

## 흰쥐에서 Aminotriazole과 Diethyldithiocarbamate가 Paraquat의 독성에 미치는 영향

차종희 · 고광삼  
조선대학교 의과대학 생화학교실

### Effects of 3-Amino-1,2,4 Triazole and Diethyldithiocarbamate on Paraquat Toxicity in Rats

Jong-Hee Cha and Kwang-Sam Koh

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chosun University  
Kwangju 501-759, Korea

**ABSTRACT** : The effects of superoxide dismutase(SOD) and catalase on the toxicity of paraquat(PQ) were studied using diethyldithiocarbamate(DDC), 3-amino-1,2,4-triazole(AT) which are inhibitors of Cu, Zn-SOD and catalase in rats. Sprague Dawley rats were divide into 6 groups: control, DDC, PQ, AT, DDC+PQ, and AT+PQ group. The PQ (50 mg/kg body weight(BW); about half dose of LD50) was administered with orally, otherwise AT(1.0 g/kg BW) and DDC(1.0 g/kg BW) were administered by intrperitoneal(IP) injection. The survival rate of rats in PQ+AT group was significantly decreased compared with PQ group while the difference of survival rate between DDC group and DDC+PQ group was not significant. The SOD activity after administration of DDC was decreased in liver, lung and kidney, but catalase activity was not changed. The catalase activity in liver, lung and kidney of AT treated rats was decreased, while SOD activity was not changed in this group. The effects of DDC and AT to the PQ toxicity was also observed in primary cultured rat skin fibroblasts. The viable cells that was measured with MTT method, was decreased in AT+PQ treated group compared to PQ treated group, but the difference of cell viability between DDC treat group and DDC+PQ treated group was not observed. This result, AT potentiate PQ toxicity while DDC were not affect, suggested that the decreased catalase activity lead to elevation of hydrogen peroxide levels and PQ toxicity may be correlate with the hydrogen peroxide rather than the superoxides.

**Key Words** : Paraquat, Aminotriazole, Diethyldithiocarbamate, Superoxide dismutase, Catalase

## I. 서 론

Paraquat(PQ)는 superoxide를 생성하는 화학물질로 알려져 있는데, Bus 등(1974)은 쥐의 간 소포체에서 PQ가 superoxide를 형성하여 과산화지질을 증가시키고 Kornbrust 등(1982)은 쥐간과 폐 소포체에서 지질과 산화를 증가시키는 것으로 보고하였고, Hassan 등(1978)은 E-coli에 대한 PQ 독성이 산소투여로 증가된다고 하여 PQ에 의한 superoxide radicals 생성 증가는 PQ 독성의 주요인으로 생각된다.

생체에는 유리기에 의한 손상으로부터 자신을 보호할 수 있는 여러 가지 방어체계 즉 superoxide dismutase

(SOD), catalase 및 peroxidase 등과 같은 항산화 효소계와 glutathione, ascorbic acid, sulfhydryl groups, uric acid, vitamins A, vitamin E 및 bilirubin 등과 같은 비효소계 항산화 물질 등이 있는데 (Proctor,1989; Halliwell과 Gurriger 등,1990), SOD는 superoxide anion( $O_2^-$ )을 과산화수소로 전환시키는 효소로서 진핵세포에는 세포질의 Cu,Zn-SOD와 과립체의 Mn-SOD, 원핵세포에서는 세포질의 Mn-SOD와 원형질막 외강(periplasmic space)의 Fe-SOD 등 여러 가지 isozymes가 알려져 있다(Fridovich, 1975a, 1989b).

SOD가 유도된 세균에 PQ를 투여하면 독성이 감소되므로 PQ 독성은 세포내 SOD 농도와 직접 관련이 있고(Hassan과 Fridovich, 1978). Phillips 등(1989)은 Cu, Zn-SOD가 돌연변이된 초파리에서 PQ에 대한 감수성

\*본 연구는 1994년 조선대학교 교내 학술연구비에 의해 연구되었음.

이 증가되며 StClair 등(1991)은 사람 Mn-SOD cDNA로 형질 전환시킨 생쥐 C3H10T 1/2 세포에서 Mn-SOD 생성을 증가시키면 PQ에 대한 감수성이 감소된다고 보고하였다. 그러나 Kelner와 Bagnell 등(1990)은 Cu,Zn-SOD 활성화와 PQ의 세포독성사이에 연관성이 없으며 Seto 등(1990)은 초파리에서 SOD 활성화증가와 PQ 독성이 연관성이 없는 것으로 보고하여 PQ 독성에 미치는 SOD의 영향에 대해서는 이견이 있다.

과산화수소는 세포의 정상적인 대사산물이며 조직에 대한 산화적 손상을 일으킬 수 있는 산소의 반응성 형태로서(Fridovich, 1975a) 과산화수소의 생성과 분해 과정은 세포손상과정에 관여하며 catalase와 peroxidase는 대표적인 과산화수소 소거 효소로 알려져 있다(Dolphin 등 1971, Jones 등 1981)

Catalase는 호기성 세포에 광범위하게 분포되어있는 효소로서 세포내에서 cytochrome과 같이 분포되어 있고 주로 소포체내에 존재하며 glutathione peroxidase(GPX)는 세포질에 있는데, 방사선조사 등과 같이 세포내 과산화수소 농도가 증가된 조건에서는 catalase의 작용이 세포의 산화적손상 방지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Meister와 Anderson, 1983).

따라서 본 실험에서는 superoxide 생성과 연관이 있는 것으로 알려진 PQ의 독성에 미치는 SOD와 catalase의 영향을 Cu,Zn-SOD 활성화 억제제인 diethyldithiocarbamate(DDC)(Kelner와 Alexander, 1986)와 catalase 활성화억제제인 3-aminotriazole(AT)(Guidet와 Shah, 1989a, 1989b)이 미치는 PQ독성에 대한 영향을 흰쥐와 섬유모세포의 생존율로서 비교 관찰하였다.

## II. 실험방법

### 1. 흰쥐생존율 측정

실험동물은 체중 130-170 g된 Sprague-Dawley종의 흰쥐 120마리를 각각 20마리씩 정상 대조군, PQ 투여군, AT 투여군, PQ+AT 병합 투여군, DDC 투여군 및 PQ+DDC 병합투여군으로 나누어 실시하였다. PQ의 투여는 PQ를 10 mg/ml 농도로 생리식염수에 용해시켜 흰쥐 체중 kg당 50 mg(50 mg/kg BW)을 1회 경구 투여하였고, PQ를 투여하지 않는 군에는 생리식염수를 동량 경구 투여하였다. AT는 100 mg/ml 농도로 생리식염수에 용해하여 흰쥐 체중 kg당 1.0g(1.0 g/kg BW)를 PQ 투여 30 분전에 복강내로 투여하였고, DDC는 100 mg/ml 농도로 생리식염수에 용해하여 흰쥐 체중 kg당 1.0 g(1.0 g/kg BW)를 PQ 투여 30 분전

에 복강내에 투여했으며, AT나 DDC를 투여하지 않는 대조군에는 동량의 생리식염수를 복강내에 주사하였다. PQ 투여흰쥐의 생존율은 PQ 투여후 1일 간격으로 14일까지 생존한 흰쥐의 수를 관찰하여 측정하였다.

### 2. 효소액 조제

시료투여 24시간 경과후에 경추 탈골에 의해 흰쥐를 희생시켜 간, 신장 및 폐를 적출하고 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 20배 용량(W/V)을 가해 균질화시켜, 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리한 상정액을 효소활성도 측정의 조효소액으로 사용하였다.

### 3. 효소활성측정

정상대조군, PQ 투여군, AT 투여군, PQ+AT 병합 투여군, DDC 투여군 및 PQ+DDC병합 투여군으로 나누었고, PQ는 흰쥐 체중 Kg 당 50 mg(50 mg/kg BW)를 경구 투여하였고, AT는 각각 체중 kg당 0.5 g, 1.0 g, 1.5 g 씩을 복강내로 주사하였으며, DDC는 체중 kg당 0.5 g, 1.0 g, 1.5 g 씩을 각각 복강내에 주사하였으며 활성도 시료는 위의 효소액조제 방법에 따라 시행하였고, catalase 활성도는 Aebi(1983)의 방법에 따라 1 분 동안에 1 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 양을 240 nm에서 측정하여 1 unit로 하였으며, SOD 활성도는 Crapo 등(1978)의 방법에 의해 xanthine+xanthine oxidase를 이용하여 cytochrome C 환원량을 측정하였고, 단백질은 Lowry등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 정량하였다.

### 4. 섬유모세포의 일차배양

흰쥐 피부 섬유모세포는 Freshney(1983)의 방법으로 일차 배양하여 실험에 이용하였다. 즉 흰쥐를 ether 흡입으로 마취시켜 70% ethanol로 전신을 소독한 후 CMF-HBSS로 3회 세척하고 피부조직을 절제하였다. 절제된 조직은 수술용칼로 잘게 잘라서 CMF-HBSS로 3회 세척하여 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml) 및 nystatin(0.25 μg/ml) 등을 함유한 EMEM에 부유시켜 falcon culture flask(T-25)에 넣고 CO<sub>2</sub> 배양기로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였고, 3일 마다 배양액을 교환해 주었다. 일차 배양된 세포는 0.25% trypsin을 처리하여 계대배양하였으며, 10회 계대배양 한 후 실험에 사용하였다.

## 5. 섬유모세포에 대한 PQ 독성 측정

섬유모세포를 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100U/ml) 및 nystatin(0.25 µg/ml) 등을 함유한 EMEM에 부유시켜  $2 \times 10^5$  세포를 falcon culture plate(6 well)에 3일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

섬유모세포 독성에 미치는 영향은 DDC, AT 및 PQ를 배양액에 첨가하여 배양한 후 생존한 세포수를 Carmichael 등(1987)의 MTT법에 의해서 측정하였다.

## 6. 실험결과의 유의성 판정

이상의 실험결과는 Student t-test에 의해서 검정하였고, P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

# III. 실험결과

## 1. AT가 PQ 투여 흰쥐 생존율에 미치는 영향

흰쥐 60마리를 각각 20마리씩 PQ 투여군, AT 투여군 및 PQ+AT 병합 투여군으로 나누어 PQ(50 mg/kg BW)를 경구투여하고, PQ 투여 1시간 경과 후 AT(1.0 g/kg BW)를 복강내에 주사하여 14일간 사육하면서 생존한 흰쥐의 수를 관찰하였다.

AT 단독 투여군은 14일까지 20마리 모두 생존했으며, PQ 단독 투여군에서는 3일째와 4일째에 각각 1마리씩 치사하여 14일까지 18마리 생존했고, AT+PQ 병

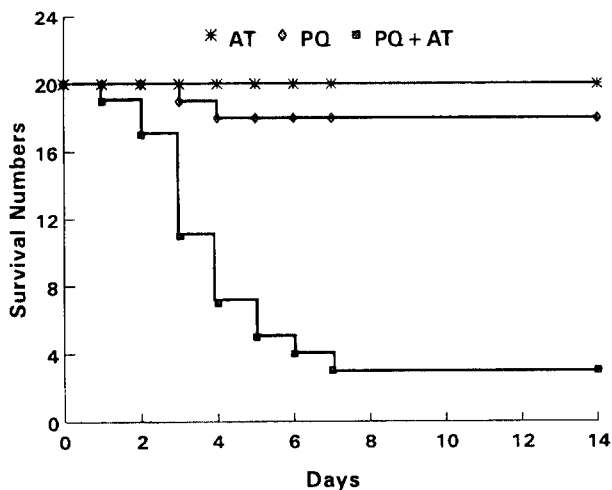


Fig. 1. Effects of AT on the survival of paraquat intoxicated rats. PQ(paraquat;50mg/kg) were administered with orally and 30 min. later, AT(3-amino-1,2,4-triazole; 1.0 g/kg) was treated by intraperitoneal injection.

합 투여군에서는 1일째 1마리, 2일째 2마리, 3일째 6마리, 4일째 4마리, 5일째 2마리, 6일째 1마리, 7일째 1마리가 각각 희생되어 14일까지 생존한 흰쥐는 모두 3마리였다. 따라서 PQ 단독 투여군에 비해서 PQ+AT 병합 투여군의 치사율이 유의하게 증가되므로 PQ에 중독된 흰쥐에 AT 투여로 PQ 독성이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

## 2. DDC 가 PQ 투여 흰쥐의 생존율에 미치는 영향

흰쥐 60마리를 각각 20마리씩 PQ 투여군, DDC 투여군 및 PQ+DDC 투여군으로 나누어 PQ(50 mg/kg BW)를 경구투여하고, PQ 투여 1시간 경과 후 DDC(1.0 g/kg BW)를 복강내에 주사하여 14일간 사육하면서 생존한 흰쥐의 수를 관찰하였다.

PQ 투여군 흰쥐는 3일째 와 4일째에 각각 1마리씩 치사하여 14일까지 18마리 생존했고, DDC 투여군에서 1일째와 2일째에 각각 6마리, 1마리가 희생되었고, 그후 14일까지 13마리 모두 생존했으며, DDC+PQ 병합 투여군에서는 1일째 6마리, 2일째 1마리, 3일째 1마리가 각각 희생되었고 그 후에는 모두 생존하여 14일까지 생존한 흰쥐는 12마리였다. 따라서 DDC 투여군과 PQ+DDC 병합 투여군 사이에 흰쥐 치사율의 유의한 변화가 없어, DDC 투여로 인한 PQ 독성에 미치는 영향은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

## 3. AT가 흰쥐 간, 신장 및 폐 catalase 활성도에 미치는 영향

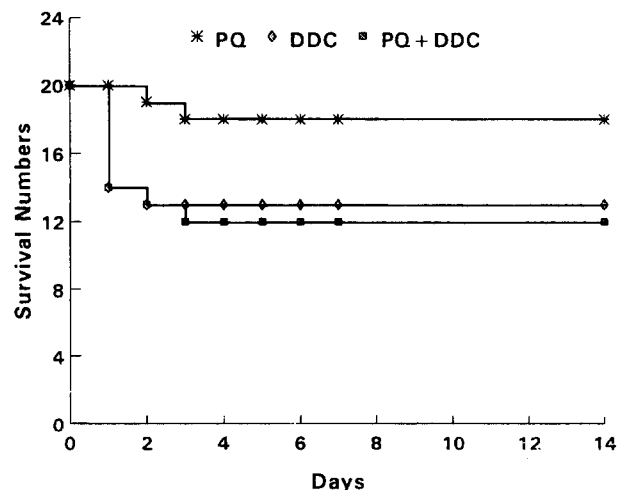


Fig. 2. Effects of DDC on the survival of paraquat intoxicated rats. PQ(50 mg/kg) was orally administered to rats 30 min prior to the intraperitoneal injection of DDC(0.5 g/kg).

**Table 1.** Effects of aminotriazole(AT) on catalase activity in various organs of rats.

Groups	Catalase activities(U/mg Protein)	
	Control	AT
Lung	6.45±1.23	4.00±1.08**
Liver	96.94±20.21	62.10±18.33*
Kidney	74.29±15.45	20.57±2.23*

AT(1.0 g/kg BW) was administered by intraperitoneal injection. 6 hours later the rats were sacrificed by cervical dislocation and catalase activity was assayed with Aebi method. Values are mean±S.D., n=5.

\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control group

흰쥐에 AT(1.0 g/kg BW)을 복강내에 주사하고 6시간 경과후 경추탈골에 의해 희생시켜 간, 폐 및 신장을 적출해 각 장기 catalase 활성을 측정된 결과, 간에서는 AT투여에 의해 정상 대조군의 효소활성도 96.94±20.21 U/mg protein에 비하여 35%가 감소한(p<0.01) 62.10±18.33 U/mg protein을 나타냈고, 폐에서는 정상 대조군의 효소활성도 6.54±1.23 U/mg protein에 비하여 AT 투여로 38%가 감소한(p<0.01) 4.00±1.08 U/mg protein을 나타냈으며, 신장에서는 정상 대조군의 효소활성도 74.29±15.45 U/mg protein에 비하여 AT 투여로 74%가 감소한(p<0.01) 19.57±2.23 U/mg protein을 나타내, 간과 폐에서 AT에 의한 catalase 활성의 감소율은 비슷하였으며, 신장에서는 간이나 폐에서보다 감소율이 더 높았다(Table 1).

#### 4. AT 농도에 따른 흰쥐 신장 catalase 및 SOD 활성도의 변화

흰쥐 15마리를 3군으로 나누어 AT를 각각 0.5 g/kg BW, 1.0 g/kg BW 및 2.0 g/kg BW 씩을 복강내에 주사하고 6시간 경과후 희생하여 신장에서 catalase 및 SOD 활성도를 측정하였다. 정상 대조군의 신장 catalase 활성도

**Table 2.** Effects of aminotriazole(AT) on catalase and SOD activity in kidney of rats.

Group	Catalase activities (U/mg Protein)	SOD activities (U/mg Protein)
Control	76.11±9.47	22.98±3.92
AT(0.5 g/kg BW)	32.61±5.45**	24.30±4.45
AT(1.0 g/kg BW)	22.61±4.65**	21.98±3.75
AT(2.0 g/kg BW)	18.67±4.68**	24.53±3.34

AT was administered by intraperitoneal injection. 6 hours later the rats were sacrificed by cervical dislocation and the activities were assayed by spectrophotometric method. Details were described in the section of materials and methods. Values are mean±S.D., n=5.

\*\*P<0.01 vs control group

는 76.11±9.47 U/mg protein 이었고, AT 0.5 g/kg BW 투여군에서는 32.61±5.45 U/mg protein, 1.0 g/kg BW 투여군에서는 22.61±4.65 U/mg, 2.0 g/kg BW 투여군에서는 18.67±4.68 U/mg protein을 각각 나타내, 정상 대조군에 비하여 0.5 g/kg BW 투여군, 1.0 g/kg BW 투여군 및 2.0 g/kg BW 투여군에서 각각 57.8%, 71.1% 및 75.0%가 감소된 활성도를 나타내서, AT 투여로 신장 catalase 활성이 유의하게 감소됨을 알 수 있다(Table 2).

SOD 활성도는 정상 대조군의 신장에서 22.98±3.92 U/mg protein 이었으며, 0.5 g/kg BW 투여군, 1.0 g/kg BW 투여군 및 2.0 g/kg BW 투여군에서 각각 24.30±4.45 U/mg protein, 21.98±3.75 U/mg protein 및 24.53±3.34 U/mg protein을 나타내, AT 투여로 인한 신장 SOD 활성의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

#### 5. DDC가 흰쥐 간, 신장 및 폐 SOD 활성도에 미치는 영향

흰쥐에 DDC(1.0 g/kg BW)를 복강내에 주사하고 6시간 경과 후 희생시켜 간, 폐 및 신장을 적출해 각 장기 SOD 활성을 측정된 결과, 간에서는 DDC 투여군에서 정상 대조군의 효소활성도 31.30±2.94 U/mg protein에 비하여 17.5%(p<0.01)가 감소한 25.88±2.24 U/mg protein을 나타냈고, 폐에서는 정상 대조군의 효소활도 21.30±1.92 U/mg protein에 비하여 21.1%(p<0.01)가 감소한 16.84±2.36 U/mg protein을 나타냈으며, 신장에서는 정상 대조군의 효소활성도 22.98±3.91 U/mg protein에 비하여 26.6%(p<0.05)가 감소한 16.83±3.35 U/mg protein을 나타내, 흰쥐에서 DDC 투여에 의해서 간, 폐 및 신장 SOD 활성이 유의하게 감소됨을 알 수 있다(Table 3).

#### 6. DDC 농도에 따른 흰쥐 신장 catalase 및 SOD 활성도의 변화

**Table 3.** Effects of diethyldithiocarbamate(DDC) on SOD activity in various organs of rats.

Group	SOD activities(U/mg Protein)	
	Control	DDC
Lung	21.30±1.92	16.84±2.36**
Liver	31.30±2.94	25.88±2.24**
Kidney	22.98±3.91	16.83±3.35*

DDC(1.0 g/kg BW) was administered by intraperitoneal injection. 6 hours later the rats were sacrificed by cervical dislocation and SOD activity was assayed by Crapo et al method. Values are mean±S.D., n=5.

\*p<0.05, \*\*P<0.01 vs control group

**Table 4.** Effects of diethyldithiocarbamate(DDC) on catalase and SOD activity in kidney of rats.

Group	Catalase activities (U/mg protein)	SOD activities (U/mg protein)
Control	76.11±9.47	22.98±3.92
DDC(0.5g/kg BW)	79.21±12.43	18.43±3.51*
DDC(1.0g/kg BW)	81.45±15.14	17.83±3.36*
DDC(2.0g/kg BW)	74.43±11.96	17.53±4.31*

DDC was administered by intraperitoneal injection and 6 hours later the were sacrificed by cervical dislocation and the activities of enzymes were assayed by spectrophotometric method. Values are mean ± S.D., n=5.

\*p<0.05 vs control group

흰쥐 15마리를 3군으로 나누어 DDC를 각각 0.5 g/kg BW, 1.0 g/kg BW 2.0 g/kg BW 씩을 복강내에 주사하고 6시간 경과후 희생시켜 신장에서 catalase 및 SOD 활성도를 측정하였다.

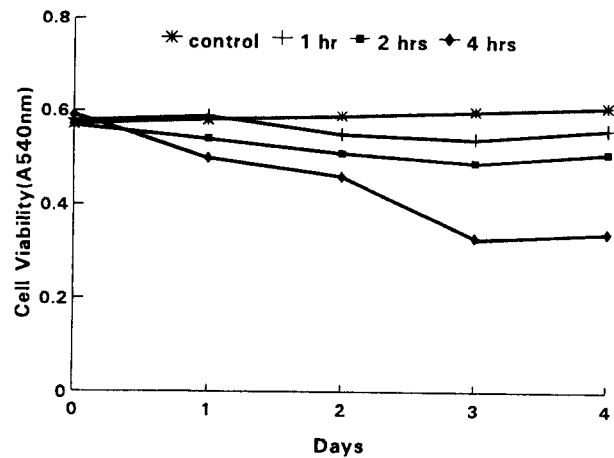
정상 대조군의 신장 catalase 활성도는 76.11±9.47 U/mg protein 이었고, DDC 0.5 g/kg BW 투여군에서는 79.21±12.34 U/mg protein, 1.0 g/kg BW 투여군에서는 81.45±15.14 U/mg, 2.0 g/kg BW 투여군에서는 74.43±11.96 U/mg protein을 각각 나타내, DDC 투여로 인한 신장 catalase 활성의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

SOD 활성도는 정상 대조군의 신장에서 22.98±3.92 U/mg protein 이었으며, DDC 0.5 g/kg BW 투여군, 1.0 g/kg BW 투여군 및 2.0 g/kg BW 투여군에서 각각 18.43±3.51 U/mg protein, 17.83±3.36 U/mg protein 및 17.53±4.31 U/mg protein을 나타내, 정상 대조군에 비하여 각각 19.6%, 22.2% 및 23.5%가 감소된 활성도를 나타내서, DDC 투여로 신장 SOD 활성이 유의하게 감소됨을 알 수 있다(Table 4).

### 7. PQ가 흰쥐 피부 섬유모세포의 생존에 미치는 영향

일차 배양한 흰쥐 피부 섬유모세포를 세포배양 용기(falcon multi well plate, 24 well)에서 3일간 배양시켜 PQ(200 µM)를 1시간, 2시간 및 4시간 동안 처리하고, 10% new born calf serum 을 함유한 EMEM 배지에 배양하면서 PQ 처리 후 1일, 2일, 3일 및 4일째에 생존한 세포를 MTT법에 따라 540 nm에서 흡광도(A540nm)를 측정 관찰하였다.

대조군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.57, 1일 후 0.58, 2일 후 0.59, 3일 후 0.60, 4일 후 0.61 이었다. PQ 1시간 처리군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.58, 1일 후 0.59, 2일 후 0.54, 3일 후 0.54, 4일 후 0.56 이었고,



**Fig. 3.** Effects of paraquat on the viability of rat skin fibroblast. Primary cultured rat skin fibroblast was treated with PQ(200M) for 1-4 hours. Viable cells were determined by MTT method. Values are mean of duplicated determinations of 4 independent cell preparations.

PQ 2시간 처리군의 A540nm은 PQ 처리 직전, 1일 후, 2일 후, 3일 후 및 4일 후에 각각 0.57, 0.54, 0.51, 0.49 및 0.50 이었으며, PQ 4시간 처리군의 A540nm은 PQ 처리 직전, 1일 후, 2일 후, 3일 후 및 4일 후에 각각 0.59, 0.50, 0.46, 0.33 및 0.34를 나타냈다. PQ 1시간 처리군과 2시간 처리군에서는 시간 경과에 따라 3일 까지 서서히 세포수가 감소되는 경향을 나타냈고, 4일째에는 세포수의 감소가 더 이상 진행되지 않았고, 4시간 처리군에서는 처리후 1일 과 2일째에는 세포수가 서서히 감소되었으나, 3일째에는 급격히 감소되어 최저치를 나타냈고, 4일째에는 세포수의 감소가 더 이상 진행되지 않았다(Fig. 3).

### 8. 백서 피부 섬유모세포에 대한 PQ의 독성에 미치는 AT의 영향

일차 배양한 백서 피부 섬유모세포( $5 \times 10^4$ )를 세포배양 용기(falcon multi well plate, 24 well)에서 3일간 배양시켜 정상 대조군, AT 군, PQ 군, PQ+AT 병합투여군으로 나누어, PQ(200 µM)는 2시간 동안 처리하고, AT는 최종농도가 20 mM이 되게 첨가하여 배양하면서 1일, 2일 및 3일째에 MTT법으로 흡광도(A540nm)를 측정하여 생존한 세포수를 관찰하였다. PQ군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.56, 1일 후 0.57, 2일 후 0.56, 3일 후 0.54 이었고, AT 군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.59, 1일 후 0.59, 2일 후 0.59, 3일 후 0.59 이었으나, PQ+AT 병합 투여군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.56, 1일 후 0.53, 2일 후 0.49, 3일 후 0.31을 나타내서 PQ 와 AT 병

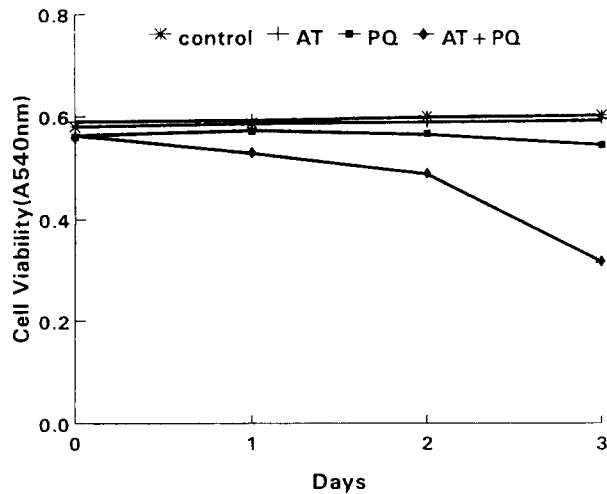


Fig. 4. Effects of aminotriazole(AT) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast were pretreated with AT for 1 hour and then treated with PQ for 4 hours. Viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations.

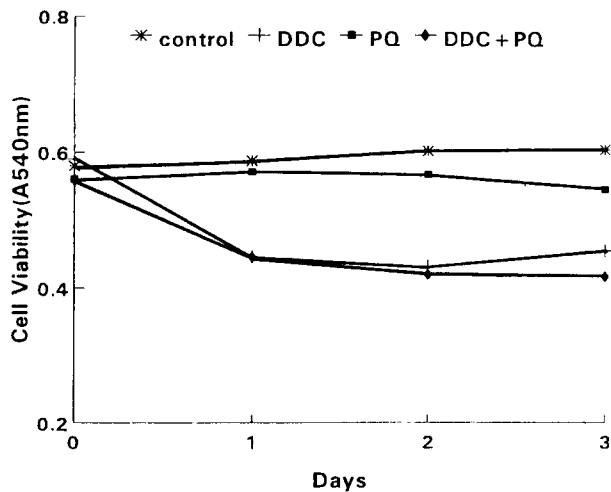


Fig. 5. Effects of diethyldithiocarbamate(DDC) on paraquat-induced cell toxicity. Primary cultured rat skin fibroblast were treated with DDC for 1 hour and then treated with PQ for 4 hours. Viable cells were determined by MTT method. Values are means of duplicated determinations of 4 independent cell preparations.

합투여로 PQ의 세포 독성이 증가됨을 알 수 있다(Fig. 4).

#### 9. 백서 피부 섬유모세포에 대한 PQ의 독성에 미치는 DDC의 영향

일차 배양한 백서 피부 섬유모세포( $5 \times 10^4$ )를 세포배양 용기(falcon multi well plate, 24 well)에서 3일간 배양시켜 정상 대조군, DDC 군, PQ 군, PQ+DDC 병합 투여군으로 나누어, PQ(200  $\mu$ M)는 2시간 동안 처리하고,

DDC는 최종농도가 20 mM이 되게 첨가하여 배양하면서 1일, 2일 및 3일째에 MTT법으로 흡광도(A540nm)를 측정하여 생존한 세포수를 관찰하였다. PQ 군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.56, 1일 후 0.57, 2일 후 0.56, 3일 후 0.54 이었고, DDC 군의 A540nm은 PQ 처리 직전에 0.59, 1일 후 0.44, 2일 후 0.43, 3일 후 0.45 이었으며, PQ+DDC 병합 투여군은 PQ 처리 직전에 0.56, 1일 후 0.44, 2일 후 0.42, 3일 후 0.41 을 나타내서, PQ와 DDC 병합투여로 인한 PQ의 세포에 대한 독성변화는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

#### IV. 고 찰

PQ radicals나 superoxide 생성은 PQ 독성의 중요한 요인으로 알려져 있으나 논란이 계속되고 있으므로, 본 연구는 PQ의 독성에 미치는 superoxide와 과산화수소의 영향을 Cu,Zn-SOD 활성 억제제인 DDC와 catalase 억제제인 AT를 이용하여 알아보았다. 흰쥐에 PQ(50 mg/kg BW)를 경구투여하고, Cu,Zn-SOD 억제제인 DDC(1.0 g/kg BW)를 복강내에 주사하여 14일간 사육하면서 생존한 흰쥐의 수를 관찰하여 DDC가 PQ 독성에 미치는 영향을 관찰한 결과, PQ 투여군은 3일째와 4일째에 각각 1마리씩 치사하였고, DDC 투여군에서 1일째와 2일째에 각각 6마리, 1마리가 희생되었으며, DDC+PQ 병합 투여군에서는 1일째 6마리, 2일째 1마리, 3일째 1마리가 각각 희생되었는데, DDC는 Cu,Zn-SOD의 Cu와 착염을 형성함으로써 효소를 불활성화 시킨다(Oberley, 1982). 따라서 DDC는 SOD isozymes 중에서 Cu,Zn-SOD를 선택적으로 억제할 목적으로 실험에 많이 이용되고 있는데, 생체내에서 Cu를 함유한 생체물질의 활성화도 동시에 억제되므로 많은 부작용이 나타난다(Oberley, 1982).

본 연구에서 DDC 투여군에서 1일 경과시에 6마리의 흰쥐가 희생된 것은 DDC의 독작용 결과로 추측되며, 3일 후부터 14일 까지 희생된 흰쥐가 없는 점으로 보아 DDC는 투여 후 1-2일 이내에 독성이 나타나는 것으로 생각된다. 그러나 흰쥐에서 PQ의 독성은 PQ 투여후 3일째에 치사율이 가장 높게 나타나므로, 본 실험에서 LD<sub>50</sub>(125 mg/kg in rat)의 약 1/2 용량인 50 mg/kg의 PQ를 경구투여하고 DDC를 주사한 흰쥐 생존율은 DDC 단독 처리군과 유의한 차이를 나타내지 않아서 DDC가 PQ의 독성에 미치는 영향은 적은 것으로 생각된다.

DDC(0.5-2.0 g/kg)를 흰쥐 복강내에 주사하고 6시간 경과 후 희생시켜 신장에서 SOD 및 catalase 활성의 변

화를 측정된 결과, 신장 SOD 활성도는 DDC 투여군에서 정상대조군에 비하여 감소된 활성도를 나타냈으나, 신장 catalase는 유의한 효소활성의 변화가 없었다. 또한 DDC(1.0 g/kg)을 흰쥐 복강내에 주사하고 6시간 경과 후 희생시켜 간, 폐 및 신장을 적출해 각 장기 SOD 활성을 측정된 결과 흰쥐의 간, 폐 및 신장 SOD 활성이 DDC에 의해서 모두 유의하게 감소되었다.

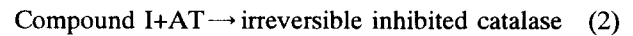
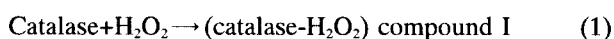
따라서 PQ의 흰쥐 치사율에 미치는 DDC의 영향이 적고, 흰쥐에 DDC 투여로 장기 SOD 활성은 억제되나 catalase 활성 변화는 없으므로 SOD 활성감소가 PQ 독성에 미치는 영향이 적은 것으로 추정된다.

한편 catalase 활성 억제제로 알려져있는 AT투여로 흰쥐 간장 catalase 활성은 35%, 폐 38%, 신장에서는 74%가 각각 감소된 효소활성을 나타내 간, 신장 및 폐에서 모두 AT에 의해서 catalase 활성이 감소됨을 알 수 있다.

PQ 독성에 미치는 catalase의 영향을 PQ를 전처치한 흰쥐에 catalase 활성 억제제인 AT를 투여하여 흰쥐의 생존율을 알고져, PQ(50 mg/kg)와 AT(1.0 g/kg)를 투여하고 14일간 사육하면서 생존한 흰쥐의 수를 관찰한 결과 PQ 단독 투여군에 비해서 PQ+AT 병합 투여군의 흰쥐 치사율이 유의하게 증가됨을 알 수 있는데, 특히 PQ에 의한 치사율이 높은 3일 및 4일째에 치사율이 현저히 증가되었다.

한편 일차 배양한 백서 섬유모세포에 대한 PQ 독성은 AT를 첨가하여 생존한 세포수가 감소되므로 AT가 PQ독성을 증가시키는 것으로 생각되며, Cu,Zn-SOD는 PQ독성에 미치는 영향이 적은 것으로 나타나서 Cha와 Yu(1994)의 실험 결과와 같은 소견이다. PQ의 독성이 미치는 Cu, Zn-SOD의 영향은 Phillips 등(1989)의 Cu, Zn-SOD 저하가 PQ에 대한 감수성을 증가시킨다는 실험결과와는 상반되며, Kelner와 Bagnell 등(1990)의 실험결과나 Seto 등(1990)의 실험결과와 유사한 소견이다. Cu,Zn-SOD는 세포질에서 superoxide를 과산화수소로 전환시키며, catalase는 과산화수소를 전자수용체로 이용하여 과산화수소를 소거하는 효소인데(Fridovich,1975a) 본 실험 결과 PQ의 독성에 미치는 DDC의 영향은 적으므로 PQ 독성은 세포질 superoxide 농도와 관련이 적은 것으로 생각된다.

AT는 catalase 활성을 비가역적으로 억제시키는데, AT의 작용은 catalase-hydrogen peroxide 복합체인 중간물질 compound I에 비가역적으로 작용하여 일어나므로, 과산화 수소가 존재할 때 AT의 효소활성 억제 작용이 나타난다(Guidet,1989a, 1989b)(반응식 1,2).



AT는 compound I(catalase+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complex)와 비가역적으로 반응하므로 catalase 활성을 억제하는데(Deisseroth와 Doune,1970), AT에 의해서 catalase 활성이 억제되면 세포내 과산화 수소의 농도가 증가되고(Guidet,1989a), 본 실험에서 도 세포 배양액에 AT 첨가로 PQ 독성이 증가되므로, SOD 활성의 감소보다 catalase 활성이 감소된 경우에 PQ의 독성이 증가되므로, 세포내 과산화수소 농도 증가는 PQ 독성과 밀접한 연관이 있는 것으로 추정된다.

## REFERENCES

- Aebi, H. (1983): Catalase, *Methods of Enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U. Bergmeyer, J. and Grahl, M), (eds). **3**, 273-286.
- Bus, J.S., Aust, S.D., and Gibson, J.E., (1974): Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 749-755.
- Carmichael, J.W., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Michell, J.B., (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Crapo, J.D., McCord, J.M., and Fridovich, I., (1978): Preparation and assay of superoxide dismutase. in *Methods in Enzymology*. (Fleischer, S. and Packer, L), (eds). (Academic Press, New York). **53**, 382-393.
- Deisseroth, A., and Dounce, A.L., (1970): Catalase physical and chemical properties mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* **50**, 319-375.
- Dolphin, D., Forman, A., Berg, D.C., Fajce, J., and Felton, R.H., (1971): Compounds I of catalase horseradish peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 614-618.
- Freshney, R.I. (1983): Disaggregation of the tissue and Primary culture, *Culture of animal cells*. (Alan R Liss Inc, New York). 104-118.
- Fridovich, I. (1975a): Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 147-159.
- Fridovich, I.(1989b): Superoxide dismutase. *J. Biol. chem.* **264**, 7761-7764.
- Guidet, B.R., and Shah, S.V., (1989a): In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am. J. Physiol.* **256**, 158-164.
- Guidet, B.R., and Shah, S.V., (1989b): Enhanced In

- vivo  $H_2O_2$  generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am. Physiol.* **257**, 440-445.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1990): Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease: Methods in Enzymology, (Fleischer, S and Packer, I), (eds). (Academic press, Inc. New York). **186**, 1-85.
- Hassan, H.M., and Fridovich, I., (1978): Superoxide radical and oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**, 8143-8148.
- Jones, D.P., Eklow, L., Thor, H., and Orrenius, S., (1981): Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated  $H_2O_2$ . *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 505-516.
- Kelner, M.J., and Alexander, N.M., (1986): Inhibition of erythrocyte superoxide by diethyldithiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalyzed glutathione depletion and methemoglobin production. *J. Biol. Chem.* **261**, 1636-1642.
- Kelner, M.J., and Bagnell, R., (1990): Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *J. Biol. Chem.* **265**, 10872-10875.
- Kornbrust, D.J., and Mavis, R.D., (1982): The effect of paraquat on microsomal lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**, 323-332.
- Lowry, C.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., and Randall, R.J., (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-277.
- Meister, A., and Anderson, M.E., (1983): Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Oberley, L.W., (1982): Superoxide dismutase and cancer, superoxide dismutase, (Oberley, L.W., ed). (CRC press, Florida). 127-165.
- Phillips, J.P., Campbell, S.D., Michard, D., Charbonneau, M., and Hilliker, A.J., (1989): Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and radical longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2761-2765.
- Proctor, P.H., (1989): Free radical and human disease, in CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine, (Miguel, J. and Quintanilha, A.T. and Weber, H.), (eds), (CRC press, Florida). **1**, 209-222.
- Seto, N.O., Hayashi, S., and Tener, G.M., (1990): Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4270-4274.
- StClair, D.K., Oberley, T.D., and Ho, Y.S., (1991): Overproduction of human Mn-Superoxide modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS Lett.* **293**, 199-203.
- 차종희, 유의경 (1994): 일차배양 백서 피부섬유아세포에서 paraquat 독성에 미치는 SOD와 catalase의 영향. 대한 화학회지. **38**, 74-79.