

[報 文]

Paraquat 유도독성에 대한 Ginkgo biloba Extract의 독성경감효과 (I)

최 병 기 · 김 영 찬*

동덕여자대학교 약학대학, *식품의약품안전청

Scavenging Effects of Ginkgo biloba Extract on Paraquat Induced Toxicity

Byung-Ki Choi and Young-Chan Kim*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University
Korea Food and *Drug Administration

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive molecules due to their unpaired electron. They have been suspected as one of the major tissue damage inducers in biological metabolic systems. Antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase, could not repair all the oxidative damages resulting from those excessive toxic ROS. It is, therefore, urgent to develop effective antioxidants to relieve from the oxidative damages. In this study antioxidative effects were investigated by using two flavonoids such as quercetin and naringenin and a flavonoid-rich extract, Ginkgo biloba extract in combination with paraquat that is known as a strong generator of oxygen radicals.

The results are summeringed as follows:

1. To assess radical scavenging ability reduction concentrations (IC_{50}) of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) within 15 minutes were measured. The values of the IC_{50} of quercetin and Ginkgo biloba extract were $15.4 \mu M$ and $13.2 \mu g/ml$, respectively. Their radical removing activities showed concentration-dependent manners.
2. In the hydrogen peroxide assay by using PMS-NADH system, quercetin, naringenin and Ginkgo biloba extract led to removing hydrogen peroxide in concentration-dependent manner whose removing abilities at $100 \mu M$ or $100 \mu g/ml$ were 75.6, 25.8 and 26.0%, respectively.
3. In the hydrogen peroxide-induced rat blood hemolysis assay all three compounds led to similar effects whose hemolysis inhibition ratios at $100 \mu M$ or $100 \mu g/ml$ were 68.0, 5.14 and 55.8%, respectively.
4. In the xanthine oxidase assay by measuring degree of NADH oxidation in the presence of hypoxanthine and xanthine oxidase, both quercetin and Ginkgo biloba extract showed excellent activities showing 42.8 and 24.2% inhibiting xanthine oxidase activity at $100 \mu M$ or $100 \mu g/ml$ concentrations, respectively.

5. In the mouse liver microsomal NADPH-dependent cytochrome p450 reductase assay, paraquat consumed NADPH in a dose-dependent manner from 0 to 1mM paraquat concentrations. When quercetin, naringenin or Ginkgo biloba extract added to this system, they blocked NADPH consumption rates at a concentration-dependent manner whose inhibition ratios of cytochrome p450 reductase at 100 μ M or 100 μ g/ml were 63.1, 52.2 and 52.2%, respectively when compared with those of the 1mM paraquat treatment.
6. Lactate dehydrogenase (LDH) is frequently used as a membrane toxicity indicator. When paraquat added to the macrophage RAW 264.7 cell live, LDH concentration was increased from 162.4 to 290.3 unit/L. When various concentration of quercetin, naringenin or Ginkgo biloba extract were added to the culture system in the presence of 1mM paraquat, they decreased LDH concentration-dependent manner, showing 182.5, 182.1 and 212.3 unit/l of LDH at 100 μ M or 100 μ g/ml treatment, respectively. However, in this case, only quercetin and Ginkgo biloba extract increased macrophage viability from 35.5 to 38.0 and 39.7% at the concentration of 100 μ M or 75 μ g/ml when measured MTT assay within 24hr, respectively.

From these results flavonoids of quercetin, naringenin and Ginkgo biloba extract exerted their antioxidant effects by removing oxygen radicals, by blocking oxygen generating enzymes. As a general, naringenin, quercetin and Ginkgo biloba extract showed the useful compounds for scavenger and antioxidant on paraquat induced toxicity.

서 론

파라콰트(paraquat), 다이콰트(diquat) 및 모르파마콰트(morfamaquat) 등은 현재 세계적으로 가장 많이 사용하고 있는 농약으로 식물의 광합성작용을 저해하며 제초작용을 나타내는 비선택적인 비피리딜(bipyridy)계의 제초제이다.¹⁾

파라콰트의 사람에 대한 치사량은 4 mg/kg이며 흰쥐에 있어서 경구 LD₅₀ 값이 120 mg/kg으로 농약으로서의 효용성은 크지만 독성이 매우 높다.²⁾ 이의 중독경로는 취급자 또는 사용자의 흡입, 피부 노출 및 섭취 등으로 외국의 경우에서도 상당한 중독사망의 사례보고^{3,4,5)}가 있으며 현재 국내에서는 전체 사용량이 20,000톤(농약연보, 1998) 이상에 이르며 이에 부수하여 농번기에는 사용량의 증대로 인한 중독환자 및 사망 예가 상당수 보고되고 있는 실정이다.

파라콰트 등의 임상적 소견으로는 국소자극작용에 의한 위장관 장애(구토, 설사, 식도 및 위장관염증) 등이 나타나며 뒤이어 간장해(황달, 빌리루빈혈증, 간효소의 혈액내 유출 등) 및 신장해(요 배설량 감소, BUN 상승, 신부전) 등이 나타나고 최

후에는 농도 및 시간 의존적으로 폐조직에 축적하여 폐장해가 나타나 호흡억제 및 신부전 등에 의해 사망하게 된다.^{6,7)}

파라콰트 등의 생화학적 독성기전에 대해서는 많은 연구가 되어 있지만 일반적으로 생체내에서 NADPH 의존성 cytochrome P450 reductase 및 xanthine oxidase와 관련된 redox cycle에 의해 생성된 radical이 분자상 산소와 반응하여 활성산소인 superoxideanion 및 hydroxy radical이 생성되고 이로 인한 세포막지질의 과산화를 일으킴으로써 세포막 손상, 단백질의 불활성화, DNA의 손상 및 NADPH의 수소탈리에 의한 지방산 생합성의 저해를 일으키는 것이 독성기전으로 받아들여지고 있다. 또한 이 과정에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species)이 세포내 NADPH를 감소시켜 간접적으로 GSH level을 떨어뜨린 지질과산화물 축진시킴은 물론 생체의 항산화 방어기전을 약화시키는 것도 한 원인이 된다.^{5,8,9)}

또한 파라콰트 등은 폐에 존재하는 alveolar macrophage를 자극하여 neutrophil chemotactic factor를 방출하게 하여 염증을 유도하고 폐조직내의 fibroblast를 자극하여 fibronectin 및 collagen의 생합성을 촉진하고 growth factor를 분비하여

폐섬유화를 일으키게 한다.

현재 파라콰트 등의 중독을 효과적으로 경감 및 치료할 수 있는 해독제나 치료제는 없는 상태이다. 일반적으로 임상적으로 빈용되고 있는 치료법과 치료제로는 위장관내의 파라콰트 등을 흡착제거하기 위한 Fuller's earth, 벤토나이트 및 활성탄의 투여와 전신적으로 흡수된 것을 제거하기 위한 haemoperfusion 및 haemodialysis법과 함께 강제 이뇨를 시키기 위해 이뇨제를 투여하는 것 등이다.^{10,11,12)} 약물로서는 코르티코스테로이드 등의 항염증제, 면역억제제, 항산화성 비타민제 및 SOD 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소가 사용된다.^{13,14)}

그러나 현재까지의 연구개발 및 응용수준은 임상에서 파라콰트 등의 독성을 효과적으로 치료하거나 억제하는 치료제 개념의 해독제 개발은 이루어져 있지 않다. 이는 첫째 파라콰트 등의 폐, 신장 및 간장 독성에 관한 생화학적 파라미터와 접근수단이 확립되지 않았다는 점, 둘째 이제까지 사용한 약물은 주로 생체내에 존재하는 항산화성 성분으로 체내 모든 조직에서 이용됨으로써 파라콰트 등의 주요 독성 발현 장기인 폐에 대한 고용량 투여에 의해서도 폐중 약물분포량이 낮다는 점, 셋째 투여 약물들의 체내 반감기가 짧고 산화효소에 의해 산화되기 쉽다는 점, 넷째 항산화 및 항염증 효과의 양면성을 구비하지 못했다는 점 등에 기인한다.

이상과 같이 파라콰트 등의 중독에 대한 새로운 독성 경감제, 해독제 또는 치료제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 체내 대사속도가 늦어 폐를 비롯한 신장 및 간장에 분포량이 높고 소량 투여에 의해서도 항산화 및 항염증작용을 동시에 가지고 있는 약물을 개발하는 것이 독성 경감제 개발에 접경이 된다고 하겠다.

이러한 의미에서 본 연구자는 최근 은행잎 추출물 및 관련 플라보노이드류의 항산화 및 항염증작용을 검토한 결과 탁월한 효과가 있음을 확인한 바 있다. 은행잎 추출물은 이미 혈류축진 및 심혈관 질환에 사용되고 있어 안전성이 확립되어 있는 약물이다. 따라서 본 연구에서는 제조효과는 강력하나 독성이 큰 농약 비피리딜계 제초제인 파라콰트에 대한 은행잎 엑스의 독성 경감 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험 동물 및 사육 환경

실험동물은 식품의약품안전청 독성연구소에서 분양 받은 체중 200~300g의 Wistar계 흰쥐, 체중 25~30g의 숫컷 ICR계 마우스를 사용하였다. 시험기간 중 온도는 21~25°C, 습도는 40~70%, 12시간 조명등의 사육환경을 유지하였으며 사료와 음료는 자유로이 섭취시켰다.

2) 시료 및 시약

Naringenin과 quercetin은 Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입 했으며 Ginkgo biloba ext. (은행잎 추출물)는 선경제약에서 원료 표준품을 제공 받았다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH), phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nicotinamide daenine dinucleotide phosphate (NADPH), hypoxanthine, xanthine oxidase (XOD), Dulbecco's phosphate buffer saline, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), lipopolysaccharide (LPS), horseradish peroxide, alloxan monohydrate, o-phthaldialdehyde, egg white albumin (EWA), sodium heparine, dimethyl sulfoxide (DMSO), lactate dehydrogenase (LDH), 4-aminoantipyrine, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, tryphan blue, lactate dehydrogenase (LDH) assay kit, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl formaldehyde (DMF)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 실험 방법

1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazine(DPPH) radical 의 제거능 측정

DPPH의 메탄올 용액 (1.5×10^{-4} M) 0.95 ml에 DMSO에 일정농도로 용해시킨 시료 용액 0.05 ml를 가하고 격렬하게 진탕하여 실온에서 15분간 방치한 후 메탄올로 희석하여 전량 5 ml로 만든 후

520 nm에서 흡광도 감소율을 측정하였다. IC₅₀ (50 % scavenging concentration of DPPH radical, μm)는 DPPH의 잔류량(%) 및 공시험 DPPH의 양(100%)에서 구하였다.

2) PMS-NADH계에서 발생된 H₂O₂ 측정

Minotti 등¹⁵⁾의 방법을 응용하여 H₂O₂를 측정하였다. 0.1 mM 인산 완충 생리식염액 (pH 7.5)에 7.5 mM NADH 수용액 0.2 ml, 정제수 1.2 ml, 시료 DMSO용액 30 μl 및 1.6 mM phenazine methosulfate (PMS) 수용액 0.1 ml를 가하여 진탕 혼합한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 다음에 20 mM EDTA 0.2 ml, 50 mM phenol 수용액 0.3 ml, 10 mM, 4-aminoantipyrine 수용액 0.3 ml 및 40 units/ml horseradish peroxidase 수용액 0.2 ml를 가하여 진탕한 후에 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로 H₂O₂ 표준액을 사용하여 검량선을 작성하여 H₂O₂의 양을 구하였다.

3) H₂O₂ 유도 용혈 측정

Otomo 등¹⁶⁾의 개량법에 의해 측정하였다. 흰쥐의 적혈구 (2×10^8 cell)를 함유한 Dulbecco의 인산 완충 생리식염수 (Dulbecco' PBS, pH 7.2), 146 mM H₂O₂, DMF에 용해한 시료용액 (DMF의 최종 농도 0.2%)을 포함한 반응액 2 ml를 37°C에서 서서히 30분간 incubation시킨 다음 빙수 중에서 반응을 정지시킨 후 1,700 \times g에서 30분간 원심 분리하여 540 nm에서 상징액의 흡광도를 측정하였다.

4) Hypoxanthine-Xanthine Oxidase 계에서

Xanthine Oxidase 및 Superoxide Anion 측정

Oyanagui 등¹⁷⁾의 개량법에 의해 측정하였다. 측정용 반응액은 125 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), DMF (dimethyl formaldehyde)에 용해한 시료용액, 0.08 mM EDTA, 20 IU/ml lactate dehydrogenase, 0.32 mM NADH, 40 μM hypoxanthine, 0.05 IU/ml xanthine oxidase를 포함한 액 3 ml를 사용하였다. 측정의 시작은 0.32 mM NADH를 첨가하여 37°C에서 10분간 340 nm에서 NADH의 흡광도 감소를 측정하였다.

5) NADPH 의존성 Cytochrome p450 reductase의 측정

ICR계 마우스를 에틸로 마취시킨 후 0.15 M KCl로 간을 관류하고 분획원심분리법에 의해 분리

하여 얻은 간의 microsome을 0.15 M KCl에 재현탁하여 사용하였다. 단백질량은 Lowry법에 의해 측정하였다. 1 mg protein/ml microsome 1.0 ml에 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 0.4 ml, 50 mM paraquat 용액 30 μl , 시료용액 각각 30 μl 를 가해 진탕혼합한 후에 37°C에서 10분간 incubation하였다. 다음에 5 mM NADH 용액 0.1 ml를 가하고 진탕하여 최종 3 ml로 조절한 다음 340 nm에서의 흡광도를 1분마다 10분간 측정하였다. 대조에는 동일한 완충액을 사용하였다. NADPH의 분자흡광계수 ($6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 흡광도로부터 NADPH 양을 산출하고 효소 저해율은 다음 공식에 의해 구하였다.

$$\text{효소저해율(\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

C₁ : 시료를 첨가하지 않을 때의 NADPH 소비량

C₂ : 시료를 첨가할 때의 NADPH 소비량

6) 항혈당 작용의 측정

체중 23~33 g의 ICR계 마우스를 사용하였다. 동물들은 alloxan 투여 3~4시간 전부터 절식을 시킨 후 alloxan (50 mg/kg) 0.2 ml를 꼬리 정맥을 통하여 투여했다. 전 처치할 시료는 20% DMSO의 생리식염수에 녹인 후 alloxan 투여 24시간 후 hexokinase법에 의해 측정하였다.

7) 세포 독성의 측정

(1) Lactate dehydrogenase (LDH)의 측정

Paraquat를 처치한 RAW 264.7 대식세포의 세포막 integrity에 대한 시료의 영향을 평가하기 위해 LDH 유리 정도를 측정하였다. 대식세포 2×10^6 개를 24 well plate에 2시간 동안 부착시킨 후 paraquat와 여러 농도의 시료를 처치하였다 37°C, 5% CO₂ 중에서 24시간 동안 incubation시킨 후 배양액 중에 유리된 LDH의 양을 측정하였다.

(2) 대식 세포 생존율 측정

① 세포 : RAW 264.7 cell은 10% FBS, 100 U/ml 페니실린, 0.1% 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에서 계대배양시킨 후, 1×10^6 cells/ml로 96-well plate에 분주한 다음 2시간 동안 부착시켰다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 중에서 배양했다.

② 세포의 생존율 측정 : MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide) 환원법¹⁸⁾에 의해 측정하였다. 측정은 590 nm에서 ELISA reader로 측정했으며 MTT의 환원정도는 대조시료에 대해 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH radical 제거 효과

Ginkgo biloba ext. 및 flavonoids가 radical scavenger로서 효과가 있는지 여부를 검사하기 위해 안정한 DPPH radical제인 DPPH에 대해 상기의 시료 물질을 첨가에 따른 DPPH의 50% 감소율(IC₅₀)의 측정 결과를 나타내었다 (Table 1). 본 실험 결과 DPPH radical에 대해 Ginkgo biloba ext.는 13.2 µg/ml, quercetin은 15.4 µM의 농도에서 50% reical 소거 효과를 나타내었으나 naringenin에서는 효과를 나타내지 않았다. Ginkgo biloba ext.와 quercetin의 이러한 효과는 농도의 의존적인 경향을 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Radical scavenging effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on DPPH radical

Samples	IC ₅₀ ^{a)}
Quercetin	15.4 ± 2.9 (µM)
Naringenin	- ^{b)}
Ginkgo biloba ext.	13.2 ± 2.5 (µg/ml)

a) Concentration required for 50% reduction of DPPH after 15 min. The mixture contained DPPH methanolic solution and samples dissolved in DMSO. After 15 min, the absorbance of mixture was measured at 580 nm.
 b) inactivated

2. PMS-NADH계 H₂O₂의 생성억제작용 및 항산화 효과

H₂O₂에 대한 소거 작용을 살펴보기 위해 PMS-NADH 계에서 발생하는 H₂O₂를 정량한 후, Ginkgo biloba ext. 및 flavonoids를 넣었을 때 H₂O₂의 생성억제작용과 항산화 효과와 비교하여 그 결과를 Table 2에 제시하였다. H₂O₂에 대한 생성억제작용 및 항산화 효과를 살펴본 결과 Ginkgo biloba ext.와 quercetin 및 naringenin은 모두 농도 의존적으로 quercetin > Ginkgo biloba ext. =

Table 2. Antioxidative effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on production of H₂O₂ in PMS-NADH system

Samples	Conc.	Inhibition (%) ^{a)}
Quercetin	2(µM)	4.6 ± 5.0
	10	48.6 ± 5.1
	50	58.1 ± 4.5
	100	75.6 ± 6.8
Naringenin	2(µM)	8.2 ± 2.4
	10	12.7 ± 3.5
	50	17.9 ± 2.6
	100	25.8 ± 5.2
Ginkgo biloba ext.	2(µg/ml)	0.5 ± 2.2
	10	11.0 ± 3.5
	50	16.8 ± 4.5
	100	26.0 ± 7.9
	200	61.2 ± 8.9

Reaction mixture contained PMS (1.6 mM), NADH (7.5 mM), simple in DMSO and phosphate butter (0.1 mM, pH 7.5) at 37°C for 10 min.

a) Mean ± S. D., value (n=3).

naingenin 순으로 억제 효과를 나타내었으며 Ginkgo biloba ext.는 185 ± 9.5 µg/ml, quercetin은 11.9 ± 3.7 µM에서, naringenin은 189 ± 10.5 µM에서 각각 IC₅₀를 나타내었다 (Table 2).

H₂O₂는 기타 free radical과 달리 매우 안정하여 catalase, peroxidase에 의한 분해외에는 감소하지 않는다. 식포 과정이 일어나고 있는 경우에는 식포 내에 superoxide anion이 다량 생성하며 불안정하기 때문에 곧 H₂O₂로 변환된다. 생성된 H₂O₂는 superoxide anion과 반응하여 반응성이 높은 OH radical을 생성하여 세포막을 lipid-peroxidation하며 손상시킨다. 이런 의미에서 Ginkgo biloba ext.의 H₂O₂에 대한 생성억제, 소거 및 항산화 작용은 paraquat의 독성 경감에 중요한 단서를 제공한다고 사료된다.

3. 용혈 억제 효과

Ginkgo biloba ext. 및 flavonoids의 항산화 및 용혈 억제 작용을 평가하기 위해 free radical에 의한 세포 손상에 대한 억제 효과를 시험하여 그 결과를 나타내었다 (Table 3).

시료의 H₂O₂의 적혈구막 과산화와 그에 따른 용혈 작용에 대한 직접적 소거 작용 또는 과산화 지질

Table 3. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on H₂O₂-induced hemolysis

Samples	Conc.	Inhibition(%) ^{a)}
Quercetin	1(μM)	22.3±6.4
	10	52.0±2.6
	100	68.0±4.6
Naringenin	1(μM)	23.1±5.7
	10	41.7±5.3
	100	51.4±4.3
Ginkgo biloba ext.	1000	-8.9±3.5
	1(μg/ml)	29.7±6.8
	10	33.6±2.6
	100	55.8±2.5
	1000	-10.4±4.2

Erythrocytes were treated with samples at different concentrations with H₂O₂ (146 mM).

The percentage of inhibition was calculated from total hemolysis by H₂O₂.

(a) Mean±S.D., value (n=3)

에 대한 항산화 작용을 검토한 결과 Ginkgo biloba ext.는 1~100 μg/ml naringenin과 quercetin은 1~100 μM 농도 범위에서 농도 의존적인 효과를 나타내었다. 그러나 Ginkgo biloba ext.와 naringenin은 각각 1000 μg/ml 및 1000 μM 농도를 기점으로 하여 용혈을 촉진하는 경향을 나타내었는데 이것은 고농도일 때 이들 시료 자체의 세포막에 대한 독성 때문이라고 생각된다.

4. Xanthine Oxidase에 대한 활성의 억제 효과

Hypoxanthine-xanthine oxidase계에서 시료의 첨가에 따른 xanthine oxidase 활성 억제 효과 및 superoxide anion의 생성 억제 작용을 비교하여 그 결과를 나타내었다 (Table 4).

Xanthine oxidase (XOD)가 매개한 superoxide anion 생성에 대하여 시료의 XOD 활성 억제 또는 superoxide anion에 대한 항산화 효과를 검토한 결과 Ginkgo biloba ext.는 1~1000 μg/ml 및 quercetin은 1~100 μM의 농도 범위내에서 각각 농도 의존적으로 XOD 억제 및 superoxide anion의 생성억제 작용을 나타내었다. 그러나 naringenin은 별 영향을 주지 않았다.

Superoxide anion은 호중구와 호산구 그리고 대식세포와 단구와 같은 세포에서 많이 생성되는데 이러한 세포의 세포막 분획에서 superoxide anion을 생성하여 세포막 외로 분비한다. 본 실험에서는 su-

Table 4. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on the activity of xanthine oxidase

Samples	Conc.	Inhibition(%) ^{a)}
Quercetin	1(μM)	1.4±0.4
	10	33.8±7.8
	100	42.8±7.1
Naringenin	1(μM)	1.4±0.7
	10	9.2±2.9
	100	6.8±1.3
Ginkgo biloba ext.	1(μg/ml)	8.0±1.7
	10	19.3±5.8
	100	24.2±2.7
	1000	40.2±8.5

Reaction mixture contained sodium phosphate buffer (125 mM, pH 6.5), EDTA (0.08 mM), LDH (20 IU/ml) and NADH (0.32 mM). Incubation was started by the addition of NADH at 37°C. XOD (0.05 IU/ml) and hypoxanthine (0.04 mM) were mixed just prior to NADH addition.

a) Mean±S.D., value (n=3).

peroxide anion의 공급원으로서 xanthine oxidase가 사용되었는데 xanthine oxidase는 활성산소종이 매개된 여러 질환에서 중요한 역할을 한다. Xanthine oxidase는 포유 동물의 조직에 폭넓게 분포해 있는 효소로서 분자 산소 존재하에서 전자를 받아서 hypoxanthine을 xanthine 그리고 나서 uric acid로 전환시키고 superoxide anion도 함께 발생시킨다.

Paraquat는 환원된 xanthine oxidase로부터 전자를 받아서 paraquat radical이 되어 활성 산소종을 생성하는 반응을 매개하여 세포막의 지질 과산화 반응을 유발하는데 이것은 xanthine oxidase가 풍부한 기관인 소장, 췌장, 폐, 간에서 paraquat 독성이 크게 나타나는 원인이 된다.

5. NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase의 저해 효과

NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase에 대한 시료의 효소 활성 저해와 지질 과산화에 대한 항산화 효과를 평가하기 위해 마우스 간의 microsome을 사용하여 paraquat의 NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase에 대한 영향과 시료의 효소 저해 작용을 검토하고 그 결과를 나타내었다 (Table 5).

Table 5. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on NADPH dependent cytochrome p450 reductase in liver microsome

Samples	Conc.	Consumption rate of NADPH (nmol/min/mg protein)	Inhibition of Cyt p450 reductase(%)
control		0.88±0.10	
PQ	0.1(μM)	1.22±0.09	
	0.5	1.62±0.11	
	1	2.55±0.07	
Quercetin	10(μM)	1.34±0.08	47.5
	50	1.27±0.10	50.2
	100	0.94±0.09	63.1
Naringenin	10(μM)	1.97±0.08	22.7
	50	1.50±0.11	41.2
	100	1.22±0.09	52.2
Ginkgo biloba ext.	10(μg/ml)	2.56±0.12	...a)
	50	1.94±0.07	23.9
	100	1.22±0.08	52.2

The mixture containing liver microsomal protein (1mg), paraquat (1mM) and NADPH (0.1mM) was incubated in Tris-HCl butter (50mM, pH 7.5) at 30°C for 10 min and the absorbance was measured at 340 nm.

a) not inhibited

NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase는 redox cycle 대사를 통한 superoxide anion을 생성하여 세포막 지질에 과산화물을 일으켜 세포손상을 초래하는 paraquat의 독성 기전에 관계하는 효소이다. NADPH는 NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase의 작용에 의하여 소비되므로 효소 활성은 반응 개시 후 10분간의 NADPH의 흡수 극대인 340 nm에서 흡광도의 경시 변화를 측정하여 1분 당의 NADPH 소비량 (nmol/min/mg protein)으로 표시하였고 시료 미첨가시와 첨가시의 NADPH 소비량에 대한 백분율 (%)로 표시하였다. 간 microsome의 NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase에 대한 paraquat의 영향을 검토한 결과 paraquat 자체가 농도 의존적으로 효소에 대한 활성을 증가시켰다.

Paraquat의 이러한 효소 활성 작용에 대하여 시료는 paraquat 1mM 첨가 시의 NADPH 소비량 2.55 nmol/min/mg protein에 대해 농도 의존적으로 저해 작용을 나타내었는데 Ginkgo biloba ext.는 10~100 μg 농도에서 2.56~1.22 nmol/min/mg protein의 저해 작용을 나타내었다. Quercetin은 10~100 μM 농도에서 1.34~0.94 nmol/min/mg protein 및 naringenin은 10~100 μM 농도에서 1.97~1.22 nmol/min/mg protein의 저해 작용

을 나타내었다. 본 실험에서 사용한 시료가 paraquat의 독성기전 관련효소를 저해하는 것으로 보아서 독성 경감제로서 가능성을 시준하였다.

6. 알록산 유도 혈당 상승의 억제 효과

Ginkgo biloba ext. 및 flavonoids의 in vivo 항산화 효과를 살펴보기 위해 알록산으로 유도된 혈당 상승에 대한 시료의 효과를 검토하여 그 결과를 나타내었다(Table 6). 알록산을 투여하면 알록산의 대사과정 중에 생성된 활성 산소종에 의해 췌장 β-세포가 파괴어 혈당상승이 유도된다.^{19,20,21)}

실험결과, 24시간 절식한 마우스의 꼬리정맥으로 50 mg/kg씩 투여된 alloxan은 24시간 후 유의할만한 수준으로 혈당을 상승시켰다. 이것에 대해 시료를 40 mg/kg씩 전처리했을 때 alloxan에 의한 혈당 상승은 유의할만한 수준으로 감소하였다. 마우스의 정상적인 혈당치는 82±12 mg/100 ml (혈당 측정 때까지 48시간 절식)였으며 alloxan을 투여했을 때는 178±15 mg/100 ml까지 상승하였다. 한편, paraquat를 단독으로 투여한 후 혈당을 측정해 본 결과 정상군에 비하여 유의하게 변하지 않았다. 그러나 알록산과 동시에 투여하였을 때에는 알록산 단독 투여 군보다 22% 상승하였다. 알록산과 paraquat에 의한 이런 혈당 상승 작용에 대하여 시료를

Table 6. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on blood glucose levels

Samples	Blood glucose (mg/100ml) ^(a)
Control	82±12
ALX	175±15*
ALX+PQ	228±35*
Quercetin+ALX+PQ	104±12**
Naringenin+ALX+PQ	88±16**
Ginkgo biloba ext.+ALX+PQ	111±37**

Animals were pretreated with samples (p.o., 40 mg/kg) 1 hr before alloxan (i.v., 50 mg/kg) administration. Control animals were treated with the saline containing DMSO>

(a) Mean ± S.D. value (n=5)

ALX : alloxan, PQ : paraquat

* Significantly different from the control at P<0.05

** Significantly different from the ALX+PQ group at P<0.05

전처리했을 때, alloxan 투여군에 비하여 naringenin을 전처리한 군은 88±16 mg/100 ml로, quercetin은 104±12 mg/100 ml로, Ginkgo biloba ext.는 111±37 mg/100 ml로 혈당치를 감소시켰다. 결과로부터 paraquat는 xanthine oxidase가 풍부한 채장에서 xanthine oxidase로부터 전자를 받아들여 paraquat radical이 된 후 활성 산소종 생성 반응을 개시하는데 paraquat 단독으로 채장에서 급성 독성을 유발하지 않지만 알록산과 함께 투여하였을 때는 상승 작용에 의해 활성 산소종이 급격히 생성되어 채장 β-세포가 파괴되고 혈당이 급격히 상승하는 것으로 보인다.

이상과 같이 alloxan의 대사과정 동안 생성된 활성 산소종에 의해 유발되는 고혈당에 대하여 Ginkgo biloba ext. 및 flavonoids가 혈당 상승 억제 효과를 나타내는 것은 in vivo에서 알록산과 paraquat에 의해 생성된 활성 산소종에 대하여 소거 작용과 항산화 효과를 가지고 있음을 나타낸다.

7. Paraquat에 의한 대식세포 독성 경감 효과

Paraquat에 의해 유도된 세포 독성에 대한 시료의 경감 효과를 검토하기 위해 LDH 유리 정도와 MTT에 의한 세포 생존율을 측정하여 그 결과를 나타내었다 (Table 7, Table 8). LDH는 대식세포의 세포막에 대한 독성 측정이 지표로 흔히 사용된다.^{22, 23)} 따라서 세포를 paraquat (1 ml)와 함께

배양시킨 후 세포로부터 유리되는 LDH를 세포 독성의 지표로 이용하였다. 1 mM의 paraquat에 24 시간 노출시켰을 때 LDH 유리량이 정상 세포보다 78.7% 증가하였으며, paraquat와 시료를 함께 처리한 세포의 LDH 유리량은 농도 의존적으로 감소하였다. MTT 환원법으로 세포생존율을 측정된 결과 12시간에서 정상 세포보다 더 분화하였다가 24 시간에서는 정상 세포보다 생존율이 감소하였다.

대식세포가 활성화되면 활성 산소종을 생성하여 1차적인 면역 기능을 수행하지만 활성 산소종의 생성이 지나치게 되면 대식세포의 치사를 가져오게 되는데, paraquat 자체가 배지내에서 활성 산소종을 생성할 수 있는 redox cycle을 촉진시키거나 대식세포를 활성화시켜 활성 산소종의 생성을 극대화시키고 세포 분화를 촉진시킨 다음 시간이 경과하면서 과도하게 생성된 활성 산소종이 세포막을 공격하여 LDH의 유리를 일으키며 궁극적으로는 세포 치사를 가져오는 것으로 추측된다. Paraquat (1 mM) 단독으로는 12시간 동안 대식세포를 활성화시키지만 박

Table 7. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on the release of lactate dehydrogenase from RAW 264.7 cells cultured with paraquat (1 mM)

Samples	(μ M)	LDH ^(a) (unit/L)
Control		162.4±4.5
PQ		290.3±4.2*
Quercetin+PQ	12.5(μ M)	282.7±17.3
	25	239.7±12.7**
	50	199.2±11.4**
	100	182.1±14.6**
Ginkgo biloba ext.	25(μ g/ml)	243.0±8.2
+PQ	50	222.8±5.8**
	100	212.3±17.3**
	200	209.3±13.5**

RAW 264.7 cells (1×10^6 cell/ml) in 2 ml of DMEM were incubated for 2 hr to allow cell adherence and paraquat, and/or various concentrations of samples were added to the cultures. Incubation was performed at 37°C under an incubator of 5% CO₂ and 95% O₂ for 24h. Media were collected from the cultures and assayed for lactate dehydrogenase (LDH) activity. LDH release of control was 162.4±4.5.

(a) Mean±S.D. value (n=3)

* Significantly different from the control at P<0.05

** Significantly different from the PQ group at P<0.05

Table 8. Inhibitory effects of Ginkgo biloba ext. and flavonoids on the release of lactate dehydrogenase from RAW 264.7 cells cultrued with paraquat (1mM)

Samples	Conc.	Viability(%)	
		12hr	12hr
Control	100	100	
PQ		109.23±2.77	83.17±1.55
LPS		101.23±4.14	87.33±2.33
PQ+LPS		82.57±3.87	35.52±1.55
Quercetin	10(μM)	92.33±2.49*	35.37±2.72
+PQ+LPS	50	96.65±4.99*	37.16±1.55
	100	101.23±3.31*	38.09±3.50
	120	104.37±6.08*	38.13±3.11
Naringenin	10(μM)	86.05±2.21	28.56±1.99
+PQ+LPS	50	88.13±2.49	20.56±2.31
	75	88.29±5.52	39.72±7.33
	125	92.74±6.35*	
Ginkgo biloba ext.	25(μg/ml)	85.20±3.31	36.07±4.33
+PQ+LPS	25	86.22±5.54	7.12±4.33
	75	88.29±5.52	39.72±7.33
	125	92.74±6.35*	

RAW 264.7 cells (1×10⁶ cell/ml) in 2ml of DMEM were incubated for 2hr to allow cell adherence and paraquat, and/or various concentrations of samples were added to the cultures. Incubation was performed at 37°C under an incubator of 5% CO₂ and 95% O₂ for 24h. The viability of the control was expressed as 100%.

(a) Mean ± S.D. value (n=3)

* Significantly different from the PQ+LPS group at p<0.05

테리아의 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)와 함께 배양시키면 세포의 생존율은 정상세포보다 감소한다. LPS는 다양한 조직에서 활성 산소종의 생성을 매개하여 지질 과산화물을 생성하며, 대식 세포와 반응하여 H₂O₂, O₂⁻, HO, ¹O₂를 생성한다고 보고되어져 있다.^{24, 25)}

따라서 대식 세포를 paraquat, LPS와 함께 배양하면 12시간에 활성 산소종으로 인하여 세포 독성이 나타나는 것이다. 한편 시료를 paraquat와 함께 처치하면 24시간에 LDH의 유리가 감소하였는데 이러한 효과는 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 그리고 paraquat와 시료를 동시에 투여한 군에 시료를 처치하였을 때의 생존율도 naringenin을 제외한 나머지 시료가 모두 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 이러한 효과는 배양 24시간보다 배양 12시간에 더욱 뚜렷이 나타났다.

결 론

활성 산소종 (reactive oxygen radical; ROS)의 원인으로 발생한 세포 독성과 염증에 대하여 은행잎

엑스(Ginkgo biloba ext.)를 대상으로 하여서 in vivo 및 in vivo 실험을 통한 항산화 효과를 생화학적 접근에 의해 규명하여 활성 산소에 의해 조직을 손상시키는 대표적 물질인 paraquat 독성에 대하여 경감 효과를 검토하였다.

1. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin은 각각 15.4 μM, 13.2 μg/ml의 농도에서 DPPH radical의 50% 제거 효과를 나타내었다.

2. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 H₂O₂ 생성의 억제 및 항산화 효과를 나타내었으며 IC₅₀는 각각 44 μM, 350 μM 및 390 μg/ml 이었다.

3. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 H₂O₂ 유도 용혈을 억제하였으며 IC₅₀는 7.8 μM, 92 μM 및 82 μg/ml이었다.

4. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin은 xanthine oxidase 활성 억제 및 항산화 효과를 나타내었으며 IC₅₀는 240 μM 및 1150 μM이었다.

5. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 간 microsome의 NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase 활성을 농도 의존적으로

저해하는 효과를 나타내었다.

6. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 alloxan 유도 혈당 상승에 대한 항혈당 효과를 나타내었으며 paraquat 단독으로는 혈당상승 작용을 나타내지 않았지만 alloxan과 함께 병용 투여시에는 상승작용을 나타내었다.

7. Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 paraquat에 의한 대식세포로부터 LDH 유리를 억제시켰으며 대식 세포의 치사율을 감소시켰다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 Ginkgo biloba ext. 및 quercetin, naringenin은 in vitro, in vivo에서의 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 또한 이들 물질은 대사과정 중 생성된 활성 산소종에 의한 paraquat의 세포 독성을 경감시키는 점으로 보아 paraquat의 독성 경감제 개발에 유용하리라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Grossel, T.A. and Bricker, J.D., Principles of Clinical Toxicology, 2nd ed., Raven Press, 143-146(1990)
- Hartli, J.B., Grinspan, S. and Root, R.K., Paraquat suicide in a young women-Results of therapy directed against the superoxide radical. *Yale J. Biol. Med.*, **50**, 481-488(1977)
- Dreibach, R.H. and Robertson, W.O., Handbook of Poisoning, 12th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, California (1982)
- Bismuth, C., Schereman, J.M., et al., Elimination of paraquat. *Hum. Toxicol.*, **6**, 63-38 (1987)
- Rose, M.S., Smith, L.L., and Wyatt, I., Evidence for the energy-dependent accumulation of paraquat into the lung, *Nature*, **252**, 314-315(1974)
- Okonek, S. Hofmann, A., and Henningsen, B., Efficacy of gut lavage, hemodialysis, and hemoperfusion in the therapy of paraquat or diquat intoxication. *Arch. Toxicol.*, **36**, 43-51 (1976)
- Gisselin, R.E., Smith, R.P., and Hodge, H.C., Clinical Toxicology of Commercial Products, 5th ed. pp. III-328-336, Williams & Wilkins, Baltimore (1984)
- Forman, J., Aldrich, T.K., Posner, M.A. and Fisher, A.B., *J. Pharmacol. Ther.*, **221**, 428 (1982)
- Smith, P.H., and Heath, D., Paraquat, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **4**, 441-445(1976)
- 早野俊一, 救急醫學, **12**, 1463(1988)
- 野田照義, 青柳光生, 救急醫學, **11**, 957(1987)
- 埜野泰, 田部井, 武田和司, 草野英二, 救急醫學, **11**, 665(1987)
- Suntres, Z.E., Hepworth, S.R. and Shek, P.N., *Biol. Pharm.*, **44**, 1811(1992)
- Brown, L.A., Bai, C. and Jones, D.P., *Am. J. Physiol.* **262**, 305-312(1992)
- Chen, N., Bowles, M.R. and Pond, S.M., *Biol. Pharm.*, **44**, 1029-1036(1992)
- Choi, B.K. and Cho, N.K., Scavenging effects of flavonoids on paraquat induced pulmonary toxicity. *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **10**, 29-30 (1995)
- Minoti, G. and Aust, S. D., Superoxide dependent redox cycling of citrate-Fe³⁺ : evidence for a superoxide dismutase like activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **253**(1), 257-267(1987)
- Otomo, S. and Fujihira, E., Stabilizing effect of antiinflammatory drugs on erythrocyte membrane. *Yakugaku Zasshi*, **93**(6), 782-786(1973)
- Oyanagui, Y., Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **25**(13), 1473-1480 (1976)
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2), 55-63(1983)
- Heikkila, R.E., Winston, B. and Cohen, G., Alloxan-induced diabetes-evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol.*, **25**(9), 1085-1092(1976)
- Rossini, A.A., Arcangeli, M.A. and Cahill, G.F.Jr., Studies of alloxan toxicity on the beta cell. *Diabetes*, **24**(5), 516-522(1975)
- Kitazawa, Y., Matsubara, M., Takeyama, N. and Tanaka, T., The role of xanthine oxidase in paraquat intoxication. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**(1), 220-224(1991)
- Hassoun, E.A., Roche, V.F. and Stohs, S.J., Release of enzymes by ricin from macrophages

- and chinese hamster ovary cells in culture. *Toxicol. Meth.*, **3**, 119(1993)
23. Klee, S., Nurnberger, M.C. and Ungemach, F.R. The consequences of nitrofurantoin-induced oxidative stress in isolated hepatocytes: Evaluation of pathobiochemical alterations. *Chem.-biol. Interact.*, **93**(2), 91-102(1994)
24. Yoshikawa, Y., Takano, H., Takahashi, S., Ichikawa, H. and Kondo, M., Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multipleorgan failure. *Circ. Shock*, **42**(1), 53-58(1994)
25. Nathan, C.F., Secretion of oxygen intermediates: role in effector functions of activated macrophages. *Fed. Proc.*, **41**(6), 2206-2211(1982)