

에탄올이 유기인제 농약에 의한 Cholinesterase 불활성화에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 약리학교실
최형철 · 김종호 · 하정희 · 이광윤 · 김원준

영남대학교 의과대학 부속병원 인턴
우현재 · 허창욱 · 손수민 · 천은진

The Effects of Ethanol on Cholinesterase Inactivation by Organophosphorous

Hyoung Chul Choi, Jong Ho Kim, Jeoung Hee Ha, Kwang Yoon Lee, Won Joon Kim
Hyun Jae Woo, Chang Uk Huh, Soo Min Son, Eun Jin Chun

*Department of Pharmacology
College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea*

- Abstract -

Background: In Korea the agricultural community widely uses organophosphorous, and organophosphorous poisonings are increasing every year.

We compared change in activity of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase by organophosphorous and by the interaction of ethanol and organophosphorous. We also compared the effect of reversible anticholinesterase drugs, physostigmine and neostigmine. The object of this study is to investigate the effects of several anticholinesterase drugs and on how ethanol influences the activity of cholinesterase.

Materials and Methods: Fifteen male university students were randomly selected, and blood samples were taken from the antecubital vein. The acetylcholinesterase in the RBC and the pseudocholinesterase in the serum were extracted and separated. The enzyme activity change was measured by the electrometric method. After adding acetylcholine, the pH change was measured with a pH meter.

Results and Conclusion: Our results indicated that reversible anticholinesterase drugs decreased the cholinesterase activity more efficiently than organophosphorous. The acetylcholinesterase and pseudocholinesterase activity were decreased by ethanol.

When ethanol was added, oxime a cholinesterase activator, increased acetylcholinesterase activity but does not increased pseudocholinesterase activity.

Key Words: Organophosphorous, Anticholinesterase drug, Ethanol

서 론

문명의 급속한 발달과 사회 환경의 급격한 변화에 따라 생활 환경이 복잡 다양화되면서 해마다 약물중독에 의한 인명 피해가 증가되고 있으며 그 중 특히 농약의 사용 부주의, 자살 목적으로의 음독 등이 빈번히 발생하고 있다(김명환 등, 1988; 이재규와 박재황, 1993; 황금만 등, 1993). 우리나라의 경우 1950년대부터 농촌에서 유기인제 농약이 농작물의 살충제로 널리 사용되면서 유기인제 중독으로 인한 사고가 매년 증가하는 추세에 있으며 중독 사례에 대한 보고도 많다(허기석 등, 1983; 류형국 등, 1993; 이재규와 박재황, 1995). 또한 유기인제는 농약 뿐 아니라 군사적 목적의 화학 무기의 주성분으로 사용되어지고 있으며(Sidell, 1992), 1995년 3월 동경의 지하철역에서 일어난 독가스 테러 사건에 사용된 약품도 유기인제의 일종인 sarin이었다(조선일보, 1995). 유기인제의 작용은 이들의 공통구조인 phosphorus가 acetylcholinesterase(AChE)의 ester부위에 결합하여 esterase가 인산화됨으로써 acetylcholine(ACh)을 분해하는 능력을 상실하게 되는 것이다. 따라서 유기인제에 노출되면 신경말단에 ACh이 축적되어 콜린성신경이 분포된 말초장기의 세포에 대하여 무스카린성 작용을 일으키고, 자율신경절 및 골격근의 니코틴성 수용체에 대하여 처음에는 흥분시키고 이어서 억제 또는 마비를 시키며, 중추신경계의 콜린성신경을 흥분시킨다. 이때 인산화된 esterase가 다시 가수분해되어 재활성화되는 속도는 극히 느려서 AChE의 기능이 거의 영원히 회복되지 못하므로 이들을 비가역성 향콜린에스터라제 약물이라고 한다. 따라서 새로운 AChE가 생성되어야만 비로소 esterase의 기능이 생기게 된다(Berman과 Decker, 1986; Watanabe와 Katzung, 1992; Ruffolo, 1995; Palmer, 1996).

한편 체내의 콜린에스터라제에는 콜린성 섬유,

적혈구, 혈소판 및 태반에 풍부한 acetylcholinesterase(AChE: specific-, true-, erythrocyte cholinesterase)와 신경교세포, 위성세포, 혈장, 간장 등에 존재하는 butyrylcholinesterase(BuChE: nonspecific-, pseudo-, serum cholinesterase)의 두가지 subtype이 존재하며 이 두 효소간에는 기질(ACh 및 콜린성 화합물)에 대한 특이성과 여러 약물에 대한 억제 정도에 차이점을 가지고 있다(Berman과 Decker, 1986; Watanabe와 Katzung, 1992; Ruffolo, 1995; Palmer, 1996). 현재까지 acetylcholinesterase의 생리적 역할이나 약제와의 반응 양상은 잘 알려져 있지만 다른 아형인 pseudocholinesterase에 대한 약제와의 반응성은 확실치 않다. 그리고 가역성 향콜린에스터라제 약물과 비가역성 향콜린에스터라제 약물 등 반응 시간에 따른 비교는 많지만 효능에 대한 비교 자료는 많지 않은 실정이다. 따라서 비가역성 향콜린에스터라제 약물에 속하는 유기인제의 acetylcholinesterase, pseudocholinesterase 억제 정도와 임상적으로 자주 사용되는 가역성 향콜린에스터라제 약물의 효능을 비교하고, 콜린에스터라제 활성제에 의한 활성도의 증가 양상을 연구할 필요성이 있고 특히 농사일 도중의 음주가 보편화된 우리나라 농민들의 행동 특성을 감안, 에탄올과 상호 작용시 여러 유기인제의 콜린에스터라제 억제 정도의 조사가 필요하다.

따라서 이 연구에서는 가역성 향콜린에스터라제 약물과 유기인제의 효능 비교와 알콜 섭취가 유기인제 농약의 콜린에스터라제 활성도에 미치는 영향을 파악하는 것을 목표로 하였다.

재료 및 방법

남자 대학생 15명을 무작위 추출하여 상박부 정맥에서 채혈하여 실험에 이용하였다. 혈액 중 적혈

구내에 존재하는 acetylcholinesterase와 혈장에 존재하는 pseudocholinesterase를 분리하기 위해 채혈한 혈액 10ml에 heparin 0.5ml를 첨가한 후 2000rpm으로 15분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하고 혈장을 보관하였다. 순수한 acetylcholinesterase를 얻기 위해 분리한 적혈구 부분에 2-3배 용적의 생리식염수를 넣고 천천히 잘 혼합한 후 다시 2000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 2-3배의 생리식염수를 넣고 2000rpm에서 20분간 더 원심시켰다. 그후 상층액을 제거하고 적혈구와 같은 용량의 생리식염수를 넣고 천천히 흔들어 균일한 현탁액을 만든 후 이 현탁액 0.5ml를 취하여 24.5ml의 0.01% saponin 용액에 넣어서 용혈시키고 이 용혈액을 acetylcholinesterase로 사용하였다. 그리고 앞서 분리한 혈장을 4배의 증류수로 희석하여 pseudocholinesterase로 사용하였다. 알콜을 처치하지 않은 군의 실험은 이를 사용하였으며 알콜 유효농도가 0.1%인 군의 실험에는 만들어진 acetylcholinesterase, pseudocholinesterase에 ethyl alcohol을 넣어 유효농도가 0.1%가 되도록 하였다. 콜린에스터라제 활성도의 측정은 콜린에스터라제가 ACh을 acetic acid와 choline으로 가수분해한다는 점을 이용하여 각 효소에 ACh을 기질로서 주입한 후 생성된 산(acetic acid)에 의해 변화된 pH를 pH meter로 측정하여 간접적으로 활성도를 알아내는 electrometric method를 이용했다. 각 효소에 사용한 완충액의 구성은 acetylcholinesterase의 경우 20mM sodium pentobarbital, 4mM KH_2PO_4 , 600mM KCl의 혼합용액을 제조한 후 pH를 8.1로 조정하였으며, pseudocholinesterase의 경우 6mM sodium pentobarbital, 4mM KH_2PO_4 , 300mM NaCl의 혼합용액을 제조한 후 pH를 8.0으로 조정하였다. 효소 억제제로 유기인제 농약인 parathion과 fenthion을 사용하였고 비교 약물로 가역성 향콜린에스터라제 약물인 physostigmine과 neostigmine을 사용하였다. 콜린에스터라제 활성을 증가시킬 목적으로는 인산화된 esterase의 가수분해를 촉진시켜 콜린에스터라제를 활성화시키는 pralidoxime을 사용하였다.

실험은 25℃에서 10분간 완충액과 효소를 반응시킨 후 pH meter로 pH를 측정(pH a)하고, 실험

약물과 함께 효소의 기질로서 0.11M ACh 0.4ml, 0.165M ACh 0.4ml를 각각 acetylcholinesterase, pseudocholinesterase 용액에 처치하여 25℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 위의 과정이 끝난 후 다시 pH meter로 각 시험관 내의 pH를 측정(pH b)하였으며 효소 억제제나 알콜이 첨가되지 않은 대조군의 pH 변화량을 활성도 100%로 계산하여 각 실험군의 효소 활성도를 %로 나타내었다.

본 실험에 사용한 physostigmine, neostigmine, parathion, fenthion, pralidoxime, acetylcholine 등의 약물은 모두 증류수에 녹여 사용하였고 통계 처리는 student t-test를 이용하여 95%에서 유의성을 검증하였다.

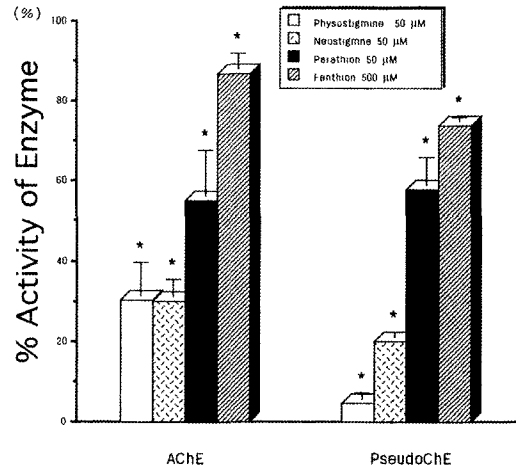


Fig. 1. Effect of reversible and irreversible anticholinesterase agent on the acetylcholinesterase, pseudocholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

성 적

그림 1은 각 약물을 처치했을 경우에 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도를 나타낸 것이다. 아무런 약물도 처치하지 않은 경우의 효소 활성도를 100%로 볼 때 acetylcholinesterase의 활성도는 physostigmine 50mM을 처치했을 경우

30.08±8.24%, neostigmine 50mM을 처치했을 경우 30.03±4.00%, parathion 50mM을 처치했을 경우 54.88±11.48%, fenthion 500mM을 처치했을 경우 86.56±3.99%를 나타내었다. 그리고 pseudocholinesterase의 활성도는 physostigmine 50mM을 처치했을 경우 4.63±1.28%, neostigmine 50mM을 처치했을 경우 20.06±1.15%, parathion 50mM을 처치했을 경우 57.85±6.79%, fenthion 500mM을 처치했을 경우 73.61±0.97%이었다. Acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase 두가지 모두 physostigmine 및 neostigmine 등의 가역성 항콜린에스터라제 약물에 의한 효소 활성도 감소가 parathion 및 fenthion 등의 비가역성 항콜린에스터라제 약물에 의한 감소보다 더욱 현저하였고, physostigmine을 처치한 경우는 pseudocholinesterase의 활성도 감소가 acetylcholinesterase보다 더욱 현저하게 감소하였다.

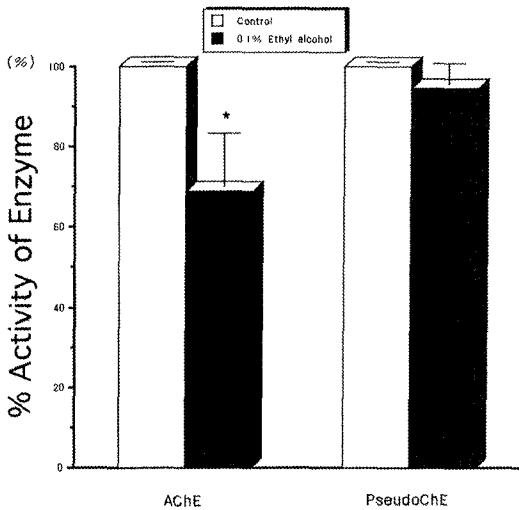


Fig. 2. Effect of 0.1% ethyl alcohol on the acetylcholinesterase, pseudocholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

그림 2는 0.1% 에탄올이 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 대조군의 활성도를 100%

으로 볼때 0.1% 에탄올을 처치했을 경우의 acetylcholinesterase의 활성도는 68.92±13.26%, pseudocholinesterase의 활성도는 94.66±4.97%로서 acetylcholinesterase는 에탄올에 의해 효소 활성도가 유의성 있게 감소하였다.

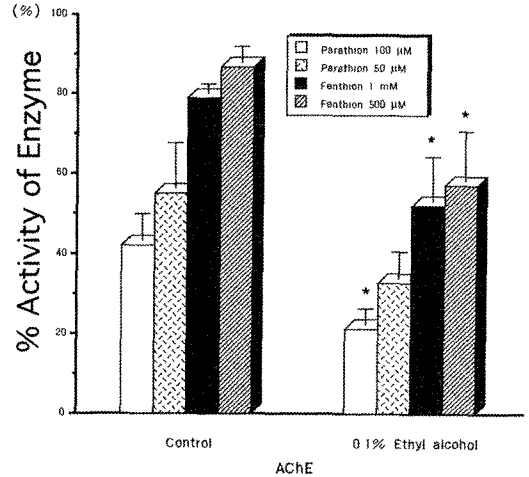


Fig. 3. Effect of irreversible anticholinesterase agent and 0.1% ethyl alcohol on the acetylcholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

그림 3은 각각의 유기인제에 의한 acetylcholinesterase 활성도를 0.1% 에탄올 처치에 따라 비교한 것이다. Parathion 100mM 처치시 에탄올 처치하지 않은 군은 41.91±6.83%, 에탄올 처치군은 21.28±3.68%이었고, parathion 50mM 처치시 에탄올 처치하지 않은 군은 54.88±11.48%, 에탄올 처치군은 32.77±6.48%이었다. Fenthion 1mM 처치시 에탄올 처치하지 않은 군은 78.96±2.34%, 에탄올 처치군은 52.03±11.01%이었고, fenthion 500mM 처치시 에탄올 처치하지 않은 군은 86.56±3.99% 에탄올 처치군은 57.09±12.36%이었다. 에탄올을 처치 했을 경우 4가지 약물 모두에 대하여 acetylcholinesterase의 활성도가 모두 현저하게 감소하였다.

그림 4는 각각의 유기인제에 의한 pseudocholinesterase 활성도를 0.1% 에탄올 처치에 따라 비교

한 것이다. Parathion 100mM 처치시 에탄올을 처치하지 않은 군은 $39.13 \pm 4.19\%$, 에탄올 처치군은 $18.75 \pm 1.65\%$ 이었고, parathion 50mM 처치시 에탄올을 처치하지 않은 군은 $57.85 \pm 6.79\%$, 에탄올 처치군은 $33.59 \pm 2.39\%$ 이었다. Fenthion 1mM 처치시 에탄올을 처치하지 않은 군은 $61.42 \pm 3.28\%$, 에탄올 처치군은 $51.04 \pm 3.64\%$ 이었고, fenthion 500mM 처치시 에탄올을 처치하지 않은 군은 $73.61 \pm 0.97\%$, 에탄올 처치군은 $69.79 \pm 6.17\%$ 이었다. Parathion을 처치했을때 에탄올에 의한 pseudocholinesterase의 활성도는 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 acetylcholinesterase의 활성도 감소에 비하여 작게 영향을 받았다.

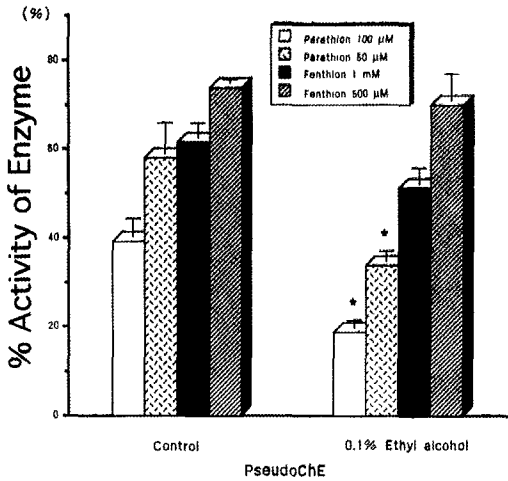


Fig. 4. Effect of irreversible anticholinesterase agent and 0.1% ethyl alcohol on the Pseudocholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

그림 5는 0.1% 에탄올 처치와 oxime에 의한 acetylcholinesterase의 활성도를 parathion 100mM 처치한 군, parathion 100mM과 oxime 100mM을 처치한 군, parathion 100mM과 oxime 1mM을 처치한 군 등 3군으로 나누어 비교한 것이다. Oxime의 농도가 증가할수록 감소되었던 효소 활성도의 회복 정도가 커짐을 알 수 있고 이는 에탄올 처치와는 관계없이 증가되는 양상을 나타내었다.

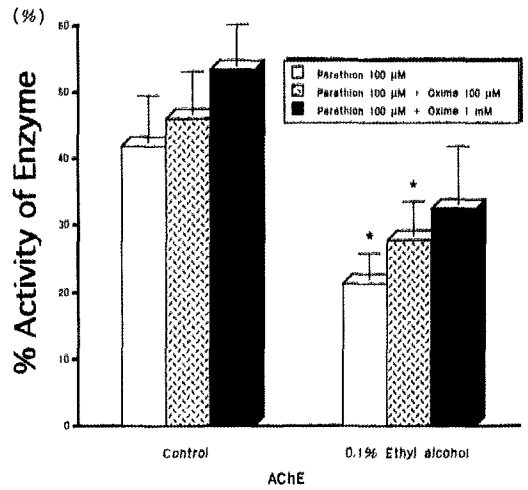


Fig. 5. Effect of pralidoxime and 0.1% ethyl alcohol on the acetylcholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

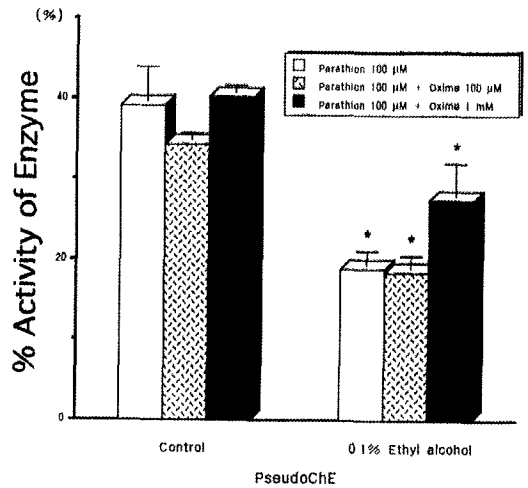


Fig. 6. Effect of pralidoxime and 0.1% ethyl alcohol on the pseudocholinesterase activity. % Activity was calculated from 100%. Values are expressed as mean±SE (n=5). *P<0.05: Significantly different from control.

그림 6는 0.1% 에탄올 처치와 oxime에 의한 pseudocholinesterase의 활성도를 parathion

100mM 처치한 군, parathion 100mM과 oxime 100mM을 처치한 군, parathion 100mM과 oxime 1mM을 처치한 군 등 3군으로 나누어 비교한 것이다. Acetylcholinesterase에서와는 달리 oxime의 농도가 증가되어도 효소 활성도의 회복에는 영향이 크지 않음을 나타내었다.

고 찰

우리나라의 경우 농촌에서 유기인제 농약이 널리 사용되고 있으며 이로 인한 유기인제 중독 사고가 매년 증가 추세에 있다. 따라서 농약 중독과 그 응급 처치에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있으나 유기인제 농약으로 인한 효소 활성도 변화에 대한 연구는 미비한 실정이다. 또한 농부들이 알콜을 섭취하고 근로에 임하는 경우가 많은데 알콜 섭취와 농약 중독에 대한 연구 또한 다각도로 이루어지고 있지 않다. 따라서 이 연구에서는 유기인제 농약으로 인한 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도 변화와 일반적인 음주량인 혈중 농도 0.1% 알콜과 유기인제 농약을 동시에 섭취했을 경우의 효소의 활성도 변화를 측정해 보았다.

가역성 항콜린에스터라제 약물인 physostigmine 및 neostigmine과 비가역성 항콜린에스터라제 약물인 parathion 및 fenthion의 효능을 비교하면 1시간의 반응시간에서는 가역성 항콜린에스터라제 약물이 효소 활성도를 더욱 감소시켰다. 이 결과에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 그리고 알콜을 처치한 군과 처치하지 않은 군을 비교해 보면 효소 활성도는 알콜을 처치한 군에서 더 감소하였는데 pseudocholinesterase에서 보다 acetylcholinesterase의 경우에서 더 현저히 감소했다. 이것은 Husain과 Somani (1997)가 보고한 에탄올이 acetylcholinesterase의 활성도를 감소시킨다는 사실과 일치했다. 콜린에스터라제의 활성도는 약물에 따라서 감소 정도가 약간의 차이를 보였는데 최근에 나온 fenthion보다는 parathion이 더 활성도를 감소시키는 것으로 나타났고 농도가 증가할수록 활성도를 더 감소시키는 것으로 나타났다. 그리고 알콜을 처치시 활성도 감소도 역시 parathion이

fenthion보다 그 정도가 컸고, pseudocholinesterase보다는 acetylcholinesterase에 대한 영향이 더 큰 것으로 나타났다. 이와 함께 유기인제 농약에 중독시 많이 사용되어지고 있는 콜린에스터라제 활성제인 oxime을 parathion과 함께 처치하면 acetylcholinesterase의 경우는 oxime에 의해 효소 활성도가 증가되었으나 pseudocholinesterase의 경우는 별 영향이 없는 것으로 나타났다. 이것은 oxime의 작용이 혈장보다는 골격근의 신경-근 접합 부위에서 가장 잘 일어난다는 사실과 일치했다.

결론적으로 유기인제 농약으로 인한 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도 감소는 알콜 처치시 더욱 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 콜린에스터라제 활성제인 oxime은 acetylcholinesterase에 대해서는 효소 활성도를 높이지만 pseudocholinesterase에 대해서는 효소 활성도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

요 약

이 연구에서는 유기인제 농약으로 인한 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도 변화와 알콜과 유기인제 농약의 상호 작용시 효소 활성도 변화를 비교하고, 임상적으로 쓰이고 있는 가역성 항콜린에스터라제 약물과도 비교하여 여러 항콜린에스터라제 약물의 효능과 알콜 섭취가 콜린에스터라제 활성도에 미치는 영향을 파악하는 것이 이 실험의 목적을 두었다.

남자 대학생 15명을 무작위 추출하여 상박부 정맥에서 채혈하여 혈액중 적혈구내에 존재하는 acetylcholinesterase와 혈장에 존재하는 acetylcholinesterase를 분리하였고 cholinesterase가 acetylcholine을 acetic acid와 choline으로 가수분해한다는 점을 이용하여 각 효소에 acetylcholine을 기질로서 주입한 후 1시간 후 생성된 acetic acid에 의해 변화된 pH를 pH meter로 측정하여 간접적으로 활성도를 알아내는 electrometric method를 이용하여 활성도 변화를 측정하였다.

위 실험 조건에서 가역성 항콜린에스터라제 약물이 유기인제 농약보다 콜린에스터라제 활성도를 감

소시켰고, 유기인제로 인한 acetylcholinesterase와 pseudocholinesterase의 활성도 변화는 에탄올 처치시 더욱 현저하게 감소되는 것으로 나타났으며, 폴린에스터라제 활성제인 oxime은 acetylcholinesterase에 대해서는 효소 활성도를 높이지만 pseudocholinesterase의 효소 활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- 김경환: 자율신경계 및 신경액소성 전달. 김경환 편. 약리학 강의. 사판, 의학문화사, 서울, 1997, p 65-89.
- 김명환, 박명재, 김순길. 농촌 지역에서 발생한 치명적 약물중독에 관한 임상적 관찰. 대한내과학회지 35. 821-827, 1988.
- 류형국, 한형원, 조희영, 김인환, 이일세, 이경민: 급성유기인제 중독증에서 호흡부전에 대한 임상적 고찰. 대한 내과학회지 45 507-515, 1993.
- 이재규, 박재황 급성 약물 중독에 관한 임상적 고찰. 대한 응급의학회지 4 35-42, 1993.
- 이재규, 박재황 유기인계와 카바메이트계 급성 약물 중독 환자에서 아트로핀 처치후 치료효과에 대한 비교분석. 대한 응급의학회지 6. 143-153, 1995.
- 조선일보 1995년 11월 30일자, 47면.
- 황금만, 이용철, 이수택, 이승렬, 이양근. 급성 약물중독환자의 실태조사. 대한 응급의학회지 4: 43-52, 1993.
- 허기석, 김형진, 신대균, 신명진, 손창학, 김문중: Atropine 처치 용법에 따른 유기인제 중독증의 예후 비교. 대한 내과학회지 27: 81-87, 1983.
- Berman HA, Decker MM. Kinetic equilibrium and spectroscopic studies on dealkylation of alkylorganophosphoryl-acetylcholinesterase. J Biol Chem 261: 10646-10652, 1986.
- Husain K, Somani SM: Influence of exercise and ethanol on cholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 21(4). 659-670, 1997.
- Palmor Taylor: Anticholinesterase agents. In Hardman JG: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics. 9th ed. Mcgraw Hill, New York, 1996, p 161-176.
- Ruffolo RR: Physiology and biochemistry of the peripheral autonomic nervous system. In Brody TM. Human Pharmacology. 2nd ed. Mosby, St. Louis, 1995, p 79-96.
- Siedll, FR Clinical considerations in nerve agent in chemical warfare agents. Academic Press, San Diego. 1992, p 155-194.
- Watanabe AM, Katzung BG Cholinoceptor activating & Cholinesterase inhibiting drugs. In Katzung BG: Basic & Clinical Pharmacology 5th ed, Appleton & Lange, Singapore, 1992, p 82-96.