

Paraquat 유도독성에 대한 금은화 엑스의 효과 (IV)

최 병 기

동덕여자대학교 약학대학

Scavenging Effects of Lonicera Japonica Extracts on Paraquat Induced Toxicity (IV)

Byung-Ki Choi

College of Pharmacy, Dongduk Women's University

Abstracts

Scavenging effects on paraquat induced toxicity were investigated by using methanol (MeOH) and ethylacetate (EtoAC) extracts of *Lonicera japonica*.

The results are summarized as follows:

1. To Fe(III)-ADP-NADPH induced microsomal lipid peroxidation, MeOH and EtoAC extracts showed antioxidative activities and inhibition ratio at 100 µg/ml 44.4% and 73.8% respectively.
2. To microsomal NADPH dependent cytochrome p-450 reductase in rat liver, MeOH and EtoAC extracts inhibited the enzyme activities and inhibition ratio were 26.3% and 44.8% respectively.
3. Administration (30 mg/kg, iv) of paraquat to rats caused the marked elevation of GOT, GPT, LDH, ALP in the serum and lipid peroxides in the microsome as compared to the control group. Serum GTP, LDH, ALP and liver microsomal LPO were reduced significantly by administration of MeOH extract (1,000 mg/kg), EtoAC extract (40 mg/kg) and Silymarin (150 mg/kg) as compared to the paraquat group. From the results, MeOH and EtoAc extracts of *Lonicera japonica* showed the useful scavenger and reducer on the paraquat induced hepatotoxicity.

서 론

Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 효용성이 크지만 상대적으로 독성¹⁾⁻³⁾이 매우 높아 취급자 또는 사용자의 흡입, 피부노출 및 경구섭취 등 중독경로를 통해 중독 또는 사망하는 예가 많다.^{4),5)}

중독의 임상적 소견으로는 위장장애, 간장장애, 신장장애 및 폐장장애가 나타나며 최종적으로 사망하게 되나 현재까지 이의 중독을 효과적으로 경감 및 치료할 수 있는 독성경감제 또는 해독제나

치료제가 거의 없는 실정이다.^{6,7)}

이러한 이유에서 천연물 중 paraquat의 독성기전에 관련이 있는 microsomal NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase를 저해하고, 이 효소에 의해 생성되는 활성산소(hydrogen peroxide, hydroxy radical, superoxide anion)로 인하여 초래되는 세포막의 지질과산화물을 억제할 수 있는 항산화 작용을 갖는 금은화(*Lonicera japonica*)⁸⁾⁻¹²⁾에 대해 일차적으로 paraquat 간독성에 대한 독성경감 효과를 검토한 바 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물은 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 체중 200 g 내외의 Wistar계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 시험기간 중 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5^\circ\text{C}$, 12시간 명암 등의 사육환경을 유지하였으며 사료와 물은 충분히 공급하였다.

2) 실험시약

시료로서 금은화(Lonicera japonica)는 시중에서 구매하였고, Silymarin은 국내제약회사에서 원료 표준품을 제공받았다.

실험에 사용한 주요시약인 paraquat (methylviologen), adenosine diphosphate (ADP), nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) thiobarbituric acid (TBA)는 Sigma 사제를, 이외의 시약은 국내에서 시판되는 특급 시약을 사용하였다.

3) 금은화 엑스

잘 건조된 금은화를 분쇄 및 분말로 만든 후 70% methanol로 수욕상에서 5시간 3회 추출한 다음 추출액을 모아 여과하여 감압농축하여 methanol extracts (MeOH ex.)를 얻었다.

MeOH ex.를 n-hexane, chloroform, ethylacetate로 계통적으로 분획하여 ethylacetate fraction (Eto AC ex.)을 얻고 이를 감압건조하여 시료하였다.

2. 실험방법

1) NADPH 의존성 지질과산화의 측정^{13), 14)}

1 mg protein/ml microsome 용액 (1.0 ml)에 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5, 0.4 ml), 30 mM ADP 수용액 (0.2 ml), 1.5 mM FeCl₃ 수용액 (0.2 ml) 및 시료용액 (100 µg/ml)을 가하여 진탕 혼화한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 여기에 5 mM NADPH 용액 (0.2 ml)를 가하여 진탕 혼화한 다음 37°C에서 60분간 incubation하였다. 반응 용액에 2% BHT 용액 (0.2 ml), 40 mM EDTA 용액 (0.2 ml) 및 TBA 시약 (7.6 ml)을 가하여 진탕 혼화한 다음 여과수욕상에서 30분간 가열하고 냉각한 다음 여과하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고 malondialdehyde (MDA)의 분자흡광계수 ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

cm^{-1})을 사용하여 흡광도에서 MDA양을 산출하였다.

2) NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase 활성의 측정¹⁵⁾

1 mg protein/ml microsome (1.0 ml)에 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5, 0.4 ml), 30 mM ADP 용액 (0.2 ml), 1.5 mM FeCl₃ 용액 (0.2 ml) 및 시료용액 (100 µg/ml)을 가하여 진탕 혼화한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 여기에 5 mM NADPH 용액 (0.2 ml)을 가하여 잘 혼화하고 최종 3 ml로 조절한 다음 340 mM에서의 흡광도를 매 1분마다 10분간 측정하였다. 대조에는 동일한 완충액을 사용하였다. NADPH의 분자흡광계수 ($6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)을 이용하여 흡광도로부터 NADPH양을 산출하고 효소의 저해율을 구하였다.

3) 동물실험

(1) 약물투여방법

실험동물은 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 다음 6~8마리를 1개군으로 하여 다음과 같은 실험군으로 하였다.

정상군은 생리식염수를 단독투여하였고, paraquat (PQ) 투여군은 PQ를 생리식염수에 용해하여 체중 kg당 30 mg을 1회 투여하였다. PQ 및 금은화 엑스 또는 silymarin 병용투여군은 PQ를 생리식염수에 용해하여 체중 kg당 30 mg을 정맥내에 투여하고 PQ 투여 18시간의 30분전과 투여 6시간 후에 금은화의 methanol ex.는 1,000 mg/kg 체중, ethylacetate ex.는 40 mg/kg 체중 및 Silymarin은 150 mg/kg 체중을 각각 병용 투여하였다.

(2) 혈청 및 간 microsome 분획의 조제

Cinti 등의 방법¹⁶⁾에 준하였다. Wistar계의 웅성 흰쥐를 ether로 마취시키고 복부동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 채혈한 다음 간장을 적출하여 0.15 M KCL 용액을 관류하여 혈액을 제거하고 간장 1g에 대하여 3 ml의 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)을 가하여 homogenize하였다.

Homogenate는 9,000 × g에서 원심분리하여 상징액을 분취하였다. 이 상징액을 4°C에서 1시간 105,000 × g에서 원심분리하여 상징액을 분취 제거하고 여기서 얻은 침전물을 20% glycerol 용액을 사용하여 5배로 희석한 다음 이것을 micro-

some으로 하여 1 ml씩 분주하여 -80°C에서 동결 보존하여 용시해동하여 사용한다.

Microsome 중의 단백질량은 Lowry법¹⁷⁾에 따라 정량하였다.

(3) 간 microsome 분획중의 과산화지질 측정
 흰쥐의 간 microsome 분획 0.2 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml를 가하고 용해시킨 다음 20% acetic acid buffer (pH 3.5) 1.5 ml 및 0.8% TBA 시액을 가한 다음 Ohkawa의 방법¹³⁾에 의해 조작한 다음 분광광도법으로 532 nm에서 측정하였다.

표준품으로는 1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane을 사용하였다.

(4) 혈액 생화학적 분석

혈청중의 GPT 및 GOT활성은 Retman 및 Frankel 법¹⁸⁾, LDH 활성은 효소법¹⁹⁾과 ALP 활성은 Kind-King법²⁰⁾에 따라 Kit를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 간 microsome을 사용한 NADPH에 의존성 지질 과산화반응의 억제효과

금은화 엑스의 생체시료 중에서의 활성산소 생성억제효과를 rat의 간 microsome의 지질과산화반응에 의해 검토하였다. Microsome은 불포화지방산이 다량 함유되어 있어 효소에 의한 지질과산화반응이 촉진되며 항산화효과의 측정에 사용된다.

지질과산화 개시제로 ADP, Fe(III)과 NADPH를 사용하여 microsome과 함께 37°C에서 1시간 incubation하고 반응후 반응중의 지질 산화방지를 위해 BHT 및 EDTA를 가하고 thiobarbituric acid법에 의하여 측정하여 TBA가(TBAV)를 구하였다.

지질과산화에 대한 금은화 엑스(MeOH 및 EtoAC ex.)의 산화억제율은 시료미첨가시에서 시료첨가시의 TBAV의 차를 시료첨가시의 TBAV에 대한 백분율로 표시하여 Table 1에 나타내었다.

금은화 엑스 중 MeOH ex. 및 EtoAC ex.는 각각 100 µg/ml에서 과산화 억제작용을 나타내었으며 그 산화억제율은 각각 44.4 및 73.8%이었다.

NADPH 의존성 지질과산화반응은 ADP-Fe(III)가 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase와 NADPH에 의해서 환원되고, 산소와 반응하여 생

Table 1. Antioxidative effects of Lonicera japonica extracts on Fe(III)-ADP-NADPH induced microsomal lipid peroxidation

Lonicera japonica extracts (100 µg/ml)	TBAV ^{a)} (MDA nmol/mg protein)	Inhibition ratio of LPO (%) ^{b)}
None	75.2	-
MeOH extract	41.8	44.4
EtoAC extract	19.7	73.8

Reaction medium composed of microsomal protein (1.0 mg), 3.0 mM ADP, 0.15 mM FeCl₃ and 0.1 mM NADPH in 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.5).

^{a)} TBAV was indicated as concentration of malondialdehyde (nmol/mg microsomal protein).

$$b) \text{ Inhibition ratio (\%)} = \frac{\text{TBAV}_1 - \text{TBAV}_2}{\text{TBAV}_1}$$

TBAV₁ : microsomal lipid peroxidation was measured without sample.

TBAV₂ : microsomal lipid peroxidation was measured with sample. LPO : lipid peroxide (malondialdehyde)

성된 ADP-perferryl ion [ADP-Fe (III)-O₂, ADP-Fe (III). O₂]에 의해 일어난다고 보고되어 있다.

NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase가 저해되면 지질과산화가 억제되는 상관성을 갖고 있다.

2. NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase 활성의 억제효과

Wistar계 흰쥐의 간 microsome을 사용하여 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase의 효소활성에 대한 금은화의 MeOH 및 EtoAC ex의 영향과 효소억제작용을 검토하고 그 결과를 나타내었다 (Table 2).

NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase는 paraquat의 독성기전에 관한 효소로서 paraquat의 redoxcycle 대사를 증가하여 superoxide anion과 H₂O₂를 생성하여 세포막을 지질과산화하여 세포손상을 초래한다.

본 효소가 저해되면 지질과산화가 억제되며 동시에 NADPH의 소비가 억제되므로 NADPH 농도의 경시 변화를 측정하여 NADPH 소비량 (nmol/min/mg protein)을 표시하였다. 시료의 미첨가시와 첨가시의 NADPH 소비량에 대한 억제백분율 (%)을 측정한 결과 MeOH 및 EtoAC ex.의 100 µg/ml 농도에서 각각 26.3 및 44.8% 나타내었다.

Table 2. Inhibitory effects of *Lonicera japonica* extracts on microsomal NADPH dependent cytochrome p-450 reductase

<i>Lonicera japonica</i> extracts (100 µg/ml)	Consumption rate of NADPH (nmol/min/mg protein)	Inhibition ratio of cyt.p-450 reductase (%)
None	4.13	—
MeOH extract	3.04	26.3
EtoAC extract	2.28	44.8

Reaction medium composed of microsomal protein (1.0 mg), 3.0 mM ADP, 0.15 mM FeCl₃ and 0.1 mM NADPH in 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.5).

$$\text{Inhibition ratio of reductase (\%)} = \frac{\text{Cons}_1 - \text{Cons}_2}{\text{Cons}_1} \times 100$$

Cons₁ : NADPH consumption rate was measured without sample.

Cons₂ : NADPH consumption rate was measured with sample.

3. 간장중의 MDA 형성억제 효과

Paraquat (30 mg/kg, iv)의 단독투여에 의해서 지질과산화로 생성된 rat의 간 microsome의 malondialdehyde (MDA)의 농도는 정상군보다 현저하게 증가하였으나, 금은화의 MeOH ex. (1,000 mg/kg) 및 EtoAC ex. (40 mg/kg)과 Silymarin (150 mg/kg)의 병용투여에 의해 모두 유사하게 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

생체내 지질과산화에 의해 간, 신장 및 혈관 등의 질환이 발생하는 것으로 볼 때 세포내 LPO 농도의 감소는 간세포에 대한 destructive effect를 경감하리라 추정된다.

4. 혈청중의 간지표 효소활성의 변화

Paraquat (30 mg/kg, iv)의 투여에 의한 유도 간독

Table 3. Antioxidative effects of *Lonicera japonica* extracts on lipid peroxide in liver microsome of rats intoxicated with paraquat

Treatment	LPO (MDA nmol /mg protein)	Inhibition ratio of LPO (%)
Control	51.0 ± 19.1	
Paraquat	12.0 ± 38.2 [#]	
MeOH extract (1,000 mg/kg)	62.4 ± 27.9*	44.3
EtoAC extract (20 mg/kg)	57.2 ± 26.0*	48.9
Silymarin (150 mg/kg)	54.8 ± 27.3*	51.0

[#]: Significantly different from the control group ([#]p < 0.05).

*: Significantly different from the paraquat group (*p < 0.05).

Each sample was given p.o. 18 hr and 30 min. before, and 6 hr after the administration of paraquat (30 mg/kg, i.v.)

LPO; Lipid Peroxides (MDA; Malondialdehyde)

The results expressed as mean ± standard error (n = 6).

성에 대하여 금은화의 MeOH ex. (1,000 mg/kg) 및 EtoAC ex. (40 mg/kg)과 Silymarin (150 mg/kg)를 각각 병용투여하여 간기능 변화와 밀접한 관계를 갖고 있는 GPT, GOT, LDH 및 ALP의 효소활성도의 변화를 측정하여 그 결과를 나타내었다 (Table 4, 5).

GPT, GOT, LDH 및 ALP의 효소활성은 paraquat 단독 투여군이 정상군에 비해 전체적으로 증가하였으나 상기의 금은화 엑스 각각에 대해 GOT를 제외하고는 전부 유의성 있게 감소 및 억제하였다.

또한 금은화 엑스와 간장치료제인 Silymarin과 비교할 때 Silymarin 효과가 다소 억제효과가 컸다.

Table 4. Effects of *Lonicera japonica* extracts on biochemical parameters in serum of rats intoxicated with paraquat

Treatment	Dose (mg/kg)	GTP Activity		GOT Activity	
		Karmen Unit	Inhibition %	Karmen Unit	Inhibition %
Control		26.3 ± 3.88		83.1 ± 18.5	
Paraquat		78.9 ± 7.32 [#]		200.8 ± 18.8 [#]	
MeOH extract	1,000	62.3 ± 15.7*	21.0	186.9 ± 12.4	6.92
EtoAC extract	40	58.5 ± 14.7*	25.9	189.0 ± 15.1	5.87
Silymarin	150	51.8 ± 4.57*	34.3	196.2 ± 4.02	2.29

[#]: Significantly different from the control group ([#]p < 0.05).

*: Significantly different from the paraquat treated group (*p < 0.05, **p < 0.01).

Each sample was given p.o. 18 hr and 30 min. before, and 6 hr after the administration of paraquat (30 mg/kg, i.v.)

GOT; glutamic oxaloacetate transaminase, GPT; glutamic pyruvate transaminase

The results expressed as mean ± standard error (n = 6).

Table 5. Effects of Lonicera japonica extracts on biochemical parameters in serum of rats intoxicated with paraquat

Treatment	Dose (mg/kg)	LDH Activity		ALP Activity	
		Wroblewski	Inhibition %	K-A unit	Inhibition %
Control		675.7 ± 104.0	—	28.2 ± 5.10	—
Paraquat		2271.9 ± 43.7 [#]	—	58.3 ± 5.91 [#]	—
MeOH extract	1,000	2186.2 ± 259.2	3.77	39.3 ± 16.3 [*]	14.4
EtoAC extract	40	1671.0 ± 195.4 [*]	26.4	45.7 ± 3.7 ^{**}	21.6
Silymarin	150	1434.0 ± 328.8 [*]	36.9	30.6 ± 0.14 ^{***}	47.5

[#]: Significantly different from the control group ([#]p < 0.01).

^{*}: Significantly different from the paraquat treated group (^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01, ^{***}p < 0.001).

Each sample was given p.o. 18 hr and 30 min. before, and 6 hr after the administration of paraquat (30 mg/kg, i.v.)

The results expressed as mean ± standard error (n = 6).

결 론

금은화 (*Lonicera japonica*)의 methanol (MeOH) 및 ethylacetate (EtoAC) extracts에 대해서 rat의 간 microsome를 사용하여 Fe(III)-ADP에-NADPH에 의한 지질과산화에 대한 항산화능과 paraquat 독성기전 효소인 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase의 저해능을 검색하고 이를 바탕으로 paraquat 유도독성에 대한 억제효과를 검토하였다.

1. MeOH 및 EtoAC ex.는 Fe(III)-ADP-NADPH 계를 사용한 간 microsome의 지질과산화를 억제하였으며 억제율은 100 µg/ml에서 각각 44.4% 및 73.8%이었다.

2. MeOH 및 EtoAC ex.는 간 microsome의 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase를 억제하였으며 억제율은 100 µg/ml에서 각각 26.3% 및 44.8%이었다.

3. Paraquat 투여에 의해 rat의 간 microsome 중 과산화물 (LPO)의 농도가 현저하게 증가하였으나 MeOH 및 EtoAC ex. 투여에 의해 유의성 있게 감소하였다.

4. 간기능 변화와 밀접하게 관련 있는 생화적 parameter인 GPT, GOT, LDH 및 ALP 효소활성이 paraquat 투여에 의해 증가하였으나 MeOH ex. (1,000 mg/kg), EtoAC ex. (40 mg/kg) Silymarin (150 mg/kg)의 각각 투여에 의해 GOT를 제외한 전체에서 유의성 있게 감소하였다.

5. 위의 결과에서 금은화의 MeOH 및 EtoAC ex.는 항산화능과 paraquat의 간독성 억제효과가 있음을 추정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Dreisbach, R. H. and Robertson, W. O., Handbook of Poisoning, 12th ed. Lange Medical Publication, Los Altos, California, 1982.
- Grossel, T. A., and Bricker, J. D., Principles of Clinical Toxicology, 2nd ed. Raven press, 1990; 143-146.
- Bismuth, C., Schereman, J. M., et al, Elimination of Paraquat, Hum. Toxicol., 1987; 6: 63-68.
- Lisa, A. R., Berniece, E. S. and Pierce A. R., Paraquat poisoning-toxicologic and pathologic findings in three fatal cases, Clinical Toxicology, 1981; 18(8): 915-928.
- Kelling, P. L. and Smith, L. L., Relevance of NADPH depletion and mixed disulfide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration, Biochem. Biophys. Rev. Commu. 1978; 62: 126-137.
- Ross, W. E., Block, T. R. and Chang, R. Y., Paraquat-induced DNA damage in mammalian cell, Biochim. Biophys. Res. Commun. 1978; 91: 1302-1308.
- Manzor, A. C., Gregott; C., Di Nucci, A. and Richelmi, P., Toxicology of paraquat and related bipyridyls, biochemical, clinical and therapeutic aspects., Vet. Hum. Toxicol. 1979; 21: 404-407.
- Tang, W., Eisenbrand, G., Chinese drugs of plant origin Springer verlag Berlin Heiderberg, 1992; 621-625.
- Wang-Leung, Yee Ling, Studies on the components of the flowers of *Lonicera japonica* Thumb, and their, antibacterial activities, Hsiang-Kang ch'in Huk Hsue Than Hsueh Pao, 1981; 8: 1115.
- Kawai, H., Kgroyanagai, M., Umehara, K., Ueno A., and Satake, M., Studies on the saponins of *Lonicera japonica* Thumb. Chem. Pharm. Bull. 1998; 36(12): 4769-4769.
- Chung, K., C., Kwon, D., Y., Baeck, S., H., Kim S., H.,

- and Chang, H. W., Effect of Lonicera Flos' ethylacetate fraction on mutagenicity, *Yakhak Hoeji*, 1988; 32(5): 328-333.
12. Yeun, H., W., Study on antiinflammatory effect of Lonicera japonica, Department of pharmacy graduate school, Sookmyun Women's University Ms Thesis (1990).
 13. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., Assay for lipid peroxids in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 1979; 195: 351-358.
 14. Yagi, K., Microdetermination of lipid peroxid in blood plasma or serum, *Vitamines*, 1975; 49: 10-403.
 15. Carson, P. and Schoenig, G., P., Induction of liver microsomal NADPH cytochrome p-450 reductase by some new synthetic Pyrethroids, *Toxicology & Applied Pharmacology*, 1980; 51: 507-512.
 16. Cinti D., L., Moldeus, P. and Schenkman, S., Kinetic parameters of drug metabolizing enzyme in Ca^{+2} sedimented microsome from rat liver.
 17. Lowry, O., H., Rosebrough, N., J., Farr, A.L. and Randall, R., J., Protein measurement with the Folin-protein agent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
 18. Reitman, S. and Frankel, S., A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. pathol.*, 1957; 28: 56-63.
 19. Kawano, S., Nakagawa, H., Toga, H., Investigation on physiological values of blood in industrial workers, Report 3. Serum colloid reaction and enzyme activity values, *sangyo, Igaku* 1982; 24(3): 275-283.
 20. King, J., Effect of hydrogen ion concentration on lactate dehydrogenase(LDH) assays, *Clin. Chem.* 1972; 18(11): 1443.