파라콰트 중독 흰쥐에서 항산화제 U-74389G의 치료 효과

연세대학교 의과대학 응급의학교실, 외과학교실*, 약리학교실**

오진호 · 정성필 · 임 훈 · 노성훈* · 김혜영** · 김승호 · 이한식 · 민진식*

= Abstract =

Effect of Antioxidant, U-74389G, on Paraquat-Intoxicated Rats

Jin Ho Oho, M.D., Sung Pil Chung, M.D., Hoon Lim, M.D., Sung Hoon Noh, M.D.*,
Hye Young Kim, M.D.**, Seung Ho Kim, M.D., Hahn Shick Lee, M.D., Jin Sik Min, M.D.*

Departments of Emergency Medicine, Surgery* and Pharmacology,**
Yonsei University College of Medicine

Background: This study was conducted to verify the hypothesis that the suppression of lipid peroxidation with the antioxidant, U-74389G, could improve the survivability of paraquat intoxicated rats.

Methods: First, we obtained the 24-h mortality by using several paraquat dosages and calculated the 24-h LD50 in 24 male Wistar rats(250~350 g). To examine the effect of U-74389G, we divided the rats in 4 groups: a control group and U-74389G only group, a paraquat only group, and a paraquat plus U-74389G group(n=10 each). Paraquat, 35 mg/kg, was injected intraperitoneally at 0 h. U-74389G, 10 mg/kg, was administered intraperitoneally at 0, 12 h or at 1, 12 h in the respective groups. The rats were observed for 24 hours. At 24 h, plasma and lung, liver, and kidney tissues were obtained after sacrificing the surviving rats to determine the degree of lipid peroxidation by using a thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) quantitative analysis.

Results: The 24-h LD50 of paraquat was calculated as 40 mg/kg in our rats. The 24-h mortality was as follows: control group and U-74389G group 0%, paraquat group 30%, and paraquat plus U-74389G group 10%. The TBARS analysis showed no differences between the U-74389G and the control groups. The paraquat group showed significantly increased TBARS levels in the serum and in the kidney and lung tissue compared to the control group($p<0.05$). With U-74389G, the increased TBARS levels were significantly decreased in the plasma, kidney, and lung tissues compared to the paraquat group($p<0.05$). However, in the liver tissue, there were no significant differences among the groups.

Conclusion: A 21-aminosteroid antioxidant, U-74389G, improved the survivablity of paraquat-intoxicated rats through the suppression of lipid peroxidation. Our result suggests the possibility of clinical application of this drug as an antidote for paraquat poisoning.

Key Words: Paraquat, Lipid peroxidation, Antioxidant, Aminosteroid

저자연락처: 이한식 서울특별시서대문구신촌동134번지 연세의대응급의학교실
Tel: 02) 361-5790, Fax: 02) 392-3715, E-mail: emer@yumc.yonsei.ac.kr

I. 서 론

파라콰트(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)는 세계적으로 100여 개국에서 흔히 사용되는 제초제로 우리나라에서는 그라목손 또는 파라코라는 상품명으로 판매되고 있다. 선진국에서는 파라콰트에 대한 직업적 노출과 사고 및 자살에 의한 사망이 사회적 문제가 되어 이 약물의 사용을 제한하여 왔다[1]. 또한 몇 개 국가에서는 직업적인 사용자가 아닌 경우 5% 미만의 제제만 판매를 허용하고 있다. 한편 우리나라에서는 24.5%의 고농도 제제만 판매되고 있어, 이로 인해 매년 수 백명 이상의 사망자가 보고되고 있는 실정이다[2].

파라콰트는 소화기계는 물론 점막과 피부를 통해 흡수가 가능하며 중독 증세로는 직접 접촉된 피부나 안점막의 괴사 및 구강과 소화기 점막의 부식을 유발하고 인후두와 기관 등의 호흡기에 침범하여 급성 호흡부전을 일으키기도 한다. 흡수된 제초제는 간독성과 신부전 등의 전신적 독성을 유발하게 되고 여러 가지 양상으로 폐손상을 진행시켜 결국 호흡부전에 이르게 한다. 파라콰트가 독성을 일으키는 기전은 조직내에서 산화 환원의 주기적 순환을 통하여 이루어 지는데, 간과 폐 및 신장의 미세소체(microsome)에서 이루어지며 이때 생성된 유리기로 인해 단백질 효소의 불활성화, 지질 과산화 및 DNA 분절화를 통해 세포 손상을 일으키게 된다고한다[3].

한편, U-74389G는 항산화제인 21-aminosteroid의 일종으로서 강력한 철의존성 지질 과산화 억제제이다. 즉, 지질 과산화에 의해 야기되는 세포막 파괴를 억제하고 지질 과산화물 및 산소 유리기 등의 제거를 통해 항산화 작용을 나타내게 된다[4]. 연구자들은 파라콰트 중독시 독성의 주된 기전인 지질 과산화를 억제함으로써 흰쥐에서 생존률을 향상시킬 수 있다라는 가설을 확인하기 위해 본 실험을 계획하였다.

II. 대상과 방법

근교계인 위스타(Wistar) 흰쥐(체중 250~350 g)를 실험에 사용하였다. 쥐들은 SPF 환경에서 사육되었으며 물과 먹이에 자유롭게 접근할 수 있었다. 먼저 파라콰트 투여 용량의 결정을 위해 할로탄 흡입마취하에서 파라콰트 원액(Zeneca Agrochemicals, Fernhurst, Haslemere, UK)을 0.5%로 희석하여 체중당 20, 35, 50 mg씩 복강내 투여하였다(각 8마리). 24시간동안 생존여부를 관찰하여 LD50을 구하였다.

다음으로 U-74389G의 치료효과를 알아보기 위하여 같은 방법으로 마취한 다음, 대조군(4 마리), U-74389G 투여군, 파라콰트 투여군, 파라콰트와 U-74389G 투여군(각 10마리)으로 나누었다. 파라콰트는 0.5% 용액 35 mg을 복강내 투여하였으며, U-74389G(Upjohn Co., Kalamazoo, MI)는 10% intralipid 1 ml에 0.1N HCl 1 ml 당 U-74389G 25 mg를 용해시킨 용액 0.25 ml를 첨가한 후 pH 6.8이 되도록 하여 10 mg/kg씩 2회 복강내 투여하였으며 투여시간은 U-74389G 군은 초기와 12시간 후, 파라콰트와 U-74389G 투여군은 파라콰트 투여 1시간 후와 12시간 후에 투여하였다. 24시간 후 쥐를 희생시켜 혈장, 폐, 간, 신장 조직을 얻어 -70 C에서 보관하였다.

TBARS의 정량분석을 통하여 지질 과산화의 정도를 확인하였는데 Ohkawa법을 변형한 방법으로 측정하였다[5]. 이를 요약하면 0.1M Tris-HCl(pH 7.4)을 첨가하면서 조직을 균질화시킨 후 0.2 ml를 취하여 8% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml에용해시킨 다음 0.8% 4,6-dihydroxy-2-mercapto-pyrimidine(TBA, 2-thiobarbituric acid)와 20% acetic acid(pH 3.5)를 각각 0.4 ml 씩 첨가한 후 100 C에서 1시간 동안 가열하였다. 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 상층액의 발색복합체를 추출하여 분광광도계로 파장 535nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 1,1,3,3-tetraethoxy propane을 사용하였고, 각 조직에 대해 Bradford 방법으로 단백질 정

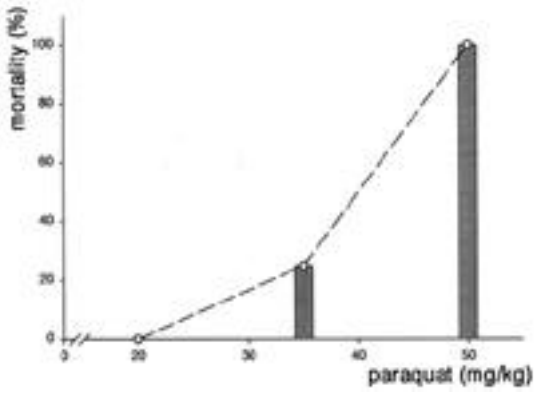

그림 1. 파라콰트 20, 35, 50 mg/kg를 복강내 투여했을 때의 24시간 사망률. 흰쥐의 24시간 LD50은 40 mg/kg로 계산됨

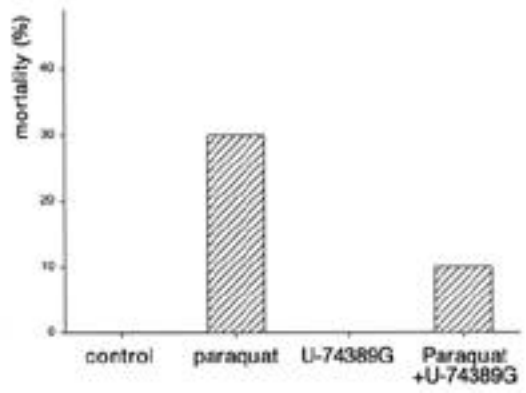

그림 2. 각 군의 24시간 사망율 비교. 대조군(0/4), 파라콰트 투여군(3/10), U-74389G 투여군(0/10), 파라콰트+U-74389G 투여군(1/10)

표 1. TBARS를 이용한 각 장기별 지질 과산화 대사산물.

	혈장	간	신장	폐
대조군 (n=4)	7.20±0.56	0.97±0.02	1.43±0.02	2.02±0.10
U-74389G (n=10)	−	0.95±0.11	1.37±0.19	1.99±0.39
파라콰트 투여군 (n=7)	9.25±0.72*	1.02±0.06	1.61±0.09*	2.22±0.15*
파라콰트+U-74389G (n=9)	8.14±0.40**	0.98±0.06	1.42±0.09**	1.95±0.24**

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances자료는 평균±표준편차 (nmol/mg protein).
*: p<.05, vs 대조군. **: p<.05 vs 파라콰트 군.-; 실험 오류로 구할 수 없었음.

량을 실시하여[6] 단백질 mg당 nmol로 표시하였다.

자료는 평균±표준편차로 표시하였으며 SPSS 8.0 프로그램을 이용하여 ANOVA와 Mann-Whitney U test로 분석하였다. p값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

파라콰트 투여량을 결정하기 위한 실험에서 체중 kg 당 20, 35, 50 mg의 3가지 용량으로 복강내 투여했을 때 각 군의 24시간 사망률은 그림 1과 같다. 이 결과를 이용하여 산출된 24시간 LD50은 40 mg이었다. U-74389G의 효과를 보기 위한 실험에서 파라콰트 투여량은 LD50보다 적은 35 mg/kg로 임의로 정하였다. 각 군의 24시간 사망률은 그림 2와 같다.

대조군(n=4), U-74389G 투여군(n=10), 파라콰트 투여군 중 24시간 생존한 7마리, 파라콰트와 U-74389G 투여군 중 24시간 생존한 9마리의 4군에서 혈장 및 조직 TBARS의 값은 표 1과 같다. U-74389G 투여군 중 혈장에서의 TBARS 값은 실험상의 오류로 인해 구할 수 없었으나 다른 조직에서는 대조군과 차이를 보이지 않았다. 파라콰트 투여군은 대조군에 비해 혈장, 신장, 폐의 TBARS 값이 의미있게 증가하였으며($p<0.05$) U-74389G의 투여로 증가된 TBARS 값의 의미있는 감소가 관찰되었다 ($p<0.05$). 그러나 간 조직에서는 군 간에 의미있는 차이가 관찰되지 않았다.

IV. 고 찰

파라콰트는 1882년에 산화환원 지시제로 처음 합성되었고, 1958년 비선택적 접촉형 제초제로서의 효

능이 알려져 영국에서 처음 농약으로 사용되기 시작했다[3]. 하지만 여러 나라에서 직업적 노출과 사고 및 음독에 의한 사망이 사회적 문제가 되어 그 사용을 제한하여 왔다[1]. 일본의 경우 1980년 중반까지 매년 1,300명 가량이 파라콰트 중독으로 사망하였다고 한다. 그 후 저독성의 다이콰트 혼합 제제나 저농도 제재를 보급하고 구토 유발제 또는 염료를 혼합하여 쉽게 인지할 수 있도록 하는 등의 조치를 취하였고, 대중매체를 통한 홍보와 특정 지역 및 사용자에게만 판매를 허가하는 등 일련의 조치를 통하여 사망자 수가 급격히 감소하였다[7,8]. 또한 미국의 경우 위와 같은 노력으로 파라콰트 중독에 의한 사망이 한 해 10명 미만으로 보고되고 있다[3]. 우리나라의 경우에는 1970년 파라콰트가 농약으로 등록된 이후 사용량 및 중독 환자수가 증가되어 왔으나 이에 대한 대책이 전무하였으며, 최근 농약회사에서는 구토유발제 및 염료를 혼합하거나 전체 생산량을 감산하는 등의 조치를 취하고 있으나 현재까지는 뚜렷한 실효를 거두지 못하고 있다.

파라콰트는 세포 내에서 NADPH 의존성 환원에 의해 유리기를 형성하고 파라콰트 유리기는 산소의 존재하에 빠른 산화반응을 일으키며 이는 다시 쉽게 환원된다. 이같은 산화-환원의 순환 반응으로 과산화 유리기 및 히드록실 유리기가 생성되어 지질 과산화, 단백질 및 DNA 변성 등을 통해 세포 손상을 초래한다[3]. 산소 유리기의 생성과 제거의 불균형으로 유리기가 많아질 때 세포나 조직은 산화성 스트레스를 받게 되며 과다한 유리기의 생성은 조직 손상을 유발하여 질병을 일으키거나 악화시키는 요인이 된다고 알려져 있다. 유리기는 파라콰트 중독 이외에도 폐 산소 독성, 성인성 호흡곤란 증후군, 패혈증 등과 관계가 있으며 특히 허혈-재관류 손상에서 산소 유리기는 인체의 거의 모든 장기에서 세포 손상을 일으킨다고 한다[9].

이러한 유리기의 조직 손상은 대부분 지질 과산화에 기인한다. 지질 과산화는 지질 분자에서 두 개의 불포화 결합 사이에 위치하는 메틸렌 그룹으로부터 수소 원자를 추출함으로서 시작되며 결과적으로 새로운 지질 유리기가 형성되어 지질 과산화물 혹은 지질 히드로과산화물을 생성하게 된다. 반응이 지속되면 비교적 안정된 물질인 말론알레히드(malonaldehyde, MDA)가 생성되는데 이를 측정함으로서 산소유리기에 의한 조직 손상 정도를 확인할 수 있다[10-13]. TBARS 검사는 지질 과산화를 측정하는 대표적인 방법으로 지방산의 과산화물인 MDA가 일정한 조건(산성 및 가열)에서 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 발색복합체를 형성하는 것을 이용하는데 이 검사는 지질과산화 및 이에 의한 조직 손상 정도를 잘 반영한다고 알려져 있다[14,15].

파라콰트의 치료로 그 효과가 인정된 것은 아직 없으며 단지 몇 가지 약물에 대해 연구가 진행되어 왔는데 예를 들면 폐에서의 축적 방지(polyamine, D-propranolol 등), 폐로부터의 배출 증가(cyclo-phosphamide, D-propranolol 등), 폐 섬유화 억제(corticosteroid, immunosuppressive agents, fibrinolytic agents, radiotherapy 등) 등이 시도 중이나 연구에 따라 다양한 결과가 보고되고 있다[16,17]. 또한 파라콰트 독성의 주된 기전인 산화-환원 반응의 주기적 순환을 예방하거나 유리기 제거를 목적으로 superoxide dismutase, N-acetylcysteine, deferoxamine 등의 사용에 대한 연구도 진행되고 있다[9,18-20].

연구자들은 항산화 물질 21-aminosteroid의 일종인 U-74389G를 연구에 이용하였는데 21-amino-steroid 제제는 철을 킬레이트화 시키고 철의존성 지질 과산화에 대한 억제 작용이 강하며 지질 과산화물기의 제거와 산소 유리기 제거 등의 기전을 통해 항산화 작용을 나타낸다고 보고되었다[4]. 이 제제는 외상성 뇌손상시 유리기에 의한 신경 세포막의 지질 과산화를 감소시킬 목적으로 개발, 연구되어 왔고 추가적으로 허혈-재관류 손상, 고산소혈증 등의 치료에 사용이 가능하다고 알려졌다[21-23].

U-74389G의 투여 방법과 용량은 연구마다 다양하다. 투여 방법으로는 정맥 주사가 가장 선호되나 복강내 투여도 가능하다고 한다[24,25]. 투여량은 정주일 때 1.5-3 mg/kg의 용량이 많이 선택되나[26,27], 돼지

를 모델로 하여 고용량으로 80 mg/kg 까지 사용한 예도 있다[28]. U-74389G를 복강내로 투여할 경우 많은 용량을 투여해야 하나 U74389G는 pH 4.0 이상에서는 용해가 되지 않으므로 산성 용매에 용해시킨 후 pH를 중성으로 맞추어 사용하는데 이러한 조작에 의해 농도가 낮아져 투여 용적이 커지게 된다. 이와 같은 이유로 본 실험에서는 10 mg/kg의 용량을 선택하였고 이 용량은 약물의 제조회사에서 권장한 복강내 투여용량이지만 복강으로 투여시 약물의 생체이용률이 10% 정도에 불과한 점을 감안하면 적은 용량이라 할 수 있다.

Melchiorri 등은 흰쥐에서 파라콰트의 복강내 투여시 24시간 LD50은 79 mg/kg라고 보고하였다[29]. 그러나 연구자들의 예비 실험에서 79 mg/kg를 복강내 투여한 결과 모두 12시간 내에 사망하여, 파라콰트 투여량을 결정하기 위한 실험을 계획하였다. 파라콰트의 용량을 20, 35, 50 mg/kg로 다르게 하여 투여한 결과 LD50는 35 mg/kg에서 50 mg/kg 사이에 있음을 알 수 있었으며 비록 실험군이 적었지만 그래프를 통하여 산출한 LD50은 40 mg/kg이었다. 따라서 연구자들은 U-74389G의 효과를 보기 위한 실험에서 파라콰트 용량을 산출된 LD50 보다는 적지만 중독 효과를 충분히 나타낼 수 있는 35 mg/kg로 선정하였다. 또한 LD50의 산출시기를 약물 투여 24시간 후로 정하였는데, Melchiorri 등이 보고한 바에 의하면 이 시간 이후에 발생하는 사망은 유리기 생성과 직접적인 연관이 없으며 각 조직 손상에 의한 기능부전이 원인일 가능성이 높다고 하였다.

한편 이 연구는 몇 가지 제한점을 갖고 있는데 첫째, 파라콰트 투여량을 결정하기 위한 실험에서 실험군의 수가 적었고 U-74389G의 치료 효과를 보기 위한 실험에서는 실험동물의 개체수가 적은 점을 들 수 있다. 둘째, 본 실험에서는 파라콰트와 U-74389G를 모두 복강내로 투여하였기 때문에 약물간의 상호작용이 있을 수 있다는 것이다. 셋째, 지질 과산화를 억제함으로서 사망률을 감소시킬 수는 있지만 파라콰트 중독의 사망 원인으로 지질 과산화 이외의 다른 기전이 작용할 수도 있다는 점이다. 이 중 하나로 제시되는 것은, 파라콰트의 산화-환원의 주기적 순환 반응이 계속됨에 따라 NADPH의 결핍으로 세포의 물리적 혹은 생화학적 기능의 부전으로 인해 세포 사망이 초래될 수 있다는 것이다[30]. 따라서 임상적으로 파라콰트 중독에서 U-74389G를 사용하기 위해서는 투여량과 투여 방법에 대한 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

이상의 결과에서 파라콰트에 중독된 흰쥐를 이용한 실험을 통하여 항산화제 21-aminosteroid의 일종인 U-74389G는 혈장, 신장 및 폐 조직에서 파라콰트에 의한 지질 과산화를 억제하는 효과를 보여 사망률을 감소시킴을 알 수 있었고, 파라콰트에 대해 효과가 확실히 보고된 해독제가 없는 상황에서 임상적인 사용 가능성을 제시하였다. 그러나 임상적 사용을 위해서는 투여량과 투여 방법에 대한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Klaassen CD: The basic science of poisons. *Toxicology*. New York, McGraw-Hill, 4th ed. p602-605, 1996.
2. 김성중: 제초제 I. 파라쿼트(Paraquat). *중독백과* p128-130, 1998.
3. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Weisman RS, Howland MA, Hoffman RS: Paraquat and Diquat. *Toxicologic Emergencies*. Stamford, Appleton & Lange, 6th ed. p1475-1484, 1998.
4. Braughler JM, Pregenzer JR, Chase RL: Novel 21-aminosteroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262:10438-10440, 1987.
5. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358, 1979.
6. Bradford MM: A sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.

7. Crome P: Paraquat Poisoning. *Lancet* 8:333-334, 1986.
8. **김성중, 이영수**: Paraquat **중독후생존한** 17**례에대한 임상적관찰**. *대한응급의학회지* 8:93-97, 1997.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 119:598-620, 1992.
10. Dillard CJ, Tappel AL: Fluorescents products of lipid peroxidation of mitochondria and microsome. *Lipids* 6:715, 1971.
11. Hochstein P, Jain SK: Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed Proc* 40:183-190, 1981.
12. Nielsen H: Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein III: Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids* 616:215-224, 1981.
13. Slatter TF: Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 222:1-8, 1984.
14. Jarero DR: Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Methods Enzymol* 12:302-310, 1978.
15. Gutteridge JMC, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biol Sci* 15:129-135, 1990.
16. Bateman DN: Pharmacological treatments of paraquat poisoning. *Hum Toxicol* 6:57-62, 1987.
17. Bismuth C, Ganier R, Baud FJ: Paraquat poisoning. An overview of the current status. *Drug Saf* 5:243-251, 1990.
18. Bernard GR: N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* 91(suppl 3C):54-59, 1991.
19. Bolli R: Superoxide dismutase ten years later: A drug in search of a function. *J Am Coll Cardiol* 18:231-233, 1991.
20. Fantinii GA, Yoshioka T: Deferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 246:1953-1959, 1993.
21. Hall ED, Yonkers PA, McCall JM: Effect of 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg* 68:456-461, 1988.
22. McLaughlin GE, Frank L: Effects of the 21-aminosteroid, U74389F, on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. *Crit Care Med* 22:313-319, 1994.
23. Shenkar R, Abraham E: Effects of treatment with the 21-aminosteroid, U74389F, on pulmonary cytokine expression following hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 23:132-139, 1995.
24. Awasthi S, Gyurasics A, Knight SA, Welty SE, Smith CV: Protein oxidation biomarkers in hyperoxic lung injury in rats: effects of U-74389. *Toxicol Lett* 95:47-61, 1998.
25. Fukuma K, Marubayashi S, Okada K, Yamada K, Kimura A, Dohi K: Effects of lazaroid U-74389G and methylprednisolone on endotoxin-induced shock in mice. *Surgery* 125:420-430, 1999.
26. Lehmann CH, Egerer K, Georgiew A, Weber M, Kox WJ: Inhibition of tumor necrosis factor-α release in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. *Intensive Care Med* 22(Suppl 3):338, 1996.
27. Remmers D, Dwenger A, Grotz M: Attenuation of multiple organ dysfunction in chronic sheep model by the 21-aminosteroid U74389G. *J Surg Res* 62:278-283, 1996.
28. Zhang H, Spapen H, Maikis P: Tirilazad mesylate(U-74006F) inhibits effects of endotoxin in dog. *Am J Physiol* 268:1847-1855, 1995.
29. Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G: Paraquat toxicity and oxidative damage. *Biochemical Pharmacol* 51:1095-1099, 1996.
30. Rose MS, Lock EA, Smith LL, Wyatt I: Paraquat accumulation: Tissue and species specificity. *Biochem Pharmacol* 25:419-425, 1976.