

有機磷系 殺蟲劑가 흰쥐의 Cholinesterase 活性에 미치는 影響

윤 수 홍·김 신 희·박 병 윤*

曉星女子大學校 藥學大學 衛生化學教室, 食品加工學科*

Effects of Organophosphorous Insecticides on Mice Cholinesterase Activity

Soo Hong Yoon, Shin Hee Kim and Byoung Yoon Park*

Lab. of Hygienic Chem., Coll. of Pharm., *Dept. of Food Sci. & Technology,
Hyoosung Women's University, Tajeu, Korea

ABSTRACT

Changes in cholinesterase (ChE) activity, electrophoretic pattern of ChE and histopathologic state on the mice serum, brain and liver by administration of organophosphorous insecticides were studied.

The mice ChE activities on serum, brain and liver decreased by increasing of concentration and time both administration of malathion and DDVP, whereas on serum and brain the activities of the 7 days after administration decreased, and then presented the gradually slight recovery in course of time. The ChE on serum and liver showed many isozyme bands by polyacrylamide gel electrophoresis but several on brain. And isozyme bands disappeared and diffused by administration of organophosphorous insecticides and development of time. The mice liver with administration group of malathion on histopathologic test showed midzonal necrosis between central vein and portal area, and with administration group of DDVP mainly presented portal necrosis on location of portal area.

緒 論

매년 농약의 사용량이 증가함^{1,2)}에 따라 농약의 미분해 잔유물에 의한 人畜毒性, 食品汚染 및 토양과

水質의 汚染등이 심각하게 대두되어^{3,4)} 인류의 건강을 크게 위협하고 있는 실정이다. 더우기 농약은 生體內의 많은 효소들의 生活을 저해⁵⁻⁷⁾하는 것으로 알려져 있고 특히 有機磷系 殺蟲劑는 神經傳達系와 관련이 있는 cholinesterase (ChE)의 活性을 阻害⁸⁾하

는 것으로 알려져 그 연구의 중요성이 더해지고 있다.

ChE는 肝臟에서 생합성되어 血液內에 移行되며 中樞神經系를 포함하여 筋肉, 腺組織, 赤血球 및 기타 조직에 존재한다⁹⁾. 또한 ChE는 일정한 enzyme 특성을 갖지 않고 여러가지 isozyme group으로서 작용하여 acetylcholine에 基質特異性이 없고 choline ester나 非 choline性 ester를 加水分解하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 한편 유기인계 농약의 ChE에 대한 阻害作用은 유기인계 殺蟲劑의 磷酸 ester 부위가 acetylcholine의 ester 부위와 同一한 機轉에 의해서 inhibitor enzyme complex를 형성함으로써 非可逆的 抑制效果를 일으키는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

본 研究에서는 有機磷系 殺蟲劑의 ChE에 대한 阻害정도를 알아보기 위하여 malathion과 DDVP를 흰쥐의 腹腔內投與하여 血清, 腦 및 肝臟중의 ChE의 活性변화, 電氣泳動에 의한 ChE isozyme pattern의 변화 및 肝臟의 病理組織學的 상태를 조사하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

체중 30~32 g의 흰쥐(ICR種) 수컷 36마리를 2個群으로 나누어 第I群은 malathion, 第II群은 DDVP를 각각 投與하고 따로 6마리를 無處理 對照群으로 하였다.

2. 有機인계 溶液의 調製

98% malathion과 50% DDVP를 각각 corn oil 과 glycerin으로 희석하여 0.4 mg/kg, 0.1 mg/kg 및 0.05 mg/kg 용액으로 調製하여 사용하였다.

3. Sample의 調製

각 實驗群을 다시 6마리씩 3個群으로 나누어 malathion과 DDVP 용액을 WHO/FDA 殘留農藥 許容量¹²⁾에 따라 농도를 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg 및 0.4 mg/kg으로 하여 腹腔內注射하였다. 그리고

7일과 14일째에 絶食後 血清, 腦 및 肝臟을 摘出した 후 腦와 肝臟은 조직 1g에 0.0 M phosphate 완충액(pH 7.1) 5 ml를 homogenizer에 넣고 저온에서 충분히 마쇄한 후 4,000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 그 상등액을 사용하였고, 血清은 氷凍액에서 凍結한 全血을 同一한 방법으로 遠心分離하여 使用하였다.

4. Cholinesterase 活性 測定

Reinhold의 방법¹³⁾에 준하여 血清 및 조직 homogenate 0.2 ml에 barbital 완충용액 20 ml로 混和한 다음, 混액 6 ml에 0.01% phenol red액 0.6 ml, 3% acetylcholine chloride 0.6 ml를 순서대로 가하고 즉시 540 nm에서 螢光도를 測定하였다. 계속하여 25°C 水浴上에서 60분간 incubation한 후 螢光도를 測定하여 그 差를 구하여 $\Delta pH(\text{initial pH} - \text{final pH})$ 를 산출하였다.

ChE의 活性은 Michel unit¹⁴⁾($\Delta pH/0.1 \text{ ml, hr}$)로 나타내었다.

5. 電氣泳動

polyacrylamide gel 電氣泳動은 Davis法¹⁵⁾에 준하여 6% polyacrylamide gel과 tris-glycine 완충액(pH 8.3)을 사용하여 150 volt에서 5시간 泳動하였다. 효소는 0.2 M phosphate 완충액(pH 7.1) 50 ml에서 15분간 活性化¹⁶⁾시킨 후 동일 완충액 25 ml, naphthylacetate-acetone 混액 0.5 ml 및 fast blue BB염 10 mg을 첨가하여 incubation후 10% acetic acid액에 넣어 보관하였다.

6. 病理組織學的 檢査

摘出した 肝臟은 2~3 mm 두께로 절단한 후 40% formaline 용액으로 10시간동안 고정시키고, 70% 와 95% ethanol에서 각각 脫水시킨 후 chloroform에 3시간 처리, paraffin으로 포매하여 이를 rotary microtome(American Optical Co.)으로 60 μm 두께로 절단한 후 hematoxylin-eosin 액으로 染色하여 檢鏡하였다.

結果 및 考察

1. 體重 및 臟器의 重量

Malathion과 DDVP 투여시 흰쥐의 체중과 肝臟 및 腦의 重量변화는 Table 1~2와 같았다.

對照群에 대한 malathion 및 DDVP 投與群의 체

Table 1. Body weight, liver weight, LW/BW*, brain weight by malathion administration

Groups	Days	Body weight (g)	Liver weight (g)	LW/BW (%)	Brain weight (g)
Control	0	31.17	1.48	4.75	0.28
I-1**	7	26.00	1.71	6.58	0.39
	14	26.50	1.20	4.53	0.38
I-2	7	27.67	1.34	4.96	0.34
	14	30.00	1.50	5.00	0.37
I-3	7	29.00	1.51	5.21	0.35
	14	29.67	1.62	5.46	0.32

* Liver weight/Body weight.

** I-1 ; 0.05mg/kg malathion, I-2 ; 0.1 mg/kg malathion, I-3 ; 0.4mg/kg malathion.

2. 血清 Cholinesterase 活性 변화

對照群의 血清 ChE活性은 0.20 Michel unit였다. Fig. 1에서와 같이 malathion 投與의 경우 7일 후의 活性은 감소하였으나 14일 후의 活性은 증가하

Table 2. Body weight, liver weight, LW/BW*, brain weight by DDVP administration

Groups	Days	Body weight (g)	Liver weight (g)	LW/BW (%)	Brain weight (g)
Control	0	31.17	1.48	4.75	0.28
II-1**	7	28.67	1.83	6.38	0.65
	14	21.50	1.12	5.21	0.36
II-2	7	27.17	1.77	6.51	0.35
	14	23.38	1.09	4.66	0.38
II-3	7	26.33	1.68	6.38	0.30
	14	23.00	1.29	5.61	0.39

* Liver weight/Body weight.

** II-1 ; 0.05mg/kg DDVP, II-2 ; 0.1mg/kg DDVP, II-3 ; 0.4mg/kg DDVP.

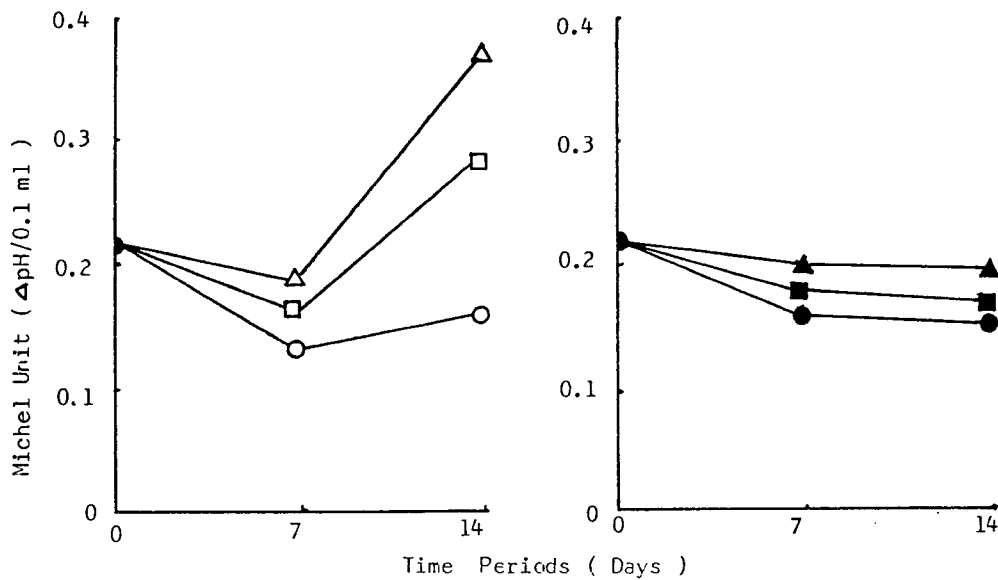


Fig. 1. Changes in activity of mice serum ChE by malathion and DDVP administration. symbols : -Δ-, 0.05mg/kg malathion; -□-, 0.1 mg/kg malathion; -○-, 0.4mg/kg malathion; -▲-, 0.05mg/kg DDVP ; -■-, 0.1mg/kg DDVP ; -●-, 0.4mg/kg DDVP.

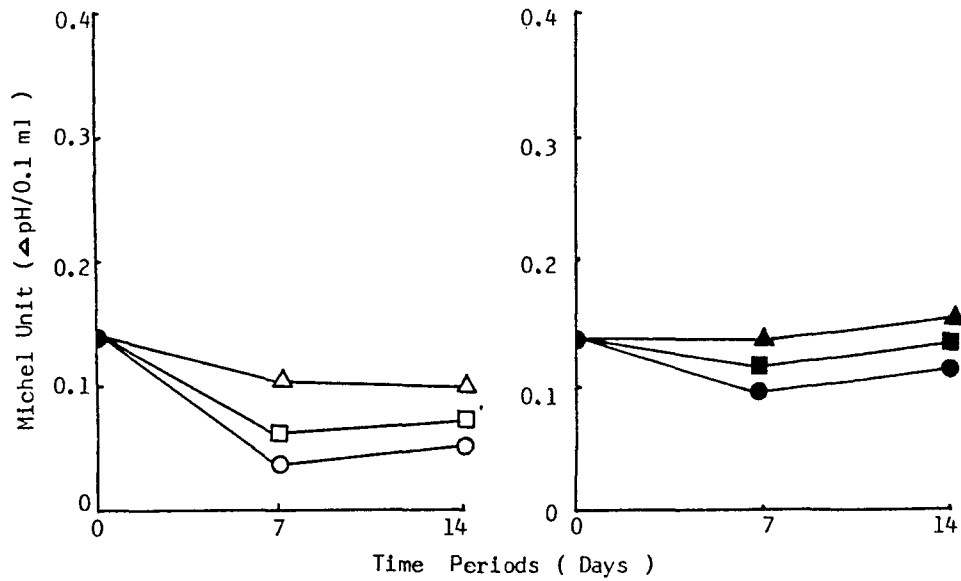


Fig. 2. Changes in activity of mice brain ChE by malathion and DDVP administration. symbols ; Δ , 0.05mg/kg malathion ; \square , 0.1mg/kg malathion ; \circ , 0.4mg/kg malathion ; \blacktriangle , 0.05mg/kg DDVP ; \blacksquare , 0.1mg/kg DDVP ; \bullet , 0.4mg/kg DDVP.

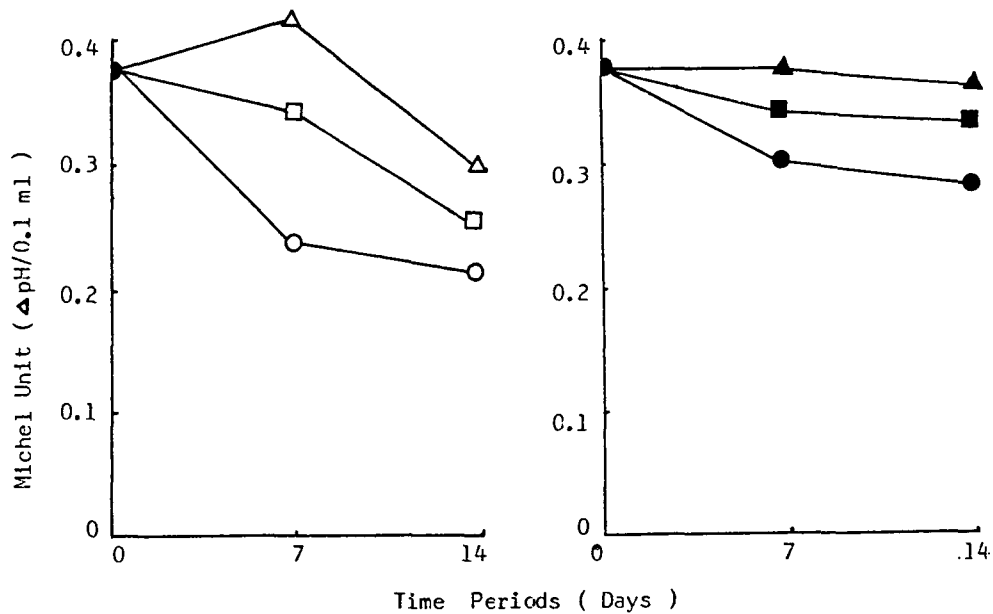


Fig. 3. Changes in activity of mice liver ChE by malathion and DDVP administration. symbols ; Δ , 0.05mg/kg malathion ; \square , 0.1mg/kg malathion ; \circ , 0.4mg/kg malathion ; \blacktriangle , 0.05mg/kg DDVP ; \blacksquare , 0.1mg/kg DDVP ; \bullet , 0.4mg/kg DDVP.

는 경향을 보였으며, DDVP 投與時는 7일과 14일 후에도 계속 감소하였다. 그리고 投與 藥물의 농도가 높을수록 ChE의 活性은 낮게 나타났다.

3. 腦 Cholinesterase 活性 변화

對照群의 ChE의 活性은 0.14 Michel unit이며 malathion과 DDVP의 投與에 따른 ChE의 활성 변화는 Fig. 2에서와 같이 7일째는 감소하다가 14일째는 약간 증가하는 경향을 보였으나 전체적으로는 對照群에 비하여 낮게 나타났다.

4. 肝臟 Cholinesterase 活性 변화

對照群의 肝臟 ChE활성은 0.38 Michel unit이며 Fig. 3에서와 같이 ChE활성 변화는 전체적으로는 腦의 경우와 유사하였으나 0.05 mg/kg 농도의 malathion을 투여하였을 경우 7일째 ChE의 활성은 對照群보다 훨씬 높게 나타났다.

5. Cholinesterase isozyme pattern 변화

Fig. 4는 對照群과 malathion 투여 7일 후, Fig. 5은 投與 14일 후의 血清, 腦 및 肝臟의 polyacrylamide slab gel electrophoresis에 의한 isozyme pattern이다.

주로 specific enzyme을 가지고 있는 腦의 isozyme band와 nonspecific enzyme을 가지고 있는 血清 및 肝臟 ChE isozyme band와는 현저하게 그 數의 差異를 나타내었으며 그리고 投與藥物的 농도와 시간에 따라서 isozyme band의 수와 농도가 감소하였다. 이러한 현상은 ChE total activity의 저하와 관련이 있는 것으로 추정된다.

6. 肝臟의 病理組織學的 所見

1) 肉眼的 所見

對照群의 肝臟은 전 사육기간을 통하여 적갈색이었으며 그 표면은 평활하고 수분에 의해 윤기를 나타내면서 탄력성이 있었다. 그러나 malathion 및 DDVP를 腹腔內 注射한 실험군에서는 1주에서 표면에 황갈색을 띠는 얼룩이 관찰되어 염증성 변화가 수반된 것을 알 수 있었으며, 2주째에는 더욱 進行

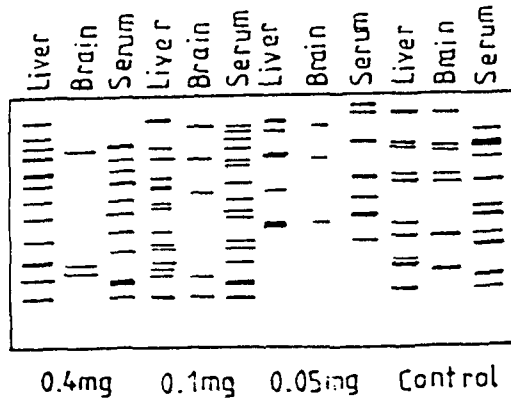


Fig. 4. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of the 7 days after malathion administration.

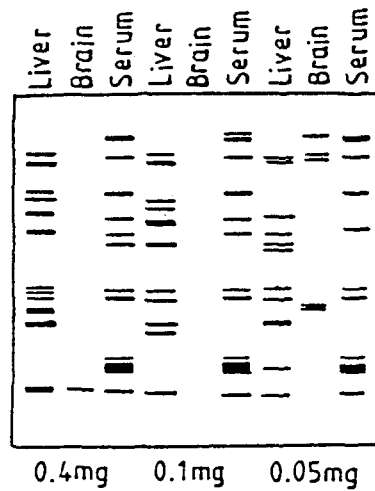


Fig. 5. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of the 14 days after malathion administration.

되었음을 나타내었다.

2) 顯微鏡的 所見

對照群에서 간소엽은 중심정맥을 가운데로 하여 간소엽 배열은 규칙적이었으며, 肝細胞는 균질한 顆粒狀의 세포질을 보여주고 있었다. 동양혈관은 약간 충혈되어 있었으며, Kupper's 세포는 적고 문맥에는 간혹 淋巴球의 침윤을 볼 수 있었다(Fig. 6).

Malathion을 주사한 實驗群은 7일째에 간표면에 호중구, 탐식구의 침윤이 관찰되었고 細胞變性이 있어 malathion에 의한 직접적인 毒性으로 여겨지고,

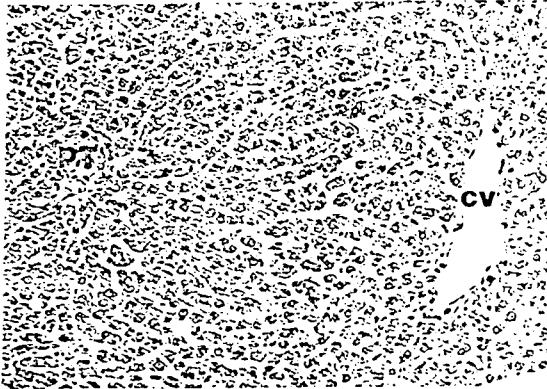


Fig. 6. Mouse liver of control group. A hepatic lobule shows regular arrangements of the hepatic cords composed of uniform hepatocytes. A central vein (CV) and a portal tract (PT) are unremarkable, except mild congestion of the central vein. H-E, stain, $\times 200$.

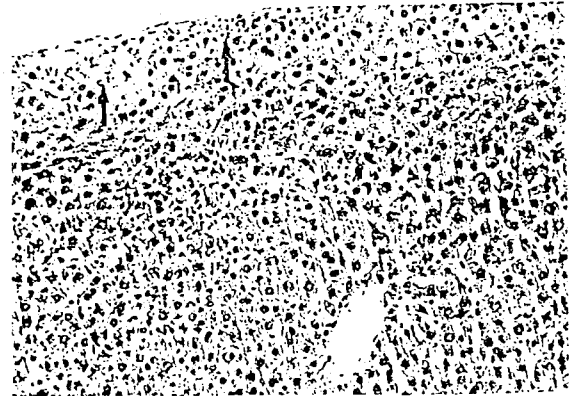


Fig. 7. Mouse liver of the 7days after intraperitoneal injection of malathion, 0.4mg/kg. The surface area of the liver shows neutrophilic infiltration and cellular degradation (arrow). The hepatic cords are unremarkable. H-E stain, $\times 200$.

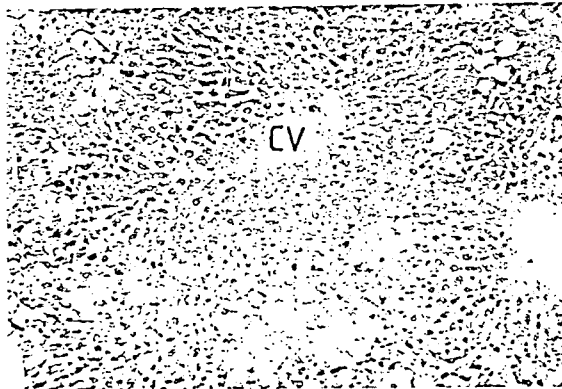


Fig. 8. Mouse liver of the 14days after intraperitoneal injection of malathion, 0.4mg/kg. Necrosis is disclosed in midzonal area of a hepatic lobule. H-E stain, $\times 200$.

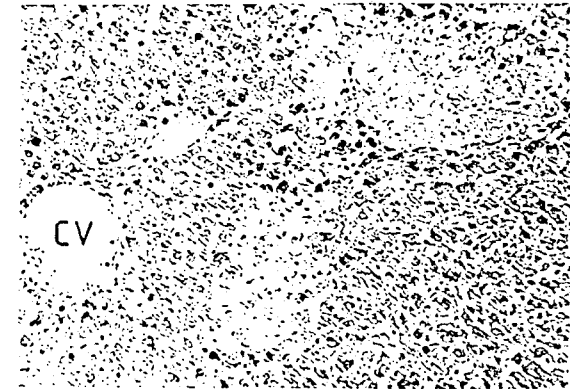


Fig. 9. Mouse liver of the 14days after intraperitoneal injection of DDVP, 0.4mg/kg. Marked portal necrosis is seen. Central veins show congestion. H-E stain, $\times 200$.

간표면의 배열은 전반적으로 경한 不規則性이 보였고 Kupper's 細胞의 증식이 관찰되었다(Fig. 7).

Malathion 注射 14일째는 간세포 괴사가 간소엽의 midzonal area에 경한 염증세포 침윤을 동반하여 관찰되었는데 괴사영역 주변의 肝細胞는 두核을 가진 것도 있어서 再生所見을 보이기도 하였다(Fig. 8).

DDVP를 投與한 실험군에서는 간표면의 직접적인 毒性作用이나 염증변화는 malathion 주사군에 비하여 적었다. 그러나 DDVP 投與 14일째에 간문맥

주변부에 세포괴사가 여러 부위에서 발견되었다(Fig. 9).

摘 要

본 研究는 흰쥐에 有機磷系 農약인 malathion과 DDVP의 投與에 의한 血清, 腦 및 肝臟의 ChE活性, 電氣泳動에 의한 ChE isozyme pattern 및 病理組織學的 상태의 변화를 조사하였다.

血清, 腦 및 肝臟의 ChE 활성은 malathion과

DDVP 投與群에서 농도와 시간이 증가함에 따라 저하하였으며, 血清 및 腦 ChE활성은 7일째는 저하하였으나 시간이 경과함에 따라 다소 회복되는 경향을 나타내었다.

ChE isozyme은 血清 및 肝臟에서는 전기영동상 많은 band가 관찰되었고 腦에서는 소수의 band만이 나타났으며 농약의 투여 농도 및 시간의 경과에 따라 band의 수와 선명도가 감소되었다.

肝臟의 病理組織學的 檢査는 malathion 投與群에서는 central vein과 portal area사이의 midzonal necrosis가 관찰되었으며, DDVP 投與群에서는 portal area에 국한된 portal necrosis가 주된 所見이었다.

參 考 文 獻

1. 農藥工業協會, 農藥年報, 時事文化社, 99 (1984)
2. Yoon, S.H., The study on variation of enzyme activities by environmental contamination. *These Collection Yeungnam Junior College.* 9, 195~198 (1980)
3. 洪鍾旭, 金章億, 殺蟲劑가 土壤環境中 酵素 活性에 미치는 影響. 韓國農化學會誌 29, 294~303 (1986)
4. 洪鍾旭, 金政鎬, Dibnoboton의 土壤 및 溶液中에서의 分解, 韓國環境農學會誌 3, 16~22 (1984)
5. Lin, P.T., Main, A.R., Tucker, W.P., Motoyama, N., Dauterman, W.C., Studies on organophosphorous impurities in technical malathion: Inhibition of carboxylesterase and the stability of isomalathion. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21, 223~231 (1984)
6. Patil, T.N., Fattah, A.S.A.A.E., Plapp, F.W., Koch, R.B., ATPase and dehydrogenase activities from house flies susceptible and resistant to organochlorine insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13, 5~12 (1980)
7. Ahn, Y.J., Shono, T., Fukami, J.I., Linkage group analysis of nerve insensitivity in a pyrethroid-resistant strain of house fly. *Pestic. Biochem.*, 26, 231~237 (1974)
8. Eto, M., Organophosphorous pesticides: Organic and Biological Chemistry, CRC press, 1~168 (1974)
9. 柴田進, 病態生化學, 金芳堂, 京都, 日本, 158 (1973)
10. Bergmeyer, H.H., Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. 5, *Verlchemie.* 52~74 (1984)
11. Michelson, M.J., DavilovM, A.F., Fundamentals of biochemical pharmacology, 221 (1974)
12. 한국과학기술연구소, 우리나라 식품 및 화학물질의 안정성 현황조사 및 방지책수립, WHO/FDA 잔류농약허용량 (1972, 12)
13. Reinold, J.G. et al., Measurement of serum ChE activity. *Amer. J. Clin. Path.*, 23, 645 (1953)
14. Michel, H.O., An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma ChE activity. *J. Lab. and Clin. Med.*, 34, 1564(1946)
15. Davis, B.J., Disc electrophoresis II: Method and application of human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404~427 (1964)
16. Harris, H., Hopkinson, D.A., Robinson, E.B., Two dimensional electrophoresis of Pseudo-ChE components in normal serum. *Nature Dec.*, 96, 29 (1962)