

## Paraquat 유도 폐독성에 대한 Flavonoid류의 독성경감 효과

최 병 기 · 조 내 규

동덕여자대학교 약학대학

## Scavenging Effects of Flavonoids on Paraquat Induced Pulmonary Toxicity

Choi Byung Ki and Nai Kyu Cho

*Dongdock Women's University, College of Pharmacy*

### Abstract

To investigate and evaluate the scavenging and antioxidative effects of various flavonoids on paraquat induced pulmonary toxicity, in vivo and vitro tests of eight flavonoids(catechin, epicatechin, flavone, chrysin, apigenin, quercetin, morin and biochanin A) were carried out.

In vitro test, inhibitory and antioxidative effects of lipoxigenase dependent lipidperoxidation, NADPH dependent cytochrome p-450 reductase to liver and lung microsome and superoxide anion production in rat peritoneal exudated macrophage were studied.

In vivo test, biochemical parameters and cell population in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) in mouse and rats after administration of paraquat and flavonoids were tested.

The results are summerized as follows;

1. All flavonoids tested inhibited on NADPH dependent cytochrome p-450 reductase in liver and lung microsome.
2. All flavonoids tested showed the inhibitory effects on the superoxide anion production in rat peritoneal exudated macrophage.
3. Lactate dehydrogenase, acid phosphatase and total protein in BALF of mouse which increased by the administration of paraquat, decreased significantly by catechin, chrysin, morin and biochanin A.
4. Numbers of alveolar macrophage and PMN in BALF of rats which increased by the administration of paraquat decreased by all the tested flavonoids.

Therefore, all flavonoids tested showed the useful compounds for scavenger and antioxidant on paraquat induced pulmonary toxicity.

## 서 론

Paraquat(1,1'-dimethyl-bipyridilium 4,4'-dichloride)은 농업에 광범위하게 이용되는 제초제로써 사람 및 실험동물에 대해 흡입 및 피부 폭로(노출)에 의해 종종 치명적인 pulmonary fibrosis를 일으키는 경우가 있다.<sup>(1-10)</sup>

포유동물에 있어 paraquat의 일차적인 표적장기는 폐이며 이것은 특수한 energy의존성 polyamine uptake pathway cell내에 paraquat의 선택적 축적 때문에 일어 난다고 하였고, 이와 같은 축적에 의한 폐장해로 폐포 상피세포의 상해, 다형백혈구의 침윤, 폐공강내의 출혈, 폐수종의 형성과 폐포성 조산소증을 일으키고 폐섬유화(fibrosis)로 진전되어 종국적으로 사망한다고 하였다.<sup>(11,12)</sup>

위와 같이 paraquat에 의해 폐독성을 발현할 때 형태학적으로 이상성(二相性)을 나타내는데 초기의 destructive phase에서는 alveolar type I 및 II의 상피세포가 소실되고 아울러 폐포염(alveolitis), 폐수종 및 염증세포의 침윤 등이 보이며 후기의 proliferative에서는 interalveolar 및 intraalveolar fibrosis 등의 각각에 대한 특성을 나타낸다.<sup>(13)</sup>

Paraquat 폭로 후 폐포에서 macrophage와 neutrophil에 의해 alveolitis가 일어남을 형태학적 연구에서 확인된 바 있다.

실제로 미생물 등의 이물이 생체내 진입하면 호중구 및 macrophage 등의 세포막을 자극하여 "respiratory burst"라고 하는 산소 소비반응이 생기고 산소는  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 로 변화하는 myeloperoxidase에 의해 OCI가 되며 곧  $O_2^-$  및 OH로 대사된다.<sup>(14)</sup>

위의 활성산소가 제거되지 않고 과잉축적 될 경우 염증을 일으키는 이때 염증에 의한 조직장해의 발전은 염증세포가 자극을 받았을때 백혈구 유주인자나 단백질 분해효소(lysosome enzyme)를 방출함과 동시에 백혈구 유주인자에 의해 다수의 다형백혈구나 단구가 침윤하여 염증이 확대되고 이물을 탐식할 때 염증 부위에 생성되는 활성산소와 같은 활성물질에 의해 염증세포를 재자극 하여 많은 화학물질이 생성된다.<sup>(15)</sup>

사람의 Alveolar macrophage(AM)유래 neutrophil chemotactic factor가 호중구를 자극하여 단백질분해효소 및 기타 mediator를 방출하는 것으로 보아 AM은 paraquat 자체에 의한 직접손상이나, 조직손상을 조절하는데 중요한 역할을 한다.<sup>(16)</sup> 또한

최근 pulmonary fibrosis발병의 개념은 fibroblast에 대한 접착성 glycoprotein인 fibronectin과 AM 유래 성장인자(AMDGF)인 두개의 mediator가 fibrosis 발달에 중심적인 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>(17,18)</sup>

한편으로 Paraquat 자체의 일반 독성기전은 생체내에서 NADPH 의존성 cytochrome P-450 reductase 및 xanthine oxidase와 관련된 redox cycle에 의해 생성된 paraquat radical 분자상의 산소와 작용하여 활성산소인 superoxide anion과 hydroxy radical이 생성되고 이로 인한 지질과산화에 의한 세포막 손상, hyaluronic acid의 depolymerization, 단백질의 불활성화, DNA의 손상 및 NADPH의 수소탈리에 의한 지방산 생합성의 저해 등이 일어난다.

또한 quinone계 항암제와 같이 세포내 NADPH의 감소로 환원형 glutathion의 감소가 일어나 지질과산화를 촉진하여 장해를 일으킨다.<sup>(19,20,21,22,23)</sup>

본 연구는 paraquat에 유도된 폐독성이 paraquat의 직접 및 간접에 의한 지질과산화 및 염증반응, 신장, 폐 및 적혈구의 세포손상을 야기한다는 점에서 조혈성상관성을 고려하여 항산화 작용과 항염증작용이 기대되는 flavonoid 8종을 가지고 paraquat의 독성기전에 관련된 NADPH 의존성 cytochrome P-450 reductase의 활성 및 흰쥐의 복강삼출 macrophage의 superoxide anion의 생성에 대한 억제 작용을 검토하였다.

또한 paraquat 단독 또는 flavonoid와 병용투여한 마우스 및 흰쥐의 bronchoalveolar lavage fluid (BALF)를 채취하여 마우스의 BALF 중의 lactate dehydrogenase, acid phosphatase 효소활성과 protein의 변동추이 및 이에 대한 flavonoid의 효과와 흰쥐의 BALF 중에서 paraquat 유도독성에 대한 flavonoid가 cell population에 미치는 영향을 검토하기 위해 flow cytometry에 의해 cell size와 granularity를 측정된 결과 paraquat 유도 폐독성의 경감제로써 유용성에 대한 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

체중 200~300g의 수컷 Spraque-Dawley계 흰쥐와 체중 25~30g의 수컷 IRC계 마우스를 국립보건안전연구원에서 분양받아 사용했다.

2) 시료 및 시약

Catechin, Epicatechin, Flavone, Chrysin, Apigenin, Quercetin, Morin, Biochanin A, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin, phenazine methosulfate, nitroblue tetrazolium, NADH, 4-aminoantipyrine, horsedish peroxidase, lipoxxygenase, linoleic acid, paraquat(methyl viologe), thiobarbituric acid 및 Eagl's minimum essential medium은 미국의 Sigma 회사제를 lactate dehydrogenase, acid phosphatase 및 총단백질의 Kit는 인화제약회사제를 사용하였다.

2. 실험방법

1) Lipoxxygenase의존성 지질과산화의 측정

완충액 (50mM HEPES-NaOH, 0.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Alcohol, PH 7.6)을 조제하였다. 시료용액으로 linoleic acid 1 mM, lipoxxygenase 3μg/ml를 함유한 완충액 10ml를 실온에서 진탕하면서 암소에서 10분간 방치하고 전분용액을 지시약으로하여 0.001 N-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>용액으로 적정하고 따로 공시험을 하여 보정하였다.

2) NADPH 의존성 cytochrome P-450 reductase 활성의 측정

ICR계 mouse를 1.15% KCl액을 사용하여 분획원심분리법<sup>(24)</sup>에 의해 분리하여 얻은 간 및 폐의 microsome을 1.05% KCl액에 재 현탁하여 사용했으며, 단백질량은 Lowry법<sup>(25)</sup>에 의해 측정하였다.

1mg protein/ml microsome 1.0ml에 50mM Tris-HCl 완충액(PH 7.5) 0.4ml, 30mM ADP 용액 0.2ml 및 시료용액 10μl를 가해 진탕혼화한 후에 37°C에서 10분간 incubation한다. 다음에 5mM NADPH용액 0.2ml를 가하고 교반하여 측정용 cell에 옮겨 340nm에서의 흡광도를 1분마다 10분간 측정하였다. 대조에는 NADPH 용액 대신에 50mM Tris-HCl 완충액을 사용하였다. NADPH의 분자흡광계수(6.2 × 10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)를 이용하여 흡광도로부터 NADPH양을 산출하고 효소저해율은 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

3) 흰쥐의 macrophage에 의한 SO생성의 측정

(1) 흰쥐 peritoneal exudated macrophage의 조제

SD계 rat(250~300g)에 유동 paraffin 10ml를 복강내 주사(ip)하고 3일후 도살하였다. cell은 새로 조제한 Eagle's minimum essential medium (MEM, 30ml)에 의해 복강으로부터 세척 및 수확하였다. 3~5마리에서 얻은 cell 500g에서 10분간 원심분리한 다음 MEM으로 한번 더 세척하였다. 이때 생존 macrophage는 90% 이상이였다.

(2) Rat macrophage중 superoxide anion의 생성측정

Oyanagui<sup>(26)</sup>의 개량법에 의해 시험하였다. 본 시험계로서 macrophage 1.2<sup>-3</sup> × 10<sup>6</sup>, 125 M sodium phosphate buffer(PH 6.5), DMF에 용해시킨 시료용액 0.03ml, 0.08mM EDTA, 20IU/ml lactate dehydrogenase, 0.32 mM NADH를 사용하였으며, NADH첨가 후 37°C에서 10분간 340 nm에서 NADH의 감소량을 흡광광도법에 의하여 측정하였다.

4) 마우스의 bronchoalveolar lavage fluid(BLAF)의 생화학적 측정

(1) BLAF의 채취법

생리식염수에 용해시킨 paraquat 30mg/kg체중을 다시 복강내 투여 하였다.

투여한 후 5일째에 마우스에 sodium pentobarbital 150mg/kg체중을 정맥주사한 후 신동맥을 절단하여 탈혈시켰다.

Thoracic cavity를 열고 기관지를 절단하여 phosphate buffered saline[PBS(-)]로 trachcannula를 사용하 Henderson 등<sup>(27)</sup>의 방법에 따라 BALF를 채취하고 마우스당 세척액의 전체량은 2ml로 하였다.

세척액은 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 BALF의 시료로 하였다.

(2) BALF의 생화학적 측정

① 총단백질의 측정

총단백질의 양은 Lowry법<sup>(25)</sup>에 의해 측정하였다.

## ② Lactate dehydrogenase의 측정

Lactate dehydrogenase의 효소활성은 Cabaud에 의해 측정하였다.

③ Acid phosphatase의 효소활성은 Alvarez법에 의해 측정하였다.

## 5) Flow cytometry에 의한 흰쥐의 BALF에서 cell population의 측정

SD계 흰쥐(250~300g)을 생리식염수 투여 대조군, paraquat투여군 및 paraquat와 flavonoid 병용투여군으로 하여 paraquat 투여군은 30mg/kg씩을 각각 복강내 주사하고 투여후 paraquat와 flavonoid 병용투여군에는 paraquat를 투여후 5시간 후에 flavonoid를 100mg/kg씩을 각각 투여하였다. 5일째 되는날 각군의 rat에서 Henderson 등<sup>(27)</sup>의 방법에 따라 bronchoalveolar lavage fluid(BALF)를 채취하고 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 BALF중의 세포를 수확하고 냉PBS로 2회 세척 및 원심분리 하였다. Haemocytometer로 세포수를 측정하여  $1 \times 10^6$  세포/50 $\mu$ l되게 PBS로 조정하였다.

Mouse and rat macrophage R-PE(1:10 희석액, Pharmingen, U.S.A)을 가하여 4°C암실에서 반응시켰다.

30분 후에 암실에서 세척완중액(0.1% BSA와 0.1%  $\text{NaN}_3$ 를 함유한 PBS액)로 세포를 세척하므로써 single staining을 종료하였다. single staining이 종료된 세포는 200 $\mu$ l의 1% p-formaldehyde로 고정시킨후 암실에서 flow cytometry로 분석하였다.

Flow cytometer 의한 분석은 FACScan(Beckton-Dickinson, U.S.A)을 사용하여 분석하였다. 공기 냉각장치로 된 15mW argon ion laser(488 nm)를 사용하였으며 자료분석용 software는 Lysis II 프로그램을 사용하였다. Lymphocyte, monocyte, PMN 및 macrophage의 세포분포는 forward scatter(cell size)와 90° side scatter(granularity)에 의한 분포로 구분하였다.

10,000개의 세포를 FACScan 분석에 사용하였고 laser beam에 의해 산란되는 빛을 forward의 영역을 R<sub>2</sub>, macrophage 및 polymorphonuclear neutrophil의 영역을 R<sub>3</sub>로 gating하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Lipoxygenase의존성 지질과산화의 억제 및 항

## 산화효과

Flavonoid lipoxygenase의존성 지질과산화반응에 대한 억제효과 농도(IC<sub>50</sub>)를 검토하여 Table 1에 제시하였다.

실험결과에 의하면 flavon 및 apigenin을 제외한 catechin, epicatechin, chrysin, quercetin, morin 및 biochanin A는 5-lipoxygenase에 의해 linoleic에서 생성된 hydroperoxid에 대해  $0.5 \times 10^{-6}$ - $2.9 \times 10^{-5}$ mM의 농도에서 억제작용을 나타내었다.

또한 상기 flavonoid중 epicatechin, chrysin, morin 및 biochanin A는  $10^{-6}$ mM농도로 현저한 억제효과를 나타내었다.

Leukocyte중의 5-lipoxygenase는 arachidonic acid의 과산화를 촉매하여 5-hydroperoxy-6,8,11,14-icosatetraenoic acid(5-HETE)을 생성하고 이 생성물질의 대사가 진전되어 5-hydroxy-6,8,11,14-icosatetraenoic acid(5-HETE)로 전환한다.

Prostaglandin류 이외 lipoxygenase pathway를 통하여 생성된 arachidonic acid의 대사유도체는 매우 강한 염증원으로 작용할 수 있으며, arachidonic acid의 hydroxyl화된 유도체인 leukotriene B<sub>4</sub>는 지금까지 알려진 PMN의 가장 강력한 chemotactic factor이고, 또한 12-L-hydroxyicosatetraenoic acid(12-HETE)는 잠재적 chemotactic agent이다.

5-lipoxygenase효소로 생성된 다른 hydroxyl화된 유도체인 leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> 및 E<sub>4</sub>는 SRS-A(slow reacting substance of anaphylaxis)의 활성물질이다.

종합적으로 볼때 cyclooxygenase 및 lipoxygenase에 의한 arachidonic acid의 대사유도체는 염증과정중에 중요한 역할을 하며, paraquat유도 간, 신장 및 폐독성이 염증반응을 수반하여 진전되어, 장해를 일으킨다는 점에서 linoleic acid의 lipoxygenase의존성 지질과산화 반응에 대한 flavonoid의 항산화 억제작용은 독성경감제의 개발에 유용함을 시준한다.

### 2. NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase의 저해효과

Paraquat의 독성기전에 관련 있는 NADPH의존성

**Table 1.** Inhibitory Effects of Flavonoids on Peroxidation in Lipooxygenase system.

Flavonoids	IC <sub>50</sub> (mM)
Catechin	2.9 × 10 <sup>-5</sup>
Epicatechin	4.5 × 10 <sup>-6</sup>
Flavone	-
Chrysin	0.5 × 10 <sup>-6</sup>
Apigenin	-
Quercetin	0.75 × 10 <sup>-5</sup>
Morin	2.0 × 10 <sup>-6</sup>
Biochanin A	4.3 × 10 <sup>-6</sup>

cytochrome p-450은 paraquat의 redox cycle 대사를 증가하여 superoxide anion과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하여 세포막의 지질에 지질과산화반응을 하여 세포손상을 초래한다.

NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase을 저해하면 지질의 과산화가 억제되므로 간 및 폐의 microsome을 사용하여 flavonoid의 NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase에 대한 효소저해작용을 검토하고, 그 결과를 Table 2 및 3에 제시하였다.

NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase의 작용에 의하여 NADPH가 소비하므로 효소활성은 반응개시후 10분간의 NADPH의 흡수극대인 340nm에서 흡광도의 경시변화를 측정하여 1분당의 NADPH 소비량(nmol/min/mg protein)으로 표시하였고, flavonoid에 의한 효소저해율은 flavonoid 미첨가시의 NADPH 소비량에서 flavonoid 첨가시와의 차에서 flavonoid 첨가시의 NADPH 소비량에 대해 백분율(%)로 표시하였다.

간 microsome 중에서 NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase에 대한 8종의 flavonoid의 효소저해를 검토한 결과 flavonoid 미첨가시의 NADPH 소비량 5.39nmol/min/mg protein에 대해 0.25~2.75nmol/min/mg protein의 저해농도와 49.7~95.4%의 저해율을 나타내어 flavonoid의 전부가 효소저해효과를 나타내었으며, 이 중에서 catechin, quercetin, morin 및 biochanin A는 효소저해율 70% 이상을 보여 그 효과가 현저하였다. (Table 2)

폐 microsome 중에서 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase에 대한 8종의 flavonoid의 효소저해를 검토한 결과 flavonoid 미첨가시의 NA-

DPH 소비량 1.61nmol/min/mg protein에 대해 0.13~1.05nmol/min/mg protein의 저해농도와 34.8~91.1%의 저해율을 나타내어 flavonoid의 전부가 효소저해효과를 나타내었으며, 이 중에서 flavone, chrysin, apigenin, quercetin, morin 및 biochanin A는 효소저해율 70% 이상을 보여 그 효과가 현저하였다(Table 3).

본 실험에서 사용한 flavonoid가 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase의 효소저해율에 미치는 종류와 작용력의 차이는 약물대사효소의 편재, 약물대사능, 대사기전의 차이 등으로 인한 것이라 추정되며 계속 검토할 부분이라 사료된다. 또한 paraquat 독성 기전 관련효소를 저해하는 것으로 보아 독성경감제로 유용하다고 사료된다.

**3. 흰쥐 macrophage중의 superoxid anion생성 억제 효과**

병태적인 산화적 세포의 손상은 macrophage와 polymorphonuclear neutrophil(PMN)과 같은 식세포로부터 유래하는 과잉의 superoxide anion생성

**Table 2.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on NADPH Dependent Cytochrome P-450 Reductase in Liver microsome.

Flavonoids (1mM)	Consumption of NADPH (n mol/mg protein)	rate Inhibition of cytochrome p-450 reductase % <sup>a</sup> (%)
None	5.39	-
Catechin	1.13	79.0
Epicatechin	2.26	58.0
Flavone	2.40	55.5
Chrysin	2.71	49.7
Apigenin	2.55	52.7
Quercetin	0.73	86.5
Morin	1.61	70.1
Biochanin A	0.25	95.4

Reaction mixture contained liver microsomal protein(1mg), 3.0mM ADP, 0.15mM FeCl<sub>3</sub> and 0.1 mM NADPH in 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) at 30°C for 10 min.

a) Inhibition ratio of reductase(%) =  $\frac{ConC_1 - ConC_2}{ConC_1} \times 100$

ConC1: NADPH consumption rate was measured without sample.

ConC2: NADPH consumption rate was measured with sample.

**Table 3.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on NADPH Dependent Cytochrome P-450 Reductase in Lung microsome.

Flavonoids (1mM)	Consumption rate of NADPH (n mol/mg protein)	Inhibition of cytochrome p-450 reductase(%)
None	1.61	-
Catechin	1.05	34.8
Epicatechin	0.81	49.7
Flavone	0.32	80.1
Chrysin	0.35	78.3
Apigenin	0.24	85.0
Quercetin	0.48	70.2
Morin	0.13	91.9
Biochanin A	0.16	90.1

Reaction mixture contained lung microsomal protein(1mg), 3.0mM ADP, 0.15mM FeCl<sub>3</sub> and 0.1 mM NADPH in 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) at 37°C for 10 min. (λ: 340nm)

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

ConC1: NADPH consumption rate was measured without sample.

ConC2: NADPH consumption rate was measured with sample.

에 의해 일어난다.

흰쥐의 복부삼출 macrophage의 superoxide anion생성과 이에 대한 8종의 flavonoid의 항산화효과를 검색하여 그 결과를 Table 4에 제시하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH)-NADH법에 의해 macrophage시험체서의 SO생성과 억제를 측정 한 결과 모든 flavonoid는 10μM의 농도에서 NADH산화를 억제하였다. 또한 flavone, apigenin, quercetin, morin 및 biochanin A의 NADH산화억제율은 80% 이상을 나타내어 그 효과가 현저하였다.

#### 4. 마우스의 BALF에서 효소활성과 단백질량의 변동

BALF는 독성연구에 있어 화학물질유도에 의한 폐의 염증반응과 폐손상을 평가하는데 유용하게 사용한다.

Paraquat유도 폐세포독성에 대한 flavonoid의 효과를 평가하기 위해 mouse의 BALF를 채취하여 이것중의 효소활성과 총단백질량의 변동추이를 검토하였다.

**Table 4.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on the Production of Superoxide Anion in Rat Peritoneal Exudated Macrophage.

Flavonoids (10μM)	Oxidation of NADPH (n mol/ml)	Inhibition of NADH Oxidation(%)
None	25.3	-
Catechin	14.1	44.2
Epicatechin	13.1	48.6
Flavone	3.9	84.5
Chrysin	6.6	73.7
Apigenin	5.0	80.3
Quercetin	3.9	84.6
Morin	4.1	83.8
Biochanin A	2.8	89.1

효소활성의 측정은 세포가 necrosis될때 방출 및 증가되는 지표효소인 lactate dehydrogenase(LDH)와 세포가 사멸하거나, 이물질의 유입에 따른 alveolar macrophage가 증가할때 방출 및 증가 되는 lysosome효소인 acid phosphatase(ACP)에 대해 실시 하였다. 또한 아울러 화학물질 유도 폐독성에서 alveolar-capillary barrier의 침투성의 증가를 평가할 때 지표로 사용하는 총 가용성단백질량을 측정하였다.

실험은 ICR계 마우스를 대조군(생리식염수 투여), 대조군(paraquat 30mg/kg 체중 투여) 및 실험군(paraquat 30mg/kg 체중 및 flavonoid 100mg/kg 체중 병용투여)하여 투여 5일후에 Henderson 등<sup>(12)</sup>의 방법에 따라 BALF를 채취하였으며 이액의 원심 분리한 상등액에 대해 LDH 및 ACP의 효소활성(mlu/ml) 및 총단백질량(mg/ml)을 측정하여 그 결과를 Table 5에 제시하였다.

그 결과에 의하면 paraquat 단독투여군은 생리식염수 투여 대조군에 비해 LDH 및 ACP의 효소활성이 각각 172±41 및 8.7±1.1mlu/ml에서 695±164mlu/ml(p<0.01) 및 13.9±2.3mlu/ml(p<0.05)으로 현저하게 증가하였으며, 또한 총단백질량도 0.32±0.03mg/ml에서 0.48±0.05mg/ml(p<0.05)으로 증가하였다.

위의 결과는 paraquat 유독성에 의해 폐손상의 destructive phase의 특징인 염증반응과 침윤의 발현으로 기인한다고 사료된다.

Paraquat와 flavonoid 병용투여군은 paraquat 단독투여군에 대해 LDH 및 ACP 효소활성은 LDH의 효소활성이 catechin은 375±79mlu/ml(p<

0.05), chrysin은 398±60mlu/ml(p<0.05) 및 biochanin은 149±20mlu/ml(p<0.01)으로 감소하였으며, ACP의 효소활성이 catechin은 7.5±0.5 mlu/ml(p<0.05), quercetin은 7.4±1.0mlu/ml(p<0.05) 및 biochanin은 6.8±1.0mlu/ml(p<0.01)로 감소하였다.

총단백질의 양에 있어서도 catechin은 0.22±0.03 mg/ml(p0.05), chrysin은 0.20±0.02mg/ml (0.05), morin은 0.19±0.02mg/ml(p<0.01) 및 biochanin은 0.22±0.02mg/ml(p<0.05)으로 감소하였다.

위의 결과에서 morin 및 biochanin A가 LDH 및 ACP의 방출 억제작용과 protein의 삼출 억제작용

이 현저하였다.

5. 흰쥐의 BALF에서 cell population에 대한 영향

Flavonoid가 paraquat유도 BALF중의 cell population에 대한 영향을 검토하고자 flowcytometry에 의해 측정하였다.

10,000개의 세포를 분석에 사용하였고, laser beam에 의해 산란되는 빛을 forward scatter와 side scatter에 나타나는 세포의 분포도에서 lymphocyte(B 및 T cell)의 영역을 R<sub>1</sub>, monocyte의 영역을 R<sub>2</sub> 및 alveolar macrophage(AM)와 polymorphonuclear neutrophil(PMN)의 영역을 R<sub>3</sub>로 gating하여 분석하였으며 이들을 cell population의 백분율로 계산하여 그 결과를 Table 6 및 Fig. 1, 2, 및 3에 제시하였다.

실험결과에서 폐의 염증과 fibrosis의 조정과 여러 가지 기능을 나타내는 단구성 식세포(mononuce-

**Table 5.** Effects of Various Flavonoids on Total protein and Activity of Lactate Dehydrogenase(LDH) and Acid phosphatase(ACP) in Aspirated Mouse Bronchoalveolar Lavage Fluid Pretreated with Paraquat in vivo.

Treatment <sup>a)</sup>	LDH (mlu/ml)	ACP (mlu/ml)	Total protein (mg/ml)
None	172±41	8.7±1.1	0.32±0.03
Paraquat (PQ) alone	695±164**	13.9±2.3*	0.14±0.05*
PQ+ Catechin	375±79†	7.5±0.5†	0.22±0.03†
PQ+ Epicatechin	406±81	9.3±1.4	0.34±0.04
PQ+ Chrysin	398±60†	9.0±1.3	0.20±0.02†
PQ+ Flavone	820±205	14.1±1.7	0.38±0.04
PQ+ Apigenin	984±184	13.7±1.8	0.35±0.04
PQ+ Quercetin	766±127	7.4±1.0†	0.42±0.03
PQ+ Morin	336±56†	8.9±1.3	0.19±0.02**
PQ+ Biochanin A	149±20**	6.8±1.0**	0.22±0.02†

<sup>a)</sup> Mice were first pretreated intraperitoneally with paraquat(0.2ml of 15w/v% solution in saline) 5hrs before treatment with flavonoids(3mg/animal). Then animal was sacrificed 5 days after paraquat treatment.

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with none group  
 †p<0.05, ††p<0.01 compared with paraquat group

**Table 6.** Effects of Various Flavonoids on Rat Bronchoalveolar Lavage Fluid Pretreated with Paraquat in vivo.

Flavonoids	R <sub>1</sub> (Lymphocyte) (%)	R <sub>2</sub> (Monocyte) (%)	R <sub>3</sub> (Mφ, PMN Neutrophil)(%)
None	36.8	2.0	61.2
Paraquat(PQ)	8.3	2.1	89.6
PQ+ Catechin	25.0	2.0	73.0
PQ+ Epicatechin	24.4	1.4	74.2
PQ+ Chrysin	20.7	6.3	73.0
PQ+ Flavone	15.5	1.3	83.2
PQ+ Apigenin	25.1	1.4	73.5
PQ+ Quercetin	21.2	1.3	77.5
PQ+ Morin	14.9	1.1	74.0
PQ+ Biochanin A	20.1	2.3	77.6

\* Rats were first pretreated intraperitoneally with paraquat(30mg/kg body weight) 3hrs before treatment with flavonoids(120mg/kg body weight). Then BALF was recovered washing with PBS(-) 5days after paraquat treatment.

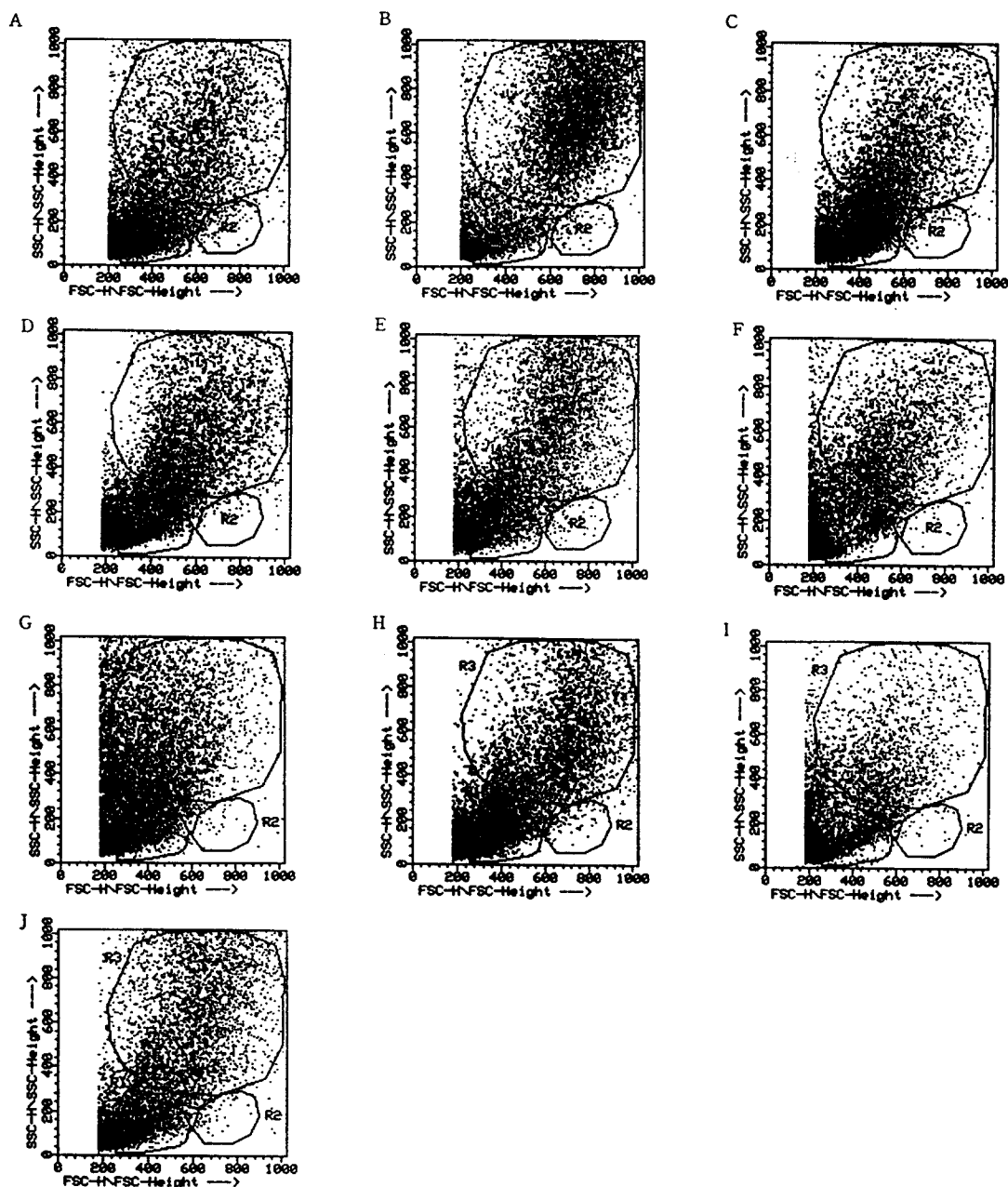


Fig. 1. Effects of various flavonoids on paraquat on pretreated rat bronchoalveolar lavage fluid cell population in vivo. X- and Y-axes denote forward scatter and side scatter, respectively. Rats were first pretreated intraperitoneally with paraquat (30mg/kg body weight) 3 hrs before administration with various flavonoids (120mg/kg body weight). After five days, paraquat-treated BALF was recovered from cannulated lung and washed cells with PBS. The washed cells were stained with anti-rat macrophage monoclonal antibody and analyzed with flow cytometry. Gated areas R1, R2, and R3 are lymphocytes, monocytes, and macrophages, respectively.  
 A: PBS, B: paraquat (PQ) alone, C: PQ+catechin, D: PQ+epicatechin, E: PQ+flavone, F: PQ+chrysin, G: PQ+apigenin, H: PQ+quercetin, I: PQ+morin and J: PQ+biochanin A



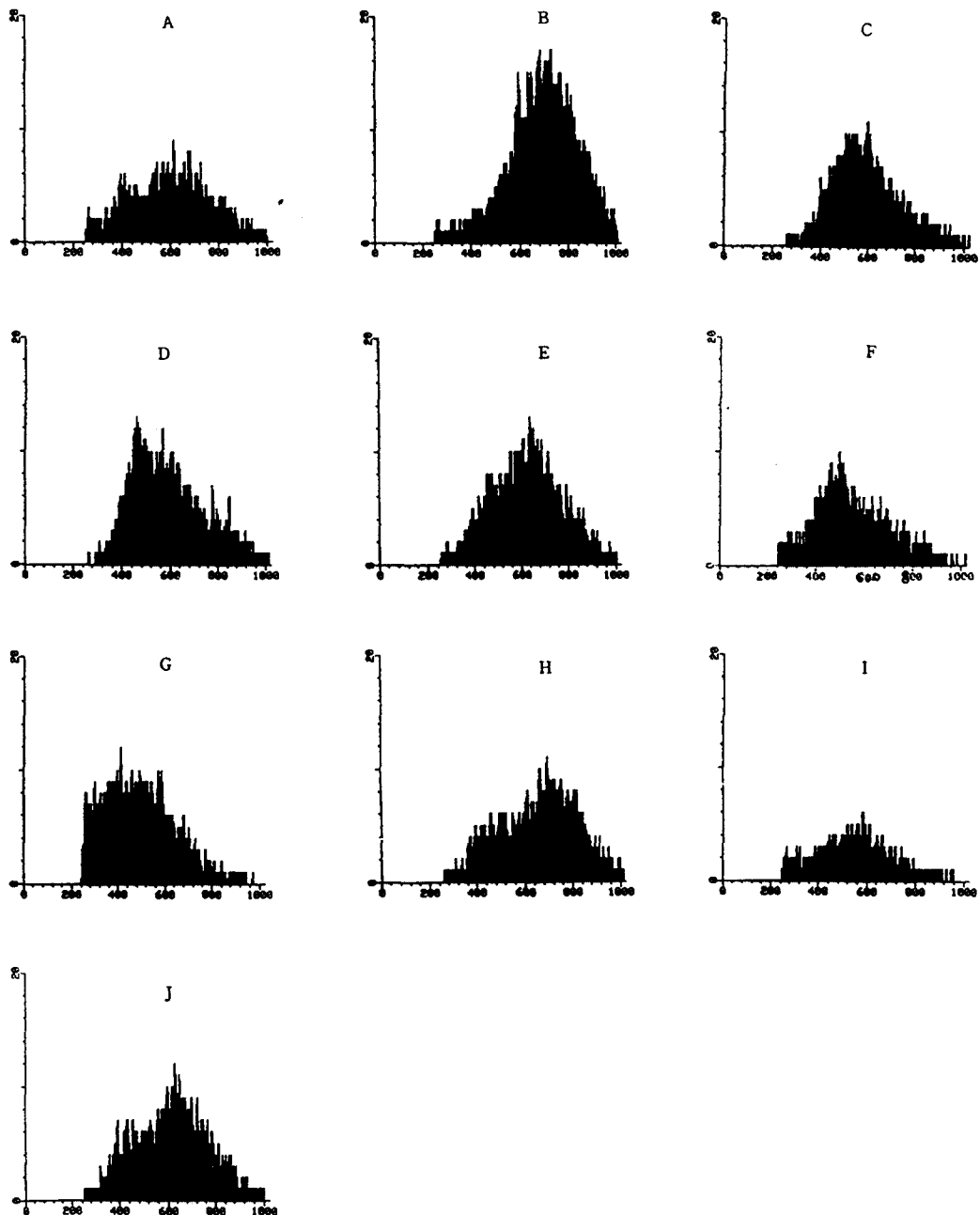


Fig. 2. Effects of various flavonoids on geometric histogram of forward-angle light scatter(FALS) of R3 region cell population of rat pretreated with paraquat in vivo. X-and Y-axes denote cell size(FALS) and corresponding cell number, respectively. The washed cells were stained with anti-rat macrophage monoclonal antibody and analyzed with flow cytometry. Mean values of cell size are as follows:

A:PBS(598), B:paraquat(PQ) alone(699), C:PQ+catechin(593), D:PQ+epicatechin(596), E:PQ+flavone(633), F:PQ+chrysin(556), G:PQ+apigenin(592), H:PQ+ quercetin(607), I:PQ+morin(551) and J:PQ+biochanin A(615)

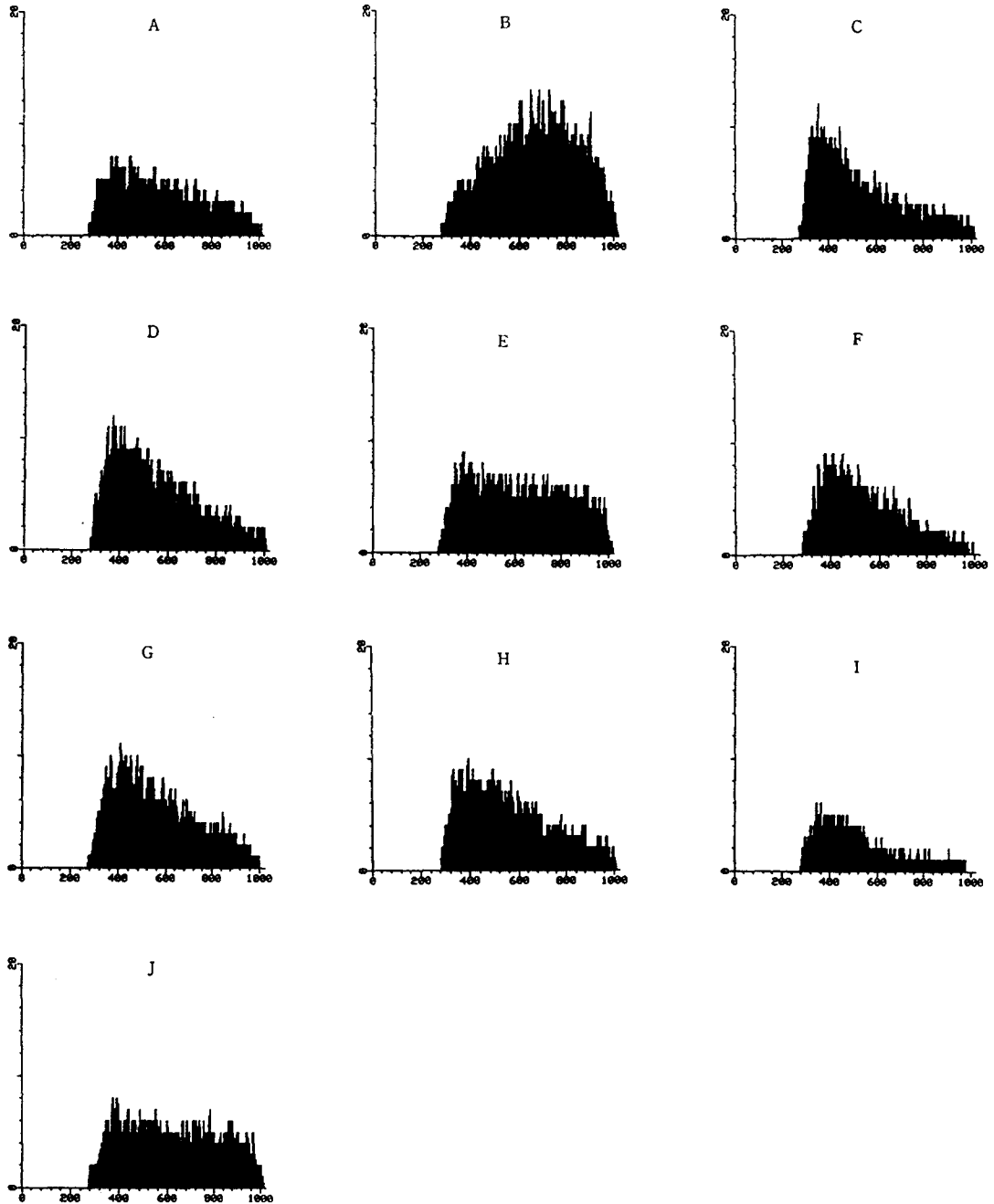


Fig. 3. Effects of various flavonoids on 90 degree light scatter(90LS) of R3 region cell population if rat pretreated with paraquat in vivo. X- and Y-axes denote cell granularity(90LS) and corresponding cell number, respectively. The washed cells were stained with anti-rat macrophage monoclonal antibody and analyzed with flow cytometry. Mean values of granularity are as follows: A:PBS(585), B:paraquat(PQ) alone(678), C:PQ+catechin(531), D:PQ+epicatechin(552), E:PQ+flavone(628), F:PQ+chrysin(534), G:PQ+apigenin(567), H:PQ+quercetin(567), I:PQ+morin(520) and J:PQ+biochanin A(601)

lear phagocytic system)와 더불어 폐 손상에 중요한 인자인 R<sub>3</sub>영역의 세포인 alveolar macrophage (AM) 등을 검토하였다.

그 결과에 의하면 대조군의 R<sub>3</sub>영역 세포분포율은 61.2%에 대해 단독 paraquat 유도의 R<sub>3</sub>영역 세포분포율은 89.6%로 대조에 비해 약 1.5배 증가 하였으나, flavonoid 병용투여군에서는 flavone 및 morin 을 제외한 catechin, epicatechin, chrysin, apigenin, quercetin 및 biochanin A에서 12~16%의 세포감소 분포율을 보여 flavonoid의 영향을 나타내었다.

폐에서 AM의 세포수는 화학적 유도물질의 투여후 염증성 폐장해에서 증가하며, 또한 AM은 생화학적, 형태학적 및 면역학적으로 상이한 heterogeneous subpopulation을 나타낸다.

급성 염증기에서는 소형 및 중형의 AM가, 아급성 염증기에는 AM population의 세포 size와 cytoplasmic vacuole이 크게 증대한다.<sup>(30, 31, 32)</sup>

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>영역이 세포분포율과 더불어 R<sub>3</sub>영역의 cell size와 granularity를 검토한 결과 Fig. 2 및 3과 같이 paraquat 유도의 증대된 cell size와 granularity가 flavonoid의 병용투여에 의해서 세포분포율에 영향을 준 flavonoid가 여기서도 동일하게 축소 및 감소되는 경향을 나타내었다.

상기 결과에 의하면 paraquat에 의하며 선택적으로 유발된 폐조직의 손상은 병용투여한 flavonoid의 항산화작용, 활성산소의 억제작용, 대식세포의 활성화억제 등의 복합적인 기전에 의하여 폐조직의 손상이 유의성 있게 억제된 것으로 사료된다.

## 결 론

Paraquat 유도독성에 대한 catechin, epicatechin, chrysin, flavone, apigenin, quercetin, morin 및 biochanin A 8종의 flavonoid을 대상으로 하여 in vitro 및 in vivo 실험을 통하여 독성경감효과를 In vitro 실험에서는 lipoxygenase계에서의 hydroperoxide의 생성, NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase의 활성화, 흰쥐의 복부 삼출 macrophage의 superoxide anion의 생성에 대해 생성억제, 항산화작용 및 억제작용을 검토하였다.

In vitro 실험에서는 paraquat 유도 폐독성을 평가하는데 유용한 paraquat 유도 bronchoalveolar

lavage fluid을 가지고 세포 및 비세포성의 parameter와 그 영향을 검토한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Catechin, epicatechin, chrysin, quercetin, morin 및 biochanin A는  $2.9 \times 10^{-5} \sim 0.5 \times 10^{-6}$  mM의 IC<sub>50</sub>에서 lipoxygenase계 과산화생성의 억제 및 항산화효과를 나타내었다.
2. 8종의 flavonoid는 간 및 폐 microsome의 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase의 활성을 저해하였다.
3. 8종의 flavonoid는 paraquat 비유도 및 유도의 간 및 폐 microsome의 지질과산화물을 억제 및 항산화효과를 나타내었다.
4. 8종의 flavonoid는 흰쥐의 복강삼출 macrophage에서 superoxide anion의 생성을 억제하였다.
5. Paraquat을 투여한 마우스의 BALF에서 lactate dehydrogenase, acid phosphatase 및 total protein의 효소활성과 양이 증가하였으나 catechin, morin 및 biochanin A에 의해 유의성 있게 감소하였다.
6. Paraquat을 투여한 흰쥐의 BALF에서 macrophage 및 PMN 등의 세포수가 증가하였으나 8종의 flavonoid에 의해 감소하였다.

위의 결과를 종합하여 볼때 8종의 flavonoid는 paraquat에 의한 독성 발현시 독성경감제로써 유용하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Parkinson C., Histopathology, 4(1980)
2. Dasta JF. Paraquat poisoning: a review. Am J. Hosp. Pharm, 35(1978)
3. Haley T.J. Review of the toxicology of paraquat. Clin. Toxicol, 14(1979)
4. Malone J.D.C., Carmody M., Keogh B., Paraquat poisoning: a review of nineteen cases. J. Irish Med. Assoc., 64(1971)
5. Newhouse M., McEvoy D., Rosenthal D., Arch. Dermatol., 114(1978)
6. Gage J.C. Br. J. Ind. Med. 25(1968)
7. Ilett K.R., Stripp B., Menard R.II., Reid W. D., Gillette F.R., Toxicol. Appl. Pharmacol., 28 (1974)

8. Rebello G., Mason J.K., *Histopathology*, 2 (1978)
9. Murray R.E., Gibson J.E., *Exp. Mol. Pathol.* 17(1978)
10. Kimbrough R.D., Linder R.E., *Environ. Res.* 6(1973)
11. Rose, M.S., Smith L.L., Wyatt I., *Biochem. Pharmacol.* 25(1976)
12. Bus, J.S., Gibson, J.E., *Environ. Health Perspect.* 55(1981)
13. Smith, P., Health, D.J., *Pathol.*, 114(1974)
14. Hoffman, M., Autor, A.P., *FEBS Lett.*, 121 (1980)
15. Hett, K.F., Stripp, B., Menard, R.II., Rein, W.D., Gillette, J.R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28(1974)
16. Kazimierowski, J.A., Gallian, J.I., Reynolds, H. Y., *J. Clin. Invest.* 59(1977)
17. Rennare, S.I., Hunninghake, G.W., Bitterman, P.B., Crystal, R.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. HSA*, 78(1981)
18. Gage, J.C., *Biochem. J.* 109(1968)
19. Bus, J.S., Aust, S.D., Gibson, J.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58(1974)
20. Bus, J.S., Aust, S.D., Gibson, J.E., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 11(1975)
21. Bus, J.S., Cagen, S.Z., Olgard, M., Gibson, J. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35(1976)
22. Bus, J.S., Gibson, J.E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 33(1975)
23. Bus, J.S., Gibson, J.E., *Biochem. Toxicol.*, 1 (1979)
24. Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O., Aust, S.D., *J. Biol. Chem.*, 254, 5892(1951)
25. Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265(1951)
26. Oyanagui, Y., *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1473 (1976)
27. Henderson, R.F., Benson, J.M., Hahn, F.F., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5, 451-458(1985)
28. Cabaud, P.G., Wroblewski, F., Ruggiero, V., *Amer. J. Clin. Pathol.* 30, 234(1958)
29. Alvarez, E.F., *Biochem. Biophys. Acta.*, 59, 663(1962)
30. Chandler, D.B., Fuller, W.C., Jackson, R. M., Fulmer, J.D., *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 461-467(1986)
31. Chandler, D.B., Fulmer, J.D., *J. Immunol.*, 139, 893-898(1987)
32. Everson, M.P., Chandler, D.B. *Am. J. Pathol.*, 140, 503-512(1992)