

## Paraquat 유도 간독성에 대한 Hydroxycinnamic acid계 화합물의 독성 경감 효과 (II)

최 병 기, 오 은 정

동덕여자대학교 약학대학

### Scavenging Effects of Hydroxycinnamic acids on Paraquat Induced Hepatotoxicity (II)

Byung-Ki Choi and Eun-Jeung Oh

*College of Pharmacy, Dandong Women's University*

#### ABSTRACT

Antioxidative and scavenging effects were investigated by using two hydroxycinnamic acids (caffeoyl and chlorogenic acids), such as caffeic acid and chlorogenic acid, on oxidative stress and hepatotoxicity that induced by paraquat.

The results are summarized as follows:

1. To assess radical scavenging ability, reduction concentration ( $IC_{50}$ ) of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were measured.  $IC_{50}$  values of caffeic acid and chlorogenic acid were  $29.7 \pm 0.6 \mu M$  and  $26.0 \pm 0.5 \mu M$  respectively. Their radical scavenging activities showed concentration-dependent manner.
2. In  $H_2O_2$ -induced hemolysis assay to rat blood, caffeic acid and chlorogenic acid led to different effects, whose hemolysis inhibition ratios at  $100 \mu M$  were  $45.2 \pm 7.1\%$  and  $11.6 \pm 3.1\%$  respectively.
3. In hypoxanthine-xanthine oxidase system producing superoxide anion, caffeic acid and chlorogenic acid showed different inhibitory activities of xanthine oxidase showing  $36.8 \pm 4.3\%$  and  $5.4 \pm 2.3\%$  respectively.
4. To microsomal NADPH dependent cytochrome p-450 reductase in rat liver, paraquat consumed NADPH at a dose-dependent manner from 0 to  $1 \mu M$  paraquat concentration. Caffeic acid and chlorogenic acid blocked NADPH consumption rates at concentration-dependent manner and inhibition ratios at  $100 \mu M$  were 67.6% and 59.2% respectively.
5. Administration (30 mg/kg, iv) of paraquat to rats caused the marked elevation of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and lipid peroxides (LPO) in the serum and lipid peroxides in the microsome as compared to the control group. Serum GOT, GPT, LDH, ALP and LPO and liver microsomal LPO were reduced significantly by caffeic acid (50 mg/kg), chlorogenic acid (25 mg/kg) and silymarin (150 mg/kg) as compared to the paraquat group.

From these results, caffeic acid and chlorogenic acid exerted their antioxidative agents by removing reactive oxygen substance (ROS) and scavenging effects by inhibiting ROS generating enzyme.

As a general, two hydroxycinnamic acids showed the useful compounds for scavenger and reducer on the paraquat induced hepatotoxicity.

## 서 론

Paraquat (N, N'-dimethyl-4, 4'-bipyridium dichloride; methyl viologen)은 현재 세계적으로 광범위하게 사용되는 비선택적인 bipyridyl계 제초제이다.<sup>1)</sup>

Paraquat는 농약으로서 효용성은 크지만 독성<sup>2), 3), 4)</sup>이 매우 높아 취급자 또는 사용자의 흡입, 피부 노출 및 경구섭취 등의 중독경로를 통해 중독 또는 이로인한 사망의 예가 많다.<sup>5), 6)</sup>

중독의 임상적 소견으로는 위장장애, 간장장애, 신장장애 및 최종적으로 농도 및 시간의존적으로 paraquat가 폐조직에 축적하여 폐장해가 나타나며 호흡억제 및 신부전에 의해 사망하게 된다.<sup>7), 8)</sup> Paraquat의 생화학적 독성기전은 일반적으로 microsomal NADPH-cytochrome p-450 reductase에 의해 paraquat가 redoxcycle에서 radical을 생성하고 분자상의 산소와 반응하여 superoxide anion의 생성과 이의 연쇄 반응에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 OH radical을 생성하여서 이들이 세포막의 지질과산화물 일으켜 세포막 손상, 단백질의 불활성화, DNA의 손상 및 NADPH의 탈리에 의한 지방산 생합성 저해와 GSH 농도의 감소로 생체의 항산화 방어 기전을 약화시킨다.<sup>9), 10), 11), 12)</sup>

현재 Paraquat의 중독을 효과적으로 경감 및 치료할 수 있는 항산화 및 항염증 작용을 갖는 독성 경감제 또는 해독제나 치료제가 거의 없는 실정이다.

이러한 의미에서 본 연구자는 천연의 식물과 과일에 널리 분포되어 있고 caffeetannin으로 알려져 있으며 hydroxycinnamic acid 구조를 갖는 caffeic acid와 chlorogenic acid의 항산화작용을 검색하고 일차적으로 paraquat 간독성에 대한 독성 경감 효과를 검토한 바 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

실험동물은 사육실에서 1주일 이상 적응시킨

체중 200~260 g의 웅성 Wistar계 흰쥐와 체중 25~30 g의 웅성 ICR계 마우스를 사용하였다.

시험기간중 온도는 23±1°C, 습도 55±5°C, 12 시간 조명 등의 사육환경을 유지하였으며 사료와 물은 충분히 공급하였다.

#### 2) 실험시약

시료로서 hydroxycinnamic acid계 화합물인 caffeic acid 및 chlorogenic acid는 Sigma Chemical Co. (st. Louis, MO. U.S.A.)에서 구매하였고, silymarin은 국내제약회사에서 원료 표준품을 제공 받았다.

실험에 사용한 주요시약인 paraquat (methylviologen), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazine (DPPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), hypoxanthine, Xanthine Oxidase (XOD), thiobarbituric acid,는 Sigma사제를, 이외의 시약은 국내에서 시판되는 특급시약을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH)

#### radical의 제거능 측정

DPPH의 메탄올 용액 (1.5 × 10<sup>-4</sup>M) 0.95 ml에 DMSO에 일정농도로 용해시킨 시료 용액 0.05 ml를 가하고 격렬하게 진탕하여 실온에서 15분간 방치한 후 메탄올로 희석하여 전량 5 ml로 만든 후 520 nm에서 흡광도 감소율을 측정하였다. IC<sub>50</sub> (50% scavenging concentration of DPPH radical, μM)는 DPPH의 잔류량 (%) 및 공시험 DPPH의 양 (100%)에서 구하였다.

### 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 응혈 측정

Otomo 등<sup>13)</sup>의 개량법에 의해 측정하였다. 흰쥐의 적혈구 (2 × 10<sup>8</sup>cell)를 함유한 Dulbecco의 인산완충 생리식염수 (Dulbecco' PBS, pH 7.2), 146 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DMF에 용해한 시료용액 (DMF의 최종 농도 0.2%)을 포함한 반응액 2 ml를 37°C에서 서서히 30분간 incubation시킨 다음 빙수 중에서 반응을 정지시킨 후 1,700 × g에서 30분간 원심 분리하여 540 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다.

### 3) Hypoxanthine-xanthine oxidase계에서 xanthine oxidase 활성의 측정

Oyanagui 등<sup>14)</sup>의 개량법에 의해 측정하였다. 측

정용 반응액은 125 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), DMF (dimethyl formaldehyd)에 용해한 시료용액, 0.08 mM EDTA, 20 IU/ml lactate dehydrogenase, 0.32 mM NADH, 40  $\mu$ M hypoxanthine, 0.05 IU/ml xanthine oxidase를 포함한 액 3 ml를 사용하였다. 측정의 시작은 0.32 mM NADH를 첨가하여 37°C에서 10분간 340 nm에서 NADH의 흡광도 감소를 측정하였다.

#### 4) NADPH 의존성 cytochrome p450 reductase 활성의 측정<sup>15)</sup>

ICR계 마우스를 에틸로 마취시킨 후 0.15 M KCl로 간을 관류하고 분획원심분리법에 의해 분리하여 얻은 간의 microsome을 0.15 M KCl에 재현탁하여 사용하였다. 단백질량은 Lowry법에<sup>16)</sup>의 해 측정하였다. 1 mg protein/ml microsome 1.0 ml에 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 0.4 ml, 50 mM paraquat 용액 30  $\mu$ l, 시료용액 각각 30  $\mu$ l를 가해 진탕 혼합한 후에 37°C에서 10분간 incubation하였다. 다음에 5 mM NADPH 용액 0.1 ml를 가하고 진탕하여 최종 3 ml로 조절한 다음 340 nm에서의 흡광도를 1분마다 10분간 측정하였다. 대조에는 동일한 완충액을 사용하였다. NADPH의 분자흡광계수 ( $6.2 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 흡광도로부터 NADPH양을 산출하고 효소 저해율을 구하였다.

#### 5) 동물실험

##### (1) 실험동물 및 약물투여방법

실험동물로는 체중 200 g 내외의 음성 Wistar계 흰쥐를 단백질 15% 및 지방 3% 이상 함유한 시판 혼합사료로 사육하였으며 일주일 이상 사육실 환경에 적응시킨 후 6~8마리를 1개군으로 하여 다음과 같은 실험군으로 하였다.

① 정상군 : 0.9% saline을 단독 투여하였다.

② paraquat (PQ) 1회 투여군 : PQ를 0.9% saline에 용해하여 체중 kg당 30 mg을 정맥내에 투여하였다.

③ PQ 및 hydroxycinnamic acids (caffeic acid 및 chlorogenic acid) 또는 Silymarin 병용투여군 : PQ를 0.9% saline에 용해하여 체중 kg당 30 mg을 정맥내에 투여하고 paraquat 투여 18시간의 30분전과 투여 6시간 후에 caffeic acid는 50 mg/kg 체중, chlorogenic acid는 25 mg/kg 체중, Silymarin 150 mg/kg 체중을 각각 병용하여 투여하였다.

##### (2) 혈청 및 간 microsome 분획의 분리

실험동물을 ether로 마취시키고 복부동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 채혈한 후 간장을 생리식염수 용액으로 관류하여 혈액을 제거한 다음 적출하고 여기에 3배량의 0.25 M sucrose 용액으로 homogenize하였다. 간 homogenate를 Kamath 등<sup>17)</sup>의 방법을 개량한 Cinti 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 조작하여 원심분리한 다음 그 pellet들 microsome 분획으로 사용하였다.

##### (3) 과산화지질의 측정

###### ① serum중의 과산화지질 측정

Rat의 serum 0.1 ml에 0.4 ml의 생리식염수를 가하여 Yagi<sup>19)</sup>의 방법에 의하여 조작한 다음 spectrofluorometer로 emission파장 515 nm, excitation 파장 553 nm에서 측정하였다.

###### ② 간 microsome 분획내의 과산화지질 측정

Rat의 간 microsome분획 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% thiobarbituric acid 시액을 가한 다음 Ohkawa<sup>20)</sup>의 방법에 의해 조작한 다음 발색물질을 분광광도법으로 532 nm에서 측정하였다.

표준액으로는 1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane 5 nmol을 사용했다.

##### (4) 혈청중의 효소활성도 측정

채혈한 rat 혈액을 실온에서 30분간 방치한 다음 2,000 g에서 20분간 원심분리시켜 얻은 혈청에서 혈청중의 GOT, GOT, LDH 및 ALP를 autoanalyzer (Gilford system 3500)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. DPPH radical에 대한 radical 제거효과

Radical scavenger로써 hydroxycinnamic acid계 화합물이 효과가 있는지 여부를 검색하기 위해 안정한 radical제인 DPPH를 가지고 hydroxycinnamic acid계 화합물의 첨가에 따른 DPPH의 50% 감소율 (IC<sub>50</sub>) 측정하여 그 결과를 제시하였다 (Table 1).

Caffeic acid는  $29.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 에서, chlorogenic acid는  $26.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  50% radical 소거효과를 나타내었다.

이러한 효과는 농도 의존적인 경향을 나타내었

**Table 1.** Radical scavenging effects of hydroxycinnamic acids on DPPH radical

Hydroxycinnamic acids	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a)</sup>
Caffeic acid	29.7±0.6
Chlorogenic acid	26.0±0.5

a) Concentration required for 50% reduction of DPPH radical. The mixture contained DPPH methanolic solution and hydroxycinnamic acids dissolved in DMSO. After 15 min, the absorbance of mixture was measured at 580 nm. The results expressed as mean ± standard errors (n=6)

다.

## 2. 적혈구의 용혈 억제 효과

Hydroxycinnamic acid류 화합물의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 적혈구막 과산화와 그에 따른 용혈작용에 대한 억제작용 또는 과산화지질에 대한 항산화 작용을 검토한 결과 caffeic acid는 1~100 μM의 농도범위에서, chlorogenic acid는 1~1000 μM의 농도범위에서 농도의존적으로 용혈 억제효과를 나타내었다.

그러나 caffeic acid는 1000 μM 이상의 농도를 기점으로 용혈을 촉진시키는 경향이 있었는데 이는 caffeic acid가 고농도일 때 시료자체의 세포막에 대한 독성 때문이라고 추정된다.

## 3. Xanthine oxidase 활성의 억제효과

Hypoxanthine-xanthine oxidase계에서 hydroxycinnamic acid류 화합물의 첨가에 따른 xanthine oxidase (XOD)활성의 억제효과를 비교하여 그 결과를 나타내었다 (Table 3).

XOD의 억제효과는 XOD계에서 생성된 superoxide anion에 의해 340 nm에서 시간당 산화되는 NADH의 감소량에서 XOD의 활성을 측정하였다.

실험결과 caffeic acid는 1~100 μM의 범위에서 농도 의존적으로 XOD의 활성을 억제하였으나 chlorogenic acid는 뚜렷한 억제효과를 나타내지 못하였다.

일반적으로 paraquat는 hypoxanthine-xanthine oxidase계에서 paraquat radical이 되어 분자상의 산소에 반응하여 활성산소종이 되고 이것이 세포막의 지질과산화물을 유발한다. xanthine oxidase가 주로 채장, 폐 및 간장에 풍부하게 분포되어 있어 이 부위에서 paraquat의 독성발현의 한 원인이 된

**Table 2.** Inhibitory effects of hydroxycinnamic acids on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced hemolysis

Hydroxycinnamic acids	Conc. (μM)	Inhibition (%)
Caffeic acid	1	23.2±7.5
	10	40.6±5.1
	100	45.2±7.1
	1000	-
Chlorogenic acid	1	2.2±1.4
	10	5.5±2.5
	100	11.6±3.3
	1000	21.1±3.2

Erythrocytes were treated with the mixture of hydroxycinnamic acids at different concentrations with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (146 mM). The percentage of inhibition was calculated from total hemolysis by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results expressed as mean ± Standard errors (n=6)

**Table 3.** Inhibitory effects of hydroxycinnamic acids on xanthine oxidase

Hydroxycinnamic acids	Conc. (μM)	Inhibition (%)
Caffeic acid	1	2.7±0.5
	10	18.4±3.5
	100	36.8±4.3
Chlorogenic acid	1	7.7±1.4
	10	2.8±1.6
	100	5.4±2.3

Reaction mixture contained sodium phosphate buffer (125 mM, pH 6.5), EDTA (0.08 mM), LDH (20 IU/ml) and NADH (0.32 mM). Incubation was started by the addition of NADH at 37°C. XOD (0.05 IU/ml) and hypoxanthine (0.04 mM) were mixed just prior to NADH addition.

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

다.

## 4. NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase 활성의 억제효과

마우스의 간 microsome을 사용하여 NADPH의 의존성 cytochrome p-450 reductase에 대한 paraquat의 효소활성에 대한 영향과 시료인 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 효소억제작용을 검토하고 그 결과를 나타내었다 (Table 4).

NADPH의존성 cytochrome p-450 reductase는 paraquat독성기전에 관련하는 효소로서 이 효소가 활성화되면 NADPH가 소비되므로 효소활성은 반응 개시 후 10분간의 NADPH의 흡수극대파장인 340 nm에서 흡광도의 경시변화를 측정하여 1분당

**Table 4.** Inhibitory effects of hydroxycinnamic acids on NADPH dependent cytochrome p-450 reductase in liver microsome.

Compound added	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Consumption rate of NADPH (n mol/min/mg protein)	Inhibition of Cyt. p-450 reductase (%)
None		$2.92 \pm 0.13$	
Paraquat	100	$1.41 \pm 0.10$	
	500	$1.82 \pm 0.09$	
	1000	$2.75 \pm 0.11$	
Caffeic acid	10	$1.36 \pm 0.07$	50.5
	50	$1.21 \pm 0.10$	56.0
	100	$0.97 \pm 0.08$	64.7
Chlorogenic acid	10	$2.13 \pm 0.11$	22.5
	50	$1.78 \pm 0.10$	35.3
	100	$1.50 \pm 0.08$	45.6

Reaction mixture contained liver microsomal protein (0.1 mg), paraquat (1 mM), NADPH (0.1 mM) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) was incubated at 30°C for 10 min, and the absorbance was measured at 340 nm. The results expressed as mean  $\pm$  standard errors. (n=6)

의 NADPH소비량 (nmol/min/mg protein)으로 표시하였고 시료의 미첨가시와 첨가시의 NADPH소비량에 대한 억제백분율 (%)로 표시하였다. 간 microsome의 NADPH 의존성 cytochrome p-450 reductase에 대한 paraquat의 영향을 검토한 결과 농도의존적으로 효소활성을 증가시켰으나 caffeic acid 및 chlorogenic acid 각각 100  $\mu\text{M}$ 을 첨가할 때 64.7% 및 45.6%의 효소활성 억제율을 나타내었다. Paraquat 독성발현기전에 관여하는 효소를 억제하는 것을 보아서 독성경감제로 유용할 것으로 사료된다.

##### 5. 간장 및 Serum중의 과산화지질량의 변화

Paraquat (30 mg/kg, iv)의 단독투여에 의해 지질 과산화로 생성된 rat의 간 microsome 및 serum중의 과산화지질 (lipid peroxides, LPO) 농도는 정상군보다 현저하게 증가하였으나, caffeic acid (50 mg/kg) 또는 chlorogenic acid (25 mg/kg)의 병용투여에 의하여 유의성 있게 감소되었다 (Table 5).

또한 현재 간질환치료제로 사용하는 Silymarin (150 mg/kg)을 병용투여한 결과 현저하게 LPO 농도가 감소되었고 이의 경향은 caffeic acid 투여시와 유사하였다.

일반적으로 생체내 lipid peroxidation에 의해 간, 신장 및 혈관 등의 관련 질환이 발생하는 것으로

**Table 5.** Effects of hydroxycinnamic acids on lipid peroxides in serum and liver microsome of rats intoxicated with paraquat.

Treatment	Serum	Liver microsome
	LPO (MDA n mol/ml)	LPO (MDA n mol/g)
Control	$2.94 \pm 0.32^a$	$155.1 \pm 26.4^b$
Paraquat (PQ)	$4.66 \pm 0.63$	$394.5 \pm 78.6$
Caffeic acid (50 mg/kg)	$2.57 \pm 0.40^b$	$221.3 \pm 30.9^a$
Chlorogenic acid (25 mg/kg)	$3.32 \pm 0.41^a$	$240.6 \pm 27.3^a$
Silymarin (150 mg/kg)	$2.89 \pm 0.30^b$	$194.7 \pm 21.5^a$

Significantly different from the paraquat treated group. a)  $P < 0.05$ , b)  $P < 0.01$ , c)  $P < 0.001$ . Each sample was given P.O. 18 hr and 30 min. before, and 6hr after the administration of paraquat (30 mg/kg, iv).

LPO; Lipid peroxides, MDA; Malon dialdehyde.

The results expressed as mean  $\pm$  standard errors. (n=6)

알려져 있음을 볼 때 caffeic acid 및 chlorogenic acid는 세포내 LPO 농도의 감소에 의해 간세포에 대한 destructive effect를 경감할 수 있으리라 추정된다.

##### 6. 혈청중의 효소활성 변화

Paraquat 유도 간독성에 대해 caffeic acid나 chlorogenic acid를 각각 병용투여하여 간기능 변화와 밀접한 관계를 갖고 있는 혈청 GPT, GOT, LDH

**Table 6.** Effects of hydroxycinnamic acids on biochemical parameters in rats intoxicated with paraquat

Treatment	GOT (Karmen Unit)	GPT (Karmen Unit)	LDH (Wroblewskiunit)	ALP (K-A Unit)
Control	58.5±9.17 <sup>c)</sup>	24.5±3.20 <sup>b)</sup>	645.1±102.0 <sup>c)</sup>	27.4±5.10 <sup>b)</sup>
Paraquat(PQ)	261.5±43.8	104.2±17.9	1918.6±236.2	58.0±3.57
Caffeic acid (50 mg/kg)	97.1±12.8 <sup>b)</sup>	82.9±11.2 <sup>b)</sup>	1357.0±130.8 <sup>a)</sup>	46.2±2.70 <sup>c)</sup>
Chlorogenic acid (25 mg/kg)	80.5±6.36 <sup>b)</sup>	58.4±12.8 <sup>b)</sup>	1075.3±140.6 <sup>b)</sup>	37.8±4.63 <sup>c)</sup>
Silymarin (150 mg/kg)	75.3±6.40 <sup>b)</sup>	56.9±5.35 <sup>b)</sup>	871.4±152.5 <sup>c)</sup>	36.2±6.22 <sup>c)</sup>

Significantly different from the paraquat treated group. a)  $P < 0.05$ , b)  $P < 0.01$ , c)  $P < 0.001$ . Each sample was given P.O. 18 hr and 30 min before, and 6hr after the administration of paraquat (30 mg/kg, iv).

GOT ; glutamic oxaloacetic transaminase, GPT; glutamic pyruvic transaminase, LDH ; lactate dehydrogenase, ALP ; alkaline phosphatase. The results expressed as mean ± standard errors. (n=6)

및 ALP의 효소활성도의 변화를 측정하여 그 결과를 나타내었다 (Table 6).

혈청 GPT, GOT, LDH 및 ALP의 효소활성은 paraquat 단독투여군 (30 mg/kg, iv)이 정산군에 비해 전체적으로 효소활성이 현저하게 증가하였으나, caffeic acid (50 mg/kg) 및 chlorogenic acid (25 mg/kg) 각각의 병용투여에 의해 전부 유의성 있게 상승억제작용을 나타내었다.

또한 간장질환 치료제인 Silymarin (150 mg/kg)을 병용투여한 결과 chlorogenic acid와 유사효과를 나타내었으며 두 개의 hydroxycinnamic acid계 화합물중 가수분해성 caffeetannin인 chlorogenic acid가 caffeic acid보다 개선효과가 좋았다.

## 결 론

Hydroxycinnamic acid계 화합물인 caffeic acid와 chlorogenic acid를 사용하여 paraquat 유도 간독성에 대한 독성경감 효과를 검토하였다.

1. Caffeic acid 및 chlorogenic acid는 각각  $29.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$  및  $26.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$ 의 농도에서 DPPH radical의 50% 제거효과 ( $\text{IC}_{50}$ )를 나타내었다.

2. Caffeic acid 및 chlorogenic acid는  $\text{H}_2\text{O}_2$  유도용혈작용을 억제하였으며 억제율은  $100 \mu\text{M}$ 에서 각각  $45.2 \pm 7.1\%$  및  $11.6 \pm 3.3\%$ 이었다.

3. Caffeic acid 및 chlorogenic acid는 xanthine oxidase의 활성억제 및 항산화 효과를 나타내었으며  $100 \mu\text{M}$ 에서 억제율은 각각  $36.8 \pm 4.3\%$  및  $5.4 \pm 2.3\%$ 이었다.

4. Caffeic acid 및 chlorogenic acid는 간 microsome의 NADPH의존성 cytochrome P-450 reductase활성을 농도 의존적으로 억제하는 효과를 나타내었다.

5. Paraquat투여에 의해 rat의 간 microsome 및 혈청 중 과산화지질 (LPO)의 농도가 현저하게 증가하였으나 caffeic acid 및 chlorogenic acid투여에 의해 유의성있게 감소되었다.

6. Paraquat투여에 의해 간기능 변화와 밀접한 관계가 있으며 생화학적 parameter인 GPT, GOT, LDH 및 ALP 효소활성이 현저하게 증가하였으나 caffeic acid (50 mg/kg)와 간질환치료제인 Silymarin (150 mg/kg)의 각각 병용투여에 의해 GPT, GOT, LDH 및 ALP의 효소활성이 유의성 있게 감소하여 상승억제작용을 나타내었다.

위의 결과를 종합할 때 caffeic acid 및 chlorogenic acid와 같은 hydroxycinnamic acid계 화합물은 in vitro 및 in vivo에서 활성산소종의 생성을 억제하는 항산화력과 paraquat oxidative stress에서 유래하는 간독성의 경감효과가 있음을 추정할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Grossel. T.A. and Bricker, J.D., Principles of Clinical Toxicology, 2nded, Raven press, 1990; 143-146
- Hartliy, J.B., Grinspan, S. and Root, Rok., Paraquat suicide in a young women—result of therapy directed against the superoxide radical. Yale J.Biol. Med. 1977:

- 50, 481-488
3. Dreisbach, R.H. and Robertson, W.O., Handbook of Poisoning, 12th ed. Lange Medical Publication, Los Altos, California, 1982
  4. Bismuth, C, Schereman, J.M., *et al*, Elimination of Paraquat. Hum. Toxicol., 1987; 6, 63-68
  5. Slater, T.F., Free radical mechanism in tissue injury. Biochem. J., 1984; 222(1), 1-15
  6. Rose, M.S., Smith, L.L., and Wyatt, I., Evidence for the energy-dependent accumulation of paraquat into the lung. Nature, 1974; 252, 314-315
  7. 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
  8. Manzor., Gregotti 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
  9. Bus, J.S., Aust, S.D. and Gibson, J.E. Superoxide and singlet oxygen-Catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl vilolgen) toxicity. Biochem. Biophys. Rev. Commu. 1974; 58, 749-755
  10. Keeling, 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
  11. Ross, W.E., Block, E.R. and Chang, R.Y., Paraquat-induced DNA damage in mammalian cell, Biochim. Biophys. Res Commun. 1979; 91, 1302-1308
  12. Michael, J.K. and Richard, B., Paraquat resistance associated with reduced NADPH reductase in an energy dependent paraquat-accumulation cell line, Arch. Biochem. Biophys., 1989; 274(2), 366-374
  13. Otomo, S. and Fujihira, E., Stabilizing effect of anti-inflammatory drugs on erythrocyte membrane. Yakugaku Zasshi, 1973; 93(6), 782-786
  14. Oyanagui, Y., Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. Biochem. Pharmacol., 1976; 25(13), 1473-1480
  15. Hirayama, T., Mori, Y. and Watanabe, T., Active Oxygen scavenging activity of Cu(II) chelate of imidazole and thiazole derivatives and their antioxidant effect on lipid peroxidation in vitro, Jpn.J. Toxicol. Environ. Health, 1993; 39(5), 437-444
  16. Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin-protein reagent, J.Biol. chem., 1951; 193:265-275
  17. Kamath, S.A., Kummerow, F.A. and Narayan K.A., A simple procedure for the isolation of rat liver microsome. Febs. Letters 1971; 17(1), 90-92
  18. Cinti, K.L., Moldeus, P. and Schenkman, S., Kinetic parameters of drug metabolizing enzyme in Ca<sup>2+</sup> sedimented microsome from rat liver. Biochem. Pharmacol. 1972; 21, 3249-3256
  19. Yagi, K., A simple fluorometric assay of lipoperoxide in blood plasma, Biochem. Med., 1976; 15, 212
  20. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. 1979; 95, 351-358