대 한 외 상 학 회 지
Vol. 18, No. 1, June, 2005

• 원 저 •

파라쿼트를 투여한 백서의 급성 폐 손상 모델에서 메틸렌블루 투여가 Inducible Nitric Oxide Synthase 유전자 발현에 미치는 효과에 관한 연구

서울대학교 의과대학 응급의학교실, 외과학교실*, 제주대학교의과대학 외과학교실**

박현수 · 이창현* · 정성구 · 서길준 · 정성은 · 윤여규***

— Abstract —

The Effect of Methylene Blue on Inducible Nitric-oxide Synthase in a Rat Model of Acute Lung Injury Induced by Paraquat

Hyun Soo Park, M.D., Chang Hyun Lee, M.D.*, Sung Goo Jung, M.D., Gil Joon Suh, M.D., Sung Eun Jung, M.D., and Yeo Kyu Youn, M.D.***

Department of Emergency Medicine and Surgery, Seoul National University College of Medicine
*Department of Surgery, Cheju National University College of Medicine**
*Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine***

Purpose: This study was designed to determine if methylene blue inhibited the lipid peroxidation, the production of NO, and the gene expression of iNOS in acute lung injury induced by paraquat and if the inhibitory effect was dose dependent.

Methods: Female Sprague-Dawley rats were divided into four groups: the control group, the group treated with paraquat only, the group treated with paraquat and a low dose of methylene blue (2 mg/kg), and the group treated with paraquat and a high dose of methylene blue (20 mg/kg). Methylene blue was administered via the jugular vein 1 h after paraquat administration, and animals were sacrificed 6 and 24 h after paraquat administration. Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH) as an antioxidant defense, the plasma NO concentration, and the expression of iNOS mRNA in the lung tissue were measured

Results: Lung MDA contents decreased, with no significant difference between the methylene-blue groups and the paraquat-only group. Lung GSH contents were significantly elevated at 24 h in the methylene-blue groups compared with the paraquat-only group. Plasma NO concen-

* Address for Correspondence : **Gil Joon Suh, M.D.**
Department of Emergency Medicine, Seoul National University College of Medicine
28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel : 82-2-2072-2196, Fax : 82-2-3672-8871, E-mail : suhgil@snu.ac.kr

접수일: 2005년 5월 16일, 심사일: 2005년 5월 18일, 수정일: 2005년 6월 1일, 승인일: 2005년 6월 20일

trations were significantly reduced at 6 and 24 h in the methylene-blue groups compared with the paraquat-only group. There was also a significant decrease in the plasma NO concentration at 6 h in the high-dose methylene-blue group compared with the low-dose methylene-blue group. The expression of iNOS mRNA in the lung tissue was slightly decreased in the methylene-blue groups. It was also markedly increased at 24 h in the paraquat-only group compared with the methylene-blue groups. The gene expression was relatively decreased in the high-dose methylene-blue group compared with the low-dose methylene-blue group.

Conclusion: This study suggests that methylene blue has an inhibitory effect on the plasma NO concentration and the expression of iNOS mRNA in lung injury induced by paraquat. No inhibitory effect of methylene blue on lipid peroxidation or dose-dependent inhibitory effects were clearly shown.

Key Words: Paraquat, Methylene blue, Malondialdehyde, Nitric oxide, Nitric oxide synthase

Ⅰ. 서 론

최근 들어 패혈증이나 패혈증 쇼크는 산화질소의 과다한 분비와 관련이 있다는 보고가 많이 있다. 패혈증 쇼크에서 혈중이나 소변에서 산화질소가 의미있게 증가하는 것으로 알려져 있으며, 산화질소의 양과 내독소혈증, 혈역학적인 이상 사이에 임상적인 연관성이 있다고 보고 되고 있다(1). 산화질소 합성효소중의 하나인 iNOS (inducible nitric oxide synthase)는 일단 발현된 뒤에는 다량의 산화질소를 생성하여 치료에 반응하지 않는 혈관확장을 유발시켜 저혈압을 일으킨다(2,3). 또한 생성된 산화질소는 superoxide radical과 반응하여 peroxynitrite를 형성하며 이 물질은 직접적으로 세포손상을 유발시킨다. 또한 다량의 산화질소는 직접적으로 심근의 기능을 감소시키거나 관상동맥 혈관내피의 손상이나 관상동맥 미세혈관의 수축을 통해 간접적으로 심기능의 이상을 야기 한다(4).

파라쿼트 중독 시 보이는 폐의 급성호흡곤란증후군(ARDS; acute respiratory distress syndrome)은 폐에 직접적 혹은 간접적으로 손상을 주는 급성반응에 대한 결과로서 나타나며, 폐모세혈관과 폐포막의 투과성 증가, 무기폐, 폐동맥압항진, 환기관류이상, 폐단락, 폐포관류감소 등으로 인하여 궁극적으로 저산소증이 발생한다. 특별한 치료가 없으며, 사망률이 매우 높다. 치료로서는 산화질소의 흡입이 폐모세혈관의 확장과 폐동맥압의 감소를 유발하여 저산소증이 개선되고 폐단락이 감소한다는 보고가 많이 있었지만 사망률의 개선은 보고 되지 않았다(5).

메틸렌블루는 메트헤모글로빈혈증의 치료에 사용되는 제제로서, 최근들어 패혈증시 메틸렌블루의 투여는 산화질소의 작용을 억제한다고 보고 되고 있다. 동물실험과 패혈증 환자에서 메틸렌블루의 투여는 수축기 혈압, 확장기 혈압, 평균 동맥압, 전신 혈관 저항을 높여(6-8) 저혈압을 개선하며, 혈압상승제에 대한 반응을 촉진하고 동시에 혈중 산화질소의 농도를 감소시킨다고 알려져 있으나, 심박출량, 말초조직에서의 산소소모량, 산소추출량의 증가는 나타나지 않는 것으로 보고 되고 있다(6,7). 메틸렌블루의 이러한 혈압상승 효과는 정확한 기전이 밝혀져 있지 않으나 guanylate cyclase를 억제함으로써 나타나는 것으로 보인다(7). 메틸렌블루는 단기간 투여 시 평균 동맥압을 증가시키고, 심근수축력과 산소운반능을 개선시켜준다고 알려져 있다(9). 폐 손상과 관련하여 동물실험에서 메틸렌블루의 투여 효과에는 논란이 있으며, 폐포손상을 감소시키고 사망률을 감소한다는 보고가 있는 반면(10), 패혈증 쇼크환자에서 메틸렌블루의 투여는 전신혈관 및 폐혈관을 수축시켜 폐동맥 산소화를 악화시키기 때문에 급성호흡곤란증후군에서는 사용을 제한하여야 한다는 보고도 있다(11).

이상과 같이 파라쿼트 중독 시 급성 폐 손상에 의한 급성호흡곤란증후군이 나타난다는 것은 잘 알려진 사실이다. 하지만 현재까지 이러한 파라쿼트 중

독에 의한 폐 손상에서 메틸렌블루의 투여효과에 관한 연구가 많이 이루어지지 않았고, 산화질소나 산화질소 생성에 관여하는 NOS와 특히 패혈증 시에 증가하는 것으로 알려진 iNOS에 대한 효과도 거의 보고 되지 않았다.

본 연구에서는 파라쿼트 투여로 야기된 급성 폐 손상 모델에서 메틸렌블루의 투여가 지질과산화 및 산화질소의 생성을 억제하고 또한 iNOS의 유전자 발현을 억제하여 급성 폐 손상을 억제하는 효과가 있는지 알아보고자 하였으며, 또한 이러한 효과가 메틸렌블루의 투여 용량에 따라 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 실험동물

1) 실험군

10주령(240~250 g)의 웅성 specific pathogen free Sprague-Dawley 백서(서울대병원 임상의학연소 분양 제품)를 사용하였다. 실험동물군은 실험 2주 전부터 실험실에서 일반사료(Purina, 송탄, Korea)와 물을 먹이면서 주위환경에 적응시켰으며, 실험 시작 6시간 전부터 금식시켰다. 실험군은 메틸렌블루의 투여용량에 따라 다음과 같이 분류하였다.

(1) 대조군; 생리식염수만 투여한 군
(2) 실험군 1; 파라쿼트+생리식염수 정맥 투여군
(3) 실험군 2; 파라쿼트+저용량(2 mg/kg) 메틸렌블루 정맥 투여군
(4) 실험군 3; 파라쿼트+고용량(20 mg/kg) 메틸렌블루 정맥 투여군

대조군과 각 실험군은 12마리로 하였으며, 파라쿼트 투여 6시간과 24시간 후에 각각 6마리씩 희생시켜 검사를 시행하였다(Table 1).

2) 실험동물에 대한 처치

백서에게 ketamine hydrochloride(75 mg/kg)와 xylazine(25 mg/kg)를 대퇴부에 근육주사하여 마취시킨 후 앙아위(supine position)로 눕혔다. 파라쿼트는 20 mg/kg(Sigma, St Louis, MO)를 증류수 0.4 ml에 혼합하여 복강 내로 한차례 투여하였다. 파라쿼트 투여 1시간 후에 광학현미경(× 3, Olympus, Melville, NY USA)으로 보면서 백서의 경정맥을 박리하여 23 guage scalp needle을 삽입하여 정맥로를 확보하였다. 메틸렌블루 저용량 투여군은 파라쿼트 투여 1시간 후 2 mg/kg를 증류수 0.3 ml에 혼합하여 syringe pump (Harvard, USA)를 사용하여 3분에 걸쳐서 서서히 경정맥을 통해서 정맥주사 하였으며, 고용량 투여군은 메틸렌블루 20 mg/kg를 동일한 방식으로 정맥 주사하였다. 파라쿼트만 투여한 군은 파라쿼트 투여 1시간 후 생리식염수를 동량을 정맥주사 하였다. 수액보충을 위하여 모든 군에서 피하에 생리식염수 50 ml/kg를 피하에 주사하였다. 대조군은 특별한 처치를 가하지 않고 피하에 생리식염수만 50 ml/kg를 투여하였다. 각 실험군의 백서는 파라쿼트를 투여한 후 6시간과 24시간에 ketamine hydrochloride(50 mg/kg)를 사용하여 마취시킨 후, 복부와 흉곽을 절개하여 heparin이 발라져 있는 주사기를 사용하여 심장에서 혈액을 채취한 후 즉시 폐를 적출하여 4℃생리식염수로 철저하게 세척한 후, 액체질소에 담가 급냉시킨

Table 1. Study design

Group	Treatment	No. of sacrificed rats		Total (n)
		6 hours after treatment	24 hours after treatment	
Control	No	6	6	12
Group 1	PQ only	6	6	12
Group 2	PQ + Low dose MB	6	6	12
Group 3	PQ + High dose MB	6	6	12
Total (n)		24	24	48

PQ: paraquat; MB: methylene blue

후에 -70℃에 보관하였다. 심장에서 채취한 혈액은 곧바로 4℃에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후에 혈장만 분리하여 -70℃에 보관하였다.

2. 실험방법

1) MDA (malondialdehyde)의 측정

지질과산화의 정도를 알아보기 위한 MDA의 측정은 thiobarbituric acid를 사용하였다(12). 먼저 상기 방법으로 얻은 폐조직 1 g에 1.15% KCl을 9 ml의 비율로 섞어 가위로 잘게 자른 후에 homogenizer (Fisher scientific, Pittsburgh, PA USA)로 7℃에서 10초씩 10번 정도 잘게 빻아 균질화 하였다. 균질화된 조직액 0.1 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml, NaOH로 pH를 3.5에 맞춘 20% acetic acid 1.5 ml, 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 1.5 ml를 혼합하고 증류수를 섞어 4 ml로 만든 후에 95℃의 물에서 30분에서 1시간 둔 후 실온에서 식혔다. 여기에 다시 증류수 1 ml와 흡광도를 높이기 위해 n-butanol과 pyridine을 15:1의 비율로 섞은 혼합액 5 ml를 섞어 1~2분간 흔들어 준 뒤 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액 1~2 ml를 얻어서 분광광도계(Beckman, Fullerton, CA USA)로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화의 정도는 조직 1 g당 MDA의 nmol (nmol/g)로 표시하였다.

2) GSH (glutathione)의 측정

폐조직의 GSH치는 Griffith(13)의 DTNB-GSSG Reductase Recycling Assay방법을 사용하였다. 본 방법은 전체 글루타치온(total glutathione)과 산화형 글루타치온(GSSG, glutathione disulfide)을 측정하는 방법으로써 환원형 글루타치온(GSH)의 측정은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

GSH의 값=전체 글루타치온의 값-½ GSSG의 값

수치는 조직 1 g당 micromole (μmol/g)으로 표시하였다.

(1) 전체 글루타치온의 측정

전체 글루타치온의 측정에 사용하는 제제로 저장완충액(stock buffer)은 0.413 M의 sodium phosphate와 6.3 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)를 사용하여 pH를 7.5로 유지하고, 작업완충액(working buffer)은 저장 완충액에 NADPH를 0.248 mg/ml의 농도로 섞어 4℃에 보관하며 실험당일에 준비하여 사용하였다. DTNB[5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]액은 저장 완충액에 6 mM를 용해시켜 냉동 저장하였다. GSSG reductase는 저장 완충액으로 266 U/ml의 농도로 만들어 4℃에 보관하고 GSH 표준용액은 100 mM GSH를 10,000배 희석하여 사용하였다. 조직내의 전체 글루타치온을 측정하기 위해 동결 보관된 조직을 녹인 후 단백질을 제거하기 위하여 조직량의 10배에 해당하는 5% SSA (sulfosalicylic acid, Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 첨가한 후 homogenizer로 균질화 하였다. 그후 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액 0.01 ml에 증류수 0.19 ml, 작업 완충액 0.7 ml, DTNB 0.1 ml를 혼합하여 잘 섞은 뒤에 6 μl GSSG reductase 용액을 첨가하여 항온기에서 30℃로 유지하면서 분광광도계로 412 nm에서 흡광도의 변화를 1분 간격으로 15분간 측정하였다. 표준 농도 곡선은 검체 용액 대신 GSH 표준 용액을 혼합액에 넣어 GSH를 각각 1 nmol, 2 nmol, 3 nmol, 4 nmol 포함되게 하여 흡광도를 측정하여 작성하였다. 전체 글루타치온 측정치는 검체 용액의 15분간의 흡광도 변화 곡선의 기울기를 이용하여 표준 농도 곡선에서 산출하였다.

(2) GSSG의 측정

GSSG의 측정은 GSH의 자동산화반응을 억제하기 위하여 원심분리된 검체 용액 0.1 ml에 추가로 2-vp(2-vinylpyridine) 2 μl와 triethanolamine 6 μl를 첨가하고 잘 섞은 뒤 60분 후에 전체 글루타치온 측정과 동일하게 측정하였다. GSSG 표준 용액은 50 mM GSSG를 5% SSA 0.1 ml, 2-vp 2 μl, triethanolamine 6 μl로 만든 희석용액으로 희석시켜 0.2 nmol, 0.1 nmol, 0.05 nmol, 0.025 nmol 포함되게 만들어 412 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

3) 혈중 산화질소 측정

액체 용액상태 하에서는 산화질소는 저절로 nitrate (NO_3^-)와 nitrite (NO_2^-) 이온으로 변하

는데 생체 내에서는 이들이 가장 안정된 산화질소 산물이다. 본 연구에서는 nitrate와 nitrite를 합한 산화질소의 농도를 측정하며, 이 방법은 Greiss reagent를 사용하는 kit로 구성되어 있다. 본 방법에서는 nitrate와 nitrite의 농도를 구분하지 않았다(14). 혈중 산화질소의 농도는 μmol/L로 표시하였다.

4) iNOS mRNA 발현 측정

상업용 kit시약(TRI Reagent, Molecular Research Center, Inc, USA)을 사용하여 절제된 폐조직 100 mg에서 RNA를 추출한 뒤, 분광광도계(Beckman, Fullerton, CA USA)를 사용하여 260 nm에서 추출된 RNA의 농도를 측정하였다. 추출된 RNA중 100 ng을 역전사하여 first strand complementary DNA (cDNA)를 만들었다. 역전사에 필요한 반응혼합물은 5 mM $MgCl_2$, 1mM dNTP, 2.5 mM Random Hexmer (Promega, Madison, WI USA), 1 U/μl ribonuclease inhibitor (Promega, USA), and Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (GibcoBRL, USA) 등으로 만들었다. cDNA를 합성한 후에 백서 iNOS와 백서 glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 대한 중합효소연쇄반응(Waltham, MA USA)을 시행한다. 중합효소연쇄반응을 위한 반응화합물은 2 pmol of primer, 2.5 U/μl Taq polymerase(Takara, Tokyo, Japan), 0.8 mM of dNTP, and 1.5 mM $MgCl_2$ 등으로 만들었다. 중합효소연쇄반응은 초기 94℃에서 3분간 denaturation 후 30 cylcle을 시행하며, 각 cycle은 94℃에서 1분간 denaturation 후 58℃에서 1.5분간 annealing을 하고 72℃에서 10분간 elongation한다. 백서의 iNOS cDNA 합성에 필요한 oligonucleotide primer들은 5'-CCCTTCCGAAGTTTC TGGCAGCAGG-3'(sense)와 5'-GGCTGTCA-

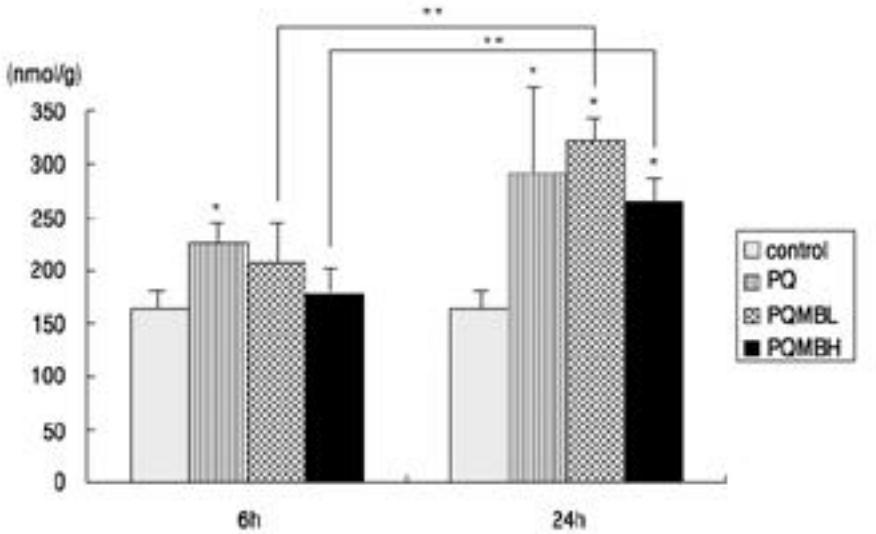

Fig. 1. The effect of methylene blue on lung MDA level.

Lung MDA levels were decreased with no significance in the methylene blue treated groups compared with the paraquat only treated group. There was no significant change in lung MDA level between the high and low dose methylene blue treated groups. Lung MDA levels were significantly elevated between at 6 h and 24 h after operation in the both high and low dose methylene blue treated groups.

PQ: paraquat only treated group; PQMBL: paraquat with low dose methylene blue treated group; PQMBH: paraquat with high dose methylene blue treated group

*: significant compared with the control group

**: significant between at 6 h and 24 h in each group

GAGCCTTGTGCCTTTGG-3'(antisense)이고, 백서의 GAPDH cDNA를 위한 oligonucleotide primer는 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'(sense)와 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'(antisense)이다. Housekeeping gene의 GAPDH의 발현을 control로 하며, GAPDH band가 없는 RNA는 제외시켰다. 증폭된 PCR products는 0.5 μg/ml ethidium bromidewere가 포함된 1.5% agarose 겔에서 전기영동 시킨 후에 자외선으로 검사하였다. iNOS gene과 GAPDH gene PCR products의 크기는 각각 498bp와 309bp로 하였다. 겔 사진촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Seoul, Korea)를 사용해서 스캐닝 하였다.

3. 자료 분석:

SPSS for Windows 11.0 package를 이용한 통계분석법 중에서 one-way ANOVA와 T test를 사용하였다. 각 측정치의 값은 평균±표준편차로 표시하였고 유의검정 수준은 $p < 0.05$로 하였다.

III. 결 과

1. MDA의 변화(Fig. 1)

폐조직에서의 MDA양은 대조군에서는 164.56±14.04 nmol/g 이었다. 6시간 실험군에서의 MDA의 양은 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 225.17±28.94, 207.78±46.87, 177.4±27.65 nmol/g 이었다. 파라쿼트만 투여한 군은 대조군과 비교하여 MDA 양이 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), 메틸렌블루 투여군에서 파라쿼트만 투여한 군에 비해 MDA 양이 감소하였으나, 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며, 메틸렌블루

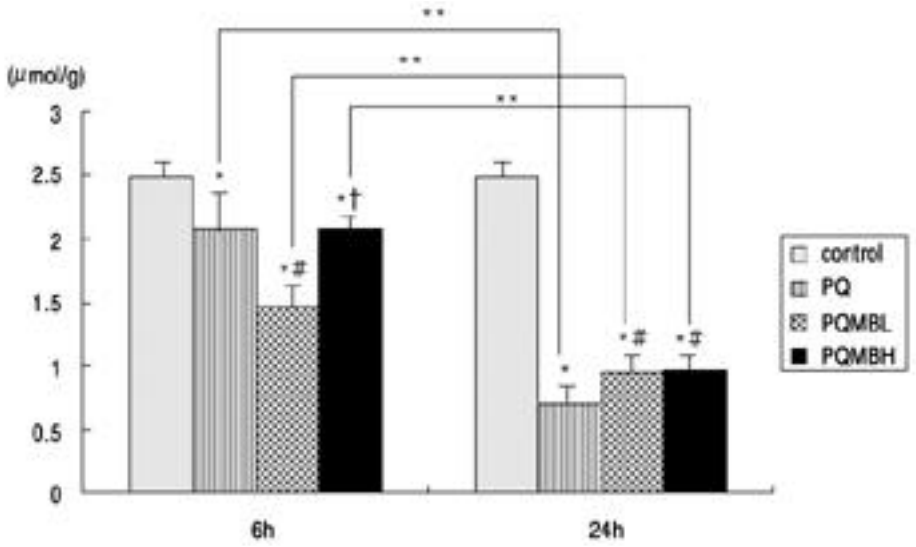

Fig. 2. The effect of methylene blue on lung GSH level.
There was a significant increase in lung GSH content in the high dose methylene blue treated group compared with the low dose methylene blue treated group. Lung GSH contents were significantly elevated at 24 h in the methylene blue treated groups compared with the paraquat only treated group. Lung GSH levels were elevated significantly between at 6h and 24h after operation in all three paraquat treated groups.
PQ: paraquat only treated group; PQMBL: paraquat with low dose methylene blue treated group; PQMBH: paraquat with high dose methylene blue treated group
*: significant compared with the control group
**: significant between at 6h and 24h in each group
#: significant between the high and low dose paraquat treated groups

투여용량에 따른 차이도 없었다. 24시간 실험군에서 MDA의 양은 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 290.66±86.88, 321.55±22.33, 264.85±25.53 nmol/g 로 나타나 세군 모두 대조군과 비교하여 MDA양이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 메틸렌블루 고용량 투여군에서 파라쿼트만 투여한 군에 비해 MDA 양이 감소하였으나, 통계학적으로 의미있는 차이는 없었다. 시간변화에 따른 MDA양은 메틸렌블루 저용량과 고용량 투여군에서 6시간대에 비해 24시간대에 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$).

2. GSH의 변화

대조군 폐조직의 GSH양은 2.48±0.51 μmol/g 이었다. 6시간 실험군의 폐조직 GSH의 양은 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 2.08±0.28, 1.46±0.15, 2.12±0.12 μmol/g 이었다. 대조군과 비교하여 세군 모두 GSH 양의 유의한 감소를 보여주었으며($p < 0.05$), 메틸렌블루 저용량 투여군에서 파라쿼트만 투여한 군과 메틸렌블루 고용량 투여군에 비해 GSH양이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 24시간 실험군에서의 GSH의 양은 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 0.70±0.12, 0.95±0.18, 0.97±0.10 μmol/g 로 나타나 세군 모두 대조군과 비교하여 GSH양이 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). 메틸렌블루 저용량 및 고용량 투여군은 파라쿼트만 투여한 군에 비해 GSH양이 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$), 두군간에 의미있는 차이는 없었다. 시간변화에 따른 GSH양은 파라쿼트만 투여한 군, 메틸렌블루 저용량과 고용량 투여군 모두에서 6시간대에 비해 24시간째 의미있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2).

3. 혈중 산화질소 농도

대조군의 혈중 산화질소의 농도는 17.19±1.85 μ

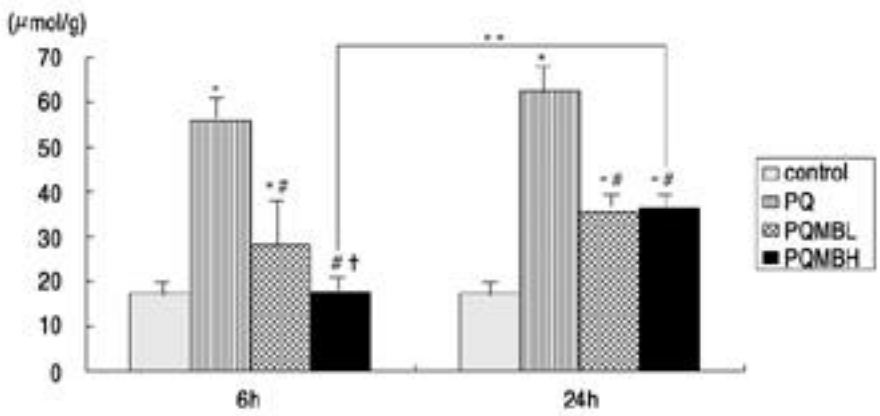

Fig. 3. The effect of methylene blue on plasma NO concentration.
Plasma NO concentrations were significantly reduced at 6 and 24 h in methylene blue treated groups compared with the paraquat only treated group. There was also a significant decrease in plasma NO concentration at 6 h in high dose methylene blue treated group compared with the low dose methylene blue treated group. Plasma NO concentration was also elevated significantly with time in the high dose methylene blue treated group.
PQ: paraquat only treated group; PQMBL: paraquat with low dose methylene blue treated group; PQMBH: paraquat with high dose methylene blue treated group
*: significant compared with the control group
**: significant between at 6h and 24h in each group
#: significant between the high and low dose paraquat treated groups

mol/L 이었다. 6시간 실험군의 혈중 산화질소의 농도는 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 55.71±5.43, 28.27±10.25, 17.81±2.20 μmol/L 이었다. 대조군과 비교하여 파라쿼트만 투여한 군과 저용량 메틸렌블루 투여군에서 산화질소 농도가 증가하였고, 메틸렌블루 저용량 및 고용량 투여군에서 대조군과 파라쿼트만 투여한 군에 비해 혈중 산화질소 농도가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 또한 고용량 메틸렌블루 투여군은 저용량 메틸렌블루 투여군과 비교하여 혈중 산화질소가 유의하게 감소하였다. 24시간 실험군의 혈중 산화질소의 농도는 파라쿼트만 투여한 군, 파라쿼트 투여 후 저용량 메틸렌블루 투여군 및 고용량 메틸렌블루 투여군에서 각각 62.28±6.26, 35.39±2.27, 36.30±2.65 μmol/L 이었다. 혈중 산화질소의 농도는 파라쿼트만 투여한 군에서 대조군에 비해 산화질소의 농도가 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), 메틸렌블루 저용량 및 고용량 투여군은 대조군과 파라쿼트만 투여한 군과 비교하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 시간변화에 따른 혈중 산화질소의 농도는 메틸렌블루 고용량 투여군에서 6시간대에 비해 24시간대에 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 3).

4. 폐조직의 iNOS mRNA의 발현

대조군의 폐조직에서는 iNOS의 유전자 발현이 나타나지 않았다. 6시간 실험군에서 파라쿼트만 투여한 군은 iNOS 유전자 발현이 중등도로 증가하였으며, 메틸렌블루 저용량 및 고용량 투여군에서는 파

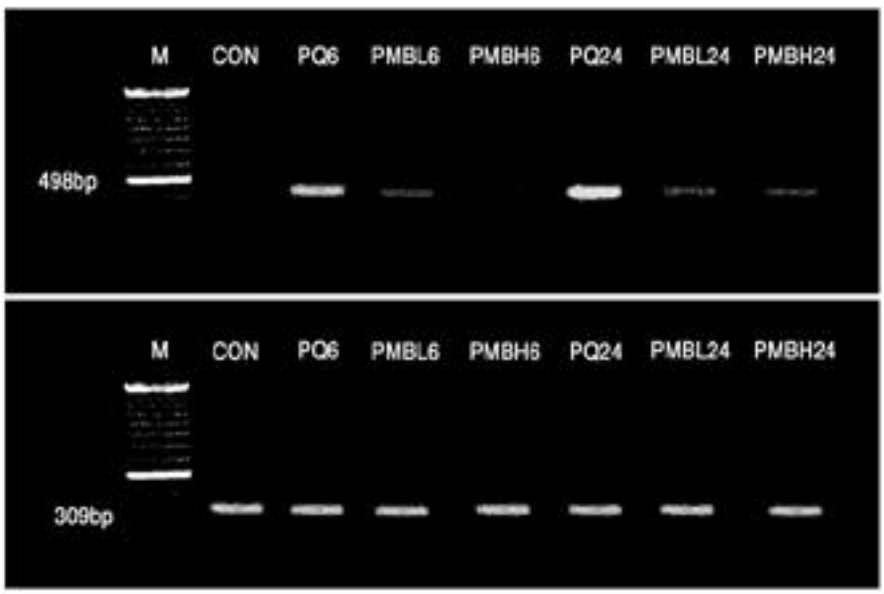

Fig. 4. The effect of methylene blue on the gene expression of iNOS mRNA in the lung.
The expression of iNOS mRNA in the lung tissue was increased in the paraquat only treated group at 6 h, which was slightly decreased in the methylene blue treated groups. It was also markedly increased at 24 h in the paraquat only treated group compared with methylene blue treated groups. The gene expression was relatively decreased in the high dose methylene blue treated group compared with the low dose methylene blue treated group.
CON: control; PQ6: paraquat only treatment at 6 h; PMBL6: paraquat with low dose of methylene blue at 6 h; PMBH6: paraquat with high dose of methylene blue at 6 h; PQ24: paraquat only treatment at 24 h; PMBL24: paraquat with low dose of methylene blue at 24 h; PMBH24: paraquat with high dose of methylene blue at 24 h

라쿼트만 투여한 군에 비해 유전자 발현이 감소하였으나, 두군 간에 큰 차이는 없었다. 24시간 실험군에서는 파라쿼트만 투여한 군은 iNOS 유전자 발현이 현저하게 증가되어 나타났으며, 메틸렌블루 투여군에서는 iNOS 유전자 발현이 약간 감소하였다. 시간대에 따른 변화는 파라쿼트만 투여한 군과 메틸렌블 저용량, 고용량 투여군 모두에서 6시간대에 비해 iNOS 발현이 약간 증가하였다(Fig. 4).

IV. 고 찰

본 연구에서 메틸렌블루의 투여는 파라쿼트 투여로 인한 급성 폐 손상 모델에서 지질과산화를 억제하고 폐조직의 iNOS 유전자 발현과 혈중 산화질소의 농도를 감소시켰다. 메틸렌블루는 파라쿼트보다 세 가지 종류의 flavo함유 효소인 xanthine oxidase, NADH cytochrome c reductase 및 NADPH cytochrome c reductase와 100~600배 더 효과적으로 반응하여 환원작용을 나타낸다. Cytochrome c 존재 하에서 메틸렌블루는 파라쿼트에 의해 유발된 superoxide 유리기와 hydroxyl기를 현저하게 감소시키는 것으로 알려져 있다(15). 반면에 Haluzik 등(16)은 메틸렌블루의 투여가 산화질소의 생성을 억제하지만 산화성 손상을 감소시켜주지 못한다고 보고하였다. 메틸렌블루는 thiazine vital dye로서 산화질소 합성효소를 억제하는 것으로 알려져 있으며(17), 스트레스와 lipopolysaccharide를 준 쥐의 시상하부에서 유발된 iNOS 활성도의 증가를 억제한다고 보고 되었다(18). 또한 메틸렌블루를 투여함으로써 연골퇴행의 매개물질로 알려져 있는 관절연골내의 산화질소의 증가가 억제되며, 이 기전으로는 메틸렌블루가 iNOS 유전자 발현을 억제함으로써 나타난다고 보고되었다(19).

본 연구에서 메틸렌블루의 투여용량에 따른 변화는 파라쿼트 투여 후 6시간 군에서는 메틸렌블루 고용량 투여군이 저용량 투여군에 비해 폐조직의 MDA양을 감소시키고, 혈중 산화질소의 농도와 폐조직의 GSH양이 유의하게 증가하는 효과가 있지만, 파라쿼트 투여 후 24시간 군에서는 이러한 효과가 없었다. 본 연구에서는 저용량군(2 mg/kg) 군에 비해서 고용량군은 20 mg/kg를 동량의 증류수에 섞어서 5분에 걸쳐 정맥내로 투여하였으나 실질적인 산화질소 생성이나 지질과산화 억제 효과는 없었다. 향후 고용량의 메틸렌블루를 2 mg/kg씩 충분한 시간적 간격을 두고 10번에 나누어 투여하거나 혹은 사료에 섞어서 경구로 나누어 투여하여 저용량군과의 차이를 알아보는 보완실험이 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서는 백서의 혈역학적인 변화를 관찰하지 못했기 때문에 위에 언급한 부작용은 알 수 없었다.

산화질소가 파라쿼트에 의한 폐 손상에 관여하는 기전은 정확하게 알려져 있지 않다. 산화질소는 저농도에서는 생리학적인 기능과 신경전달물질로 작용하지만, 과량 생성 시, 앞에서 언급한 것과 같이 세포나 염색체 손상을 유발한다. 산화질소는 glutamate 뇌독성을 유발시킬 수 있고(20), 자가면역이나 면역복합체에 의한 조직손상 등을 유발할 수 있다(21, 22). 가능한 기전으로는 산화질소가 과산화물과 반응하여 peroxynitrite를 만들어서 폐 손상을 유발할 수 있으며, 뇌 속의 NOS 자체가 스스로 과산화물을 합성하여 산화성 손상을 유발하기도 하며, 이런 과산화물의 생성은 NOS 억제제인 L-NAME에 의해서 억제된다고 보고 되었다(23). Berisha 등은 파라쿼트 투여에 의해 발생된 산소유리기에 의한 폐 손상은 과도한 산화질소의 합성과 관련이 있었고, 이러한 폐 손상은 NOS 억제제인 L-NAME나 L-NNA 등에 의해서 억제되었다고 보고하였다(24). 산화질소 합성효소인 NOS가 구조적으로 세포내 cytochrome P450 reductase와 유사하다고 밝혀진 후(25), Day 등은 파라쿼트가 과다한 산화질소 하에서 과산화물($O_2^{\cdot -}$)을 생성하기 위하여 NOS를 사용하는 기전, 즉 NOS가 cytochrome P450 reductase 계열의 파라쿼트 diaphorase라는 것을 보고하였다(26). 파라쿼트 diaphorase는 NADH나 NADPH로부터 전자를 빼어서 소분자인 파라쿼트로 전자를 전달해주는 역할을 하는 효소를 의미하며, flavin을 포함하는 산화환원 효소로서 NADH나 NADPH를 전자공여자로 사용한다는 것이다.

앞에서 언급하였듯이 산화질소 합성효소 NOS의 다른 동종효소인 eNOS나 다른 동종효소를 생성하는 세포들도 산화질소를 합성할 수 있다. 따라서 혈중 산화질소의 일부는 다른 동종효소이거나 폐조직 외의 다른 조직세포에서 합성되었을 가능성을 배제

할 수 없다(27). 본 연구에서는 모든 종류의 동종효소를 모두 측정할 수 없었기 때문에 혈중 산화질소 농도가 폐조직에서 합성된 산화질소라고 단정지을 수는 없다. 그러나 본 연구에서 파라쿼트만 투여한 군에서 혈중 산화질소의 농도의 증가와 폐조직에서의 iNOS 유전자발현의 증가가 나타났으며, 반면 메틸렌블루를 투여한 군에서는 혈중 산화질소 농도의 감소와 iNOS 유전자 발현의 감소가 나타났기 때문에 혈중산화질소의 농도는 폐조직의 iNOS 유전자 발현 정도와 비례한다고 제시할 수 있다. 하지만 혈중 산화질소의 농도의 증가가 eNOS나 nNOS의 유전자 발현이 아닌 iNOS의 유전자 발현의 증가에 의한 것이라는 점을 입증하기 위해서는 폐조직내의 eNOS와 nNOS의 유전자 발현이 증가하지 않는다는 것을 보여줄 수 있는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구에서는 파라쿼트 투여로 야기된 급성 폐손상 모델에서 메틸렌블루의 투여가 지질과산화 및 산화질소의 생성을 억제하고 iNOS의 유전자 발현을 억제하여 급성 폐 손상을 감소시키는 효과가 있는지 알아보고, 이러한 효과가 메틸렌블루의 저용량(2 mg/kg)와 고용량(20 mg/kg)에 따라 차이가 있는지를 알아보고자 하였다. 연구 결과 파라쿼트를 투여한 패혈증 모델에서 메틸렌블루는 폐조직의 항산화효과를 나타냈고, 혈중 산화질소 농도가 감소하며, 폐조직의 iNOS 유전자 발현을 억제하는 효과가 있었다. 그러나 메틸렌블루의 지질과산화 억제 효과와 투여용량에 따른 차이는 명백하게 관찰되지 않아서 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1) Gomez-Jimenez J, Salgado A, Mourelle M, Martin MC, Segura RM, Peracaula R, Moncada S. Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. Crit Care Med 1995;23:253-7.
2) Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. Gen Pharmacol 1997;29:159-66.
3) Ceppi ED, Smith FS, Titheradge MA. Nitric oxide, sepsis, and liver metabolism. Biochem Soc Trans 1997;25:929-34.
4) Shulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca2+ independent nitric oxide synthase in the myocardium. Br J Pharmacol 1992;17:399-402.
5) Lopez BL, Christopher TA, Griswold SK, Ma XL. Bench to Bedside: Nitric oxide in Emergency Medicine. Acedemic Emergency Medicine 2000;7:285-293.
6) Andresen M, Dougnac A, Hernandez G, Espejo J, Castillo L, Bugedo G, Letelier LM, Dagino J. Inhibition of the nitric oxide pathway in refractory septic shock. Rev Med Chil 1996;124:442-7.
7) Driscoll W, Thurin S, Carrion V, Steinhorn RH, Morin FC 3rd. Effect of methylene blue on refractroy neonatal hypotension. J Pediatr 1996;129:904-8.
8) Andresen M, Dougnac A, Diaz O, Hernandez G, Castillo L, Bugedo G, Alvarez M, Dagino J. Use of methylene blue in patients with refractory septic shock: impact on hemodynamics gas exchange 1998;13:164-8.
9) Daemen-Gubbels CR, Groeneveld PH, Groenveld AB, van Kamp GJ, Bronsveld W, Thijs LG. Methylene blue increases myocardial function in septic shock. Crit Care Med 1995;23:1363-70.
10) Galili Y, Kluger Y, Mianski Z, laina A, Wollman Y, Marmur S, Soffer D, Chernikovsky T, Klausner JP, Robau MY. Methylene blue - a promising treatment modality in sepsis induced by bowel perforation. Eur Surg Res 1997;29:390-5.
11) Gachot B, Bedos JP, Veber B, Wolff M, Regnier B. Short-term effects of methylene blue on hemodynamic and gas exchange in humans with septic shock. Intensive Care Med 1995;21:1027-31.
12) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Annal Biochem 1979;95:351-358.
13) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathine sulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Annal Biochem 1980;106:207-212.

14) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Annal Biochem 1982;126:131-138.
15) Kelner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM. Methylene blue competes with paraquat for reduction by flavo-enzymes resulting in decreased superoxide production in the presence of heme proteins. Arch Biochem Biophys 1988;262:422-6.
16) Haluzik M, Nedvidkova J, Skrha J. The influence of NO synthase inhibitor and free oxygen radicals scavenger--methylene blue--on streptozotocin induced diabetes in rats. Physiol Res 1998;47:337-41.
17) Geng Y, Zhou L, Thompson WJ, Lotz M. Cyclic GMP and cGMP-binding phosphodiesterase are required for interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes. J Biol Chem 1998;16:27484-91.
18) Lomniczi A, Cebral E, Canteros G, McCann SM, Rettori V. Methylene blue inhibits the increase of inducible nitic oxide synthase activity induced by stress and lipopolysaccharide in the medial basal hypothalamus of rats. Neuroimmunomodulation 2000;8:122-7.
19) Cohen N, Robinson D, Ben-Ezzer J, Hemo Y, Hasharoni A, Wolmann Y, Otremski I, Nevo Z. Reduced NO accumulation in arthrotic cartilage by exposure to methylene blue. Acta Ortho Scand 2000;71:630-6.
20) Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate toxicity in primary control cultures. Proc Natl Acad Sci. USA 1991;88:6368-71.
21) Kolb, H, Kolb-Bachofen V. Nitric Oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. Immunol Today 1992;13:157-60.
22) Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6338-42.
23) Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J Biol Chem 1992;267:24173-6.
24) Berisha HI, Pakbaz H, Absood A, Said SI. Nitric oxide as a mediator of oxidant lung injury due to paraquat. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7445-7449.
25) Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 1991;351:714-8.
26) Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:12760-5.
27) Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophase nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:6711-5.