



배양림프구에서 Paraquat의 세포독성에 대한 Vitamin C와 Deferoxamine의 항산화 효과

이화여자대학교 의과대학 응급의학교실, 고려대학교 생명환경과학대학 생명유전공학과¹

어은경 · 김경희¹

The Antioxidant Effect of Vitamin C and Deferoxamine on Paraquat-induced Cytotoxicity in Cultured Lymphocytes

Eun Kyung Eo, M.D., Kyung Hee Kim, M.T.¹

Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University, Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Graduate School of Life and Environmental Science, Korea University¹, Seoul, Korea

Purpose: As basic information of antioxidant treatments for the patient with paraquat intoxication, in human peripheral lymphocytes, the cytotoxicity of paraquat was measured, and to evaluate the antioxidant effect of vitamin C and deferoxamine against this cytotoxicity, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity and total antioxidant status (TAS) were measured.

Methods: From 10 healthy adults, after obtaining a consent, 20 ml peripheral blood was collected. Experimental groups were divided to (1) control group, the group treated with an identical amount of saline, (2) P group: the group treated with paraquat only, (3) PV group: the group treated with paraquat followed by vitamin C 30 minutes later, (4) PD group: the group treated with paraquat followed by deferoxamine 30 minutes later, (5) PVD group: the group treated with paraquat followed by vitamin C 30 minutes later and subsequently deferoxamine one hour later, and (6) PDV group: the group treated with paraquat followed by deferoxamine 30 minutes later and subsequently vitamin C 1 hour later, and thus to total 6 groups. In each group, 10 samples of peripheral blood was assigned and 100 μ M paraquat, 100 μ M vitamin C, and 100 μ M deferoxamine were used as reagent. Lymphocytes were isolated, cultured, and cytotoxicity was measured by the Microculture Tetrazolium method (MTT assay), MDA and SOD activity, and TAS concentration were measured.

Results: In regard to the cytotoxicity measured in each group, their cytotoxicity was decreased in the group treated with antioxidants, in comparison with the group treated with paraquat only. In the cases that the order of the treatment of these two antioxidants was altered, viability in the PDV group (1.077 ± 0.121) was increased more than the PVD group (0.888 ± 0.152) statistically significantly ($p=0.018$). Concerning the amount of MDA, in comparison with the P group ($6.78 \pm 0.93 \mu$ mol/L), after the treatment of each antioxidant, the concentration of MDA was decreased statistically significantly ($p<0.05$). In the group treated with two antioxidants together, in comparison with the group treated only with one antioxidant, the amount of MDA was increased statistically significantly (PV: $3.96 \pm 0.98 \mu$ mol/L, PD: $4.92 \pm 1.50 \mu$ mol/L, PVD: $3.22 \pm 0.83 \mu$ mol/L, and PDV: $3.42 \pm 0.95 \mu$ mol/L, $p=0.007$). The concentration of SOD measured in the blood in each group after the administration of paraquat, in comparison with the control

책임저자: 어 은 경

서울특별시 양천구 목동 911-1

이화여자대학교 의과대학 응급의학교실

Tel: 02) 2650-2645, Fax: 02) 2650-5060

E-mail: liz0803@ewha.ac.kr

group, a pattern of the elevation of SOD activity and subsequent decrease was detected, however, it was not statistically significant. In the comparison of the groups treated with antioxidants, in comparison with the P group ($1419.9 \pm 265.9 \mu \text{ mol/L}$), SOD activity was decreased statistically significantly in only the PDV group ($1176.4 \pm 238.9 \mu \text{ mol/L}$) ($p=0.017$). In regard to TAS measured in each group, in comparison with the P group ($0.87 \pm 0.05 \mu \text{ mol/L}$), in all groups treated with the antioxidants, the PV group was $1.00 \pm 0.03 \mu \text{ mol/L}$ ($p=0.005$), the PD group was $9.01 \pm 0.24 \mu \text{ mol/L}$ ($p=0.005$), the PVD group was $4.64 \pm 3.98 \mu \text{ mol/L}$ ($p=0.005$), and the PDV group was $9.41 \pm 0.27 \mu \text{ mol/L}$ ($p=0.005$), and thus total antioxidant activity was increased statistically significantly. In a multiple comparison test, the PDV group showed the highest total antioxidant activity ($p<0.0001$).

Conclusion: The result of the assessment of the antioxidant effect of vitamin C and deferoxamine on paraquat-induced cytotoxicity showed that in regard to cytotoxicity, SOD activity and TAS measurement, the best result was observed in the PDV group. Therefore, it was found that vitamin C and deferoxamine were effective antioxidants for the paraquat-induced cytotoxicity, and it suggests that the administration of deferoxamine followed by vitamin C may improve their antioxidant effect more.

Key Words: Paraquat, Cytotoxicity, Vitamin C, Deferoxamine, Antioxidants

서 론

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride; 그라목손®, 파라코®, 속사포®, Fig. 1)는 식물의 광합성(photosynthesis)동안에 superoxide가 생성되어 세포벽과 원형질을 파괴하는 기전으로 잘 알려져 있는 제초제로서 토양에 닿는 즉시 무독성의 화합물로 재빨리 분해되어 환경에 무해하다는 장점 때문에 1958년 최초로 개발된 이후 전 세계적으로 가장 흔히 사용되고 있다. 그러나 독성이 강하여 자살목적이나 또는 우연한 사고에 의하여 적은

양이라도 인체에 흡수되면 여러 장기에 다발성으로 치명적인 손상을 일으키며 최종적으로 폐부전이 사망의 가장 흔한 원인으로 알려져 있다¹⁾. Paraquat 중독에 의한 사망률은 국가에 따라 20~74 %까지 보고되고 있는데, 우리나라의 경우 연간 1,000명 이상이 중독되고 500명 이상의 사망자가 발생한다고 알려져 있으나 아직까지 정확한 사망률에 관한 통계는 없는 실정이다. 우리나라에서는 농업 인구가 줄어들고 있음에도 불구하고 paraquat 중독 발생률은 급속히 증가되고 있는 추세이다²⁾. 또한 우리나라에서는 24.5% 용액이 상품화 되어 사용되고 있는데 이는 외국에

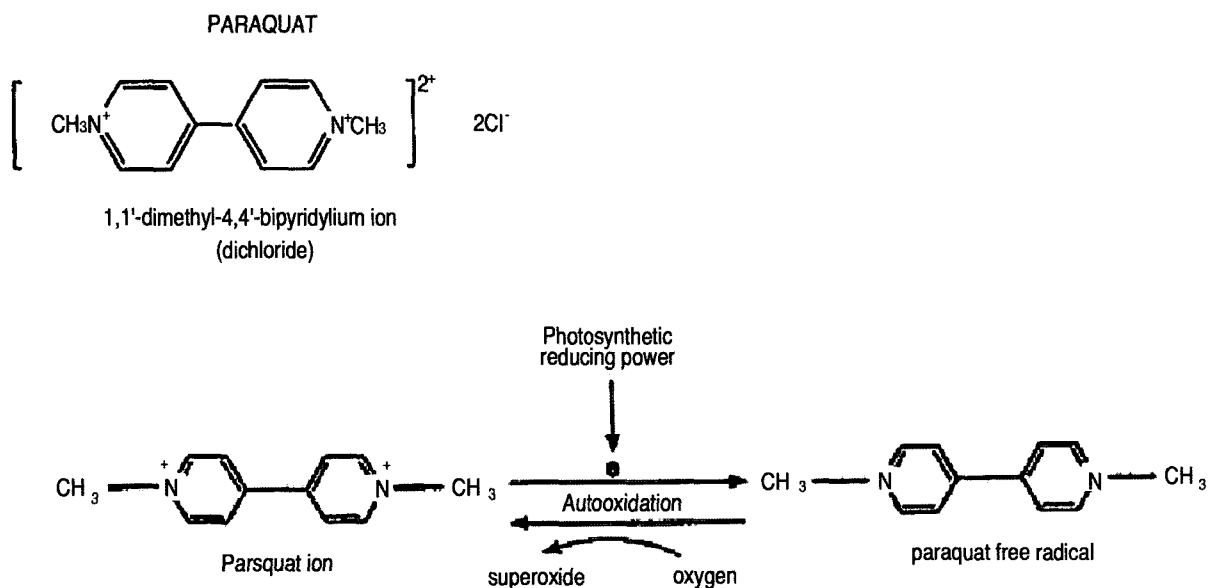


Fig. 1. Paraquat

서 시판되는 상품(2.5~5%)에 비해 농도가 훨씬 높으므로 우리나라의 사망률이 더 높을 것이며, 실제로 몇몇 임상보고에 따르면 75~91%의 높은 사망률을 보이고 있다³⁾.

Vitamin C는 그동안 강력한 항산화제로 알려져 왔으나 최근 들어 전이금속이온(transition metal ions)의 존재 하에 Fenton 반응을 촉진시켜 수산화기를 많이 발생시킴으로 오히려 전구산화제(pro-oxidant)로 작용할 수도 있다는 상반된 보고들이 발표되고 있다^{4,5)}. Deferoxamine은 체내에서 철을 킬레이트화 시키는 제제(iron chelating agent)로서 임상적으로 철 중독 시에 사용되는 약물이다. 이 약물은 조직 내에서 철을 제거하는 작용이 있으므로 paraquat 중독 시 투여하면 체내의 철을 제거하여 조직 내의 철의 농도를 감소시켜 수산화라디칼의 생성을 감소시킬 수 있다고 보고되어 왔다^{6,7)}.

과거의 많은 연구들에서 paraquat는 암세포에서 세포 독성을 유발시키거나 혹은 체중제(Paraquat)에 의한 DNA 파괴 정도를 측정하는 매개체로서 사용된 것에 불과하였다⁸⁻¹⁰⁾. 그러나 최근 들어 paraquat 자체에 의한 세포 독성을 회복시킬 수 있는 방법들 가운데 항산화제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 실제 임상에서 현재 paraquat 중독 시 뚜렷한 해독제나 치료제가 없는 실정이다. 이런 이유로 Paraquat 중독에서 vitamin C의 항산화 효과에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나 위에서 언급한 기전으로 인하여 deferoxamine에 관한 연구가 함께 이루어져야만 할 것이다.

이에 본 연구는 paraquat 중독 환자에서 항산화 치료에 대한 기초 자료로서 사람의 말초 혈액에서 paraquat 독성에 대한 세포 파괴 정도(cytotoxicity)를 측정하였다. 또한 이 세포독성에 대하여 vitamin C와 deferoxamine의 항산화 효과를 평가하고자 자유라디칼(free radical) 생성 양과 비례하는 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(이하 MDA)를 측정하였으며, 자유라디칼의 제거에 관여하는 항산화계에 대하여 생체 내에서 자유라디칼을 불활성화 시키는데 중요한 항산화효소인 superoxide dismutase(이하 SOD)활성도와 비 효소계 항산화물질로 총 항산화제(total antioxidant status, 이하 TAS)의 양을 측정하였다.

대상 및 방법

1. 검체 채취 방법

건강한 성인 10 명(남자 5명, 여자 5명)을 대상으로 하여 동의서를 작성한 후 Sodium-Heparin tube에 말초혈

액 20 ml를 채취하여 10 ml는 세포독성 측정에 이용하고 나머지 10 ml는 항산화 효과 측정에 이용하였다.

2. 실험군

실험군을 다음과 같이 총 6개의 군으로 나누어 각 군마다 10개씩 말초혈액을 배정하여 실험에 이용하였다.

- 1) C 군: 대조군, 식염수만 투여한 군
- 2) P 군: paraquat(100 μ M)만 투여한 군
- 3) PV 군: paraquat(100 μ M) 투여 30 분 후에 vitamin C(100 μ M)를 투여한 군
- 4) PD 군: paraquat(100 μ M) 투여 30 분 후에 deferoxamine(100 μ M)를 투여한 군
- 5) PVD 군: paraquat(100 μ M) 투여 30 분 후에 vitamin C(100 μ M)를 투여한 뒤 다시 1시간 후에 deferoxamine(100 μ M)를 투여한 군
- 6) PDV 군: paraquat(100 μ M) 투여 30 분 후에 deferoxamine(100 μ M)를 투여한 뒤 다시 1 시간 후에 vitamin C(100 μ M)를 투여한 군

3. 림프구 분리

15 ml falcon tube에 4 ml의 Ficol-paque를 넣고 동량의 배지로 희석한 말초혈액 8 ml를 중첩시킨 다음 1300 rpm에서 30분간 실온에서 원심분리 하여 buffy coat 층을 pasteur pipette으로 분리한 뒤 RPMI 1640 배지로 2회 세척(1300 rpm에서 8분간 원심분리)하였다. 세포 수를 $2\sim 4 \times 10^6$ /ml로 계산해서 세포 현탁액(cell suspension)을 만들었으며 모든 조작 과정은 clean bench 내에서 무균적으로 처리하였다.

4. 세포독성 측정

- 1) 원리: Microculture Tetrazolium 법(MTT assay)에 의한 세포독성 측정
CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp, USA)를 이용하여 각 군에서 배양된 세포의 세포독성을 Microculture Tetrazolium 법(MTT assay)에 의해 micro plate reader로 흡광도를 wavelength 570 nm에서 측정하였다¹¹⁾.

- 2) 세포독성 측정을 위한 배지
RPMI 1640 배지에 FBS (fetal Bovine serum)를 10%를 첨가하여 사용하였다.

3) 세포독성 측정을 위한 세포배양 및 측정 방법

세포 현탁액 50 μ l를 기준으로 처리하여 96-well에 분주하여 18시간 동안 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양한 다음 15 μ l의 dye solution (Promega, Cat.# G4,000)을 넣어준 뒤 4시간 동안 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 그 후 100 μ l의 stop solution (Promega, Cat.#G4,000)을 넣고 1시간 동안 방치한 다음 각 군 당 4개의 well에 분주되어 배양된 세포의 흡광도를 micro plate reader를 이용하여 wavelength 570 nm에서 측정 후 평균값을 계산하였다.

5. 항산화 효과 측정

1) 항산화 효과 측정을 위한 세포배양

전혈 1 ml를 10% RPMI 1640 배지 5 ml에 분주하여 각 군에 해당하는 시약 처리를 한 뒤 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양한 다음 각 군의 항산화 효과에 대한 분석을 다음의 방법으로 실시하였다.

2) Malondialdehyde (MDA) 측정

지질과산화의 정도를 알아보기 위한 MDA의 측정은 상품화된 BIOXYTECH® kit (MDA-586™, OXIS International Inc, USA)를 이용하여 측정하였다¹²⁾.

3) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

SOD의 활성도 측정은 상품화된 RANSOD® kit (Randox Lab. Ltd, UK)를 이용하여 측정하였다. SOD는 체내 산화 에너지 과정에서 발생된 독성을 지닌 과산화 라디칼(toxic superoxide radical, O₂⁻)을 과산화수소로 전환시켜 불활성화를 촉진하는 역할을 한다¹³⁾.

4) 총 항산화능(total antioxidant status; TAS) 측정

총 항산화능에 대한 측정은 상품화된 TAS kit® (ABTS®, Randox Lab. Ltd, UK)를 사용하였으며 ABTS®(2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) 억제법을 이용하여 Hitachi® 917 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다¹⁴⁾.

6. 자료 분석

통계학적 검증은 SPSS 프로그램 11.0을 이용하여 범주형 자료인 비연속형 변수의 분석은 카이제곱 검정을 시행하였으며, 연속형 변수들의 비교는 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test와 일원분산분석(one-way

ANOVA) 및 Tukey 교차 검정을 시행하였다. 각 측정치의 값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 대상군의 일반적인 특성

대상군의 일반적인 특성 및 혈액 기본 검사소견은 Table 1과 같았다.

2. 세포독성 측정

각 군에서 측정된 세포활성도는 C군에서 0.878 \pm 0.139이었으며, P군에서 0.771 \pm 0.143 (p<0.0001)로 세포활성도가 감소했다가 각각 PV 군 0.902 \pm 0.216 (p=0.001), PD 군 0.896 \pm 0.153 (p=0.019), PVD 군 0.888 \pm 0.152 (p<0.0001), PDV 군 1.077 \pm 0.121 (p=0.002)로 항산화제를 투여한 군에서 paraquat만 투여한 군에 비해 통계적으로 유의하게 세포활성도가 증가하였다(Fig. 2). Vitamin C (PV 군)와 deferoxamine (PD 군)을 단독으로 투여한 두 군 사이에는 통계적으로 차이가 없었으나 두 가지 항산화제를 함께 투여한 군에서 단독 투여 군에 비해 통계적으로 유의하게 세포활성도가 증가하였다(PV 군-PDV 군; p=0.020, PD군-PDV 군; p=0.032). 또한 두 가지 항산화제의 투여 순서를 달리한 경우 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여하였던 PDV군(1.077 \pm 0.121)에서 vitamin C를 먼저 투여하고 deferoxamine을 나중에 투여하였던 PVD 군(0.888 \pm 0.152)에 비해 통계적으로 유의하게 세포활성도가 증가하였다(p=0.018).

3. 항산화 효과 측정

1) MDA 변화

각 군에서 측정된 MDA 양은 C 군 5.71 \pm 1.41 μ mol/L에서 paraquat 투여 후 6.78 \pm 0.93 μ mol/L (P 군)로 통계적으로 유의하게 증가하였다(p=0.003, Fig. 3). 각각의 항산화제를 투여 한 후 PV 군 3.96 \pm 0.98 μ mol/L (p<0.0001), PD 군 4.92 \pm 1.50 μ mol/L (p=0.012), PVD 군 3.22 \pm 0.83 μ mol/L (p<0.0001), PDV 군 3.42 \pm 0.95 μ mol/L (p<0.0001)로 모든 군에서 통계적으로 유의하게 MDA 양이 감소하였으나 사후 검정 결과 PVD 군에서 가장 좋은 결과를 나타냈다(p<0.0001). 두 가지 항산화제를

함께 투여한 군에서 단독 투여 군에 비해 통계적으로 유의하게 MDA 양이 감소하였으나(p=0.007), deferoxamine

과 vitamin C의 투여 순서에 따른 MDA양의 변화에는 통계적 유의성이 없었다.

Table 1. Baseline characteristics of study subject groups

Parameter	Healthy subjects (mean ± SD)
Number (male/female)	10 (5/5)
Age (year)	31.9 ± 6.4
Height (cm)	166.6 ± 6.7
Weight (kg)	64.1 ± 10.0
Blood Chemistry	
Total protein (mg/dl)	7.3 ± 0.4
Albumin (mg/dl)	4.6 ± 0.1
Glucose (mg/dl)	82.7 ± 12.7
AST (mg/dl)	28.7 ± 16.5
ALT (mg/dl)	27.2 ± 24.8
Alkaline phosphatase (mg/dl)	248.7 ± 70.8
Triglyceride (mg/dl)	102.8 ± 69.0
Cholesterol (mg/dl)	166.9 ± 29.3
Blood urea nitrogen (mg/dl)	11.8 ± 2.6
Creatinine (mg/dl)	0.9 ± 0.2
Phosphate (mg/dl)	3.5 ± 0.5
Total bilirubin (mg/dl)	0.6 ± 0.2
Complete blood count	
White blood count (× 103/μl)	7.6 ± 2.3
Hemoglobin (g/dl)	14.4 ± 1.5
Hematocrit (%)	42.8 ± 3.6
Platelet (× 103/μl)	227.8 ± 34.2
Neutrophil (%)	59.3 ± 5.2
Lymphocyte (%)	31.9 ± 4.6

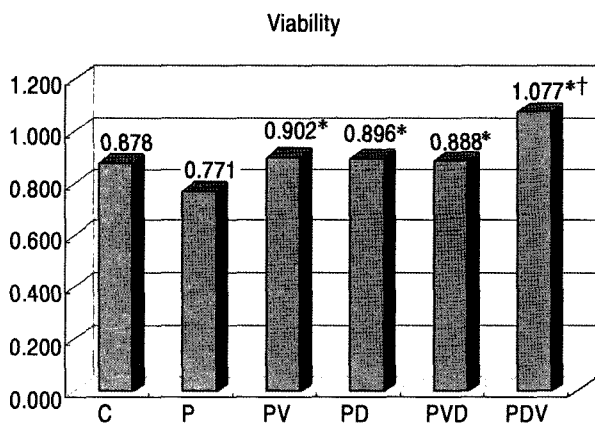


Fig. 2. Difference of cytotoxicity among experimental groups
 C: control, P: paraquat, PV: paraquat-vitamin C, PD: paraquat-deferoxamine, PVD: paraquat-vitamin C-deferoxamine, PDV: paraquat-deferoxamine-vitamin C.
 *: p < 0.05 vs. group P
 †: p < 0.05 vs. group PVD

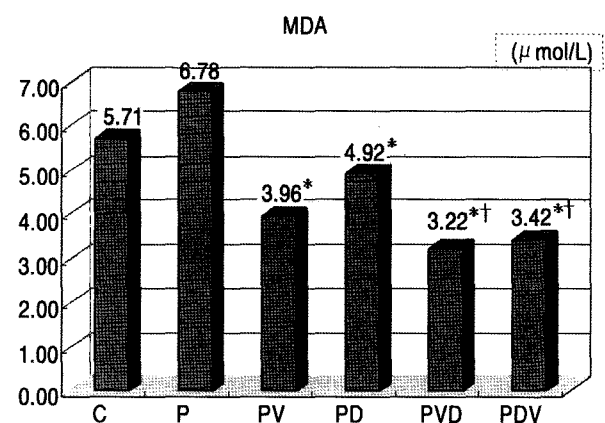


Fig. 3. Difference of malondialdehyde among experimental groups
 C: control, P: paraquat, PV: paraquat-vitamin C, PD: paraquat-deferoxamine, PVD: paraquat-vitamin C-deferoxamine, PDV: paraquat-deferoxamine-vitamin C.
 *: p < 0.005 vs. group P
 †: p < 0.05 vs. group PV and PD

2) SOD 활성도

각 군에서 측정된 혈액 내 SOD양은 각각 C군에서 1259.9±171.7 μmol/L, P 군 1419.9±265.9 μmol/L, PV 군 1369.9±145.7 μmol/L, PD 군 1431.9±451.8 μmol/L, PVD 군 1299.8±264.8 μmol/L, PDV 군 1176.4±238.9 μmol/L로 paraquat 투여 후 대조군에 비해 SOD 활성도가 증가하였다가 항산화제 투여 후 감소하는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 4). 항산화제를 투여한 군과의 비교에서는 P 군(1419.9±265.9 μmol/L)에 비해 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C 를 나중에 투여하였던 PDV 군(1176.4±238.9 μmol/L)에서만 유일하게 통계적으로 유의하게 SOD 활성도가 감소하였다(p=0.017).

3) 총 항산화능

각 군에서 측정된 총 항산화능은 C 군 0.82±0.05 μmol/L, P 군 0.87±0.05 μmol/L로 paraquat가 투여된 후에도 대조군에 비해 총 항산화능에 차이가 없었다(Fig. 5). 항산화제를 투여한 군과의 비교에서 P 군에 비해 각각 PV 군 1.00±0.03 μmol/L(p=0.005), PD 군 9.01±0.24 μmol/L(p=0.005), PVD 군 4.64±3.98 μmol/L(p=0.005), PDV 군 9.41±0.2 μmol/L(p=0.005)로 모든 군에서 통계적으로 유의하게 총 항산화능이 증가하였다. 사후 검정 결과 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C 를 나중에 투여하였던 PDV 군에서 가장 높은 총 항산화능을 나타냈다(p<0.0001).

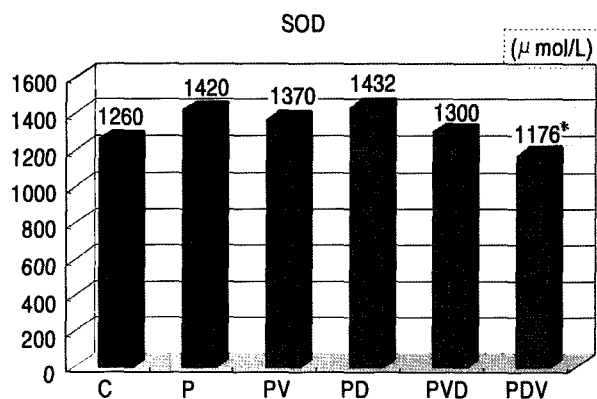


Fig. 4. Difference of superoxide dismutase activity among experimental groups
 C: control, P: paraquat, PV: paraquat-vitamin C, PD: paraquat-deferoxamine, PVD: paraquat-vitamin C-deferoxamine, PDV: paraquat-deferoxamine-vitamin C
 *: p < 0.05 vs. group P

고 찰

Paraquat에 의한 독성이 나타나는 기전은 Fenton 반응에 의한 산소유리기의 발생에 의한 것으로 보고되어 왔으며, Paraquat 중독 시에 발생하는 수산화라디칼은 과산화물과 과산화수소 라디칼 및 과산화수소 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species)에 의해 조직의 지질과산화의 마지막 단계를 매개하는 가장 강력한 산화제이며 실제로 거의 모든 다발성 장기부전에서 조직손상을 야기시키는 궁극적인 물질로 알려져 있다¹⁵. 산소의 불안정한 대사산물로서 강력한 산화작용을 지니고 있는 이러한 산화제들은 세포막의 구성 성분인 지질을 과산화 시켜서 세포막의 손상과 더불어 세포내 기능상실을 유발시킨다. Paraquat 중독 시 조기에 나타나는 임상양상으로는 소화기 점막에 대한 부식성 손상과 간 손상 및 신세뇨관 손상을 들 수 있다¹⁶. 따라서 조기 사망은 전신적인 혈관 허탈에 의해 발생한다고 알려져 왔다¹⁷. 폐 손상이 심한 이유는 정확히 밝혀져 있지는 않으나 paraquat가 폐 조직 내에 선택적으로 축적된다는 사실과 폐 조직 내의 제 1 형과 제 2 형 폐포 세포가 특히 손상을 받기 쉽다는 것이 알려져 있다. Paraquat에 의한 폐 손상은 세포형태학적으로 두 가지 시기로 분류할 수 있는데, 첫 번째, 조기 파괴 시기에서는 폐 조직 내의 제 1 형과 제 2 형 폐포 세포가 손상을 받으며, 두 번째 시기에는 폐포염, 폐부종과 함께 염증세포의 침윤이 유발되는 세포 증식 시기가 나타난다¹⁸. Paraquat 중독에서 지연성 사망의 원인은 폐 손상으로 인

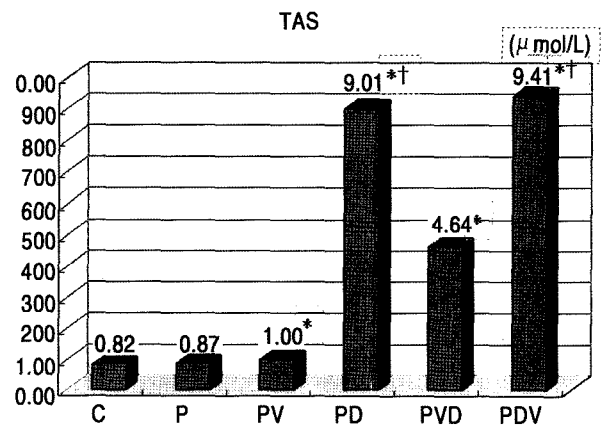


Fig. 5. Difference of total antioxidant activity among experimental groups
 C: control, P: paraquat, PV: paraquat-vitamin C, PD: paraquat-deferoxamine, PVD: paraquat-vitamin C-deferoxamine, PDV: paraquat-deferoxamine-vitamin C
 *: p < 0.05 vs. group P
 †: p < 0.005 vs. group PV and PVD

한 저산소혈증 후에 혈관 허탈, 폐혈증, 궁극적으로는 폐 섬유화가 진행되어 사망하게 된다²⁾. 따라서 paraquat 중독에 대한 연구는 조기 예후 예측인자에 대한 분석과 함께 치료적인 측면에서 최종적으로 사망에 이르게 하는 폐 손상을 경감시켜 주는 방법의 개발에 중점을 두어왔다^{5,19,20)}.

산화제에 대한 체내 방어물질로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 환원형 glutathione, vitamin E, vitamin C, α -tocopherol, β -carotene, 요산, 알부민, 빌리루빈, 세룰로플라즈민 등의 내인성 항산화제가 있으며 외인성 항산화제로 알려져 있는 철 킬레이트 제제인 deferoxamine, xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol과 cyclooxygenase inhibitor인 ibuprofen 등이 있다. 기존의 많은 연구에서 시험관내(in vitro) 실험뿐만 아니라 생체내(in vivo) 연구에서도 철의 킬레이트화가 paraquat의 독성을 예방할 수 있음을 보여주었다^{6,7,21,22)}. Van der Wal 등은 deferoxamine이 paraquat 독성으로 인해 유발된 수산화기를 억제할 뿐 아니라 제 2 형 폐포 세포에서 paraquat의 흡수를 봉쇄함으로써 deferoxamine의 보호 작용이 이루어진다고 보고하였다⁷⁾. Caraceni 등²³⁾은 쥐의 간세포를 이용하여 허혈-재관류 손상을 유발한 실험에서 항산화작용에 기여하는 deferoxamine의 이중 효과에 대해 설명하였다. 그들은 deferoxamine이 저농도(10, 100 μ M)에서는 $O_2^{\cdot -}$ 형성을 억제하는 기전은 없이 단지 철에 대해 특이적인 킬레이트 제제로서만 작용하여 지질 과산화와 세포 손상을 방지하는 역할을 하였으나 고농도(1, 10, 10 mM)에서는 $O_2^{\cdot -}$ 과 같은 산소자유라디칼(oxygen free radicals)에 대한 비특이적인 유리기제거제(radical scavenger)의 역할을 담당하는 deferoxamine의 이중 효과를 보고하였다. 비록 paraquat 독성을 완화시키기 위해 그동안 시행되어온 철 킬레이트화 제제들에 대한 실험 결과들은 기대할 만하나 사람에서의 paraquat 중독 상태 때 철 킬레이트화 치료에 대한 지표 수립은 아직 어려운 과제로 남아있다. Park 등²⁴⁾은 paraquat 중독을 치료하기 위해 deferoxamine을 하루에 3,000 mg씩 7일간 투여한 환자에서 가역적인 시력 저하가 발생한 예를 보고하였다. 이러한 합병증은 deferoxamine 투여 중단 후 시력, 시야 및 시각유발전위 모두에서 호전되는 양상을 보였다. 이처럼 deferoxamine은 paraquat 중독 시에 효과적인 킬레이트화 제제로 사용될 수 있으나 시력저하를 초래할 수 있으므로 그 적절한 용량을 결정하는데 어려움이 남아있다. 따라서 환자의 생존율을 높이면서 이러한 합병증을 줄이기 위한 장기적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Vitamin C는 그동안 강력한 항산화제로 알려져 왔으나

아직도 이러한 효과를 나타내는 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 더욱이 vitamin C의 항산화 효과는 투여 용량과 비례하게 활성산소종을 억제하는 것에서 그치지 않고 α -tocopherol, glutathione, β -carotene과 같은 미립자 형태의 항산화물질을 재생시키는 능력을 지니고 있다²⁵⁾. Helen 등²⁶⁾은 담배 연기에 노출된 백서의 간세포 내에서 MDA, 유리 지방산(free fatty acids) 등의 증가와 함께 SOD, catalase, vitamin E와 C 등의 농도가 감소되어 있었으나 vitamin C를 200 mg/체중 100 g 정도의 고용량으로 90일간 투여 시에 간세포 내 지질과산화에 대한 저항이 커지고 청소 효소(scavenging cell)의 활성이 증가했다고 보고하였다. Jeong 등²⁷⁾의 연구에서도 paraquat를 복강 내 주입하여 독성을 유발 시킨 쥐 실험을 통하여 고용량(100 mg/kg)의 vitamin C를 단독 투여한 군과 고용량의 vitamin C와 deferoxamine(100 mg/kg)을 병합 투여한 군에서 모두 높은 항산화 효과를 나타낸 반면 저용량(10 mg/kg)의 vitamin C와 deferoxamine을 병합 투여한 경우에는 deferoxamine을 단독 투여 했을 때보다 오히려 지질 과산화현상이 더 증가하여 저용량 vitamin C의 전구산화제로서의 효과를 보여주었다. 저 용량의 vitamin C에 의한 지질 과산화 증가 현상은 철(Fe^{+3}/Fe^{+2})과 vitamin C, phospholipase A₂ 등에 의한 것이며 이들의 절대적인 비율이 지질 과산화 반응을 시작하는 중요한 인자라고 한다²⁸⁻³⁰⁾. 또한 체내에서 심각하게 세포 손상이 초래된 경우에는 전이금속이온들(Fe^{+3}/Fe^{+2})이 수용성 상태로 방출되는데, 이러한 상태에서 vitamin C는 자유 전이금속이온의 산화환원 순환성 반응을 가속화시킴으로써 수산화라디칼의 생성을 촉진시키게 된다^{4,25)}. 비록 몇몇 연구들에서 vitamin C의 전처치가 paraquat 중독 작용으로부터 조직을 보호할 수 있다고는 하나 paraquat로 인해 조직 손상이 유발된 후에 치료 목적으로 사용됐던 vitamin C에 대한 그동안의 성적은 비판적이다. Kang 등³⁾은 vitamin C와 deferoxamine을 전처치한 후에 paraquat 중독을 유발시킨 동물 실험 연구 결과 보고에서 paraquat로 인한 조직 손상이 진행되는 도중에 투여된 vitamin C는 오히려 폐포 세포의 산화성 손상을 가중시켰으며 vitamin C를 전처치 한 군에서만 좋은 성적을 나타냈다고 보고하였다. 또한 이들은 deferoxamine을 전처치 한 후 paraquat 중독을 유발하고 그 다음에 vitamin C를 투여한 군에서 가장 좋은 항산화 효과를 나타냈으며, deferoxamine의 전처치 없이 paraquat 독성 유발 후 vitamin C를 투여한 군에서는 오히려 전혀 항산화제를 투여하지 않고 paraquat만 투여한 군보다 더 심각한 손상이 유발되었다고 보고하였다.

본 연구에서 세포독성 정도는 항산화제의 단독 및 병합 투여에는 영향을 받지 않았으나 항산화제 투여 순서에는 영향을 받았으며 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여한 PDV 군(0.923 ± 0.339)에서 PVD 군(1.112 ± 0.458)보다 통계적으로 유의하게 세포활성도가 증가함을 알 수 있었다. SOD의 활성도는 투여된 항산화제의 종류 및 수와는 무관하였으나 투여 순서에 있어서 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여한 PDV 군($1176.4 \pm 238.9 \mu\text{mol/L}$)에서 가장 높은 활성도를 나타냈다. MDA의 경우는 vitamin C를 먼저 투여하고 deferoxamine을 나중에 투여한 PVD 군($3.22 \pm 0.83 \mu\text{mol/L}$)에서 가장 많은 양의 감소를 나타냈으나 PDV 군에서의 측정값($3.42 \pm 0.95 \mu\text{mol/L}$)과 비교했을 때 통계적인 유의성을 나타내지 않았다. 결국 두 가지 항산화제의 투여 순서에 MDA 양은 영향을 받지 않았다. 이것은 조건은 좀 다르지만 Jeong 등²⁷⁾의 연구에서 고용량의 vitamin C와 deferoxamine을 병합 투여했을 때 MDA 양 및 SOD 활성도 측정에서 가장 좋은 효과를 보였던 결과와 비슷한 결과이다. 총 항산화능의 경우도 SOD 활성도와 마찬가지로 PDV군에서 가장 좋은 총 항산화능을 나타냈으며 두 가지 항산화제 가운데 deferoxamine의 효과가 더욱 큰 것으로 나타났다.

각 실험군에서 모든 조건을 동일하게 적용시켰음에도 불구하고 각 군의 항산화 효과를 측정하는 지표들 간의 결과가 일치되지 않는 것은 이것이 시험관내(in vitro) 연구이므로 생체 내와 같은 조건이 아니기 때문이라 추정된다. 또한 예비실험을 거쳐 각 시약의 용량 및 배양 시간 등을 결정하였으나, 이 예비실험은 배양된 림프구를 대상으로 세포독성을 측정하는 것으로 진행하였으므로 전혈을 대상으로 측정하는 총 MDA 양, SOD 활성도 및 총 항산화능에 대한 결과 가운데 일부에서 상이한 결과가 도출됐을 것으로 사료된다. 한 예로 총 항산화능의 경우 대조군인 C 군($0.82 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$)과 독성을 유발시킨 P 군($0.87 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$) 사이에 총 항산화능의 차이가 없어 paraquat 100 μM 에 의해 혈액 내의 독성 유발이 잘 안된 결과라고 추정하였다. 마찬가지로 vitamin C에 비해 deferoxamine의 항산화 효과가 훨씬 두드러지게 나타났으며 단독 투여 군에서 뿐만 아니라 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여하였던 PDV 군에서 그 효과나 가장 뛰어났고 deferoxamine을 단독 또는 vitamin C와 병용하여 투여한 군에서 다른 군과 비교해 볼 때 최대 약 10배 정도의 총 항산화능 증가가 나타났다. 또한 SOD는 세포 내에서 초기에 반응하여 paraquat와 같은 산화제의 공격 때 발생한 과산화 라디칼을 과산화수

소로 전환시켜 불활성화를 촉진하는 효소이며 MDA는 세포막의 지질 과산화 정도를 나타내는 지표인 반면 TAS는 혈중에 존재하는 항산화물질 전체에 대한 상태를 평가하는 지표이다. 본 연구에서 각각의 항산화 효과를 측정하는 지표들 간에 초래된 결과의 차이는 이러한 지표들이 이처럼 세포내에서 각기 다른 기전을 담당하고 있기 때문이라 여겨진다.

지금까지 보고된 여러 문헌 가운데 본 연구처럼 paraquat의 독성이 유발된 상태에서 세포독성 기전을 차단할 목적으로 vitamin C와 deferoxamine을 함께 투여한 연구들은 있었지만 투여 순서를 달리하여 항산화 효과를 측정했던 경우는 없었다. 또한 여러 연구들에서 vitamin C의 전처치가 여러 손상에서 항산화 효과를 높일 수 있다고 그 효능을 입증하여 보고하고 있으나 임상에서 접하게 되는 paraquat 중독 환자에 경우는 vitamin C의 전처치라는 상황을 적용시킬 수 없으므로 앞으로의 연구도 paraquat 중독이 유발된 상황에서 세포독성을 차단할 수 있는 방법을 개발 하는 것으로 진행되어야 할 것이다. 앞서 살펴본바와 같이 deferoxamine이 vitamin C와 함께 paraquat 세포 독성에 대한 방어 효과가 있다면 앞으로 더 나아가 생체 조건(in vivo)에서의 연구를 통하여 각 장기의 세포독성 정도 측정과 함께 다른 여러 가지 항산화제의 적정 용량 및 투여시기 결정, 부작용에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 paraquat 중독 환자의 경과와 항산화 요법 등의 치료 효과 및 예후 판정에 있어 말초혈액을 이용할 수 있는 방법을 모색할 수 있는 연구가 병행되어야 하겠다. 본 연구의 제한점으로는 시험관내(in vitro) 연구이므로 각 장기에 미치는 세포 독성에 대한 평가는 불가능하였으며 위에 언급한 바와 같이 항산화제의 적정 용량에 대한 모호성 등을 들 수 있겠다.

결 론

Paraquat의 세포독성에 대한 vitamin C와 deferoxamine의 항산화 효과를 측정된 결과 세포활성도에 있어서는 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여한 군에서 가장 좋은 결과를 나타냈다. MDA 측정을 제외한 나머지 SOD 활성도 및 총 항산화능 지표 측정에 있어서 항산화 효과는 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여한 군에서 가장 좋은 결과를 나타냈으며 SOD의 경우 항산화제의 단독 투여 및 병합 투여와 그 활성도는 무관하였으나 총 항산화능의 경우 두 가지 항산화제를 병합하여 투여했을 때 더 좋은 효과를 나타냈다. 마찬가지로 MDA 측정에서도 한 가지 항산화제만 투여하

였을 때보다 두 가지를 병합하여 투여한 경우에 더 좋은 항산화 효과를 나타냈으나 항산화제의 투여 순서와는 무관하였다. 따라서 이러한 결과로 paraquat에 의해 유발된 세포독성에 있어서 deferoxamine과 vitamin C가 효과적인 항산화제임을 알 수 있었으며, 또한 deferoxamine을 먼저 투여하고 vitamin C를 나중에 투여하는 방법을 사용함으로써 이들 항산화제의 효과를 더욱 상승시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Onyon LJ, Volans GN. The epidemiology and prevention of paraquat poisoning. *Human Toxicol* 1987;6:19-29.
2. Hong SY, Yang DH, Hwang KY. Associations between laboratory parameters and outcome of paraquat poisoning. *Toxicol Lett* 2000;118:53-9.
3. Lee JS, Jeong MK, Kim TJ, Kim JB, Paek JK, Choi TM, et al. Clinical Observation of Paraquat Poisoning. *Korean J Intern Med* 1994;47:93-100.
4. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 1996;25:439-54.
5. Kang SA, Jang YJ, Park H. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res* 1998;28(1):93-107.
6. Kohen R, Chevion M. Paraquat toxicity is enhanced by iron and reduced by deferoxamine in laboratory mice. *Biochem Pharmacol* 1984;34:1841-3.
7. Van der wal NA, Van Oirschot JF, Van Dijk A et al. Mechanism of protection of alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity by deferoxamine. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1665-71.
8. Lee TB, Lim DY, Jeon HJ, Min YD, Kim KC, Kim KJ et al. Differential induction of Mn-containing superoxide dismutase by paraquat in peripheral lymphocytes of normal subjects and gastric cancer patients. *Mol cells* 2003;16:13-8.
9. Ayaki H, Lee MJ, Sumino K, Nishio H. Different cytoprotective effect of antioxidants and change in the iron regulatory system in rodent cells exposed to paraquat or formaldehyde. *Toxicology* 2005;208:73-9.
10. Moon SP, Choi CH, Cha YJ, Chang JH, Kim CY, Min YD. Induction of Metallothionein and Manganese-containing superoxide dismutase by paraquat in peripheral white blood cells of patients with gastric cancer. *Korean J Gen Surg* 2000;29:751-8.
11. Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SP. Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leuk Res.* 1988;12:823-31.
12. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
13. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
14. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V and Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 1993;84:407-12.
15. Gram TE. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol Rev* 1997;49:297-341.
16. Bismuth C, Garnier R, Dally S, Fournier PE, Scherrmann JM. Prognosis and treatment of paraquat poisoning: a review of 28 cases. *J Toxicol Clin Toxicol* 1982;19:461-74.
17. Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum Toxicol* 1987;6:41-7.
18. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002;180:65-77.
19. Weidauer E, Lehmann T, Ramisch A, Rohrdanz E, Foth H. Response of rat alveolar type II cells and human lung tumor cells towards oxidative stress induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Toxicol Lett* 2004;151:69-78.
20. Lee EY, Hwang KY, Yang JO, Hong SY. Predictors of successful outcome of acute paraquat poisoning: an analysis of 602 cases. *Korean J Intern Med* 2003;64:625-31.
21. Van Asbeck BS, Hillen FC, Boonen HC, de Jong Y, Dormans JA, van der Wal NA et al. Continuous intravenous infusion of deferoxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:769-73.
22. Van der Wal NA, Smith LL, van Oirschot JF, van Asbeck BS. Effect of iron chelators on paraquat toxicity in rats and alveolar type II cells. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:180-6.
23. Caraceni P, Van Thiel DH, Borle AB. Dual effect of deferoxamine on free radical formation and reoxygenation injury in isolated hepatocytes. *Am J Physiol* 1995;269(1 Pt 1):G132-7.
24. Park MJ, Cho MS, Kim JS. Reversible Change of Vision in Patients Receiving Deferoxamine. *Korean J Ophthalmol* 45:1397-1401, 2004.
25. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2001;2:S67-74.

26. Helen A, Vijayammal PL. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *J appl toxicol* 1997;17:289-95.
27. Jeong YK, Suh GJ, Jung JS, Jung SE, Choe KJ, Youn YK. The antioxidant effect of vitamin C and deferoxamine on paraquat induced lipid peroxidation in rats. *Korean J Emerg Med* 2000;11:421-36.
28. Melin AM, Peuchant E, Perromat A, Clerc M. In vitro influence of ascorbate on lipid peroxidation in rat testis and heart microsomes. *Mol Cell Biochem* 1997;169(1-2):171-6.
29. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J Biol Chem* 1986;261:10282-9.
30. Laszczyca P, Kawka-Serwecinska E, Witas I, Dolezych B, Migula P. Iron ascorbate-stimulated lipid peroxidation in vitro. Why is the method controversial? *Gen Physiol Biophys* 1995;14:3-18.