

가자(*Terminalia chebulae*) 메탄올 추출물이 paraquat 독성에 의한 흰 쥐의 신장 및 폐조직에 미치는 영향

박 종 옥*

경성대학교 화학과

Received December 28, 2007 / Accepted January 17, 2008

Effects of Methanol Extract from *Terminalia chebulae* on Renal and Pulmonary Toxicities Induced by Paraquat in Rats. Jong-Ok Park*. Department of Chemistry Kyungsoong University, 608-736, Busan, Korea - Paraquat (1,1-dimethyl 4,4'-dipyridium dichloride; PQ) is a kind of herbicide. *Terminalia chebulae* (TC) has been used as a medicine in China and in Korea for treating illnesses such as diarrhea, collapsed anus, spasmodic, diphtheria, asthma etc.. This study was to examine new physiological activities of methanol extract of TC (TCM) on the toxicity of PQ. It was observed biochemical effects on the toxicity of PQ in kidney and lung tissues after treatment orally administered 100, 200, 300 mg/kg of TCM daily for two weeks. In the experiment related to the toxicity of PQ, we got following results: renal and pulmonary lipid peroxide contents, activities of aminopyrine N-demethylase, aldehyde oxidase and xanthine oxidase were significantly increased in control group as compared with normal group, in the treatment of TCM the values were decreased as compared with control group. Activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase which are free radical scavenging enzymes were also increased in control group as compared with normal group, but were decreased in TCM group as compared with control group. Collagen content and glucose-6-phosphatase activity in lung tissue were increased in control group as compared with normal, but was decreased in TCM group as compared with control group. From these results, we concluded that TCM can play a role as an effective agent to decrease toxicity of PQ.

Key words : *Terminalia chebulae*, paraquat, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase

서 론

우리의 신체는 각종 환경오염물질, 흡연, 알콜, 방사선 등의 환경유해물질들에 노출이 증가되고 있어 인체면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되어 있다. 또한 산소를 소비하여 에너지를 얻는 신체는 산화에 의한 산화적 스트레스 역시 높아지고 있다. 이렇듯 다양하게 유발되는 건강문제를 해결할 방안으로 생약제제에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이러한 관심의 증대는 현대의학이 가지고 있는 질병치료의 한계 및 합성의약품이 지니는 부작용 등 여러 문제점의 노출로 대체 의학으로서의 기대가 높아지고 있기 때문이다.

가자(*Chebulae fructus*)는 사군자과에 속한 낙엽성의 큰키 나무인 가자(*Terminalia chebulae* Retz)의 익은 열매를 말린 과실로 약용으로 사용되고 있다[11]. 가자에는 chebulinic acid, chebulagic acid, corilagin, glucogallin, gallic acid, terflavin A, B, C, D, isoquercitrin, tannin 등 수많은 성분이 함유되어 있고[12], tannin이 함유되어 있어 수렴지사(收斂止瀉) 작용이 있다고 보고되어 있으며[13], 녹농균, 디프테리아균, 황색

포도상구균, 용혈성 연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 알려져 있다[14,31,32].

또한 삼(澁)한 맛과 온(溫)한 약성은 허약한 장관을 따뜻하게 하므로 설사와 이질을 그치게 하며, 장출혈, 탈항, 붕루, 대하, 유정(遺精), 빈뇨에도 쓰며, 폐경, 위경, 대장경에도 작용한다[10]. 이 외에 폐의 기능이 감퇴되어 일어나는 천식, 해소 및 오랜 기침으로 음성이 변한 것을 치료하기도 한다[11].

Paraquat (1,1-dimethyl 4,4'-dipyridium dichloride; PQ)는 1950년대부터 우리나라를 비롯해 전세계적으로 광범위하게 사용된 제초제의 일종으로 미생물, 식물, 동물 그리고 인간 등에 치명적 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[22,23,39]. PQ는 여러 경로에 의하여 중독될 수 있는데 대부분은 경구에 의한 것이며, 그 외에 피부, 점막, 호흡기 등을 통하여 중독된다. 인체에 노출 시 다발적 장기 손상을 야기하여 사망을 초래할 수 있는데 국소자극작용에 의한 위장관장애, 간장애 및 신장애 등이 나타나고, 마지막에는 폐장애가 나타나 폐독성 및 신부전에 의해 사망에 이르게 된다[4,17,27,38,41]. 높은 사망률 때문에 일찌기 많은 연구가 이루어졌으나, 아직 PQ의 독성을 치료할 수 있는 해독제를 개발해 내지 못한 실정이다.

PQ의 독성 기전은 PQ가 세포내에서 cytochrome P₄₅₀ re-

*Corresponding author

Tel : +82-52-620-4633, Fax : +82-51-628-4628

E-mail : gopark@ks.ac.kr

ductase 및 xanthine oxidase와 관련된 redox cycle에 의해 paraquat radical이 되고 이것이 산소분자와 반응하여 활성산소인 superoxide anion과 hydroxyl radical이 생성되며, 이로 인해 지질과산화반응을 일으켜 세포막손상, hyaluronic acid의 depolymerization, 단백질의 불활성화, DNA의 손상 그리고 NADPH의 탈수소에 의한 지방산합성의 저해 등이 일어난다는 것과 PQ가 지방산조성의 변화를 유발하여 pulmonary surfactant level에 영향을 준다는 것이다[5]. 또한 세포내 NADPH의 감소로 인해 환원형 glutathione의 감소가 일어나 지질과산화를 촉진하고, 항산화작용기전을 약화시키는 것도 원인으로 알려져 있다[24]. 그리고, PQ는 폐조직 내 fibroblast를 자극하여 fibronectin, collagen 생합성을 촉진하고, growth factor를 분비하여 폐 fibrosis를 일으키게 한다[10].

이러한 PQ 유도 독성으로부터 생체를 보호하는 항산화효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, 과산화효소 및 glutathione peroxidase (GP) 등 내인성 항산화 효소가 있음이 밝혀졌으며 항산화물질들은 조직 내에서 생성되는 free radical을 포착, 제거할 수 있다고 보고되어 있다[2,6,9,19]. 본 논문에서는 가자 매탄올추출물(*Terminalia chebulae* methanol extract, TCM)의 새로운 생리활성을 규명할 목적으로 흰 쥐에 TCM을 투여하여 PQ 독성기전에 미치는 영향을 신장 및 폐조직 세포 중에서 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 조제

부산 시내 한의원에서 구입한 가자 500 g을 잘게 세절하여 매탄올 500 ml에 넣고 45°C에서 3시간 동안 3회 추출한 후 동결건조하여 최종 96 g의 분말을 얻어 이를 생리활성 측정을 위한 시료로 삼았다.

실험 동물 및 처치

실험동물은 대한 BioLink (충북 음성)로부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도: 22±1°C, 습도: 55±3%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 25±10 g의 ICR계 웅성 생쥐를 사용하였다. TCM의 투여는 mouse를 세군으로 나누어 각각 dose 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg의 용량으로 saline에 용해하여 매일 2주간 경구 투여하였고 PQ의 투여는 시료를 투여하고 난 후 100 mg/kg 용량으로 복강주사하고 24시간 후에 처치하였다.

효소원의 조제

시료 투입이 끝난 실험동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후 떼어낸 폐와 신장조직에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer를 사용하여 10% 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 homogenate

분획으로 하였으며, 이것을 600× g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거하고 다시 10,000× g에서 20분간 원심분리하여 그 침전물에 일정량의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하고 현탁시켜 mitochondria fraction으로 하고 상등액을 다시 105,000× g에서 1시간 초원심분리하여 cytosolic fraction으로, 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 현탁시킨 액을 microsomal fraction으로 하였다. Mitochondria fraction과 microsomal fraction은 현탁한 후 재원심분리하여 효소원으로 사용하였다.

이렇게 얻어진 homogenate 분획은 lipid peroxide의 함량 측정에, cytosolic fraction은 GP, SOD 및 xanthine oxidase, aldehyde oxidase의 활성 측정에 사용하였으며, microsomal fraction은 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성 측정에, mitochondria fraction은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

조직의 lipid peroxide 함량의 측정

Ohkawa 등의 방법[26]을 변경하여 신장 및 폐조직 1 g당 4 배량의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가해 마쇄한 후 같은 양의 buffer를 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-buthanol:pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리하여 생성된 홍색의 n-buthanol : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당 존재하는 malondialdehyde양을 nmole로 표시하였다.

신장 조직에서의 효소활성

Xanthine oxidase 활성의 측정은 Stirpe과 Della의 방법[35]에 따라, aldehyde oxidase 활성의 측정은 Rajagopalan 등의 방법[30]에 따라, aniline hydroxylase 활성 측정은 Bidlack과 Lowry의 방법[3]에 따라, superoxide dismutase (SOD) 활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법[21]에 따라, glutathione peroxidase 활성 측정은 Paglia와 Valentine의 방법[28]에 따라, catalase 활성의 측정은 Aebi의 방법[1]에 따라 시행하였다.

Aminopyrine N-demethylase 활성측정은 Nash의 방법[25]을 약간 변경하여 반응액 2.0 ml에 0.1 M Na⁺/K⁺ buffer (pH 7.5)에 2 mM aminopyrine HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액 (300-400 µg protein)을 가하였다. 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 15% ZnSO₄ 2.0 ml와 포화 Ba(OH)₂ 2.0 ml를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치한 다음 10분간 원

심분리하였다. 여기서 얻은 상층액 5.0 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent 2.0 ml를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액을 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 근거하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 formaldehyde의 양을 nmole로서 표시하였다.

폐 조직에서의 효소활성 변동

Glucose-6-phosphatase의 활성 측정은 Trager와 Plaa의 방법[37]에 따라, collagen중 hydroxyproline양의 측정은 Jamall 등의 방법[15]에 따라 시행하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법[20]에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 ± 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하여 p값이 5%미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

TCM이 PQ 독성경감기전에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험동물에 가자 메탄추출물을 2주간 경구투여한 후 PQ를 처리하여 혈청 및 간장에 미치는 영향은 이미 보고된 바 있다[29]. 즉 흰 쥐에 PQ만 투여했을 때 20일 이내에 모두 죽는 것으로 나타났으나 TCM 투여시 생존율을 60% 이상 높일 수 있었고, 혈청의 생화학적 효소 변화를 측정하여 본 결과 간 독성지표인 ALT, AST활성이 PQ의 투여로 각각 3배 이상 증가되었고, 신독성지표인 혈중 BUN, creatinine값은 2배 이상 증가하던 것이 TCM투여로 50~60% 이상 감소하였다. 이로 보아 TCM이 간세포손상을 억제하며, 신장 기능을 향상시키는 효과가 있음을 추측할 수 있었다. 본 연구에서는 PQ독성의 마지막단계에서 나타나는 신장장애 및 폐장애에서 나타나는 TCM의 여러 효과를 관찰하고자 하였다.

신장 조직에 미치는 영향

지질과산화물 함량에 미치는 영향

불포화지방산은 과산화과정을 통하여 분해되어 MDA를 생성하므로 이를 지질과산화를 측정하는 지표로 삼는다[16]. PQ독성이 유도된 흰 쥐의 조직 및 세포손상의 정도를 알아보기 위하여 MDA 생성량을 신장조직 중에서 측정해 보았다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상군에 PQ를 투여할 경우 약 2배 이상의 MDA 생성 증가가 나타났으나 PQ와 TCM을 함께 투여하였을 경우 TCM량이 증가할수록 감소량이 늘어나 200 mg/kg, 300 mg/kg 투여 시에는 PQ만 투여한

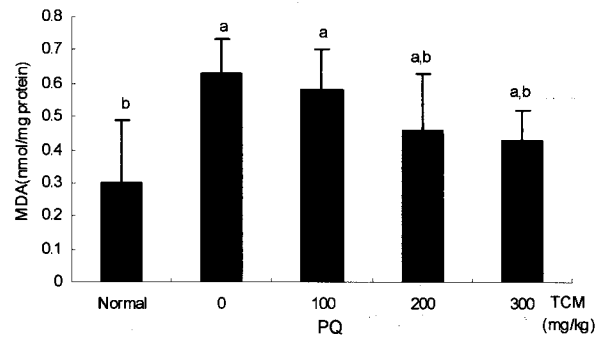


Fig. 1. Effect of methanol extract from *Terminalia Chebulae* on renal lipid peroxide level of paraquat treated mice. Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

군에 비하여 MDA양이 1/3정도 감소됨을 볼 수 있었다. 일반적으로 과산화지질을 유도하는 물질은 자신이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 대사산물로 oxygen radical을 생성시켜 지질과산화반응을 연쇄적으로 증가시킨다[18]. 또한 oxygen free radical은 세포막의 구성성분인 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 세포 기능을 저하시키며 노화현상에 관여하기도 한다[8,34,40]. 실험결과 TCM이 생성된 MDA의 양을 현저히 감소시킨 것은 독성물질인 PQ가 체내에 투여되어 세포내에서 대사되는 동안에 발생하는 superoxide radical, hydroxyl radical이 불포화 지방산을 과산화시켜 MDA의 양이 크게 증가된 것을 TCM성분 중 어떤 물질이 위의 radical의 작용을 직접 또는 간접적으로 제어하여 지질과산화물 생성을 억제하는 효과가 있는 것으로 해석할 수 있다.

활성산소생성계에 미치는 영향

체내에 투여된 약물 및 독성물질의 대사과정은 지질과산화 생성대사 효소계에 영향을 미치는 phase 1 반응과 활성산소를 제거하는 phase 2 반응으로 나눌 수 있다. TCM의 지질과산화반응 억제효과가 독성물질 대사과정 중 어떤 기전에 의하여 나타나는지를 알아보기 위하여 신장조직 세포중의 활면세포체에 존재하는 활성산소 생성계반응(phase 1)의 cytosol효소계와 microsomal효소계의 효소활성도 값을 측정하여 Table 1에 나타내었다.

신장의 cytosolic enzyme system에 미치는 영향을 검토한 결과, free radical 생성계 효소인 xanthine oxidase와 여러 물

Table 1. Effect of methanol extract from *Terminalia Chebulae* on the renal free radical formation enzymes activities of PQ treated mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity			
		XO*	AO**	AD***	AH****
Normal		2.36±0.13 ^c	1.63±0.18 ^c	4.16±0.26 ^c	0.72±0.13 ^d
PQ		6.87±0.33 ^a	4.26±0.14 ^a	7.63±0.28 ^a	2.42±0.16 ^a
PQ+TCM	100	6.24±0.27 ^b	4.18±0.20 ^a	7.26±0.31 ^{a,b}	2.17±0.20 ^{a,b}
PQ+TCM	200	6.07±0.18 ^b	3.67±0.17 ^b	7.16±0.20 ^b	1.93±0.13 ^{b,c}
PQ+TCM	300	5.93±0.20 ^b	3.53±0.14 ^b	6.83±0.19 ^b	1.86±0.15 ^c

Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

*: Xanthine oxidase; uric acid nmole/mg protein/min

** : Aldehyde oxidase; 2-Pyridone nmole/mg protein/min

***: Aminopyrine N-demethylase; formaldehyde nmol/mg protein/min

****: Aniline hydroxylase; p-aminophenol nmol/mg protein/min

질들의 산화반응을 촉매하는 효소인 aldehyde oxidase의 활성은 PQ 투여군의 경우 정상군보다 각각 2.9배, 그리고 2.6배 증가되었으나 PQ와 TCM을 함께 투여한 군의 경우 효소의 활성이 PQ처리군에 비하여 14% 그리고 17%정도 감소하였다. Xanthine oxidase는 각종 aldehyde, purin등을 분해할 수 있는데 이들 분해과정에서 많은 radical이 형성되어 생체내 산화적 손상을 일으키게 된다[35]. Aniline oxidase도 XO와 유사하게 oxygene radical을 생성시키는 효소이다[30]. 한편 신장의 microsomal enzyme system에 미치는 영향을 관찰한 결과, aminopyrine N-demethylase는 PQ 투여군은 1.83배 증가되었으나 TCM 투여군의 경우 효소의 활성이 10%정도 감소되었다. 이러한 결과는 aniline hydroxylase의 활성에서도 유사하게 관찰할 수 있었다. 즉 PQ투여로 효소활성이 3.3배나 증가되던 것이 TCM의 농도를 300 mg/kg로 투여할 때 23%정도 감소된 것으로 나타났고 그 외 농도에서의 결과는 통계적 의미가 적었다. 이러한 실험결과는 TCM이 PQ의 활성산소 생성효소계 촉진작용에 영향을 미쳐 PQ로 유도되는 지질과산화물의 생성을 억제하는 것으로 생각된다.

활성산소 해독계에 미치는 영향

체내에서 생성되는 활성산소 물질들은 활성산소 해독계 효소들로 알려진 SOD, catalase, GP 등에 의하여 대사된다. TCM으로 전처리하고 PQ를 처리하였을 때 이들 효소들의 활성에 어떤 영향이 나타나는지 실험한 결과 Table 2와 같았다. 이들은 Free radical에 의한 여러 가지 손상으로부터 생체를 보호할 수 있는 효소로써 PQ 단독 투여군은 정상군에 비해 SOD, catalase 및 GP의 활성이 각각 1.8배~2.3배 증가하였으나 TCM의 투여로 활성이 17~24% 감소하는 것으로 나타났다. Phase 2반응은 Phase 1 반응을 거친 약물이나 내인성 및 외인성 물질에 glucuronic acid, sulfate, glutathione

Table 2. Effect of methanol extract from *Terminalia Chebulae* on the renal free radical generatory enzyme system activitie of PQ treated mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity		
		SOD*	Catalase**	GP***
Normal		9.36±0.43 ^c	2.76±0.28 ^d	257.3±30.2 ^c
PQ		19.2±1.49 ^a	6.25±0.42 ^a	457.8±40.9 ^a
PQ+TCM	100	18.3±0.92 ^a	5.98±0.33 ^{a,b}	410.2±29.8 ^{a,b}
PQ+TCM	200	16.5±0.66 ^b	5.50±0.25 ^{b,c}	387.6±41.0 ^b
PQ+TCM	300	16.0±0.52 ^b	5.16±0.40 ^c	350.3±28.4 ^b

Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

*: unit[#]/mg protein

** : decreased H₂O₂ nmol/mg protein/min

***: Glutathione peroxidase; oxidized NADPH nmol/mg protein/min

#: one unit inhibit the rate of reduction of cytochrome C by 50% in a coupled system

의 결합에 의한 작용과 superoxide dismutase 를 통한 catalase, glutathione peroxidase에 의하여 대사되는 반응을 말한다[18]. SOD는 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키는 효소로 생체내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다[21]. 또 catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로

분해하여 무독화 시키는 radical scavenging enzyme이며[1], glutathione peroxidase 역시 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유리기를 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다[19]. 이 효소들은 oxidative stress에 의해 생성된 free radical이나 peroxide의 독작용을 저지시키는 free radical scavenging system에 의해 여러 가지 손상으로부터 생체를 보호할 수 있다[7]. 이러한 free radical scavenging system의 효소들은 실험결과에서 PQ의 투여로 증가되던 것이 TCM의 경구투여로 활성이 소량 감소됨을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과들은 PQ의 투여로 증가된 radical들을 해독하기 위하여 다량의 SOD, catalase, GP 등이 생성되었으나, TCM은 세포내에서 PQ 대사과정 중에 발생하는 superoxide radical과 hydroxyl radical 제거에 작용한다 하여도 통계적 유의성은 없을 정도이고 주로 phase 1반응에 영향을 주어 지질과산화물의 생성을 억제하는 것으로 추정된다.

폐 조직에 미치는 영향

지질과산화물 함량에 미치는 영향

PQ 유도 독성에 의한 폐에서의 지질과산화물 함량 변동을 Fig. 2에 나타내었다. PQ군은 정상군에 비해 MDA 생성량이 약 2배 증가하였으나 TCM 투여군의 경우 점차 감소하여 300 mg/kg에서는 MDA 생성량이 PQ군에 비해 30%정도 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 폐에는 항상 산소가 고농도로 존재하므로 폐의 표피세포는 PQ가 투여되면 적극적으로 받아 불포화지방산을 과산화시켜 MDA양이 크

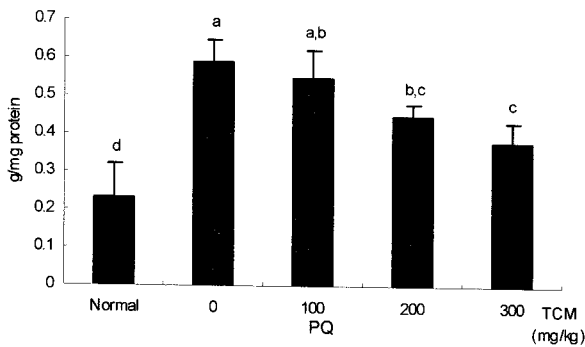


Fig. 2. Effect of methanol extract from *Terminalia Chebulae* on MDA level in lungs of PQ treated mice. Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

게 증가되는 것이고, TCM과 함께 투여할 경우에는 PQ대사과정 중 발생하는 hydroxyl radical, oxygen radical등을 TCM성분이 제거하여 지질과산화물 생성이 감소되었다고 해석할 수 있다.

Glucose-6-phosphatase 활성에 미치는 영향

일반적으로 조직세포는 oxygen radical의 공격으로 MDA가 생성되는 과정에서 민감하게 glucose-6-phosphatase (G-6-phosphatase)의 활성저하가 나타난다는 보고[35]가 있으며, 이러한 이유로 G-6-phosphatase는 폐조직의 독성지표로 삼고 있다. TCM이 PQ유도독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 폐조직 중 G-6-phosphatase의 활성 변화를 측정하여 그 값을 Fig. 3에 나타내었다.

PQ투여군의 경우 정상군보다 활성이 50%정도까지 감소함을 볼 수 있다. TCM 투여군의 경우 활성이 점차 증가하여 300 mg/kg농도에서는 정상군의 80%까지 효소 활성이 회복되는 것을 볼 수 있었다. 활면세포체의 marker효소이며 글리코겐의 합성 및 분해의 말단 단계에 관여하는 효소인 G-6-phosphatase가 PQ투여로 그 활성이 억제되던 것이 TCM의 투여로 정상군에 가깝게 회복되는 결과가 나타난 것으로 보아 G-6-phosphatase는 폐조직 독성지표로 예민한 표지자라는 것을 확인할 수 있었다.

Collagen 함량에 미치는 영향

손상된 폐조직은 복구되는 과정에서 섬유화가 진행되고 PQ 폐독성 기전의 마지막 단계인 폐섬유화는 호흡부전을 일으켜 사망에 이르게 한다[41]. PQ에 의해 일어나는 폐섬유화

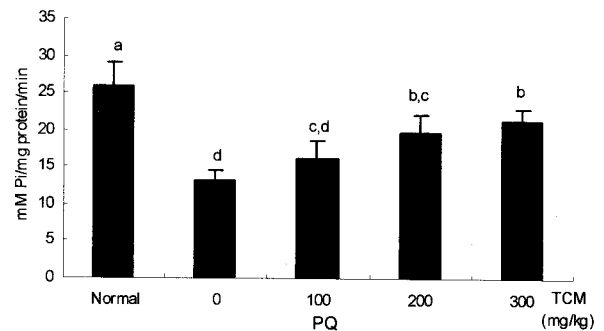


Fig. 3. Effect of methanol extract from *Terminalia Chebulae* on pulmonary glucose 6-phosphatase activity in PQ treated mice. Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

에 대한 TCM의 기능을 알아보기 위하여 collagen 함량을 측정해 보았다. Collagen은 아미노산 배열이 반복되는 Gly-Xaa-Yaa로 이루어져 있으며, Yaa 위치에 proline과 hydroxyproline이 높은 비율로 존재하고 hydroxyproline은 총collagen양의 약 10%를 차지하므로 hydroxyproline을 측정하여 collagen함량을 예측할 수 있다. Fig. 4의 결과와 같이 PQ 투여군의 경우 정상군에 비해 hydroxyproline양이 60%정도 증가된 것으로 측정되었으나 TCM의 농도가 증가함에 따라 정상군의 84%까지 감소하는 것으로 나타났다.

활성산소는 세포벽 산화를 촉진시켜 세포를 지지하고 있는 콜라겐 성분인 hydroxyproline의 농도를 증가시킨다[38]. 실험결과 PQ 투여군의 hydroxyproline 함량은 증가하였으나 TCM 투여로 감소하는 결과가 나타났다. 이것은 TCM이 PQ 유도 독성의 마지막 경로인 폐 섬유화를 경감시키는 효과가 있음을 말해준다. 이상의 실험결과들은 TCM이 PQ독성에 의한 신장과 폐조직 중의 지질과산화와 단백질의 산화적 손상을 억제함으로써 신, 폐조직세포를 보호하는 것으로 판단되며 해독기전은 활성산소 해독효소계보다 생성효소계에 영향을 미치는 것으로 추정된다.

요 약

Paraquat (PQ)는 전세계적으로 사용되고 있는 제초제의 한 종류이며 독성을 가지고 있다. 가자(*terminalia Chebulae*)는 오래전부터 설사, 이질, 디프테리아, 기침, 천식 등의 치료제로 중국, 한국 등에서 사용되고 있는 약용식물이다.

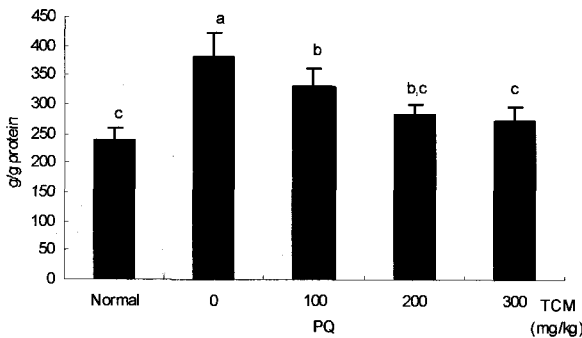


Fig. 4. Lung hydroxyproline contents of mice treated with PQ and methanol extract from *Terminalia Chebulae*. Mice were orally pretreated with concentration of methanol extract of *Terminalia Chebulae* (100, 200, 300 mg/kg) daily for two weeks and intraperitoneally injected paraquat (PQ 100 mg/kg) for one week. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (P<0.05). Means which are not significantly different are followed by the same alphabet.

TCM이 PQ 유도독성에 미치는 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 신장 조직과 폐 조직에서 지질과산화물 함량을 측정해 본 결과 PQ 처리군은 정상군에 비해 각각 2배, 2.5배 증가하였으나 TCM 투여군에서는 정상군에 가깝게 감소하였다. 2. 활성산소 생성계 효소에서 cytosolic enzyme system인 aldehyde oxidase, xanthine oxidase 그리고 microsomal enzyme system인 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성을 측정한 결과 PQ처리군에서 활성증가가 나타났으나 TCM 투여군에서는 효소활성이 소량 감소하였다. 3. 활성산소 해독계에 영향을 미치는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase를 측정한 결과 PQ 처리군은 정상군에 비해 2배 이상의 활성 증가가 나타났고 TCM 투여군의 경우 소량 감소하는 결과가 얻어졌다. 4. 폐 조직의 G-6-phosphatase는 PQ투여군의 경우 활성 저하가 나타났으나 TCM 투여군에서는 효소 활성이 점차 증가하여 300 mg/ml에서는 정상군에 가까운 수치가 나타났다. 5. 폐 조직 중의 collagen 함량은 PQ 투여군의 경우 정상군에 비해 1.5배 증가하였고 가자 메탄올추출물 투여군의 경우 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg의 순서로 함량이 점차 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 가자 메탄올추출물은 PQ 유도독성을 신장 및 폐조직에서 효과적으로 경감시키는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 경성대학교 연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Aebi, H. 1974. Catalase, pp. 673, In Bergmeyer, H. U. (eds.), *Method of enzymatic analysis*, Vol. 2, Academic Press Inc., New York.
2. Autor, A. P. 1974. Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase. *Life Sci.* **14**, 1309-1319.
3. Bidlack, W. R. and G. L. Lowry. 1982. Multiple drug metabolism; p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311-317.
4. Bismuth, C., A. H. Hall, F. J. Baud and S. Borron. 1996. Pulmonary dysfunction in survivors of acute paraquat poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* **38**, 220-222.
5. Bud, J. S., S. Z. Cagen, M. Olgaard and J. E. Gibson. 1976. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **35**, 501-513.
6. Free, J. A. 1980. Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. pp. 209, In Spiro, I. G. (eds.), *Metal ion activation of dioxygen*, John Wiley & Sons, Inc., USA.

7. Freeman, B. A. and J. D. Crapo. 1982. Biology of disease; Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412-416.
8. Granger, D. N. and D. A. Parks. 1983. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Pharmacologist* **25**, 159-164.
9. Halliwell, B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms : the key role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep.* **2**, 11-15.
10. Hemmati, A. A. and R. Hicks. 1999. Increased myofibroblasts contractile sensitivity in paraquat pretreated rat lung tissue. *Life Science* **65**, 2325-2332.
11. Huang, K. K. 1993. *The Pharmacology of Chinese Herbs*, pp. 194, CRC Press, Inc. Florida.
12. Hur, B. H. and S. J. Joo. 2003. Natural Products pp. 2-3, In Il-Moo Chang etc. (eds.), *Treatise on Asian Herbal Medicines*, Vol. I, Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul.
13. Hur, B. H. and S. J. Joo. 2003. Natural Products pp. 19-20, In Il-Moo Chang etc. (eds.), *Treatise on Asian Herbal Medicines*, Vol. II, Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul.
14. Jagtap, A. G. and S. G. Karkera. 1999. Potential of the aqueous extract of *Terminalia chebula* as an anticaries agent. *J. Ethnopharmacol.* **68**, 299-306.
15. Jamall, I. S. and V. N. Finelli. 1981. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **112**, 70-75.
16. Keles, M. S., S. Taysi, N. Sen and F. Aksoy, 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Canadian J. Biological Sciences* **28(2)**, 141-143.
17. Lee, S. H., K. S. Lee, J. M. Ahn, S. H. Kim and S. Y. Hong. 1995. Paraquat poisoning of the lung: thin-section CT findings. *Radiology* **195**, 271-274.
18. Leibovitz, B. E. and B. V. Siegel. 1980. Aspects of free radical reactions in biological systems: Aging. *J. Gerontol.* **35**, 45-48.
19. Little, C. and P. J. O'Brine, 1968. An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 145-150.
20. Lowry, O. H., V. J. Rosenbrough, A. S. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-261.
21. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
22. Mattew, H. A. Logan, M. F. Woodruff and F. Heard. 1968. Paraquat poisoning: lung transplantation. *Br. Med. J.* **3**, 759-763.
23. McDonagh, B. J. and J. Martin. 1970. Paraquat poisoning in children. *Arch. Dis. Child* **45**, 425-427.
24. Misra, H. P. and L. D. Gorsky. 1981. Paraquat and NADPH dependant lipid peroxidation in lung microsome. *J. Biol. Chem.* **256**, 9994-9998.
25. Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the herisch reaction. *J. Biol. Chem.* **55**, 416-421.
26. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yaki, 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
27. Oneyama, H. P. and F. W. Oehme. 1984. A literature review of paraquat toxicity. *Vet. Hum. Toxicol.* **26**, 495-502.
28. Paglia, E. D. and W. N. Valentine. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158-162.
29. Park, J. O. 2005. Effect of methanol extract from *Terminalia chebula* on the paraquat toxicity. Bulletin of Basic Science Research Center. Kyungsoong university. **17**, 55-60.
30. Rajagopalan, K. V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Purification and properties of hepatic aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.* **237**, 922-928.
31. Russel, L. A. 1981. Paraquat poisoning : Toxicologic and pathologic findings in three fatal case. *Clin. Toxicol.* **18**, 915-928.
32. Sato Y., H. Oketani. and K. Singyouchi. 1997. Extraction and Purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Bulletin.* **20**, 401-404.
33. Shin, T. Y., H. J. Jeong, D. K. Kim, B. S. Chae and C. M. Lee. 2001. Inhibitory action of water soluble fraction of *Terminalia chebula* on systemic and local anaphylaxis. *J. Ethnopharmacol.* **74**, 133-140.
34. Simon, R H., C. M. Scoggin and D. Patterson. 1981. Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **266**, 7171-7174.
35. Stirpe, F. and C. E. Della. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase ; in vitro Conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
36. Stralin, P. and S. L. Marklund. 1994. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal* **298**, 347-352.
37. Traiger, G. J. and G. L. Plaa. 1971. Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 105-112.
38. Vale, J. A, T. J. Meredith and B. M. Buckley. 1987. Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum. Toxicol.* **6**, 41-47.
39. Windholz, M. 1983. *The Merck Index*. No. 6894, 10th eds., MERCK & CO, USA.
40. Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human disease pp. 337-339, In Yagi, K. (eds.), *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 45, Academic Press Inc., New York.
41. Yamashita, M, and Y. Ando. 2000. A long-term follow-up of lung function in survivors of paraquat poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**, 99-103.