

[報 文]

마로 부터 분리한 Acetylmannan의 Paraquat 독성 억제 효과

정 세 영 · 심 창 섭

경희대학교 약학과

Inhibitory Effect of Acetylmannan of *Dioscorea batatas* on Toxicity of Paraquat

Se-Young Choung and Chang-Sub Shim

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT

Paraquat is a useful nonselective herbicide widely used through the world. However accidental or intentional ingestion of the herbicide cause fatal pulmonary injuring. But there is not suitable antidote of paraquat intoxication and therapeutic agents now be used are not effective. So, in this study we intended to evaluate the inhibitory effects of acetylmannan from *Dioscorea batatas* on paraquat toxicity.

100 mg/kg acetylmannan from wild or cultured *Dioscorea batatas* was administered orally to male SD rats for 3 days and the administration time interval was 24 hours. After one hour of final administration, 50 mg/kg paraquat was administered intraperitoneally. After 24 hours, the biochemical parameters of blood and tissues were examined.

In paraquat treated groups, sGPT, BUN, creatinine, ALP levels were increased by 2 to 4 times of normal values. However in acetylmannan from wild *Dioscorea batatas* treated groups, sGPT, BUN, creatinine, ALP levels in blood and lung tissue were significantly decreased to normal levels. In acetylmannan from cultured *Dioscorea batatas* treated groups, BUN, creatinine were significantly decreased to normal values, but not in sGPT, ALP levels. Therefore, we concluded that acetylmannan from wild *Dioscorea batatas* can be used as an antidote of paraquat toxicity.

서 론

Paraquat (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridylium ion)는 전세계적으로 가장 많이 사용되어지고 있는 비선택적 접촉 및 속효성 제초제 중의 하나로 인간을 포함한 포유동물에 심각한 독성을 나타낸다고 알려져 있

다.¹⁻⁷⁾

PQ 독성의 임상적 증상은 초기에 국소적 부식 작용으로 인한 점막 궤양, Hemoptysis, 오심, 설사 등이 보이며 점차 간, 신장, 심장의 손상과 황달, 빈맥 현상이 나타나고 혈청 중의 BUN, alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, transaminase level이 상

승된다. 독성이 진행될수록 폐조직에 섬유화가 일어나고 기침, 호흡곤란, 폐부종, 폐삼출로 인하여 사망하게 된다.³⁾ 사람에게 있어서 LD₅₀은 120 mg/kg, 치사량은 4 mg/kg이다.^{1),3)} PQ의 급성 독성 치료법으로서는 PQ가 소화기에서 빨리 흡수되지 않는 양이온성 화합물이므로 체내 흡수를 최소화하기 위하여 30% fuller's earth suspension, 6%~7.5% bentonite, 활성탄을 사용한 gastric lavage가 효과적이며 PQ의 배설을 촉진시킬 목적으로는 hemodialysis 및 hemoperfusion도 이용되고 hypoxia가 생존율을 높인다는 보고도 있다.³¹⁾

약물로서는 steroid제 등 항염증제가 가장 많이 사용되어지며, 지질 과산화 및 NADPH 감소를 억제하기 위한 항산화제로서 Vit C, Vit E, Vit B₂, GSH 등 생체내 상 성분과 항산화 효소인 SOD가 연구되어지고 있다.

이외에도 현재 연구가 진행 중인 독성 경감제로는 PQ의 폐 유입 차단제로서 spermine, spermidine 등의 polyamine 화합물과 oxygen radical 생성 차단제로서 NADPH cyt P-450 reductase inhibitor, xanthine oxidase inhibitor 및 장에서 흡수 억제제인 sugar sulfate 제제 등이 있다.¹²⁾ 그러나 아직까지는 임상적으로 PQ 독성 억제 또는 치료하기 위해 효과적으로 사용할 수 있는 약물은 없는 상태이다.

마는 백색의 꽃을 6~7월에 피우며 자웅 2개로, 수상화서이며 삭과는 날개 모양으로 마과 (*Dioscoreaceae*) 마속 (*Dioscorea*)에 속하는 다년생 초본의 덩이 뿌리이다.

덩이 뿌리 모양에 따라 여러 가지로 분류되는데 긴마 *Dioscorea batatas*는 그중 한 부류이다. 긴마는 장산약 또는 마라고도 부르는데, 이는 다시 우리 나라 전역에서 재배되는 덩이 뿌리가 길며 굵은 재배 마와 덩이 뿌리가 가늘며 긴 야생마로 나뉜다.¹⁴⁾

마의 일반 성분은 품종에 따라 다소 다르나 수분이 74%, 전분은 20%, 단백질이 2.5%, 비타민 A, B 및 C를 6~17% 함유하고 있으며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 무기질은 K, Na, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd이,¹⁶⁾ 주된 지방산은 linoleic acid와 linolenic acid,¹⁹⁾ 그 외 steroidal saponin, phytic acid, polyphenol oxidase 등으로 구성되어 있다.²⁰⁾ 점액 성분은 mannan이 대부분 acetyl화 된 acetylmannan으로 수용성인데 anhydromannan과 acetyl의 결합 비율은 1:2이며 다당류 중에는 man-

nose 80.8%, fructose 9.3%, galactose 6.7%, xylose 3.2%로 이루어져 있다.²¹⁾

마의 이용으로는 구황식품 뿐 아니라 당뇨병, 폐결핵, 빈뇨증 및 신체가 허약할 때 한방 약재로 많이 쓰이는데 자양, 익정益精, 지사止瀉 등의 효능이 있고²²⁾ 폐와 비장에 이롭고 소염, 해독, 진해, 거담, 이뇨, 신경통, 류머티즘에 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.²³⁾

암 뿐만 아니라 만성 간염, 류머티스 관절염, 신장증과 같이 현대 의학으로 완치가 어려운 자기 면역 질환에 대하여, 저분자보다 고분자 희분에서 interferon 유도 활성,²⁴⁾ 항종양 활성,²⁵⁾ 식작용 증강 활성 및 B 임파구의 활성 작용²⁶⁾ 등이 밝혀지고 있으며, 일부에서 그 활성 성분들이 다당으로 확인되었다. 보체계가 지나치게 활성화 됨으로서 발생하는 염증, 피부병 등 면역계질환을 예방 치료하기 위한 항보체 활성 물질은 저분자보다 고분자의 산성 및 중성 다당류임이 알려져 있고,²⁷⁾ 다당성분은 면역 증강 효과도 가지는데,²⁸⁻²⁹⁾ O-acetylmannan은 natural killer (NK) cell을 종양 세포에 결합시켜 면역 증강 효과를 가짐으로써 종양 세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾

PQ는 생체 내에서 NADPH cytochrom P-450 reductase의해서 대사를 받아 radical을 형성하게 된다. 이렇게 생성된 radical은 폐세포를 공격하여 염증을 유발시키고 결과적으로 폐의 섬유화를 일으킨다. 마의 성분중 acetylmannan이 24.8~27.4% 함유되어 있으며 다양한 생리 활성을 지닐 것으로 예상되고 있고 특히 마의 점질 다당류가 항염증작용이 나타낸다는 보고에 따라 본 연구에서는 마에 의한 항염증효과에 있어서 acetylmannan이 주요한 작용을 할 것이라는 생각을 가지고, PQ에 의한 염증 유발 및 독성 억제 물질로서 acetylmannan을 검색하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물처리

국립 보건 안전 연구원으로부터 분양 받은 200 g 전후의 SD (Sprague-Dawley)계 웅성 rat을 사용하였다. PQ (50 mg/kg)에 대해 1:2의 중량비 (100 mg/kg)로 야생마 및 재배 마의 추출물인 Acetylmannan을 Saline에 녹인 후 3번에 나누어 3일 연속 경구 투여했다. 3번째 경구 투여 1시간 후 PQ (50 mg/kg)를 Saline에 녹여 복강 투여했다. 24시간 절식 후에

sacrifice 했다.

2. 혈청 및 조직 분리

SD rat을 ether로 가볍게 마취시킨 후 회복하여 심장 채혈하고 실온에서 30분 방치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액인 serum을 분리하였다.

조직은 야생마의 acetylmannan을 1:2로 투여한 SD rat의 portal vein으로 0.9% NaCl solution을 perfusion하여 혈액을 제거한 후 분리하였다.

3. sGPT 활성 측정

GPT 기질 용액 1 ml을 취해 37°C에서 2~3분간 incubation한 후 serum 0.2 ml을 취해 혼합하고 37°C에서 30분간 incubation하였다. 여기에 2, 4-dinitrophenylhydrazine 1 ml를 가하고 상온에서 20분간 방치 후 0.4 N-NaOH 10 ml를 가하고 진탕 후 증류수를 대조로 하여 505 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

4. Creatinine량 측정

혈청 및 기준액 0.1 ml에 picrate 시약 3.0 ml를 넣어 섞은 후 37°C에서 20분간 방치 후 맹검을 대조로 하여 515 nm에서 검체 및 표준의 흡광도를 측정했다(A₁). 여기에 acid시약 2방울을 떨어뜨리고 37°C에서 5분간 incubation후 맹검을 대조로 하여 515 nm에서 검체의 흡광도를 측정(A₂)한 후 Creatinine 양을 구하였다.

5. BUN량 측정

Urease 0.1 ml을 완충액 20 ml에 섞어 만든 효소 완충액 2 ml에 각각 혈청과 기준액 (60 ml/100 ml) 0.02 ml을 넣고 37°C에서 15분간 incubation 한 후 발색액을 각각 2 ml씩 넣고 37°C에서 5분간 incubation 하였다. 5분 이후 60분 이내 맹검을 대조로 하여 570 nm에서 검체 및 표준의 흡광도를 측정한 후 BUN 양을 구하였다.

6. 혈청 Alkaine phosphatase (ALP) 활성 측정

페닐 인산 기질액 2 ml를 37°C에서 2~3분간 incubation 한 후 혈청 0.05 ml를 가하고 37°C에서 15분간 incubation 시켰다. 여기에 발색액 2.0 ml를 넣고 10분 이상 방치 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 조직에서의 ALP 활성 측정

페닐 인산 기질액 2 ml를 37°C에서 2~3분간 incubation 한 후 10% 조직 homogenate 0.05 ml를 가하고 37°C에서 15분간 incubation시켰다. 여기에 발색액 2.0 ml를 넣고 10분 이상 방치 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 간 독성에 대한 억제 효과

PQ (50 mg/kg) 단독 투여시 간 손상에 의해 혈청 중의 GPT level이 정상군의 2~4배 이상 상승했고, 야생마로부터 분리한 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 투여 최종투여 1시간 후 PQ 투여한 군의 GPT level은 PQ 단독 투여보다 60~70% 정도 감소하여 정상치로 회복됨을 볼 수 있었다. 재배마로부터 분리된 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 투여 하고 최종투여 1시간 후 PQ 투여한 군에 있어서는 PQ 단독 투여와 별 차이가 없어 간 독성에 대한 억제 효과는 없는 군으로 판명되었다.

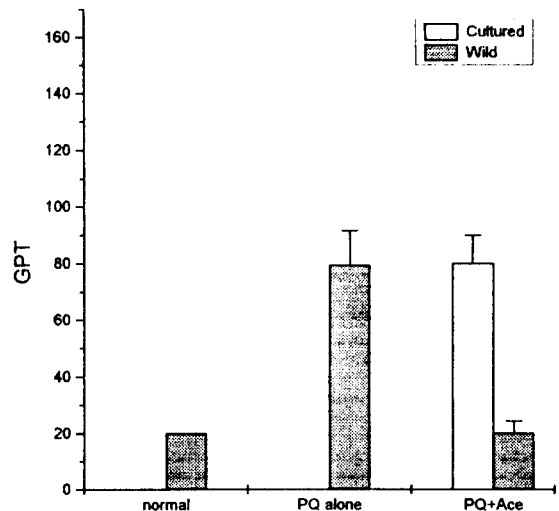


Fig. 1. Inhibitory effect of Acetylmannan from *Dioscorea batatas* on hepatotoxicity of PQ. PQ:Paraquat Ace:Acetylmannan Each value represents the mean +/- SE of data from 10 rats. Significant difference between PQ and acetylmannan treated group (P<0.01).

2. 신장 독성에 대한 억제 효과

마로부터 분리한 acetylmannan의 PQ 유도 신장 독성에 대한 억제 효과를 본 결과는 Fig. 2, Fig. 3과 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 신장 독성 지표인 creatinine 치가 PQ (50 mg/kg) 단독 투여로 정상군의 Creatinine level보다 2~3배 이상 상승되었으며, 야생마로부터 분리한 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 투여후 최종투여 1시간 후 PQ 투여한 군의 Creatinine level은 PQ 단독 투여보다 50~60% 정도 감소하였으며 수치로서 0.5 이하를 나타내었으므로 정상으로 회복된 것으로 판단되었다. 역시 재배마 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 경구 투여후 1시간 후 PQ투여한 군의 Creatinine level도 PQ 단독 투여보다 50~60% 정도 감소하여 정상치를 나타냈다. 또다른 신장 독성 지표의 하나인 BUN 치에 있어서도 Fig. 3에서 보는 바와 같이 PQ (50 mg/kg) 단독 투여는 정상군의 BUN치보다 2배 이상 상승했고, 야생마로부터 분리한 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 경구 투여 1시간 후 PQ 투여한 군의 BUN level은 PQ 단독 투여보다 50~60% 정도 감소하였다. 재배마로부터 분리한 acetylmannan

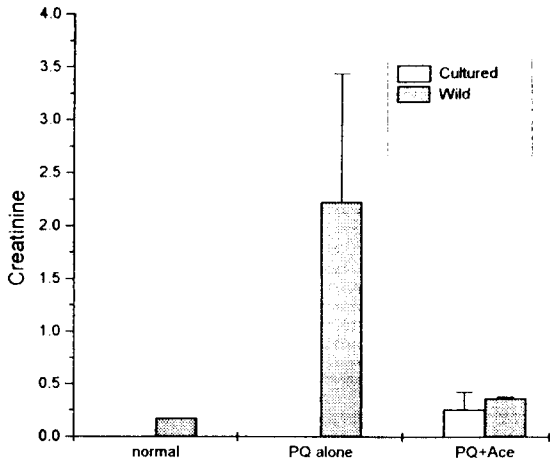


Fig. 2. Inhibitory effect of acetylmannan from *Dioscoreae batatas* on nephrotoxicity of PQ (Creatinine).

PQ:Paraquat Ace:Acetylmannan
 Each value represents the mean +/- SE of data from 10 rats.
 Significant difference between PQ and acetylmannan treated group (P<0.01).

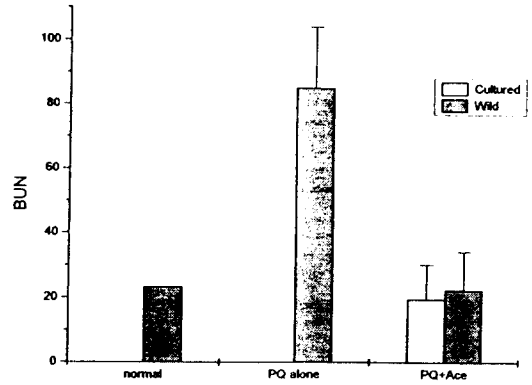


Fig. 3. Inhibitory effect of acetylmannan from *Dioscoreae batatas* on nephrotoxicity of PQ. PQ:Paraquat Ace:Acetylmannan
 Each value represents the mean +/- SE of data from 10 rats.
 Significant difference between PQ and acetylmannan treated group (P<0.01).

(100 mg/kg)을 3일 연속 경구 투여 후 1시간 후 PQ 투여한 군의 BUN level은 PQ 단독 투여보다 60~70% 정도 감소하였다. 정상군의 BUN치가 20 이하라는 점에서 야생마, 재배마의 acetylmannan 투여 군도 거의 정상치로 회복되었다고 할 수 있겠다.

3. 혈청 Alkaline phosphatase (ALP) 활성 변화

PQ (50 mg/kg) 단독 투여한 군의 경우 폐, 간, 신장조직 손상에 의해 혈중으로 유출된 ALP 활성이 정상군보다 약 2~4배 정도 상승했으며, 야생마로부터 분리한 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 경구 투여 1시간 후 PQ투여한 군의 경우 ALP 활성이 정상군과 거의 비슷했다. 그러나, 재배마로부터 분리한 acetylmannan (100 mg/kg)을 3일 연속 경구 투여 1시간 후 PQ투여한 군의 경우 ALP 활성은 PQ 단독 투여군과 비슷한 결과를 나타내 억제효과가 없는 것으로 판명 되었다(Fig. 4).

4. 야생마의 acetylmannan을 투여한 흰쥐 조직중의 ALP 활성 변화

야생마의 acetylmannan투여에 의해 혈중으로 유리되는 ALP 활성이 저하되었다는 것은 PQ에 의해 손상된 조직중에서 유리된 ALP의 양이 저하되었음을 의미하는 것이므로 조직의 ALP 활성 변화를 통해 이를

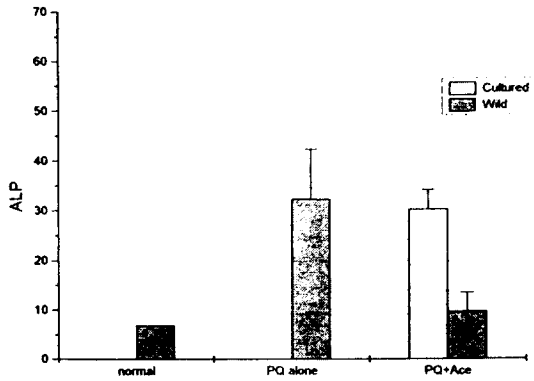


Fig. 4. Effect of acetylmannan from *Dioscoreae batatas* on serum ALP activity of PQ treated rats.
 PQ:Paraquat Ace:Acetylmannan
 Each value represents the mean +/- SE of data from 10 rats.
 Significant difference between PQ and acetylmannan treated group ($P < 0.01$).

확인 하고저 하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 폐조직에서는 PQ (50 mg/kg) 단독 투여한 군의 경우 ALP활성이 정상군보다 20% 정도 낮게 나타났고, 야생마의 acetylmannan을 (100 mg/kg) 3일 연속 경구 투여한 1시간 후 PQ투여한 군의 경우 ALP 활성

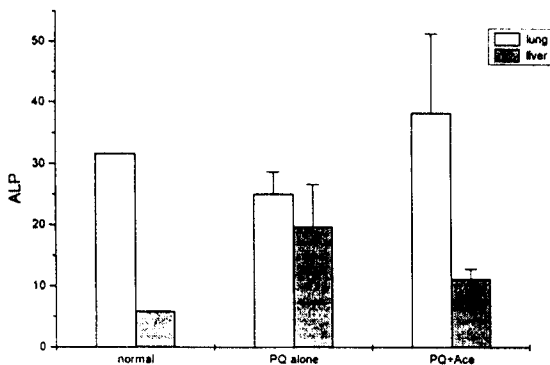


Fig. 5. Effect of acetylmannan from wild *Dioscoreae batatas* on lung and ALP activity of PQ treated rats.
 PQ:Paraquat Ace:Acetylmannan
 Each value represents the mean +/- SE of data from 10 rats.
 Significant difference between PQ and acetylmannan treated group ($P < 0.01$).

이 정상군보다 25% 정도 오히려 상승하였다. 그러나, 간 조직에서는 PQ (50 mg/kg) 단독 투여한 군의 경우 ALP활성이 정상군보다 4배 정도 상승했고, 야생마의 acetylmannan을 100 mg/kg으로 3일 연속 경구 투여한 1시간 후 PQ투여한 군의 경우 ALP 활성이 정상군 보다 2배 정도 상승하였다. 폐의 경우 PQ가 폐로 능동수송에 의해 적극적으로 도입되어 조직 손상을 강하게 나타내는 것을 야생마의 acetylmannan이 억제 하였음을 보여준 것이며 간의 경우에는 PQ 투여에 의한 간손상의 복구 과정에서 단백질 합성이 증가되어 ALP 활성이 4배나 증가된 반면 acetylmannan이 PQ 독성을 억제 함으로써 ALP 활성 증가를 2배 정도 머무르게 한 것으로 보인다.

결론

마의 acetylmannan을 추출분리하여 제초제 PQ의 간, 신장, 폐 독성에 대한 억제효과를 보았다.

야생마의 acetylmannan은 PQ에 의한 혈청중 GPT 상승, BUN, creatinine 치의 증가 등 간, 신장 독성 지표 수치들을 현저하게 억제하며 정상 치료 회복됨을 보여 주었으며 폐 독성 지표인 혈청중 ALP 활성도 억제하였다. 이때 조직중 ALP 활성은 정상 치보다도 약간 높은 수치를 나타냈으며 이는 paraquat에 의한 폐 조직 손상이 적게 일어났거나 회복되었음을 뜻하는 것으로 paraquat에 의한 폐 독성이 사망의 주요 원인이라는 점에서 매우 중요한 결과라 하겠다.

재배마의 acetylmannan의 경우는 간 독성 지표인 sGPT 수치는 정상으로 회복시켰으나 신장 독성을 나타내는 BUN, creatinine, 폐 독성 지표인 ALP 활성에는 PQ 단독 투여시와 별다른 차이가 없어 개선 효과가 없는 것으로 판명되었다.

참고 문헌

1. A. Wallace Hayes, *Principles and Methods of Toxicology*. Second Edition. Raven Press. 152-153 (1989).
2. Haley T.J., Review of the toxicology of paraquat. *Clin. Toxicol.* **14**, 1-46 (1979).
3. Gossel and Bricker, *Principles and Clinical Toxicology*. Raven Press. 143-146 (1989).
4. Nobuyoshi Sato, Kohyu Fujii, Osafumi Yuge and Michio Morio: Changes in lipid peroxi-

- dation levels and lipid composition the lungs, livers, kidneys and brains of treated with paraquat *J. Appl. Toxicol.* **12**(5), 365-368 (1992)
5. R.D. Kimbrough and T.B. Gaines: Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **17**, 679-690 (1970).
 6. C.M. Bullivant: Accidental poisoning by paraquat: Report of two cases in man. *Br. Med. J.* **21**, 1272-1273 (1966)
 7. R.D. Fairshter and A.F. Wilson: Paraquat poisoning. *Am. J. Med.* **59**, 751-753 (1975)
 8. S. Bus, S.T. Aust and J.E. Gibson: Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 749-755 (1974).
 9. H.K. Fisher, M. Humphries and R. Bails: Paraquat poisoning, recovery from renal and pulmonary damage. *Ann. Intern. Med.* **75**, 731-736 (1971).
 10. H.P. Misra and L.D. Gorsky: Paraquat and NADPH-dependent lipid peroxidation in lung microsomes. *J. Biol. Chem.* **256**, 9994-9998 (1981).
 11. T.K. Aldrich, A.B. Fisher, E. Cadenas and B. Chance: Evidence for lipid peroxidation by paraquat in the perfused rat lung. *J. Lab. Clin. Med.* **101**, 66-73 (1983).
 12. 정세영: 제조제 paraquat의 독성 기전과 경감제 개발 현황, *New drug news.* **3**(5), 20-23 (1995).
 13. H.M. Hassan: Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *methods Enzymol.* **105**, 523-532 (1984).
 14. 정을권: 산약재배, *새농민 기술대학 교육자료* **42**, 서울, p. 241, 1989.
 15. 김일혁: *약품 식물학 개론*, 학창사, 서울, 107-109, 198
 16. Onayem O: Some chemical factors affecting the quality of processed yam, *J. food science.* **51**(1), 161-164 (1986)
 17. 조재선: *식품 재료학, 기전 연구사*, 서울, 233, 1981.
 18. Bonire, J.J. and Jalil, N.S.N: Iron, nickel, copper, zinc and cadium content of two cultivats of white Yam and their source soils, *J. Sci. Food Agric.* **53**, 431 (1991)
 19. Anthony V.U. and Fred I.O: Composition of lipids in Diocorea tubers, *J. Agric. food chem.* **30**, 993-996 (1982)
 20. 한용남, 한승혜, 이인란: 산약 잡액 성분의 정제와 함량분석에 관한 연구, *한국생약학지*, **21**(4), 274 (1990)
 21. Kazunori Hironaka, Katsuyosi Takada, Kenichi Ishibashi: Chemical composition of mucilage of chinese Yam, *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**(1), 48-51 (1990)
 22. 윤국병, 장준근: *몸에 좋은 산약초*, 석오 출판사, p. 334, 1989.
 23. *약품 식물학 연구회: 산약품 식물학*, 학창사, 1992.
 24. Kiyohara, H. and Yanada, H.: Characterization of in vitro IL-2 production enhancing and anti-complementary pectic polysaccharide from kampo medicine, *Phychemistry Res.* **7**, 367 (1987)
 25. Iino, K. and Susuki, N.: Structural Characterization of a natura anti-tumor B-D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifora frondosa*, *Carbohydr. Res.* **141**, 111(1985)
 26. Ohtani, K. and Mizutani, K.: Sanchinan-A, a reticuloendothelial system activating arabinogalactan from San chiginseng, *Planta Medica*, p. 166 (1987)
 27. 신광순, 라경수, 성하진, 양한철: 식물성 식품재료로부터 보체계 활성화다당의 검색 및 그 활성검토, *한국식품과학회지*, **25**(3), 197-203 (1993)
 28. Yu Yeon-Sook: Antineoplastic immunomodulator, Preclinical evaluation of Korean medicinal plants, The 3rd International Cancer Symposium of Korea Cancer Center Hospital, september **16**, pp. 71-74 (1995)
 29. Wagner, H., Proksh, A., Reiss-maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turda, M., Fang, J.N.: Immunstimulierend wirkende polysaccharide (heteroglycan) aus hoheren pflanzen, *Arzneimittel-Forsch.* **35**, 1069-1075 (1985)
 30. Muller, E.A. and Anderer, F.A.: Synergistic action of a rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer cells and lymphokine-activated killer cells, Chemical specificity of target cell recognition, *Cancer Research*, **50**, 3646-3651 (1990)