

Paraquat의 세포독성과 흰쥐의 폐에서 3-Methylcholanthrene의 독성경감효과

임요섭^{*} · 김덕수 · 한두석¹ · 황인택²

순천대학교 환경농업과학부, ¹원광대학교 치과대학 구강해부학교실, ²한국화학연구원

요약 : Paraquat의 세포독성을 알아보기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포에 적용한 후 MTT와 NR 분석법을 이용하여 세포독성을 측정하고, paraquat의 세포독성에 대한 3-MC의 독성경감효과를 알아보기 위하여 Sprague Dawley계 수컷 랫드에 paraquat 단독 및 paraquat과 3-MC 병용투여 후 랫드의 폐를 경시적으로 채취하여 관찰하였다. Paraquat의 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT₅₀은 1668.97 μM, NR₅₀은 1030.25 μM로 산출되어 Borenfreund와 Puemer(1984)의 독성판정기준에 의하면 저독성 물질이었다. Paraquat 단독 투여 군은 H&E 염색에서 3시간째부터 폐 모세혈관 내에 적혈구 수가 증가하기 시작하여 24시간째에는 충혈상태에 이르렀으며, 폐포사이 중격에서는 큰 폐포상피수가 증가하였다. 또한 폐 조직을 둘러싸고 있는 결합조직 내에는 임파구, 대식세포 및 다형핵 백혈구 등이 다수 관찰되었고, 48시간째부터 폐포사이 중격과 폐포 내에 폐포큰포식세포가 증가하기 시작하여 96시간째에는 다수의 폐포큰포식세포가 관찰되었다. Verhoeff의 iron hematoxylin 염색에서도 paraquat 단독 투여 후 24시간째에 조직변화가 가장 심하였고, 교원섬유량의 급격한 증가, 폐포의 넓이와 폐포 구멍(alveolar pore) 간격의 확장 등이 관찰되었다. 한편, paraquat과 3-MC 병용투여군은 paraquat 단독 투여 군에 비하여 조직변화가 약하게 관찰되었는데, 병용투여 후 3시간째에는 단독투여 3시간째의 소견과 유사하였으나 점차 회복되어 폐 모세혈관 내에 적혈구 수가 증가하여 24시간째에는 대조군의 구조와 거의 유사하였다. 또한 폐 조직을 둘러싸고 있는 결합조직과 임파소절에서도 paraquat 단독 투여 군에서 보였던 변화가 거의 관찰되지 않았다. Verhoeff의 iron hematoxylin 염색에서도 병용투여 후 24시간째에는 교원섬유량이 단독 투여 군에 비하여 크게 감소하였고 폐포와 폐포 구멍의 넓이도 대조군과 유사하였다 (2002년 5월 26일 접수, 2002년 6월 24일 수리).

Key words : NIH 3T3 fibroblast, paraquat, 3-methylcholanthrene (3-MC), NR assay, iron hematoxylin stain of Verhoeff.

서 론

Paraquat는 bipyridyl계의 수용성 제4급암모늄염유도체(quaternary ammonium derivatives)로서 접촉성 제초제로 널리 사용되고 있으며 과립 형과 수용액으로 판매되고 있다. 1966년 음독에 의한 paraquat독성이 최초로 보고 되었는데 paraquat는 산소자유기(free radical)의 생성과 지방과산화(lipid peroxidation)를 동반하는 생체이물경로(xenobiotics pathway)를 통하여 독성을 유발한다(Situnayake 등, 1987).

생체이물 작용경로는 호흡상피세포와 호흡기도에

분포하는 clara 세포의 에너지 의존성(energy-dependant) 디아민 이동과정(diamine transport process)에 paraquat가 축적되는 과정을 말하는데, 이 과정에 축적된 paraquat가 2가 양이온(cation)을 재형성하기 위하여 분자산소(molecular oxygen)와 일시적으로 반응하거나 과산화음이온(superoxide anion)을 끊임없이 생산하는 산소자유기(free radical)에 의한 NADPH 의존성 일전자산화(NADPH-dependant one electron reduction)를 의미한다. Paraquat는 pentose phosphate pathway를 빠르게 자극하고 폐에서 지방산(fatty acid)의 합성을 억제하여 혼합 디설파이드(mixed disulphide)의 농도를 빠르게 증가시키므로

*연락처자

결국 폐에서 NADPH를 감소시킨다(Smith, 1987).

Paraquat은 polyamine이나 diamine을 선택적으로 흡수하는 세포인 호흡상피세포(alveolar epithelial cell)에 의하여 고농도로 농축되어(the Toronto Lung Transplant Group, 1985) 폐의 섬유화(lung fibrosis)를 불가역적으로 일으킨다. 또한 최초흡입량과 혈장 농도(plasma concentration)에 따라 위장관, 신장 및 신경근육계의 장애를 일으키기도 한다(Smith, 1987). Paraquat에 노출된 환자의 경우 해독제(antidote)가 없기 때문에 위세척으로 소화관흡수를 감소시키거나 흡수제 또는 혈액투여 등을 통하여 신장독성을 감소시키는 방법을 이용하여 치료한다(Meredith와 Vale, 1987). 심급성 폐 손상은 paraquat의 독성에 의하여 흔히 발생하며 2일 이상 생존하는 환자의 주된 사망 원인은 호흡부전(respiratory failure)이다(Vale 등, 1987).

호흡상피세포(type I cell)는 편평폐포세포(squamous alveolar cells)라고도 하며, 폐포표면을 둘러싸고 있는 매우 얇은 세포이다. 일반적으로 호흡상피세포가 폐포표면의 97%를 구성하며 큰폐포상피세포는 나머지 3%를 차지하고 있다. 호흡상피세포의 두께는 매우 얇아 때로는 25 nm정도일 때도 있으며, 전자현미경으로 관찰하면 모든 모세혈관들이 이들 상피세포에 의해 덮여 있는 것을 관찰할 수 있다. 혈관 공기장벽의 두께를 줄이기 위해 골지복합체, 과립형질내세망, 미토콘드리아와 같은 세포소기관은 핵 주변부에 모여 있고 나머지 대부분의 세포질에는 거의 존재하지 않는다. 얇은 세포질부분에는 포음소포(pinocytotic vesicle)가 풍부하게 존재하며, 이들은 계면활성제(surfactant)의 교체(turnover)와 외부로부터 들어온 작은 입자형태 오염물의 제거에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 모든 호흡상피세포에는 조직액이 공기로 차 있는 폐포 내 공간으로 흘러 들어가는 것을 방지하기 위해 부착반(desmosome)이 발달되어 있다. 호흡상피세포의 주된 역할은 가스가 쉽게 투과할 수 있도록 최소 두께의 장벽을 제공하는 것이다. 폐포상피의 재생에 관여하는 세포는 큰폐포상피세포(type II cell)와 호흡기도의 clara 세포인데 큰입방세포인 큰폐포상피세포는 이산화질소(NO_2) 가스나 이와 유사한 독성물질이 폐포에 들어오면 세포분열이 촉진되어 호흡상피세포로 변형됨으로서 폐포를 다시 정상으로 둘러싸게 한다(박경아 등, 1992). Clara 세포

는 호흡세기관지에 섬모입방세포와 함께 분포하면서 호흡상피세포의 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다(Leeson 등, 1988).

폐포는 기관지나무의 종말부분으로 직경이 약 200 μm 이며 벌집과 같이 한쪽 면이 열려있는 작은 포켓 구조를 이루고 있다. 폐포와 이웃 폐포 사이에는 폐포사이 종격이 있고, 이 종격은 탄력섬유와 아교섬유로 이루어져 폐포의 넓이를 조절할 수 있는데 Takahashi 등(1994)은 paraquat를 음독한 환자에서 폐포의 넓이를 측정한 결과 폐포의 넓이는 거의 변하지 않았다고 보고하였다.

3-Methylcholanthrene(3-MC)은 포유동물에서 monooxygenase의 양적변화를 유도하는 효소 유도제로서 생쥐에서는 3-MC가 유전적으로 monooxygenase의 량을 조절하고(Nebert 등, 1978), 포유동물에서는 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)을 유도할 수 있는 혈액단백질(hemoprotein)로 분류하고 있다. Statham 등(1978)은 PAH를 어류에 노출시키면 monooxygenase의 활성을 상승시키고 때로는 cytochrome P-450 효소계의 양도 상승시킨다고 보고하였다.

이에 저자는 paraquat가 건강세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT 분석법과 NR(neutral red)분석법을 이용하여 MTT, NR 흡광도를 측정하였고, 폐 조직에 대한 paraquat의 독성과 이에 대한 3-MC의 독성 경감효과를 알아보기 위하여 랫드에 paraquat를 단독 또는 3-MC와의 병용투여 후 경시적으로 폐조직을 관찰하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'bipyridinium dichloride, 순도: 99%)는 Kanto Chemical Co.(Japan)의 표준제품을 사용하였다. MTT와 NR정량에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 구입하였고, 세포배양액에 사용한 Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin G, streptomycin, 및 fungizone 등은 Gibco Chemical Co.(U.S.A.)제품의 GR급을, 기타 시약은 특급시약을 구입하여 실험을 수행하였다. CO_2 incubator는 Shellab Co. (U.S.A.)제품을, well multi-dish와

microplate reader(Molecular Devices)는 Nunclon Co. (U.S.A.)제품을, 도립현미경은 Olympus Co.(inverted microscope, Japan)제품을 사용하였고 MTT와 NR정량은 ELISA reader(Spectra Max 2500, U.S.A.)를 사용하였다.

실험관내 실험 (*In vitro*)

세포배양

각 제초제의 세포독성을 시험하기 위하여 원광대학교 의과대학 해부학 교실에서 분양 받은 NIH 3T3 세포(mouse skin fibroblast)를 배양용기(25 cm² flask, Nunc)에서 stock culture한 후 3~4회 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양액은 EMEM에 10% FBS와 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml) 및 fungizone(25 µg/ml)을 넣어 조제하였고, 세포는 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%로 조절한 항온기(CO₂ incubator)내에서 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 실험을 위한 세포 부유액은 1차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포 수가 2.0×10⁴ cell/ml가 되도록 만들었고, 이 세포 부유액을 세포 배양용 well multi-dish에 well당 2 ml씩 분주하여 배양하였다.

MTT정량분석법

Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 각 well에 4×10⁴ cells을 넣고 24시간 배양 후 카드뮴과 내독소 IC₅₀을 각각 넣은 후 동시에 팔선양조용수를 농도별(10⁻² mg/ml ~ 10⁻⁵ mg/ml)로 첨가한 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A.)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR분석법

Borenfreund와 Puerner의 방법(1984)에 의하여 세포를 배양용기 당 2.0×10⁴ cell/ml이 되도록 24 well multi-dish에 분주하여 24시간 배양 후, 소엽의 메탄올 추출물에 대한 각각의 클로로포름 분획이 포함된

배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한 다음 50 µg/ml의 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well 당 1 ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척하여 1% formaldehyde - 1% CaCl₂를 넣어 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader(550 nm)로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

IC₅₀ 결정

Paraquat의 IC₅₀은 배양중인 NIH 3T3 섬유모세포의 각 well에 1, 25, 50 및 100 µM 농도의 paraquat를 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT와 NR을 정량하여 각각에 대한 50% 억제농도 IC₅₀을 직선회귀식(채영암 등, 1991)에 의해 산출하였다

생체 내 실험 (*In vivo*)

실험동물 및 실험 군 배정

본 실험에 사용된 실험동물은 대한실험동물센타(충북음성)에서 번식 사육한 4주령의 랫드 중 무게가 80 ~ 100 g된 SPF albino 랫드(수컷 Sprague Dawley 계)를 입수하여 실험실 조건으로 2주간 순화시킨 후 체중 180~200 g의 랫드만을 선별하여 공시하였다. 대조군에는 working solution으로 사용된 DMSO 투여군, corn oil 투여 군과 DMSO+corn oil 혼합투여군으로 나누었다. 실험군은 paraquat LD₂₅ 투여군, 3-MC 투여군과 paraquat LD₂₅+3-MC 병용투여군으로 나누었다. 각 실험군 별로 랫드 8마리를 배정하여 경시적으로(0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 및 96 hr) 조사하였고, 각 실험은 3반복으로 수행하였다. Paraquat만을 처리한 실험군에서의 치사된 랫드는 즉시 제거한 후 생존한 랫드만을 실험에 사용하였고, 실험실 조건은 온도 23±1°C, 습도 55~60%, 광도는 인공조명으로 명암을 각각 12시간씩 조절하였고, 삼양식품 흰쥐용 사료(제 322-4호)와 1차 증류수를 일정량씩 공급하여 자유로이 섭식할 수 있도록 하였고, 깔짚은 3일을 주기로 교체하여 분비물로 인한 스트레스를 방지하였다.

약물투여

Paraquat은 LD₂₅(250 mg/kg)를 dimethylsulfoxide (DMSO) 0.5 ml에, 3-MC(60 mg/kg)는 corn oil 0.5

Table 1. The cytotoxicity of paraquat in NIH 3T3 cells by MTT assay and NR assay

Group	MTT assay		NR assay	
	Con.(μ M)	Mean \pm S.D. (% of control)	Mean \pm S.D. (% of control)	(% of control)
Control	4.15 \pm 0.00	(100)	3.87 \pm 0.06	(100)
1	4.15 \pm 0.00	(100)	3.85 \pm 0.00	(99.6)
25	4.13 \pm 0.00	(99.4)	3.78 \pm 0.02	(97.8)
50	4.10 \pm 0.00	(98.6)	3.72 \pm 0.03	(96.3)
100	4.03 \pm 0.11	(97.0)	3.68 \pm 0.02	(95.1)
IC ₅₀		1668.97 μ M		1030.85 μ M

ml에 각각 용해시킨 working solution을 투여직전 조제하여 사용하였다. Paraquat 및 3-MC 단독 투여군은 각각 상기한 0.5 ml의 시험물질을 경구투여용 주사기로 1회 경구투여 하였고, 조합 투여군은 paraquat 투여 30분 후 추가적으로 3-MC를 1회 투여하였다. 무처리 대조군에는 working solution으로 사용된 DMSO와 corn oil만 각각 단독 또는 DMSO+corn oil 조합으로 0.5 ml씩을 경구 투여하였다.

표본제작

시험물질 투여 후 각 실험군의 동물을 경시적으로 (0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 및 96 hr) 채취하여 ether로 마취시킨 다음 랫드의 흉벽을 절개하여 폐를 적출한 뒤 4~5 mm의 두께로 잘라 4°C의 10% NBF(neutral buffered formalin) 고정액에 48시간 고정 후 흐르는 물에 48시간 수세하였다. 수세한 조직은 농도 상승순으로 50, 60, 70, 80, 90, 95 및 100%의 에틸알콜 용액에 차례로 담구어 탈수한 후 xylene을 사용한 투명 과정을 거치고 parafilm에 wax를 씌워 블록을 만들었다. 포매된 조직은 microtome(독일 Leitz사)을 이용 6 μ m의 두께로 자른 다음 gelatin이 들어 있는 40~43 °C의 항온수조에 띄운 후 slide로 떠서 60°C의 신전기에서 건조시킨 조직절편을 hematoxylin-eosin 염색과 Verhoeff의 iron hematoxylin 염색을 시행하여 광학현미경(Olympus Co. Japan)으로 관찰하였다.

관찰부위

Paraquat의 독성과 paraquat에 대한 3-MC의 독성 경감효과를 관찰하기 위하여 paraquat에 영향을 많이 받는 것으로 알려진 폐의 호흡세기관지, 종말세기관지 및 폐포를 관찰하였다.

결과 및 고찰

MTT 와 NR 분석법에 의한 세포독성

NIH 3T3 섬유모세포에 제초제 paraquat를 여러 농도(1, 25, 50 및 100 μ M)로 처리한 후 MTT 흡광도와 NR 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며 MTT₅₀은 1668.97 μ M이었으며, NR₅₀은 1030.85 μ M로 산출되었다(표 1). 이는 Borenfreund와 Puemer(1984)의 세포독성 판정기준에 의하면 저독성 물질로 판정되었다.

생체 내 실험(*in vivo*) 결과

Monooxygenase의 유도체인 3-MC가 제초제 paraquat의 독성을 경감시킬 수 있는 물질인가를 알아보기 위하여 Sprague Dawley계 SPF albino 랫드에 paraquat 단독 및 paraquat과 3-MC를 병용투여한 후 경시적으로 폐(lung)를 적출하여 조직표본을 만들어 광학현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대조군

종말세기관지(terminal bronchiole, TB)에는 섬모입방상피와 크기가 큰 분비세포인 클라라 세포(clara cell, CC)를 관찰할 수 있었고, 호흡세기관지(respiratory bronchiole, RB)에서도 섬모입방상피와 클라라세포가 다수 관찰되었으며, 폐포관(alveolar duct, AD)이 열리는 가장자리에는 호흡상피세포(pneumonocyte type I, PI)가 관찰되었다(사진 1). 폐포는 납작한 편평폐포세포인 호흡상피세포로 둘러싸여 있고, 점막고유판에는 평활근세포가 그물구조를 하고 있었으며(사진 2), 폐포사이 중격 내에 서로 연결하고 있

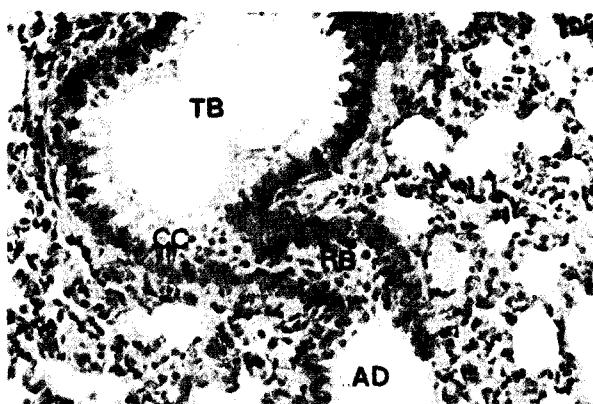


Fig. 1. Photomicrograph of control rat lung showed terminal bronchiole(TB) leading to respiratory bronchiole(RB), which devided into alveolar duct(AD). Clara cells(CC) showed in terminal bronchiole abd respiratory bronchiole. H & E stain, $\times 200$.



Fig. 2. Photomicrograph of control rat lung. The very rich capillary network lying in interalveolar septa is seen. The capillaries were contained erythrocytes(Red). A few were endothelial cell nucleus(arrowhead), type I cells (arrow) and free alveolar macrophages (asterisk). H & E stain, $\times 200$.

는 폐 모세혈관에는 적혈구(arrows)들이 관찰되었고, 중격의 간질 내에는 큰폐포상피세포(type II cell, great alveolar cell, GC)가 관찰되었으며, 폐포큰포식세포(alveolar macrophage), 섬유모세포 및 비만세포들도 관찰되었다(사진2). Verhoeff의 iron hematoxylin 염색에서는 교원섬유(red)와 탄력섬유(black)가 폐포관과 폐포를 지지하고 있었다(사진 3).

Paraquat 단독투여군

Paraquat 투여 3시간째부터 폐 모세혈관 내에 적혈

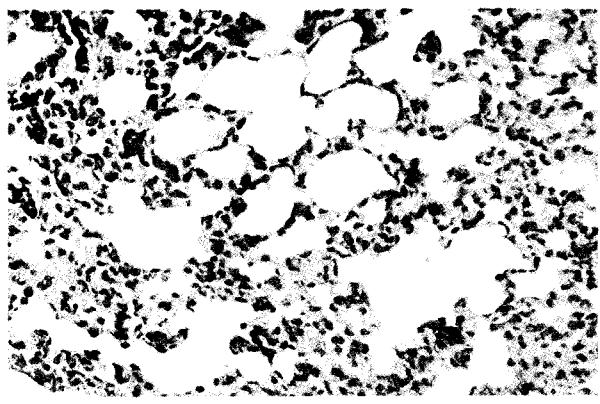


Fig. 3. Photomicrograph of control rat lung. Collagen fiber(red) and elastic fiber(black) showed in interalveolar septa. Iron hematoxylin stain of Verhoeff, $\times 200$.

구들이 충만하기 시작하여 24시간째에는 충혈상태에 이르렀으며, 폐포 사이 중격에서는 큰폐포상피세포수가 증가하는 경향이었으며, 분열하고 있는 세포(화살표)도 관찰되었다(사진 4).

폐 조직을 둘러싸고 있는 결합조직 내에는 임파구, 대식세포 및 호산성백혈구 등이 다수 관찰되었고, 임파소절에서는 종중심(germinal center)이 다수 관찰되었다. 종말세기관지와 호흡세기관지의 섬유입방상피와 클라라세포의 변화는 관찰할 수 없었다. 48시간째부터 폐포 사이 중격과 폐포 내에 폐포큰포식세포가 증가하기 시작하여, 96시간째에는 다수의 폐포큰포식세포(M)가 관찰되었고, 분열하고 있는 큰폐포상피세포(GC)도 관찰되었으나(사진 6), 폐 모세혈관 내의 적혈구 수는 감소하는 경향이었다. Verhoeff의 iron

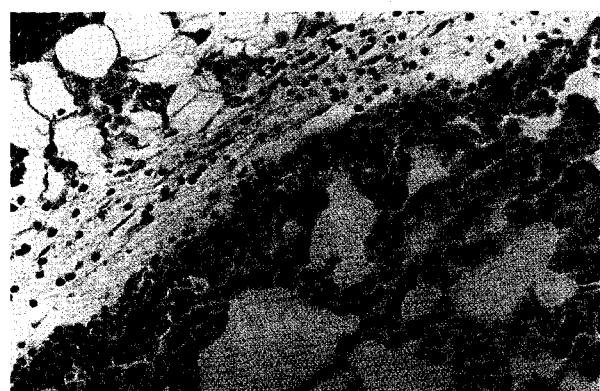


Fig. 4. Photomicrograph of 24 hrs after paraquat administration. Erythrocytes were fulled in alveolar capillary and lymphocytes, eosinophils and microphages showed in connective tissue. H & E stain, $\times 200$.

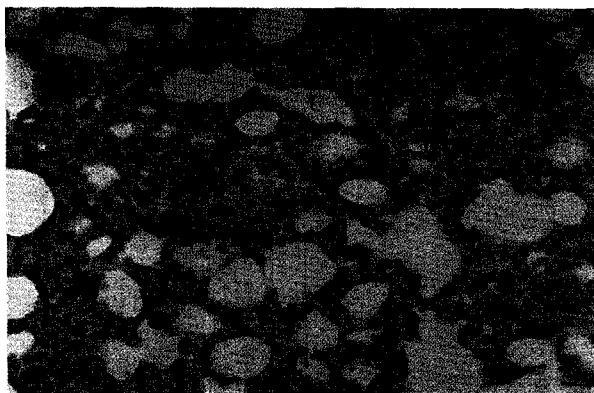


Fig. 5. Photomicrograph of 24 hrs after paraquat administration. Many erythrocytes showed in alveolar capillaries of interalveolar septa. Some Type II cells(arrow) showed in interalveolar septa. H & E strain, $\times 200$.

hematoxylin 염색에서도 24시간째에 조직변화가 가장 심하였으며, 교원섬유(red)량이 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 폐포의 넓이가 넓어지고, 폐포구멍(alveolar pore)의 간격(별표)도 넓어져 있었다(사진 7).

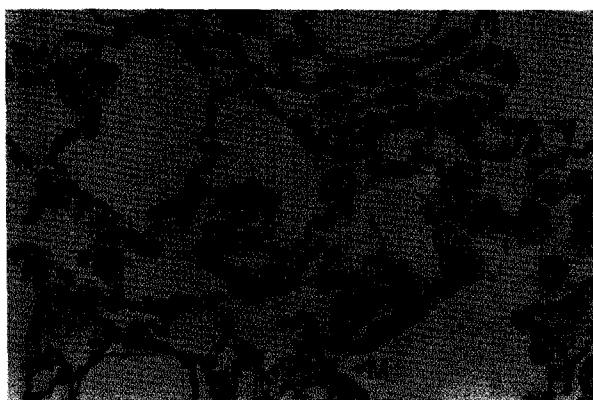


Fig. 6. Photomicrograph of 96 hrs after paraquat administration. Many alveolar macrophage (M) and Type II cells(arrow) showed in interalveolar septa or alveolar duct. H & E strain, $\times 200$.

Paraquat와 3-MC 병용투여군

Paraquat과 3-MC 병용투여 집단에서는 paraquat 단독투여 집단에 비하여 조직변화가 약하게 관찰되었는데, 병용투여 후 3시간째에는 단독투여 3시간째의 소견과 유사하였지만 점차 회복되어 폐 모세혈관 내에 적혈구 수가 증가하여 24시간째에는 대조군의 구조와 거의 유사하였다. 또한 폐 조직을 둘러싸고 있

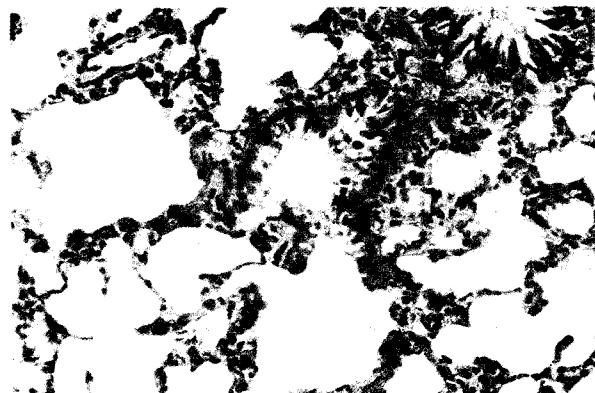


Fig. 7. Photomicrograph of 24 hrs after paraquat administration. Collagen fiber(red) were increased in terminal bronchiole, respiratory bronchiole and interalveolar septa and alveoli and alveolar pore were broadened. Iron hematoxylin strain of Verhoeff, $\times 200$.

는 결합조직과 임파소절에서도 paraquat 단독 투여군에서 보였던 변화가 거의 관찰되지 않았다(사진 8). Verhoeff의 iron hematoxylin 염색에서도 24시간째에 교원섬유의 량이 대조군에 비하여는 많게 보였으나 단독투여 집단에 비해서는 적었으며, 폐포와 폐포구멍의 넓이도 대조군과 유사하였다(사진 9).

Paraquat의 세포독성을 측정한 결과 건강세포인 NIH 3T3 섬유세포에 대한 paraquat의 MTT₅₀은 1668.97 μM 이었고 NR₅₀은 1030.85 μM 로 산출되었다. Borenfreund 등은 MTT와 NR의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포에 독성을 받기 시작하는 농도를



Fig. 8. Photomicrograph of 24 hrs after paraquat plus 3MC administration. Bronchiole lymph follicle, blood vessel and many alveoli were shown. Morphological changes nearly were not observed. H & E strain, $\times 200$.

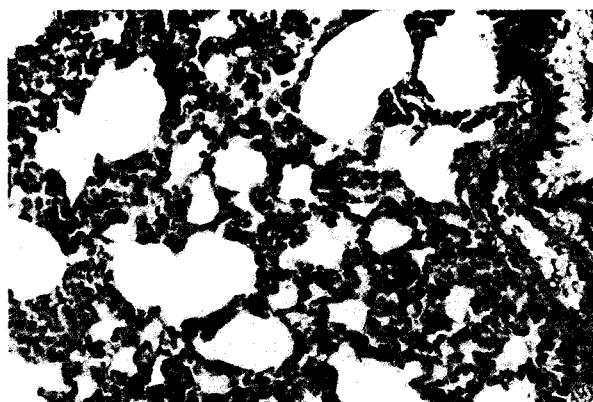


Fig. 9. Photomicrograph of 24 hrs after paraquat plus 3MC administration. The quantity of collagen fiber, breath of alveoli and alveolar pore were more decreased than paraquat only treated group. Iron hematoxylin strain of Verhoeff, $\times 200$.

MTT₉₀, NR₉₀으로 하고, 심한 독성을 받는 농도를 MTT₅₀, NR₅₀으로 결정한 후 MTT₅₀, NR₅₀이 100 μM 미만일 때를 고독성, 100 μM 과 1,000 μM 사이일 때를 중간독성, 1,000 μM 과 2,000 μM 사이일 때를 저독성, 2,500 μM 이상일 때를 무독성으로 독성물질의 판정기준을 제시하였다. 이 기준에 의하면 paraquat의 IC₅₀ 값이 모두 1,000 μM 과 2,000 μM 사이에 있어 paraquat는 저독성 물질로 판정할 수 있다.

Paraquat은 산소자유기의 생산과 지방과산화에 의하여 폐손상을 유발하고(Situnayake 등, 1987) 투여량을 증가시킴에 따라 급성 폐손상이 일어나는 것으로 보고 되어있다(Silva와 Saldiva, 1998). 본 실험에서도 paraquat LD₂₅인 250 mg/kg을 200 g 정도의 흰쥐에 투여한 결과 3시간째부터 폐 모세혈관 내에 적혈구가 증가하기 시작하여 24시간째에는 충혈상태에 이르렀으며, 교원섬유량도 급격히 증가하여 폐의 섬유화를 촉진시키는 조직학적 변화를 나타내었다.

Day와 Crapo(1996)는 생쥐에 paraquat 45 mg/kg을 투여하면 48시간 내에 호흡상피세포(Type I 세포) 수와 다형핵 백혈구 수가 급격히 증가한다고 보고하였는데, 본 실험에서도 24시간째에 결합조직 내에 다형핵 백혈구의 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 호흡세기관지와 폐포사이 중격에 호흡상피세포수가 증가하고 분열하고 있는 폐포상피세포(Type II 세포)도 다수 관찰되었다.

48시간째에는 폐포사이 중격과 폐포 내에 폐포큰포

식세포수도 증가하기 시작하여 96시간째에는 다수의 큰포식세포가 관찰되었다. 폐포상피의 재생에 관여하는 세포는 큰폐포상피세포와 호흡기도의 clara 세포인데 이들 세포는 이산화질소나 이와 유사한 독성물질이 폐포에 들어가면 세포분열이 촉진되어 호흡상피세포로 변형되는 것으로 알려져 있으므로(박경아 등, 1992) 본 실험의 결과는 투여한 paraquat의 양에 따라 폐조직의 변화가 위 논문들의 보고와 일치하였다. Takahashi 등(1994)은 paraquat를 음독한 환자에서 폐포의 넓이를 측정한 결과 폐포의 넓이는 변하지 않았다고 보고하였으나, 본 실험의 결과는 paraquat 투여 후 24시간째에 폐포의 넓이와 폐포구멍의 넓이가 넓어진 것을 관찰할 수 있었다.

Paraquat에 의하여 유발되는 급성 폐손상과 세포괴사(Cappelletti 등, 1998)를 감소시키기 위하여 다양한 물질들이 연구되고 있는데, paraquat는 산화와 과산화에 의하여 폐손상을 일으키기 때문에 항산화효소(Cappelletti, 1998; Ilizarov 등, 2001; Tomita 등, 2001), 폐의 섬유화 억제(Hemmati와 Hicks, 1999; Eisenman 등, 1998), 폐의 과산화 억제를 위한 과산화효소에 관한 연구 등이 이루어져 왔다(Franek 등, 2001). 본 실험에서 paraquat 독성경감물질로 사용된 3-MC는 포유동물에서 monooxygenase의 양적변화를 유도하는 효소유도제로서 paraquat에 의하여 생산되는 산소와 결합함으로써 생체이물 대사과정에 의하여 독성이 경감되어 폐의 손상을 억제시켰으리라 판단된다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-99-003-G00024 G3001)와 원광대학교 의약자원연구센터 연구비(98-16-05-99-B-3)에 의하여 연구된 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

인용문현

Borenfreund, E. and Puerner, JA. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays(HTD/Nr-90). *Tissue Culture Meth.* 9:7~9.

Cappelletti G, Maggioni MG and Maci R. (1998)

- Apoptosis in human lung epithelial cells: triggering by paraquat and modulation by antioxidants. *Cell. Biol. Int.* 22(9~10):671~8.
- Day BJ and Crapo JD. (1996) A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced lung injury in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140(1):94~100.
- Eisenman A, Armali Z, Raikhlin-Eisenkraft B, Bentur L, Bentur Y, Guralnik L and Enat R. (1998) Nitric oxide inhalation for paraquat-induced lung injury. *J Toxicol Clin Toxicol.* 36(6):585~6.
- Franek WR, Horowitz S, Stansberry L, Kazzaz JA, Koo HC, Li Y, Arita Y, Davis JM, Mantell AS, Scott W and Mantell LL. (2001) Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(1):569~75.
- Hemmati AA and Hicks R. (1999) Increased myofibroblast contractile sensitivity in paraquat pretreated rat lung tissue. *Life Sci.* 65(22):2325~32.
- Ilizarov AM, Koo HC, Kazzaz JA, Mantell LL, Li Y, Bhapat R, Pollack S, Horowitz S and Davis JM. (2001) Overexpression of manganese superoxide dismutase protects lung epithelial cells against oxidant injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24(4):436~41.
- Leeson TS, Leeson CR and Paparo AA (1988) Text/atlas of histology. W.B. Saunders. pp.513~534.
- Meredith TJ and Vale JA (1987) Treatment of paraquat poisoning in man: methods to prevent absorption. *Hum Toxicol.* 6:49.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55~63.
- Nebert DW, Atlas SA, Guenthner TM and Kouri RE (1978) the ah locus: Genetic regulation of the enzymes which metabolize polycyclic hydrocarbons and the risk for cancer, In polycyclic hydrocarbons and cancer(P.O.P. Ts'o and H.B. Gelboin, eds.), Academic Press, New York, 2:345~390. (1978).
- Silva MF and Saldiva PH. (1998) Paraquat poisoning: an experimental model of dose-dependent acute lung injury due to surfactant dysfunction. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31(3):445~50.
- Situnayake RD, Crump BJ, Thurnham DI and Davies M (1987) Evidence for lipid peroxidation in man following paraquat ingestion. *Hum. Toxicol.*, 6:94.
- Smith LL (1987) Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum. Toxicol.*, 6(1):31~36.
- Statham CN, Elcombe CR, Szyjka SP and Lech JJ (1978) Effect of polycyclic hydrocarbons on hepatic microsomal enzymes and disposition of methylnaphtalene in rainbow trout. *in vitro Xenobiotica*, 8:65~71.
- Takahashi T, Takahashi Y and Nio M (1994) Remodeling of the alveolar structure in the paraquat lung of humans : a morphometric study. *Human Pathology*, 25(7):702~708.
- The Toronto Lung Transplant Group (1985) Sequential bilateral lung transplantation for paraquat poisoning : a case report. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 89:734.
- Tomita M, Okuyama T, Ishikawa T, Hidaka K and Nohno T. (2001) The role of nitric oxide in paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line. *Free Radic Res.* 34(2):193~202.
- Vale JA, Meredith TJ and Buckley BM (1987) Paraquat poisoning : clinical features and immediate general management. *Hum. Toxicol.* 6:41.
- 박경아, 이원택, 박미경, 이종은 (1992) 조직학. 고려의 학 pp.465~473.
- 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 (1991) 기초생물통계학 제9장 직선회귀, 향문사 pp.176~198.

Cytotoxicity of paraquat and compensatory effects of 3-methylcholanthrene in rat lung

Yo-Sup Rim^{*}, Do-Soo Kim, Du-Seok Han¹, In-Taek Hwang²(*Division of Environment and Agricultural*

Science, College of Agriculture and Life Sciences, Sunchon National University, Chonnam 540-742, Korea,

¹Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea, ²Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea)

Abstract : This study was carried out to investigate cytotoxicity of paraquat on NIH 3T3 fibroblasts, toxicity of paraquat and compensatory effects of 3-methylcholanthrene (3-MC) on the rat lung. In order to conduct MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl -2H-tetrazolium-bromide] and NR (Neutral red) assay, the 5.0×10^4 cell/ml of NIH 3T3 fibroblast in each well of 24 multi-dish were cultured. After 24 hours, the cells were treated with solution of paraquat (1, 25, 50 and 100 μM respectively). After the NIH 3T3 fibroblast of all groups were cultured in same condition for 48 hours. MTT and NR assay were performed to evaluate the cytotoxicity of cell organelles. MTT_{50} and NR_{50} of paraquat were 1668.97 μM and 1030.85 μM , respectively. These IC_{50} of Paraquat were decided as a low cytotoxicity by Borenfreund and Puemer (1984). In order to observe the toxicity and compensatory effects of paraquat on the rat lung, Sprague Dawley male rats were used as experimental animals and were divided into paraquat only treated group and simultaneous application group of paraquat and 3-MC, at 30 min and 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 hrs interval after each treatment. The animals were sacrificed by decapitation and their or the lungs were immediately removed, immersed in fixatives, and were processed with routine method for light microscopic study. Paraffin sections were stained with H&E and iron hematoxylin of Verhoeff. Under the light microscopy, erythrocytes were full in alveolar capillaries at 3 hrs and congested at 24 hrs after paraquat administration. The great alveolar cells (Type II cell) were increased and mitosis of great alveolar were observed in interalveolar septa. Many lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear (PMN) cells were observed in connective tissue surrounding lung tissue and germinal center in lymph follicles of terminal bronchiole. Alveolar macrophages were increased in interalveolar septa and alveoli at 48 hrs. And observed many alveolar macrophages at 96 hrs. In iron hematoxylin stain of Verhoeff, Collagen fiber were increased in respiratory bronchiole, interalveolar septa and alveoli and breath of alveoli, and alveolar pore were broaden. But, in paraquat plus 3-MC treated group, morphological changes were mild in lung tissue. These results indicate that 3-MC has a compensatory effects against toxicity of paraquat by conjugation with oxygen.

*Corresponding author (Fax : +82-61-752-8011, E-mail : ysrim@sunchon.ac.kr)