Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 15, No. 4 pp. 2189-2198, 2014

http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2014.15.4.2189
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

백서를 이용한 고독성 제초제 파라쿼트 중독 치료를 위한 저농도산소요법의 효과 연구

김훈[1*], 민진홍[1], 한규홍[1], 강준호[1]
[1]충북대학교 의과대학 응급의학교실

The protective effect of hypoxic therapy on paraquat-induced toxicity rat model

Hoon Kim[1*], Jin-Hong Min[1], Kyu-Hong Han[1] and Joon-Ho Kang[1]
[1]Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University

요 약 본 연구는 제초제 음독 중에서 가장 치명률이 높은 파라쿼트 중독의 독성 감소를 위하여 파라쿼트 독성 기전으로 알려진 파라쿼트 유도성 활성산소종을 감소시키기 위해 기존의 항산화제들 치료제와는 달리, 사전에 산소 농도를 줄여서 파라쿼트에 의한 활성 산소종 발생 자체를 줄이는 저농도 산소요법의 유용성을 연구하였다. 이를 위해 백서를 활용하여 생존률 및 파라쿼트에 의한 활성 산소종의 영향을 가장 빠르고 많이 받는 폐조직의 육안적 조직학적 변화를 비교 분석함으로써 세포 독성 상황에서 저농도 산소요법의 효과를 분석하였다. 그 결과 저농도 산소요법을 처리한 군에서 유의한 생존률 증가와 함께 H&E Stain 결과에서는 염증세포 증가 및 Aveolar space에 부종 소견이 저농도 산소요법을 함께 시행한 군에서 완화된 소견을 확인할 수 있었다. 또한 파라쿼트의 독성기전의 핵심인 산화스트레스발생 분석을 시행한 결과, MDA assay, Glutathione assay 및 SOD Assay 모두에서 파라쿼트는 산화스트레스를 증가하지만 파라쿼트와 함께 저농도 산소요법을 처리한 경우 산화 스트레스가 감소함을 증명하였다. 이를 통해 본 연구는 임상에서 파라쿼트 중독에 대한 새로운 치료 대안으로서의 기초 연구로서 활용이 기대된다.

Abstract Paraquat (PQ) is a very effective and widely used herbicide that was commercially introduced in 1962. In this study, instead of using antioxidants like in the past, to inhibit the formation of PQ-induced ROS, we attempted to reduce the oxygen concentration by using non-lethal hypoxia therapy. Therefore, we studied the toxicity of PQ in vivo, analyzed the major effects of ROS on the targeted lung tissue and compared the results with the gross histological changes after the cell protective effect of non-lethal hypoxia therapy. *In vivo* studies demonstrated that low-concentration oxygen therapy (i.e., 10 – 12% oxygen) in rats administered with PQ was associated with a higher survival rate than in rats that received only PQ. *In vivo* non-lethal hypoxia treatment showed better survival and less lung tissue damage. Using a hypoxic/anaerobic incubator with integrated multifaceted molecular analysis, including MDA assay, glutathione assay, and SOD assay, we established an optimal, significantly reduced *in* vivo non-lethal hypoxia treatment by exploiting the PQ-induced cytotoxicity responses.

Key Words : Paraquat, Reactive oxygen species, Antioxidants, Hypoxic therapy, Oxidative stress

1. 서론

파라쿼트(1,1'-dimethy-4,4'-bipyridinium dichloride, paraquat, PQ) 중독에 의한 사망률은 국가에 따라 30~80%로 다양하게 나타나지만, 우리나라는 24.5%의 고농도 파라쿼트를 생산하고 있어 쉽게 접할 수 있는 농촌 지

본 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 수행된 기초연구사업(2012R1A1A2005020)과 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비(기성회교내연구) 지원 사업으로 수행되었음.
*Corresponding Author : Hoon Kim(Chungbuk national univ.)
Tel: +82-43-261-2847 email: nichekh2000@chungbuk.ac.kr
Received November 20, 2013 Revised (1st December 11, 2013, 2nd December 10, 2013) Accepted April 10, 2014

역을 중심으로 연간 1,000명 이상의 사망자가 발생하고 있으며 자살 목적으로 농약을 음독하여 사망한 환자의 50%를 차지한다고 알려졌다[1,2].

파라쿼트는 1958년 최초로 개발된 이후 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 널리 사용되고 있는 비선택적 제초제로 강한 독성 때문에 인체에 소량이 흡수 되도 폐, 신장 및 간 등에 심각한 손상을 주는 치명적인 약물로서 국내에는 그라목손, 뉴속사포, 파라손골드 등의 상품명으로 시판되고 있다. 급성 파라쿼트 중독은 심한 전신성 조직 파괴와 동반된 쇼크로 24~48시간 내에 사망하거나, 수일 내에 신장, 간장, 심장, 중추신경계, 부신, 골격근, 비장 등을 손상하는 다발성 장기부전으로 사망한다. 파라쿼트는 복용 후 24~48시간 이내에 폐부종, 폐출혈, 폐울혈이 발생하고 이후 폐섬유증으로 진행된다. 음독 후 체내에 흡수된 파라쿼트의 독성 기전은 잘 알려져 있지 않지만, 위장관을 통하여 빠르게 흡수되어 폐와 신장 등 주요 장기에 침착된 파라쿼트 이온이 세포 내에서 cytochrome P450 reductase 및 glutathione reductase 등의 효소에 의해 순환적 환원을 일으켜 활성산소종(reactive oxygen species)인 superoxide radicals를 과다 생성하여 세포막 지방 과산화(lipid peroxidation), 세포사멸(apoptosis) 유도 등 세포손상을 발생시키는 것으로 알려졌다[3, 4].

특히, 여러 신체 중요 장기 중 폐에 심한 손상을 일으키게 되는데, 폐 조직에서는 파라쿼트가 에너지 의존과정으로 흡수되어 혈장과 비교해서 농도가 6~10배 정도 높고 대기의 산소와 쉽게 접할 수 있어 활성 산소 종에 의해 가장 많이 손상을 받기 때문이다[5]. 폐에 대한 독성은 반응성 산소유리기인 활성 산소 종에 의해 직접손상, 염증세포의 활성화에 의한 초기 폐 손상, 그리고 섬유아세포 증식 및 세포 기질의 변화들이 나타나는 후기손상 등을 통해 급성 폐 손상과 급성 호흡부전 증후군 및 폐섬유화에 의한 저산소 혈증으로 환자를 사망에 이르게 하므로 파라쿼트 중독 환자에는 생존율을 높이기 위해 치료 방법으로 고농도 산소는 공급하지 않는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다[6].

다른 한편으로 대기보다 낮은 농도의 산소 공급은 파라쿼트 중독에서 폐 손상을 줄여 생존율을 높일 수 있을 것으로 가정할 수 있는데, Cheng 등[7]은 *in vitro* 상에서 파라쿼트를 이용하여 인간각막표피세포에 손상을 일으킨 후 저농도의 산소를 전처치하는 경우 대조군(대기중의 산소)에 비해 손상이 줄어드는 것을 보고하였다.

본 연구에서 약물 중독 환자에서 가장 높은 치사율 때문인 막대한 사회경제적 손실을 보이는 파라쿼트 중독 치료를 위한 새로운 기술을 개발하고자 하였다. 이를 위해 파라쿼트에 유발되는 활성 산소종을 감소시키기 위해 기존의 항산화제들 치료제(파라쿼트가 신체 내 산소와 반응 후 발생한 활성 산소 종을 중화하여 줄이는 기전)와는 달리, 사전에 산소 농도를 줄여서 파라쿼트에 의한 활성 산소종 발생 자체를 줄이는 새로운 대체기술인 저농도산소요법의 유용성을 연구하였다. 이를 위해 *in vivo* 실험에서 파라쿼트에 의한 활성 산소종의 영향을 가장 빠르고 많이 받는 조직인 폐조직을 대상으로 하였으며 폐조직의 육안적 조직학적 변화를 비교 분석함으로써 세포 독성 상황에서 저 농도산소요법의 효과를 분석하였다. 이를 통해 본 연구는 기존의 파라쿼트 독성극복연구와 다른 새로운 접근으로 저농도 산소요법을 통해 파라쿼트 중독의 치명적 합병증을 줄일 수 있는 최적의 기술을 개발하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1 저산소/혐기성 통합 배양기 제작

In vivo 저농도 산소요법을 확립하기 위해 우리는 최적의 조건을 유지할 수 있는 실험 장비로서 저산소/혐기성 통합배양기(hypoxic & anaerobic comi-incubator)를 자체 제작하였다[Fig. 1].

[Fig. 1] Hypoxic and anaerobic comi-incubator. We constructed a hypoxic and anaerobic comi-incubator for establishing *in vivo* non-lethal hypoxic conditions. We observed the degree of damage by varying the oxygen concentration. This device enabled us to conduct various animal experiments under hypoxic conditions.

2.2 *In-vivo* 파라쿼트 독성 모델

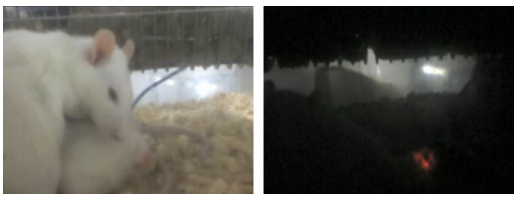
2.2.1 실험적 접근 방법

임상적 적용을 위해서 *in vivo* 상에서 파라쿼트 독성

모델 확립이 필요하다. 동물 모델로는 백서를 활용하여 생존율 평가 및 다발성 장기에 대한 독성을 조직학적 분석을 통해 접근하였다.

2.2.2 실험 방법

본 연구에서는 백서에 시간별 농도별로 파라쿼트를 복강 내 주입한 후 캠코더를 설치하여 실시간 감시를 통해 생존시간을 분석하였다[Fig. 2].



[Fig. 2] Real-time monitoring of rat survival after PQ treatment (day & night). We intraperitoneally injected PQ in rats at different time points and concentrations, and we analyzed the survival time by real-time camcorder monitoring.

파라쿼트에 장기 독성을 평가하기 위해 해부 후에 조직을 육안 및 현미경적 조직분석을 시행하였다. 조직학적 분석은 H&E 염색법 (hematoxylin and eosin stain)을 활용하였다. H&E 염색법은 조직학에서 자주 사용되는 염색법으로 hematoxylin은 세포의 핵을 보라색으로 염색하는데 이는 histone같은 핵단백질에 결합하기 때문이다. eosin은 세포의 다른 eosinophilic structure를 적색, 핑크색, 주황색으로 염색한다. eosinophilic structure는 세포 내 또는 세포 밖 단백질이며 대부분의 cytoplasm은 eoshionphilic 하다. 혈구 세포는 매우 강한 적색을 보인다.

2.3 *In-vivo* 저 농도산소요법 모델

2.3.1 실험적 접근 방법

in vivo 파라쿼트 독성모델에서 저농도 산소요법의 세포보호능을 확립하기 위하여 자체 제작한 동물용 저산소 배양기를 활용하여 최적의 저농도 산소모델을 수립하였다.

2.3.2 실험 방법

동물용 hypoxic chamber를 활용하여 *in vivo* 상에서 독성을 보이지 않는 산소 농도를 결정하기 위해 다양한 산소 농도를 다양한 시간 동안 투여하면서 심전도 감시, pulse oxymeter, 비침습적 혈압 측정기를 활용하여 생체징후를 측정하고 동맥 혈액 뽑아 산소 부분압력, 산소 포화도를 측정한다. 폐 조직을 얻어 H&E Stain 등으로 조직 내에서의 독성 평가를 시행하고 혈액 분석을 통해 산소압, 이산화탄소압, 염증반응, 다발성 장기 손상 유무 등을 조사하여 체계적으로 저농도 산소요법의 보호 효과를 분석하였다.

2.4 *In-vivo* 저농도 산소요법 보호기전 연구

2.4.1 실험적 접근 방법

파라쿼트의 독성기전의 핵심은 산화스트레스(oxidative stress)에 의한 활성 산소 종의 발생이므로 활성 산소 종의 측정을 통해 파라쿼트의 독성 정도를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 저농도 산소요법의 효과를 예측할 수 있다. *In vitro* 실험에서 측정한 방법을 적용하여 MDA 측정, SOD 활성 측정 등 다양한 분석을 통해 산화스트레스 정도를 평가할 수 있다.

세포 사멸은 파라쿼트에 의한 활성 산소 종 발생 또는 다른 세포 기전에 의해 조절 이루어지면서 세포의 기능을 상실하면서 나타난다. 따라서 세포사멸의 대사과정을 관찰하는 것도 중요한 과정이므로 이를 평가한다. 저농도 산소는 hypoxia-inducible factor 유전자를 발현하므로 이는 세포 보호기전과 관련이 있을 수 있어 유전자 발현을 평가한다.

2.4.2 실험 방법

2.4.2.1 MDA 분석법[thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)]

백서의 폐 조직을 분리한 후 조직 내 Lipid peroxide 발생량을 전에 기술한 방법인 the modified thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay 분석기술을 활용하였다. 방법은 배양액을 모은 후 5분간 3000rpm으로 원심 분리 후 동일 향의 0.67%(w/v) TBA를 넣는다. 800 μL의 supernatant를 0.1 M의 2-TBA 100 μL 와 섞은 후 100°C에서 10분간 가열한다. Cooling 후에 흡광도를 SpectraMax 250 microplate reader를 이용하여 532 m에서 측정한다.

2.4.2.2 Glutathione assay

전에 기술한 방법(Baker *et al.*,1990)에 따라 시행한다. 방법은 폐 조직을 분히 후에 RIPA buffer를 넣고 단백질을 분리한 후 정량한다. 동일 정량에서 50 μL 세포 분 핵

과 100 μL 의 반응액(1 mM NADPH, 100 mM Na_2HPO_4, 100 units GSH reductase, and 1 mM DTNB)을 37°C 배양기에서 15분간 반응한 후 흡광도를 spectraMax 250 microplate reader를 이용하여 412 nm에서 측정한다.

2.4.2.3 SOD Assay

SOD assay kit(Dojindo, Japan)를 활용하여 SOD 활성을 측정한다. 세포사멸에 관련된 단백질을 발현을 분석함으로써

2.4.2.4 세포사멸 분석

세포 사멸과 저농도산소요법 보호 효과 간의 관련성을 분석하기 위해 caspase-3 activity assay kit(Promega, USA)를 활용하여 caspase 활성도를 분석한다. Real-time PCR Machine을 활용하여 hypoxia-inducible factor 1α(HIF, primer; QT00182532, Qiagen, 3718 bp) 유전자 발현 정도를 분석한다.

2.5 통계처리

검사 결과 및 생존율의 평균값과 표준오차를 분석하였고 비모수 검정에서 평균값 비교는 Mann-Whitney로 시행하였고, 모수검정에서는 student T-test를 시행하였다.

3. 연구결과

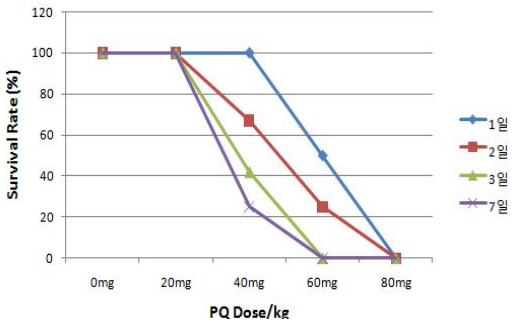
3.1 *In-vivo* 파라쿼트 독성 모델 연구결과

3.1.1 파라쿼트 독성 평가

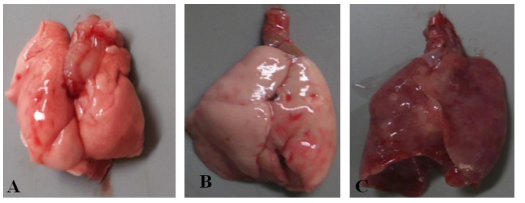
파라쿼트를 백서(10 마리)의 복강 내에 농도별로 투여 후에 실시간 감시를 통해 시간별 생존율을 분석한 결과는 80 mg/kg를 투여하면 1일 만에 모두 사망하고 60 mg/kg가 LD50으로 평가되었으면 3일간 생존하는 경우는 대략 LD50이 30 mg/kg가 되었다. 농도별로 비례적으로 파라쿼트 독성이 발생하는 사실을 확인할 수 있었다[Fig. 3].

3.1.2 파라쿼트의 육안적 장기 독성 평가

파라쿼트를 농도별로 투여 후 3일째 가장 독성이 심한 폐장기의 육안적 해부 관찰을 시행한 결과 농도별로 폐 독성이 관찰되었다. 폐의 무게가 증가하고 폐부종과 함께 출혈반 등이 파라쿼트 농도와 비례하는 사실을 확인할 수 있었다[Fig. 4].



[Fig. 3] Survival rate after intraperitoneal administration of different PQ concentrations at different time points in 10 rats. The results show that all rats treated with 80 mg/kg PQ died at day 1. The LD50 value of 60 mg/kg PQ has been assessed. LD50 corresponding to a 3-day survival was determined as 30 mg/kg. We concluded that PQ toxicity was proportional to its concentration.



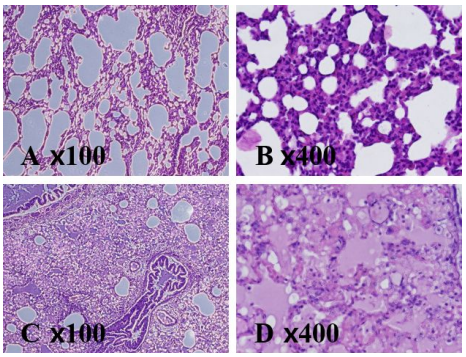
[Fig. 4] Gross observation of lung after PQ treatment. A: Control, B: 20 mg/kg PQ, C: 40 mg/kg PQ. The concentration of PQ after administration on day 3 corresponded to the most severe lung toxicity according to the gross anatomical observations. The increase of lung weight and pulmonary edema associated with hemorrhage were anti-proportional to the concentration of PQ.

3.1.3 현미경적 조직 분석

폐 조직을 분리 후에 H&E 염색을 하였을 때 파라쿼트를 투여한 폐 조직은 염증세포 증가 및 Aveolar space에 부종 소견이 관찰되었다[Fig. 5].

3.1.4 혈액검사 분석

폐 조직의 손상에 의한 동맥혈 검사상 산소농도 평가 및 일반 혈액검사 및 생화학 검사를 하였으며 그 결과 파라쿼트에 의하여 산소압 감소 및 다양한 다발성 장기 손상 소견이 관찰되었다[Table. 1].



[Fig. 5] H&E staining of lung tissue. A, B: Control. C, D: 40 mg/kg PQ for 3 days. After removing the H&E stain, increased lung inflammatory cells and edema were observed in the alveolar spaces of PQ treated lung tissues.

[Table 1] Characteristics of blood tests. The blood test of PQ + hypoxia group showed no notable differences compared to the control group, while PQ alone induced multiple organ damage and reductions in the oxygen pressure were observed.

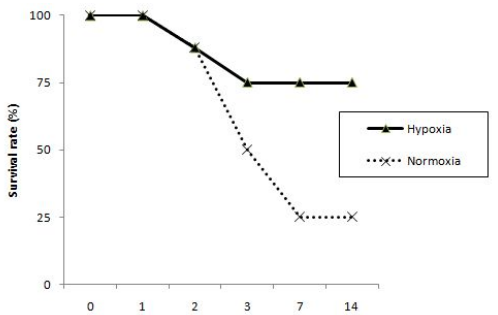
Characteristics	Control (N=5)	PQ (40 mg/kg) (N=5)	PQ (40 mg/kg) +Hypoxia (N=5)
ABGA			
pH	7.48	7.38	7.38
PaO_2 (㎜Hg)	95	48	70
$PaCO_2$ (㎜Hg)	44	39	48
O_2 saturation(%)	95.3	55.3	88
HCO_3^- (mEq/L)	26.4	15.3	19.3
CBC			
WBC (/㎣)	4,960±234	5,810±433	5,110±112
Hemoglobin	32.5±3.8	31.1±2.2	34.1±3.2
Platet (x10^3 cells/uL)	6,681±367	994±127	3,994±119
Chemistry			
AST	51.2±12.6	61±13.5	53±11.5
ALT	40.9±10.2	499.1±56.3	60.3±36.3
BUN (㎎/㎗)	0.8±0.2	0.8±0.3	1.2±0.9
Cr (㎎/㎗)	12.1±2.68	37.5±13.5	27.5±10.5
LDH	89±45	643±118	197±118
Na^+	140 ±14	144 ±12	146 ±15
K^+	4.7±0.5	5.1 ±0.4	4.2 ±0.7
Cl^-	98±9	101 ±8	113 ±9
Ca^{++}	5.53±0.5	4.98 ±0.4	4.89 ±0.8

3.2 *In-vivo* 저농도산소 요법 모델 연구 결과

3.2.1 생존률 비교

세포 손상이 발생하지 않는 저농도 산소유도를 위해 자체 제작한 동물용 저 산소 배양기를 사용하여 시간별로 산소 농도를 조절하면서 손상 여부를 확인하였다. 본 저 산소배양기는 글러브가 장착되어 있어서 밀폐된 상태(저 산소상태)에서 동물 약물 처리 및 동물 관리가 가능하게 제작하였다. 또한, 시간별로 동맥혈 분석 장비(ABL80FLEX, Denmark)로 폐 기능을 측정하고 세포 손상이 발생하지 않는 저농도 산소농도를 결정하기 위해 산소농도를 12%로 설정하였으나 쥐 호흡 때문에 10%까지 변화를 발생하였고, 예비 검사상 10% 미만에서는 저 산소에 의한 폐 손상이 확인되어서 10% 이상 값으로 결정하기로 하였다. 결과 10~12% 산소농도 이상에서 저 산소에 의한 장기 손상이 발생하지 않는 사실을 확인할 수 있었다.

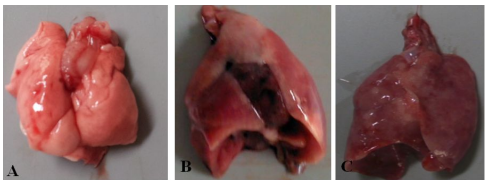
무독성 저농도 산소모델을 확립된 *in vivo* 파라쿼트 독성 모델에 적용하여 생존유무를 대조군 및 파라쿼트만 투여한 군과 비교하여 분석하였으며 14일간 장기간의 관찰에서 파라쿼트 40 mg/kg 투여 후 10~12% 산소를 처리한 군이 파라쿼트 40 mg/kg를 투여한 군에 비해 높은 생존율이 발생한다는 사실을 확인할 수 있었다[Fig. 6].



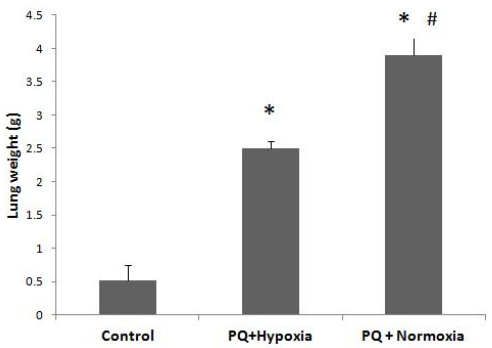
[Fig. 6] Survival curve of *in vivo* non-lethal hypoxia versus normoxia treatment of rat models (5 rats in each group). Non-lethal hypoxia treatment model showed better survival rate. Effects of the non-lethal low-oxygen concentration treatment (10 - 12% oxygen, established during the *in vivo* PQ-toxicity survival experiment) were determined by comparing the control group (normoxia conditions + 40 mg/kg PQ) and the study group(hypoxia+ 40 mg/kg PQ). The results showed that rats treated with PQ and subjected to hypoxia under experimental conditions had a high survival rate.

3.2.2 파라쿼트의 육안적 장기 독성 평가

파라쿼트를 40 mg/kg로 투여 후 3일째 가장 독성이 심한 폐장기의 육안적 해부 관찰을 시행한 결과 저농도 산소요법을 시행한 백서에서 파라쿼트 단독 투여한 백서에 비해 폐부종 또는 출혈반 등이 적게 발생한 점을 확인하였다[Fig. 7]. 저농도 산소요법을 시행 받은 백서의 폐의 무게도 덜 증가한 사실을 확인하였다[Fig. 8].



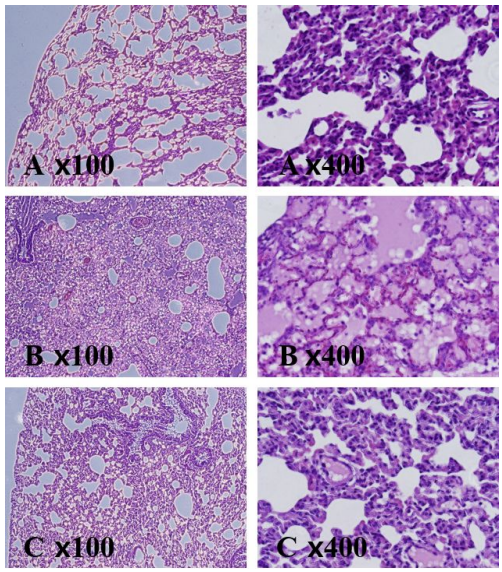
[Fig. 7] Gross observation of the lungs after PQ treatment. A: Control. B: 40 mg/kg PQ +10 – 12% hypoxia. C: 40 mg/kg PQ + normoxia (21% oxygen). At day 3 after the administration of 40 mg/kg PQ, the sample with the most severe case of lung toxicity (determined by gross anatomical observations) was subjected to a low-oxygen concentration condition after which pulmonary edema or hemorrhage were reduced.



[Fig. 8] We found underwent a low-oxygen concentration therapy in rats and rats PQ mono-therapy less than the increase in the weight of the lungs. *Significantly different from control group at $p<0.05$. #Significantly different from PQ+Hypoxia group at $p<0.05$.

3.2.3 현미경적 조직 분석

폐 조직을 분리 후에 H&E 염색을 하였을 때 폐 조직 내 염증세포 증가 및 Aveolar space에 부종 소견이 파라쿼트 40 mg/kg 단독으로 투여한 군에 비해 파라쿼트 투여 후 저농도산소요법을 함께 시행한 군에서 완화된 소견을 확인할 수 있었다[Fig. 9].



[Fig. 9] Hematoxylin and eosin (H&E) staining of lung tissues; A: control. B: 40 mg/kg PQ. C: 40 mg/kg PQ + hypoxia. After removing the H&E staining, increased number of inflammatory cells in the lung tissue and edema in the alveolar space of the lungs of the PQ-group were observed compared to the PQ-group that received hypoxia treatment.

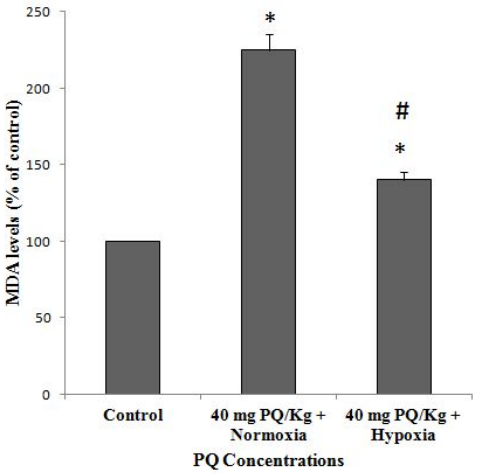
3.2.4 혈액검사 분석

폐 조직의 손상에 의한 동맥혈 검사상 산소농도 평가 및 일반 혈액검사 및 생화학 검사를 하였으며 그 결과 저농도 산소요법은 파라쿼트에 의하여 산소압 감소 및 다양한 다발성 장기 손상 소견이 파라쿼트 단독보다 덜 한 사실이 관찰되었다[Table. 1].

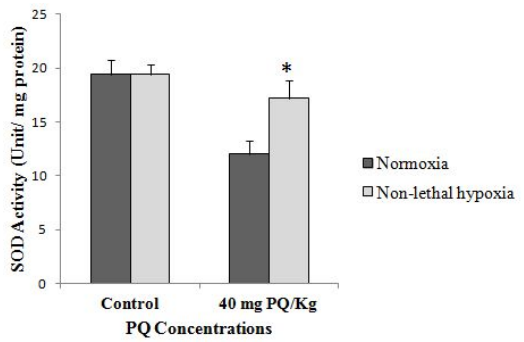
3.3 *In-vivo* 저농도산소요법 보호기전 연구 결과

파라쿼트의 독성기전의 핵심인 산화스트레스(oxidative stress) 분석을 시행한 결과, MDA 분석법, SOD 활성, glutathione 활성 분석법 모두에서 파라쿼트는 산화스트레스를 증가하지만 파라쿼트와 함께 저농도산소요법을 처리한 경우 산화 스트레스가 감소함을 증명하였다[Fig. 10, 11, 12].

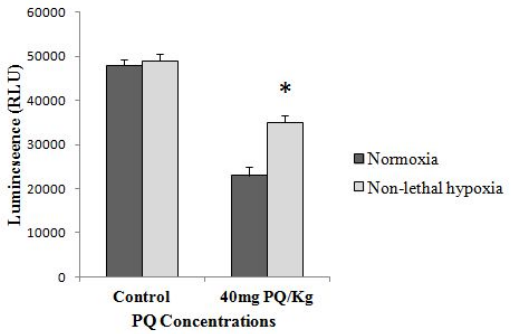
Caspase 3 단백질 활성도를 분석한 결과 저농도산소요법이 파라쿼트에 의한 세포사멸을 감소시키는 효과가 있다는 사실을 확인하였다[Fig. 13].



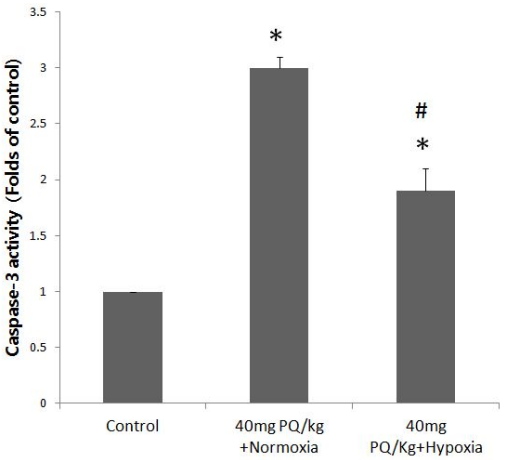
[Fig. 10] Measurement of lipid peroxide levels. Sprague–Dawley (SD) rats were exposed to normoxia (control) or hypoxia after 40 mg/kg (i.p.) PQ exposure. Then, lung tissues were harvested for measuring MDA levels. Data [mean ± standard deviation (S.D.)] were normalized to the control (normoxia-exposed group) that was taken as 100%. We proved that PQ increased oxidative stress; however, PQ treatment coupled with the low-oxygen concentration therapy reduced oxidative stress.
*Significantly different from control group at $p<0.05$. #Significantly different from PQ+Normoxia group at $p<0.05$.



[Fig. 11] Measurement of total SOD activity. Sprague–Dawley (SD) rats were exposed to normoxia (control) or hypoxia after 40 mg/kg (i.p.) PQ exposure. Then, lung tissues were harvested for measuring total SOD levels. PQ treatment with a low-oxygen concentration therapy reduces oxidative stress.
*Significantly different from control group at $p<0.05$.



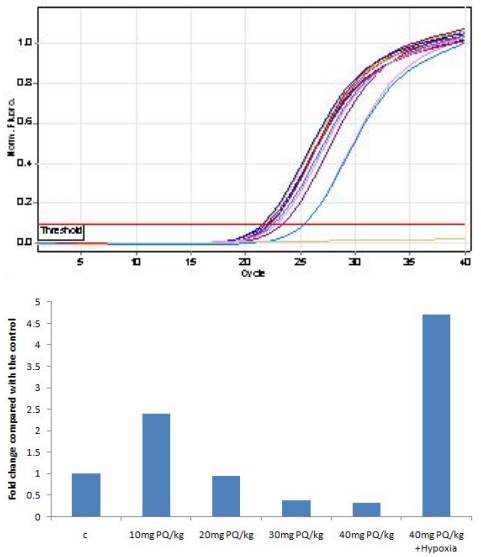
[Fig. 12] Measurement of GPx activity. Sprague–Dawley (SD) rats were exposed to normoxia (control) or hypoxia after 40 mg/kg (i.p.) PQ exposure. Then, lung tissues were harvested for measuring GSH levels. We proved that PQ increased oxidative stress; however, PQ treatment coupled with the low-oxygen concentration therapy reduced oxidative stress.
*Significantly different from control group at $p<0.05$.



[Fig. 13] Caspase-3 activity. Caspase-3 activity was analyzed in the 40 mg/kg PQ group and 40 mg/kg PQ + hypoxia group. The low-oxygen concentration therapy is effective in reducing cell death induced by PQ.
*Significantly different from control group at $p<0.05$ #Significantly different from PQ group at $p<0.05$.

HIF는 helix-loop-helix PAS transcription factor로서 저산소 상태에서 활성화되는 hetero dimeric transcription factor이다. 허혈성 상태에서 발현되어 저산소, 다양한 Stress 등에 의한 손상을 예방하는 효과가 있

는 것으로 보고되고 있다. 이에 우리는 real-time qRT-PCR 분석법을 통해 비치명적인 저산소를 처리한 군에서 HIF의 발현이 의미 있게 증가하는 것을 확인할 수 있어서 HIF의 발현 증가가 저농도 산소요법의 보호 효과 기전과 관련이 있을 것으로 판단된다[Fig. 14]. 이를 통해 *in vivo* 저농도 산소요법은 파라쿼트의 산화스트레스 감소와 활성 산소종 발생 감소 효과, 항 세포사멸에 의한 세포 보호 효과 기전이 있다는 사실을 *in vitro* 모델에서 증명하였고 유전자와 관련해서는 hypoxia-inducible factor 발현과도 관련이 있을 것으로 생각한다.



[Fig. 14] Real-time qRT-PCR analysis for hypoxia inducible factor 1a (HIF). The hypoxic group significantly increased HIF expression. The increase in HIF expression under hypoxia seemed to be related to the protective effect of hypoxia itself.

4. 논의 및 결론

농약은 크게 살충제, 살서제, 제초제, 진균제 등으로 분류되며, 제초제는 성분별로 파라쿼트, 다이쿼트, 염소화 페녹시화합물, 다이옥신, 질소화 페놀 및 질소화 크레솔 화합물, 염소염, 황화요소계, 아트라진 등으로, 작용기전에 의해 이행형 및 접촉형으로 분류된다. 파라쿼트는 비선택적 접촉형 제초제로 1882년에 메칠 바이오로젠(methyl biologen) 이라는 산화환원지시제로 합성되었으며, 1958년 제초제로 변형 개발된 이후 물에 잘 녹고 토양에 잔류하지 않으며 흙에 섞이면 독성작용이 사라져 환경오염을 시키지 않아 널리 사용되었지만, 자살목적으로 음독하거나 부주의로 노출되었을 때 사망률이 30~80%에 이르는 고독성을 보여 그 치료방법을 알아내기 위해 많은 연구가 시도되었지만, 아직 효과적인 치료방법을 밝혀내지는 못했다[1,8]. 현재 많은 나라에서 직업적 노출과 수많은 사고 및 자살에 의한 사망이 사회적 문제가 되어 이 물질의 사용을 제한했다. 한국은 1970년 파라쿼트가 농약으로 등록된 이후 중독환자 수의 증가에 대한 대책으로 구토 유발제 및 인지를 쉽게 하려고 염료를 첨가하였으며, 흡착제를 의료기관에 무상 공급하는 노력을 취했다고 한다.

파라쿼트는 음독 시 주로 소장을 통해 흡수되나 가장 흡수율이 높은 공장도 17.6%로 흡수율은 저조하다[9,10]. 사망할 가능성이 높은 음독 용량은 30 ㎎/㎏ 정도로 60 ㎏ 체중의 성인이면 1.8g, 국내에 시판되는 24.5% 용액일 때 7~8 ㎖로 일반 성인의 한 모금(20㎖)의 절반보다 적은 양이다. Vale 등(1987)에 의하면 파라쿼트 중독 시 음독량 20 ㎎/㎏ (파라쿼트 24.5% 용액이면 약 5 ㎖) 이하에서는 무증상이거나 소화기계에 국한된 증상이 보였으나 모두 회복되었고, 20~30 ㎎/㎏ (파라쿼트 24.5% 용액이면 약 5~10 ㎖)의 음독 시에서는 국소 소화계증상과 가역적 신부전 그리고 폐섬유화증 등이 몇몇 음독 환자에게서 발견되었으며, 2~3주경에 사망한 예가 있었다. 40 ㎎/㎏ (파라쿼트 24.5% 용액이면 약 10 ㎖) 이상의 음독 시에는 국소증상 이외 다발성장기능 부전과 같은 전신 중독증상이 나타나고 대부분 수일 이내에 사망하였다.

흡수된 파라쿼트는 체내분포용적이 커 모든 주요장기에 분포하나, 폐는 에너지 의존과정으로 흡수되어 혈장과 비교해서 농도가 6~10배 정도 높은 주요 표적 장기로 신기능이 정상이면 음독 후 5~7시간에 최고 농도에 도달할 수 있다[11, 12]. 일반적으로 세포는 산소 이용과 관련된 계속된 활성 산소 종(reactive oxygen species) 발생 때문에 세포 손상이 발생하게 되는데 파라쿼트는 이러한 활성 산소 종 생성을 유발하는 대표적인 화합물로서 세포 내에 들어오면 NOS oxidase, NADPH oxidase에 의해 파라쿼트 이온을 형성하고 산소와 반응하여 superoxide 같은 활성산소종을 생성하게 된다[13]. 특히, 폐 세포는 산소 부분압이 높고 자유산소기를 제거하는 효소 계가 상대적으로 적어서 활성 산소 종에 의한 손상에 가장 민감하다. 파라쿼트가 폐포 상피세포와 기도 세

포내에 위치한 diamine 전달체계에 의해 폐에 축적되면 cyclic redox 반응으로 과산화기(superoxide radical), 과산화수소기(hydrogen peroxide radical), 그리고 수산화기(hydroxyl radical) 등의 자유기를 형성, 세포막의 지질과산화를 유발하여, 폐포 상피세포인 type Ⅰ, type Ⅱ 에 직접 작용하여 폐포 내 출혈, 폐부종, 폐포상피 세포의 파괴를 통해 폐포염을 유발하게 되고 결국 폐섬유증을 일으킨다. 따라서 이러한 파라쿼트에 기인한 폐섬유증은 간질성 폐 질환의 원인과 병리기전을 연구하는 모델로서도 이용되고 있다[14].

현재까지 파라쿼트 이온에 의해 발생하는 활성산소종이 파라쿼트에 의한 세포독성의 가장 중요한기전으로판단되기때문에임상적으로는파라쿼트 중독 환자가 폐포 손상에 의한 호흡곤란 증세가 발생하더라도 산소 공급 시 세포 내 산소농도가 증가하여 파라쿼트에 의한 산화한 독성을 악화시킬 것으로 판단되어 산소치료를 지양하고 있다. 이와는 반대로 파라쿼트 독성에 의한 세포 독성 시에 저농도 산소 처치는 활성 산소 종의 발생이 감소하여 세포 독성이 감소할 것으로 판단할 수 있다. 하지만 현재까지 산소 농도와 파라쿼트의 독성과의 연관성에 관한 연구는 그다지 많지 않으며 이와 관련된 대표적인 연구로는 Hoet 등[15]이 인간 type Ⅱ 폐포세포에서 산소농도와 파라쿼트 독성에 관한 연구를 시행하였는데, LDH 분석을 통해 21% 산소농도에서 50% 세포독성 파라쿼트 농도는 25 μM, 60% 산소 농도에서 50% 세포독성 파라쿼트 농도는 7 μM로 감소한 소견을 보였고, 10% 산소 농도에서는 50% 세포독성 파라쿼트 농도가 1 mM 이상으로 증가하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 저산소/혐기성 통합배양기를 통해 다각적인 분자생물학적 분석기법(MDA 분석법, SOD 활성, glutathione 활성 분석법)를 통해서 파라쿼트에서 유발된 세포 독성을 획기적으로 줄일 수 있는 최적의 비치명적인(sub-lethal) *in vivo* 저농도 산소요법을 확립하였다. 최적화된 *in vitro* 저농도 산소요법을 파라쿼트 폐 독성 모델에 적용하여 세포보호효과 기전 연구를 위해 활성산소 종 분석을 위한 MDA 분석법, SOD 활성, glutathione 활성 분석법 등 다양한 산화스트레스(oxidative stress) 분석실험을 수행하여 저농도산소요법이 활성 산소 종 발생을 획기적으로 줄인다는 사실을 밝혔다. 또한, real-time PCR analysis을 통해 저농도 산소 유도와 관련된 보호유전자 분석하였다. 동물용 저산소배양기를 활용하여 파라쿼트 독성 동물모델에서 저산소 유도에 따른 동물(조직) 손상을 평가하고 동물(조직) 손상이 유발되지 않는 최적의 비치명적(sub-lethal) 산소 농도를 확립하여 저농도 산소요법의 치료 효과를 확인하였다.

본 연구를 통해 저농도산소요법이 in vivo상에서 파라쿼트에 유발된 세포독성을 매우 효과적으로 줄인다는 사실 및 최적의 치료조건을 확립하였고 이러한 보호 효과가 다양한 활성산소종 감소 및 산화스트레스 유전자 발현과 관련 있다는 결과를 도출하여 앞으로 파라쿼트 중독 환자의 임상 치료에 활용 가능한 기술로 추가적인 연구를 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

References

[1] Lee, E.Y., Kim, Y.T., Yang J.O., Hong, S.Y. “Long-Term Prognosis of Paraquat-Induced Lung Injury” Korean J med Vol.65, No.3, pp.308-314, June, 2003.

[2] Suzuki, K, Takasu, N., Atria S, Ueda A., Okabe T, Ishimatsu S, et al. “Evalution of Severity Indexes of Patients with Paraquat Poisoning” Hum Exp Toxicol Vol.10, No.1 pp.21-23, January, 1991. DOI: http://dx.doi.org/10.1177/096032719101000104

[3] Suntress ZE. "Role of Antioxidants in Paraquat Toxicity" Toxicology Vol.180, No.1 pp.65-77, January, 2002. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00382-7

[4] Skillrud DM, Martin WJ. "Paracuat-Induced Injury of Type Ⅱ Alveolar Cells" Am Rev Respir Dis, Vol.129, No.6, pp.995-999. November,, 1984.

[5] Yoon SC, Tac WT, Park, YA, Lee JA. Kim JW. "How is the Clinical Efficancy of Extracorporeal Extraction Treatment Especially, Forcused on the Hemodiafiltration, for Removal of Paraquat?" Korean J Nephrol, Vol.21, No6, pp.914-923. November, 2002.

[6] Uhal BD. Joshi L, True AL, Mundle S, Raza A, Pardo A. et al. "Fibroblasts Isolated after Fibrotic Lung Injury Induced Apoptosis of Alveolar Epithelial Cells in vitro" Am J Physiol, Vol.269, No.6, pp.819-828, November, 1995.

[7] Cheng Q, Nguyen T, Song H, Bonanno J. Hypoxia Protects Human Corneal Endothelium from Tertiary Butyl Hydroperoxide and Paraquat-Induced Cell Death in Vitro" Exp Biol Med, Vol.232, No.3, pp.445-453, June, 2007.

[8] Suzuki K, Takasu N, Atria S, Ueda A, Okabe T,

Ishimatsu S, et al. "Evalution of Severity Indexes of Patients with Paraquat Poisoning" Hum Exp Toxicol, Vol.10, No.1, pp.21-23. January, 1991.
DOI: http://dx.doi.org/10.1177/096032719101000104

[9] Heylings JR "Gastrointestinal Absorption of Paraquat in the Isolated Mucosa of the Rat" Toxicol Appl Parmacol, Vol.107, No.3, pp.482-493. June, 1991.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(91)90311-2

[10] Meredith TJ. and Vale JA. "Treatment of Paraquat Poisoning in Man: Methods to Prevent Absorption" Hum Toxicol, Vol.6, No.1, pp.49-55. January, 1987.
DOI: http://dx.doi.org/10.1177/096032718700600108

[11] Park SM, Kim SH, Choi SJ, Kim H, Lee WK, Kim YN, et al. "Plasma Paraquat Concentration in Acute Paraquat Poisoning" J Korean Soc Emerg Med, Vol.11, No.3. pp.345-351. June, 2000.

[12] Houze P, Baud FJ., Mouy R, Bismuth C, Bourdon R. Schermann, JM "Toxicokinetics of Paraquat in Humans" Hum Exp Toxicol, Vol.9, No.1, pp.5-12. January, 1990.
DOI: http://dx.doi.org/10.1177/096032719000900103

[13] Bonneh-Barkay D, Reaney SH., Langston WJ. Di Monte DA. "Redox Cycling of the Herbicide Paraquat in Microglial Cultures" Brain Res Mol Vol.134, No.1, pp.52-56. January, 2005.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.005

[14] Park JK, Kim GT, Song HS. Park, SM. "Apoptosis in Respiratory Epithelial Cells: Triggering by Paraquat and Modulation by L-ascorbic acid" J Korean Soc Emerg Med, Vol.15, No.6, pp.606-611. November, 2004.

[15] Hoet PH, Demedts M. Nemery, B. "Effects of Oxygen Pressure and Medium Volume on the Toxicity of Paraquat in Rat and Human Type II Pneumocytes" Hum Exp Toxicol, Vol.16, No.1, 305-310. January, 1997.
DOI: http://dx.doi.org/10.1177/096032719701600602

김 훈(Hoon Kim) **[정회원]**

- 2002년 8월 : 충남대학교 예방의학과(의학석사)
- 2011년 8월 : 충남대학교 생화학과(의학박사)
- 2004년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 응급의학과 교수

<관심분야>
보건의료, 임상의학

민 진 홍(Jin-Hong Min) **[정회원]**

- 20013년 2월 : 충북대학교 응급의학과(의학박사)
- 2010년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 응급의학과 교수

<관심분야>
보건의료, 임상의학

한 규 홍(Kyu-Hong Han) **[정회원]**

- 2013년 2월 : 충북대학교 응급의학과(의학박사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 응급의학과 교수

<관심분야>
보건의료, 임상의학

강 준 호(Joon-Ho Kang) **[정회원]**

- 2012년 5월 ~ 현재 : 충북대학교 응급의학과 교수

<관심분야>
보건의료, 임상의학