

Melandrin유도체의 진통 소염 및 항바이러스 효과

임증기 · 이은방* · 우원식* · 이강노 · 이영순* · 마은숙*

성균관대학교 약학대학, *서울대학교 천연물과학연구소, *효성여자대학교 약학대학

(Received February 7, 1994)

Analgesic, Anti-inflammatory and Antiviral Effects of Melandrin Derivatives

Jung Ki Lim, Eun Bang Lee*, Won Sik Woo*, Kang Ro Lee and Eun Sook Ma*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

*College of Pharmacy, Hyosung Women's University, Gyeongsan 713-702, Korea

Abstract—Fourteen melandrin derivatives(I-XIV) were investigated on analgesic, anti-inflammatory and antiviral activities. Compound I [N-(p-hydroxybenzoyl)-5-hydroxyanthranilic acid methyl ester], XII [N-(2-phenoxypropionyl)-5-hydroxy anthranilic acid propyl ester and XIV [N-(2-phenoxypropionyl)-5-hydroxyanthranilic acid exhibited analgesic activity in tail pressure and Randall-Selitto method. But no anti-inflammatory activity was shown. Compound I exhibited weak antiviral activity on Herpes simplex virus type I F strain by virus-induced cytopathic effect(CPE) assay and its selectivity index(SI) was 8.17.

Keywords □ Melandrin derivatives, analgesic activity, herpes simplex virus, virus-induced cytopathic (CPE) assay, selectivity index(SI)

Melandrin은 장구채(*Melandrium firmum*)에서 분리된 천연물이며,¹⁾ 5-hydroxy anthranilic acid와 p-hydroxy benzoic acid를 작용시켜 용이하게 합성할 수 있다.²⁾ Melandrin에는 진통작용이 있음이 확인되었으며,³⁾ 그 유도체에 항바이러스 효과가 있음이 알려져 있다.⁴⁾ 저자 등은 보다 강력한 생리활성 물질을 추구할 목적으로 melandrin 유도체 14종을 합성하고,⁵⁾ 이들의 생물활성을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

실험동물 및 검체

이 실험에 사용한 마우스는 체중 20~25 g의 ddY계 웅성을 사용하였고, 흰쥐는 체중 150~180 g의 Sprague-Dawley계 웅성을 사용하였다. 동물은 22~25

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

℃의 동물실 조건에서 일주일 이상 사육하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 melandrin 유도체는 Fig. 1과 같으며, 1%-CMC용액에 현탁한 후 사용하였다.

진통작용

마우스 꼬리 가압법—마우스 꼬리에 염증을 유발시킨 다음, 압력을 가하여 동통을 유발시키는 방법에⁶⁾ 따라서 실시하였다. 즉, 20% Brewer's yeast-생리식 염액 0.1 ml를 마우스 꼬리 기점으로로부터 1 cm 지점의 피하에 주사하여 염증을 유발시킨 다음, 주사 2시간 후에 검체를 경구투여하고 일정시간 후에 동통역치(mmHg)를 측정하였다. 동통역치의 측정은 electro-sphygmomanometer로서 20 mmHg/sec의 압력을 꼬리상에 세워진 합석판으로 꼬리에 압박하여 마우스가 동통반응을 나타낼 때의 압력(mmHg)을 측정하였다. 이 압력은 transducer를 통하여 physiograph

상에 기록하였다. 각 검체는 200 mg/kg을 투여하였고, 대조약물은 aminopyrine 200 mg/kg을 사용하였다.

Randall-Selitto법—흰쥐의 발바닥에 20% Brewer's yeast-생리식염액 0.1 ml를 피하로 주사하여 염증을 유발시키고, Randall-Selitto법⁷⁾에 따라서 analgesy meter(Ugo Basile Co.)로 염증부위에 압력을 가하였을 때, 동통을 감지하는 압력을 동통역치(g)로 표시하였다. 검체는 yeast 주사 2시간 후에 500 mg/kg을 경구투여하였고, 동통역치의 측정은 검체 투여 후 30분과 60분에 실시하였다. 대조약물은 aminopyrine 250 mg/kg을 사용하였다.

소염작용

흰쥐 7마리를 1군으로 하여 Takagi 등⁸⁾의 방법에 따라 항 carrageenin 부종작용실험을 실시하였다. 흰쥐의 발바닥에 1% carrageenin 0.1 ml/rat를 피하주사하여 부종을 유발시키고, 1시간 간격으로 4회에 걸쳐 부종의 용적을 plethysmometer(Ugo Basile Co.)로

측정하였다. 시료는 carrageenin 주사 30분 전에 경구투여 하였다. 검액 주사전의 용적을 기준으로 하여 그 증가율을 아래의 식으로 계산하여 부종억제 정도를 검색하였으며, 대조약물로 aspirin 500 mg/kg을 사용하였다.

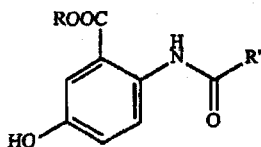
$$\text{발용적 증가율(\%)} = \frac{(V_t - V_n)}{V_n} \times 100$$

V_t: carrageenin 주사후 일정시간후의 발의 용적
V_n: carrageenin 주사직전 발의 용적

항바이러스작용

세포—Vero cell(African green monkey cell)을 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다.

바이러스—Herpes simplex virus type I(HSV-1) strain F(ATCC VR-733), Herpes simplex virus type II(HSV-2) strain MS(ATCC VR-540)를 사용하였다.



melandrin	R = H	R' =		
I	R = CH ₃	R' =	VIII	R = n-C ₄ H ₉
II	R = C ₂ H ₅	R' =	IX	R = H
III	R = n-C ₃ H ₇	R' =	X	R = CH ₃
IV	R = n-C ₄ H ₉	R' =	X I	R = C ₂ H ₅
V	R = CH ₃	R' =	X II	R = n-C ₃ H ₇
VI	R = C ₂ H ₅	R' =	XIII	R = n-C ₄ H ₉
VII	R = n-C ₃ H ₇	R' =	XIV	R = H

Fig. 1—Melandrin derivatives.

표준약물 - 표준약물은 acyclovir(삼천리제약)과 1-β-D-arabinofuranosylcytosine(Ara-C)(Sigma)를 사용하였다.

세포배양 - 세포배양은 Vero cell을 10% 열처리된 fetal bovine serum(FBS)이 포함된 DMF(Dulbecco's modified Eagle medium)(GIBCO)배지에서 실시했다. 계대 후 3~4일이면 세포가 confluent monolayer를 이루도록 하였고, trypsin 처리를 하여 다시 계대 하였다. 3개월 마다 액체 질소에 보관중인 세포를 꺼내어 새로이 배양하였다.

바이러스의 증식 - 세포를 75 cm² flask에 배양하여 confluent monolayer가 되도록 형성되면 세포 1개당 0.1 plaque forming unit(PFU)가 되도록 바이러스를 접종하고, 1시간 adsorption 시킨 후 MEM/5% FBS 배양액을 넣어 세포의 80%가 cytopathic effect(CPE)를 나타낼 때까지 37°C에서 배양하였다. 배양액을 회수하고 세번의 freeze-thawing 후 4°C, 2000 rpm에서 20분간 원심 분리시키고 그 상등액을 소량씩 분주한 후 70°C에서 바이러스 중균액으로 보존하였다.

바이러스의 역가측정 - Virus 중균액의 역가를 알기 위해 1 : 10 연속 희석된 바이러스 희석액을 96-well plate에 배양된 세포 단층에 0.1 ml씩 접종하고, 1시간 adsorption 시킨 후 각 well에 배양액(MEM/5% FBS/10% 또는 0.8% gum tragacanth)을 첨가하였다. 바이러스에 의한 CPE가 나타날 때까지 CO₂ 배양기에서 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 crystal violet으로 염색한 후 과량의 염색시약은 흐르는 물로서 세척하여 건조시켰다. 세포 단층에 CPE에 의해 50% 파괴된 바이러스의 희석배수를 결정하여 50% cell culture infective dose(CCID₅₀)/ml로 바이러스역가를 표시하였다.

항바이러스작용의 검사 - 시료를 100% DMSO에 녹이고, 실험시 최종함량이 2.5%를 넘지 않도록 한다. 실험방법은 virus-induced CPE inhibition assay로 검사하였다.⁹⁾ 세포가 confluent monolayer를 형성한 96 well plate의 각 well에 100 CCID₅₀가 되는 100 μl의 바이러스로 접종하고, 1시간 adsorption시킨 후 시험농도의 2배의 시료가 포함된 100 μl의 배양액을 넣고 37°C, CO₂ 배양기에서 3일간 virus 대조군이 100% CPE를 나타낼 때까지 배양하였다. 배양액을 제거하고 세포를 고정, crystal violet으로 염색시킨 후 CPE를 나타낸 약물농도를 계산하여 EC₅₀값을 구하였다.

약물의 세포독성검사 - 24 well plate 각 well에 1.5×10⁵개의 vero cell과 시험약물 배양액을 모두 합하여 0.5 ml를 첨가하였다. 약물이 첨가되지 않은 세포 control이 confluent monolayer를 형성할 때까지 3일간 37°C에서 배양한 후 배양액을 제거하였다. 세포를 trypsin 처리하여 각각의 세포들로 분리시킨 후 trypan blue로 염색하였다. 염색되지 않은 세포를 세어 살아있는 세포수로 계산한 후 대조군과 비교하여 각 시험농도의 세포독성을 구하고 CC₅₀(50% Cytotoxic concentration)을 구하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{대조군세포수} - \text{시험약물의 세포수}}{\text{대조군세포수}} \times 100$$

결과 및 고찰

진통작용

마우스 꼬리 가압법 - 14종의 melandrin 유도체의 진통작용은 Table I과 같다. 즉, 검체를 경구투여하고 30분 후에 동통역치를 측정된 결과, 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타낸 화합물은 I과 X, IV이었고, 90분 후에 측정된 결과는 화합물 I과 대조약물인 aminopyrine에서 나타냈으며, 화합물 XII는 동통역치가 유의성있는 차이는 아니었으나 현저히 큰 역치를 보였다.

이러한 결과로서 acid류가 ester류 보다 작용이 강하다는 것을 알 수 있으며, ester의 길이가 짧은 화합물이 긴 화합물보다 동통역치가 높게 나타나는데, 이것은 ester chain이 장애요소로 작용하는 것으로 추정된다. 5-Hydroxy anthranilic acid에 치환된 기에서 isoxazole ring의 경우는 거의 활성이 없었으나 salicylic acid와 유사한 구조를 가진 p-hydroxy benzoic acid와 소염진통제로 많이 사용되고 있는 화합물의 치환기인 2-dl-phenoxy propionic acid를 결합시킨 화합물에서는 좋은 결과를 얻었다.

Randall-Selitto법 - 이 결과는 Table II에 표시하였다. 마우스 꼬리 가압법에서 유의성 있게 차이를 나타낸 화합물 I과 XIV, 그리고 유의성은 없었으나 동통역치가 큰 화합물 XII를 선택하여 이 방법으로 진통실험을 실시한 바 역시 작용이 있으며, 특히 화합물 XII가 제일 강한 작용을 나타내었다. 특히 이

Table I—Effect of melandrin derivatives on the pain threshold in mice

Compound	Dose(mg/kg, p.o.)	No. of animals	Pain threshold(mmHg)	
			30 min	60 min
Control	—	6	119.3± 5.5	126.8± 5.5
I	200	6	151.6± 5.5**	148.8± 7.3*
II	200	6	141.8± 14.1	130.8± 7.3
III	200	6	116.8± 9.7	137.3± 15.1
IV	200	6	117.7± 6.0	120.2± 7.8
V	200	6	142.0± 17.2	123.9± 14.3
VI	200	6	134.2± 6.9	128.1± 6.0
VII	200	6	121.4± 10.2	135.0± 6.2
VIII	200	6	118.0± 13.3	121.0± 7.6
IX	200	6	138.1± 8.3	147.9± 8.4
X	200	6	130.2± 12.1	127.6± 7.2
XI	200	6	129.6± 5.2	125.4± 10.1
XII	200	6	153.3± 19.6	152.4± 14.1
XIII	200	6	121.6± 12.4	122.1± 10.0
XIV	200	6	168.1± 20.3*	162.1± 19.5
Aminopyrine	200	6	156.0± 25.0	176.4± 18.5*

Significantly different from the control group(*p<0.05, **p<0.01)

: The minute represents the time after drug treatment

Table II—Effect of Melandrin derivatives on the pain threshold in the rat paw

Compound	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Pain threshold(g)			
			30 min		60 min	
			Inflamed	Non-inflamed	Inflamed	Non-inflamed
Control	—	8	80.2± 3.46#	143.7± 6.11	92.7± 4.11*	140.5± 3.44
I	500	8	107.0± 9.62*	175.0± 16.55	102.7± 7.66	156.8± 8.67
XII	500	8	145.3± 8.56**	202.7± 21.54	130.5± 5.08**	184.4± 12.54
XIV	500	8	129.7± 6.90**	161.9± 9.70	112.3± 4.74**	160.8± 9.83
Aminopyrine	250	8	141.1± 8.18**	165.2± 11.31	158.3± 8.46**	156.3± 11.63

: Significantly different from the non-inflamed paw of control group(*p<0.01)

* : Significantly different from the control group(*p<0.05, **p<0.01)

Pain threshold was determined at 30 min and 60 min after the drug treatment.

Right paw of rats was inflamed with 0.1 ml of 20% Brewer's yeast.

들은 모두 염증을 일으킨 발에서 역치의 유의성 있는 증가를 나타내었고 비염증의 발에서는 역치의 상승은 인정되나 유의성 있는 차이는 아니었다. 이러한 사실로서 이들이 진통작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

소염작용

카라게닌 부종의 억제 효과를 시험한 결과는 Table III에서 표시하였다. 진통작용 시험에서는 14종의 화합물을 전부 검색하였으나 여기서는 5-hydroxy anthranilic acid의 유도체로서 대표적인 3종 화합물인

I, IX 및 XIV를 각 500 mg/kg의 용량으로 시험하였으며, 대조약물로는 같은 용량의 aspirin을 투여하여 실시하였다. 이미 melandrin이 소염작용이 없음을 확인하였으나,³⁾ 진통작용이 있을 경우에 소염작용도 같이 있을 경우가 많으므로 이 실험을 실시한 바, aspirin은 control군에 비하여 유의성이 있는 억제를 보였으나, 대상화합물들은 억제를 나타내지 아니하였으므로 소염작용을 인정할 수 없었다.

항바이러스 작용

화합물 14종과 표준약물의 HSV-1 및 HSV-2에 대

Table III—Effect of melandrin derivatives on carrageenin-induced paw edema in rats

Compound	Dose (mg/kg.p.o.)	No. of animals	Increase percent of paw volume(M± S.E.)			
			1	2	3	4(hr*)
Control	—	7	9.1± 1.7	23.4± 4.3	33.6± 3.7	34.7± 3.8
I	500	7	9.4± 2.5	21.3± 5.4	32.2± 7.3	34.8± 7.2
IX	500	7	11.7± 3.4	25.1± 6.4	33.6± 4.4	41.5± 3.6
XIV	500	7	14.1± 4.8	30.1± 7.7	39.3± 7.4	46.6± 6.9
Aspirin	500	7	10.6± 2.6	16.7± 4.5	17.9± 4.4*	21.8± 6.7

Significantly different from the control group: *p<0.05

#: The hour represents the time after carrageenin injection

Table IV—Antiviral activity of melandrin derivatives

Compound	Exp. No.	CC ₅₀ (μg/ml)	EC ₅₀ (μg/ml)	
			HSV-1 F	HSV-2 MS
I	92H-12	>250	30.6	>250
	92H-13	>250	68.26	>250
II	92H-12	>40	17.98	24.51
	92H-13	>40	>40	>40
	92H-14	>40	18	27
III	92H-12	>10	>10	>10
IV	92H-12	>10	7.8	8.8
	92H-13	>10	>10	10
	92H-14	>10	>10	>10
V	92H-12	>40	27	27
	92H-13	40	29.31	30.09
	92H-14	>10	>10	>10
VI	92H-12	>10	>10	>10
	92H-13	>10	>10	>104
VII	92H-12	>10	10	8.6
	92H-13	>10	>10	>10
VIII	92H-12	>10	7.8	7.2
	92H-13	>10	>10	>10
	92H-14	>10	7.2	8.6
IX	92H-12	>250	>250	>250
X	92H-12	>10	>10	>10
	92H-13	>10	>10	>10
XI	92H-12	>10	>10	>10
XII	92H-12	>10	>10	>10
XIII	92H-12	>10	>10	>10
	92H-13	>10	>10	>10
XIV	92H-12	>250	>250	>250
Acyclovir	92H-12	>4	0.36	1.37
	92H-13	>4	1.56	>4
	92H-14	>4	0.32	3.2
Ara-C	92H-12	>4	0.61	0.67
	92H-13	>4	1.04	>4
	92H-14	>4	0.31	2.55

CC₅₀: 50% cytotoxic concentrationEC₅₀: 50% effective concentration

한 항바이러스 작용의 실험결과는 Table IV에 표시한 바와 같다.

50% 세포독성에 있어서 acyclovir와 Ara-C는 4 $\mu\text{g/ml}$ 이상인 데 비하여 시험화합물들은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로서 약한 독성이 있으며, HSV-1 및 HSV-2에 대한 EC_{50} 는 표준물질보다 약한 결과를 얻었다. 다만, 화합물 I은 HSV-1에서 $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 으로 나타낸 선택지수(selectivity index)가 8.17로서 가장 높았다. Acid류(IX, XIV)는 CC_{50} , EC_{50} 이 모두 250 이상으로서 항바이러스제로서의 가치는 전혀 없는 것으로 사료된다. Ester기들의 길이가 긴 것은 EC_{50} 값은 작으나 독성이 너무 크기때문에, 항바이러스 효과는 약물이 바이러스에 작용해서인지 세포독성으로 인한 영향인지를 알 수 없었다.

문 헌

- 1) Woo, W. S. and Choi, J. S.: A phenolic amide and other constituents of *Melandrium firmum*, *Phytochemistry*, **26**, 2099 (1987).
- 2) 문정술, 이강노, 임중기, 우원식: Melandrin의 합성, *약학회지*, **35**, 332 (1991).
- 3) Woo, W. S., Lee, E. B., Chung, H. S., Cheon, S. A. and Kim, O. J.: Biological activities of melandrin, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, in press (1994).
- 4) 문정술, 이강노, 임중기, 우원식, 박상우: N-치환 5-hydroxy anthranilic acid의 합성, *약학회지*, **37**, 243 (1993).
- 5) 임중기, 우원식, 이강노, 마은숙: Melandrin 유도체의 합성, *약학회지*, 인쇄중 (1994).
- 6) 李殷芳, "진통작용 검색법", *전통약물로부터 신약개발 연구법*, p.24 (1993). 서울대학교 천연물과학연구원.
- 7) Randall, L. O. and Selitto, J. J.: A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **3**, 409 (1957).
- 8) K. Takagi, H. Kamayamo and H. Yano: Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, *Yakugaku Zasshi*, **78**, 553 (1958).
- 9) Clercq, E. De, Descamps, J., Verhelst, G., Walker, R. T., Jones, A. S., Torrence, P. F. and Shugar, D.: Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus, *J. Inf. Dis.*, **141**, 563 (1980).