J. Fd Hyg. Safety 14(3), 282-286 (1999)

Quinolinedione 유도체에 의한 혈관 수축작용 및 급성독성 연구

이선구 · 배옥남 · 강규태 · 이주영 · 유충규* · 김화정* · 정진호†
*서울대학교 약학대학 · *이화여자대학교 약학대학*

Effect of Quinolinedione Derivative on Blood Vessels and Its Acute Toxicity

Sun-Ku Lee, Ok-Nam Bae, Kyu-Tae Kang, Joo-Young Lee, Chung-Kyu Ryu*, Hwa-Jung Kim*and Jin-Ho Chung†
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
**College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea*

ABSTRACT – Effect of quinolinedione derivative (OQ-21) on phenylephrine induced vasoconstriction was investigated using aortic rings in organ bath isolated from rats. Treatment with OQ-21 resulted in moderate increase in vasoconstriction in a dose-dependent manner. In addition we studied acute intraperitoneal toxicity of OQ-21 in male and female ICR mice. The changes of body weight and clinical signs were observed for 7 days after single dose of OQ-21 from 50 mg/kg to 500 mg/kg. There were no significant changes in body weight and clinical signs. Any mouse didn't die even at maximal dose. Autopsy of OQ-21 treated mice revealed no abnormal difference from contol mice, These results suggest that OQ-21 be moderately safe and could be developed as effective drug.

Key words □ Quinolinedione derivative, OQ-21, Acute toxicity, Vasoconstriction

Quinone계 물질은 환경내에 널리 퍼져있는 물질로 식물, 동물, 박테리아, 진균류 등에 존재하며 세포내 호흡이나 광합성 등에 관계된 전자전달계의 구성성분으로 작용하며 인간에 음식과 대기내 오염물질로써 흔히 노출된다. Quinone계 화합물은 현재 mitomycin C, adriamycin, daunorubicin 등 항암제로 널리 이용되고 있으며, benzene의 산화된 대사물 중에도 다량 존재하며 환경물질 및 대기 오염물질 또는 음식이나 의약품으로 인체에 쉽게 노출될 수 있으므로 quinone계 화합물의 독성에 관한 연구는 중요한 의미를 갖는다.[1-3]

최근 본 저자들은 합성된 quinone 계열인 quinolinedione 유도체인6-(2,3,4-trifluorophenyl) amino-5,8-quinolinedione (OQ 21)가 LPS 처리에 의하여 유발된 혈관 이완에 대하여 억제 작용이 현저함을 보고하였다.[4] 이러한 작용은 OQ21이 nitric oxide synthase (NOS)의 reductase 부위에 결합함으로써 나타나고 있다. 또한 macrophage cell line을 사용한 연구에서 염증반응에 주요한 역할을 수행하는 cyclooxygenase (COX) 유전자 발현 억제 여부 및 COX 산물을 radioimmunoassay로 측정한 결과 용량 의존적으로 COX를 억제함을 발견하였다. 이상의 결과로부터 OQ21은 NOS 및 COX를 억제함으로써 패혈증을 치료하는데 효과가 있으리라고 사료된다.

따라서 본 연구에서는 생리 활성을 갖고 있는 quinolinedione 유도체 (OQ21)을 대상으로 안전성 평가를 수행하기 위하여 암수 mice에 OQ21을 1회 투여한 후 급성 경구독성을 평가하였다. 또한 quinone에 의한 혈관 이완 억제 효과뿐만 아니라 agonist에 의한 혈관 수축작용을 증폭시키는 지를 확인함으로써 혈관에 대한 독성 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

시험물질

6-(2,3,4-trifluorophenyl) amino-5,8-quinolinedione (OQ21)은 적갈색을 띄는 화합물로써 이미 보고된 문헌[4]을 토대로 하여 합성하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

시험계 및 사육환경

급성독성 시험 경우에는 서울대학교 사육장에서 공급받은 ICR계 마우스를 사용하였고 혈관실험을 위해서는 male Sprague-Dawley계 랫드를 사용하였으며 서울대학교 약학대학 동물실험 연구동에서 2주간 순화 및 사육한 후 시험에 사용하였다. 물과 사료의 제한없이 사육하였으며 밤과 낮의 주기가 각각 12시간씩 되도록 하였다. 급성독성 시험에 사용시 마우스의 연령은 5주령이었다.

급성독성 시험

군 분리 및 투여용량의 결정 – 2주간의 순화기간 중 건강하다고 판정된 마우스에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다. 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 약물의 최대용해도를 토대로 결정하였다. 암수 모두 50, 90, 150, 250 및 500 mg/kg으로 설정하였고 이때 공비는 1.7이었다. 각 군의 동물 수는 암수 모두 각각 5마리로 하였다.

시험물질의 조제 및 투여 – 시험물질은 용매인 20% tween-80용액을 이용하여 각 투여용량에 맞도록 현탁하여 조제하였다. 투여용량은 10 ml/kg로 하여 마우스내 복강에 투여하였다.

관찰 항목

1) 체중 측정

시험에 사용된 모든 실험 동물에 대하여 시험 물질 투여 직전, 투여후 1일 1회 7일간 체중의 변화를 측정하였다.

2) 일반증상관찰

모든 시험동물에 대하여 일반적인 임상증상은 투여 당일에는 투여후 6시간까지는 매 시간 마다, 투여 1일부터 부검일 까지는 1일 1회씩 7일간 관찰하였다.

3) 혈소판 및 적혈구 수 측정

투여 후 1주일째 되는 날 모든 시험동물의 혈액을 orbital sinus로부터 채취하여 적혈구의 경우 0.9% 식염수에, 혈소판의 경우 1% oxalate 용액에 각각 현탁한후 hemacytometer를 이용하여 그 수를 측정하였다.

4) 부검

시험 종료후 동물을 경추탈골로 치사시킨 다음 부검을 실시하여 외관 및 내부장기 이상유무를 육안으로 상세히 관찰하였다.

혈관 수축시험

Organ bath 실험계 – 혈관의 반응은 organ bath system을 이용하여 측정하였다.[5] 흰쥐의 흉부 대동맥을 적출하여 즉시 ice-cold Krebs-Ringer 완충액 (KR 완충액: 조성 (mM); NaCl 115.5, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $NaHCO_3$ 25.0, disodium.calcium-EDTA 0.026 and glucose 11.1, pH 7.4)으로 옮겼다. 혈관 주변의 결합조직 등을 제거하고 길이 3~4 mm의 혈관 ring을 만들었다. 내피세포가 없는 혈관은 안과용 핀셋 끝을 혈관 내에 넣고 회전시켜 내피를 제거하였다. 만들어진 혈관 ring을 KR 완충액 10 ml이 채워진 organ bath에 현수하였다. Organ bath내의 KR 완충액은 95% O_2/5% CO_2의 혼합가스를 지속적으로 공급하며 37°C, pH 7.4를 유지시켰다. 혈관의 장력 변화는 Grass FT03 force transducer (Grass Instrument Co., USA)로 감지하여 BIOPAC's MP100 data acquisition system과 Acknowledge III computer program (BIOPAC Systems Inc., USA)으로 결과를 기록, 분석하였다.

혈관 ring은 resting tension인 2 g이 된 후 30분 이상 방치하여 평형 상태에 도달하도록 하였다. 혈관을 phenylephrine 10^{-6} M으로 수축시킨 후, acetylcholine 10^{-6} M을 가하여 이완시켰을 때 이완율이 80% 이상인 것을 내피세포가 있는 혈관의 표본으로 사용하였다.

혈관 수축반응 – OQ21이 혈관수축에 미치는 영향을 연구하기 위해 대조군에는 용매인 DMSO를, 처리군에는 OQ21을 농도별로 30분간 혈관에 처리한 후 혈관수축물질에 의한 수축반응의 변화를 관찰하였다. 혈관수축물질로는 phenylephrine을 사용하였으며 각각 저농도부터 cumulative하게 가해 수축 정도를 측정하였다.

통계학적 해석

체중의 경우 평균 및 표준편차를 이용하여 변화를 관찰하였고 각 결과에 대한 대조군과 시험물질 투여군의 비교는 one-way ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 별도로 기술하지 않는 한 $p<0.05$ 인 경우 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

급성독성 시험 평가

OQ21을 5 용량으로 나누어 암·수 mice에 투여한 후 7일간 체중의 변화를 관찰하였다. 암·수 모두 대조군에 비해 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았으며 시험물질 투여군 상호간에 있어서도 차이는 없었다 (Table 1 및 Table 2). 모든 투여군의 경우 사망동물은 없었다 (Table 3 및 Table 4). 일반적으로 많은 quinone 계열 물질의 LD_{50}가 100 mg/kg 이하인 경우와 비교하여 보면 급성독성 측면에

Table 1. Body weights of ICR mice (male) following single administration of OQ-21

Days after treatment	Dose (mg/kg)					
	0	50	90	150	250	500
0	28.8±2.3	26.8±2.2	26.4±1.5	27.8±1.9	28.4±2.1	27.0±1.6
1	27.8±3.1	27.0±1.4	26.0±1.2	27.6±2.2	28.0±1.6	26.0±1.6
2	30.4±2.6	27.6±1.8	26.6±1.3	28.4±1.8	28.2±2.2	26.6±1.3
3	31.0±2.1	27.8±1.8	27.4±1.3	28.8±1.6	28.2±2.3	26.8±1.1
4	32.2±2.4	29.0±1.9	28.4±1.1	28.6±1.1	29.8±2.1	27.8±1.5
5	31.8±2.2	28.8±1.8	28.4±1.1	30.2±1.9	30.4±2.5	28.2±1.1
6	32.0±2.4	28.8±2.3	28.8±1.3	30.2±2.2	30.2±2.3	28.4±1.1
7	33.2±2.2	30.6±1.7	29.6±1.5	31.6±2.3	31.8±2.8	29.2±1.3

Data represent mean±SD (unit: g) for five animals.

Table 2. Body weights of ICR mice (female) following single administration of OQ-21

Days after treatment	Dose (mg/kg)					
	0	50	90	150	250	500
0	24.2±1.1	24.0±1.0	24.6±1.5	24.6±2.1	24.6±1.1	24.8±0.8
1	24.6±1.1	23.6±1.5	24.0±1.7	23.6±2.5	22.8±1.1	23.2±1.3
2	24.4±1.5	24.0±1.4	24.0±1.7	23.8±2.4	22.6±1.5	22.8±1.5
3	24.8±1.3	23.8±1.1	24.6±1.8	24.0±2.3	22.4±1.8	22.8±1.9
4	25.8±1.3	24.2±0.8	25.8±2.2	24.4±1.8	23.8±1.3	23.8±1.6
5	25.8±1.3	24.4±0.5	25.4±1.9	25.0±2.1	23.8±1.9	24.0±1.6
6	25.6±1.5	24.4±0.5	25.4±1.5	26.0±2.4	24.2±1.5	24.6±0.5
7	26.2±1.3	25.2±0.8	26.8±2.2	25.8±1.9	25.6±1.3	25.4±1.3

Data represent mean±SD (unit: g) for five animals.

Table 3. Survivals in ICR mice (male) following single administration of OQ-21

Dose (mg/kg)	Days after treatment								Final survivals
	0	1	2	3	4	5	6	7	
50	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
90	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
150	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
250	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Table 4. Survivals in ICR mice(female) following single administration of OQ-21

Dose (mg/kg)	Days after treatment								Final survivals
	0	1	2	3	4	5	6	7	
50	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
90	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
150	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
250	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Table 5. Clinical signs in ICR mice (male) following single administration of OQ-21

Dose (mg/kg)	Number of animals	Hours after treatment						Days after treatment						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
50	5	0[a)]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[a)]Number of animals with abnormal clinical signs.

서는 OQ21은 독성이 강하지 않은 것을 알 수 있다. 실험 동물의 관찰은 투여 직후부터 6시간은 매시간 마다 실시하였으며 이 이후는 1일 1회씩 관찰하였다. 대조군과 비교하여 특이한 증상은 관찰되지 않았다 (Table 5 및 Table 6).

Table 6. Clinical signs in ICR mice (female) following single administration of OQ-21

Dose (mg/kg)	Number of animals	Hours after treatment						Days after treatment						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
50	5	0[a)]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[a)]Number of animals with abnormal clinical signs.

Table 7. Effect of OQ-21 on hematological parameters in ICR mice (male)

Blood cells	Control	Treated groups (mg/kg)				
		50	90	150	250	500
RBC(10^9cells/ml)	1.49±0.44	1.99±0.13	2.13±0.34	1.71±0.06	1.59±0.18	1.42±0.11
Platelet(10^8cells/ml)	1.16±0.32	1.69±0.17	1.37±0.24	1.46±0.74	1.89±0.21	4.59±2.11*

Data represent mean±SD for five animals.
* represents significant difference from control group.

Table 8. Effect of OQ-21 on hematological parameters in ICR mice (female)

Blood cells	Control	Treated groups (mg/kg)				
		50	90	150	250	500
RBC(10^9cells/ml)	2.00±0.25	2.05±0.35	1.92±0.41	1.99±0.28	1.67±0.18	1.57±0.12
Platelet(10^8cells/ml)	1.38±0.16	1.45±0.28	1.35±0.23	1.68±0.41	2.09±0.72	4.32±1.20*

Data represent mean±SD for five animals.
* represents significant difference from control group.

7일후 실험동물의 부검을 실시한 결과 OQ-21을 투여한 동물군은 암수 모두 대조군에 비해 특이한 병리학적 변화는 관찰되지 않았다 (결과 제시 안함).

혈소판 및 적혈구 수 측정

OQ-21을 투여한 동물군에서 혈소판 수의 변화를 측정한 결과 최고용량인 500 mg/kg 투여군에서만 암·수 모두 증가하였으며 나머지 투여군은 대조군과 차이가 없었다. 고용량 OQ21에 의한 혈소판 증가 원인은 현재로써는 알 수 없지만 혈소판이 골수에서 생성됨을 고려하여 볼 때 OQ21에 의한 골수 자극일 가능성도 있다. 적혈구의 경우 모든 투여군에서 대조군과 차이가 없었다.

OQ21에 의한 혈관 수축작용

혈관의 수축력은 내피세포의 이완작용 능력에 따라 변화한다. OQ-21은 혈관의 이완을 억제하므로 상대적으로 혈관의 수축력이 증가하리라 생각되어 혈관수축물질의 수축력에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 1). 대조군에는 용매인 DMSO를, 투여군에는 OQ-21을 농도별로 30분간 혈관에

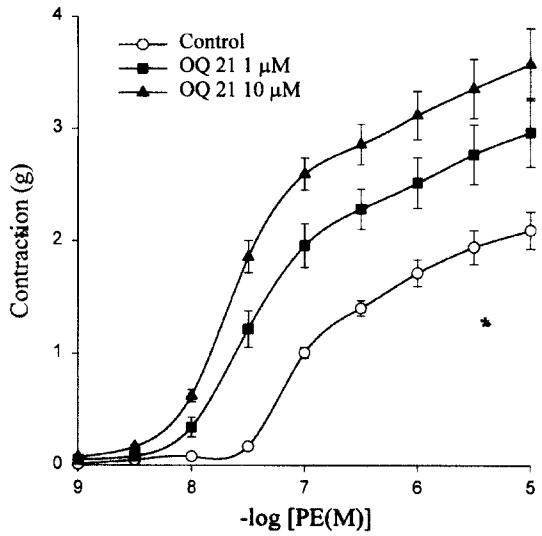

Fig. 1. Effect of OQ21 on phenylephrine-induced vasoconstriction in aortic rings.
After OQ21 was treated to arotic rings with endothelium for 30 min, dose-contraction curves of phenylephrine were obtained. Values are means±SEM of three independent experiments.

처리한 후 혈관수축물질인 phenylephrine을 저농도부터 cumulative하게 가하여 농도-수축곡선을 조사하였다. OQ-21은 혈관에 대한 phenylephrine의 반응을 더욱 예민하게 하여 대조군보다 낮은 농도의 phenylephrine에서부터 수축이 일어나게 하였으며 농도의존적으로 수축력도 증가시켰다.

이러한 quinone의 수축력 증가 작용은 내피세포가 없는 혈관에서는 나타나지 않았으므로 수축 증가는 혈관내피세포의 이완을 OQ-21이 억제함으로써 나타나는 결과인 것으로 추정된다. 이상의 결과는 혈관 독성을 유발할 수 있기 때문에 인체 안전성에 대한 검토가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 보건의료기술연구개발사업 연구비 (HMP-D-4-0012)에 의하여 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

국문 요약

OQ-21을 암·수 ICR계 마우스에 복강투여 하여 급성독성을 측정한 결과 최대용량 투여군에서도 사망한 동물은 관찰되지 않았다. 그리고 시험동물을 부검하여 육안 관찰한 결과 OQ-21 투여군은 대조군과 전혀 차이가 없었고 실제 독성도 비교적 낮은 것으로 판단된다. 또한 OQ-21이 혈관에 수축 반응에 영향을 미치는 지를 연구한 결과 용량 의존적으로 phenylephrine에 의한 혈관 수축을 증가시킴을 관찰하였다. 이상의 결과로부터 OQ-21은 급성독성이 약한 것으로 생각되지만 혈관 수축에 미치는 영향은 앞으로 인체 안전성에 관하여 검토하여야 할 과제로 사료된다.

참고 문헌

1. Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. and Graham, D. G.: Comtemporary issues in toxicology: quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2-16 (1992).
2. Brunmark, A and Cadenas, E.: Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 435-477 (1989).
3. Powis, G.: Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic. Biol. Med.*, **6**, 63-101 (1989).
4. Ryu, C. K., Jung, S. H., Lee, J. A., Kim, H. J., Lee, S. W. and Chung, J. H.: 6-Arylamino-5,8-quinolinediones and 7-arylamino-5,8-isoquinolinediones as inhibitors of endothelium-dependent vasorelaxation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2469-2472 (1999).
5. Lee, J. Y., Lee, M. Y., Chung, S. M. and Chung, J. H.: Chemically induced platelet lysis causes vasoconstriction by release of serotonin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**, 235-242 (1998).