

피페라진계 항히스타민제들의 브라디키닌 길항작용

정성현* · 이소영 · 윤혜숙*

경희대학교 약학대학, *서울대학교 천연물과학연구소

(Received September 6, 1993)

Bradykinin Antagonistic Activities of Antihistamine Agents Containing Piperazine Moiety

Sung Hyun Chung[#], So Young Lee and Hye Sook Yun-Choi*

College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

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

Abstract—Among the six antihistamine agents tested in this study, homochlorcyclizine showed the highest bradykinin antagonistic activity in the receptor binding assay as well as the isolated rat ileum assay. Schild plot analysis of bradykinin-induced ileal contraction in the presence of three different concentrations of homochlorcyclizine revealed a $pA_2=6.26$, and a correlation coefficient of 0.984. Homochlorcyclizine of (100 μ M final concentration) also showed 25% antagonistic activity in the receptor binding assay.

Keywords □ Antihistamine agents, bradykinin, receptor binding assay, Schild plot.

1974년 Rocha e Silva에 의해 혈액중에서 발견이된 브라디키닌(Bradykinin, BK)은 유사 펩타이드인 칼리딘(Lys-BK)과 함께 조직 및 혈액에 존재하는 키니노젠 단백질질에 칼리크레인효소 작용을 받아 생성되는 물질이다.^{1,2)} 적출장관을 서서히 그리고 지속적으로 수축시키는 활성이 있다고 하여 명명된 브라디키닌은 체내에서 다양한 작용을 나타낸다. 첫째, 혈관에 대한 작용으로 체내에서 발견되는 물질 중 가장 혈관 확장작용이 강력한 autacoid이다.³⁾ 대부분의 혈관에서 브라디키닌에 의한 확장작용은 혈관벽의 내피세포 존재하에 일어나는 생리반응으로, 다시 말하자면 내피세포 유래 이완 인자(endothelium derived relaxing factor, EDRF)에 의해 매개되는 것^{4,5)}으로 알려지고 있다. 한편 일부의 다른 혈관에서는 프로스타글란딘에 의하여 혈관 확장작용이 매개 혹은 증강됨이 관찰되고 있다. 이 작용은 브라디키닌이 세포막 표면에 존재하는 phospholipase A_2 효소를

활성화시켜 결과 유리된 아라키돈산으로부터 생성된 프로스타글란딘에 의해 일어나는 반응이다. 둘째, 브라디키닌은 장관, 자궁 및 기관지 등 여러 종류의 평활근을 수축시키는 활성이 있는 물질로 그 수축의 성격이 히스타민의 경우와는 달리 slow하지만 지속적이다.⁶⁾ 또한 substance P와 비슷한 정도의 강력한 통각과민 유발물질로 $A\delta$ 및 C 신경섬유를 자극하여 통증을 일으키거나 감각시켜 통각과민을 유발한다.⁷⁾ 셋째, 아직까지 브라디키닌이 염증의 매개체라고 확실하게 말할 수 없으나 여러 염증반응들(통증, 혈관 확장, 모세혈관 투과성의 증가, 평활근의 수축 등)을 일으키는 작용을 가지고 있음으로 보아 염증질환에 원인물질중의 하나라고 추측된다. Proud등은 비염의 증상에 키닌이 관련되어 있다는 많은 증거⁸⁾를 제시하였다. 알려지성 비염시의 즉각적인 증상은 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트리엔 및 키닌의 생성에 의한 것이나 나중에는 키닌수치는 낮아진다. 반면 감기원인의 30% 이상을 차지하는 rhinovirus감염에

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

의한 비염의 경우 다른 매개인자들의 농도는 변화가 없으나 키닌의 농도가 높아진다는 사실과 함께 브라디키닌을 건강한 지원자의 비강에 직접 주입하였을 때 흥미롭게도 일반적인 감기의 증상상(코막힘, 비루증, 목의 통증등)이 일어남이 보고되었다. 그외 작용으로 브라디키닌은 신세뇨관 세포의 수용체를 활성화시켜 집뇨관에서 염소이온의 수송을 촉진시켜 결과 뇨의 량 및 조성에 영향을 끼친다. 또한 알도스테론에 의해 신장조직내의 칼라크레인 효소의 함량이 증가하는 것으로 보아 키닌들이 신장기능의 조절에 관여되는 것으로 사료된다.⁹⁾

본 실험은 히스타민에 대한 여러 생리반응들이 브라디키닌의 경우와 아주 흡사하다는 사실(Table 1)에 근거하여 기존의 항히스타민제중 우선 피페라진핵을 가지고 있는 약제들의 브라디키닌 길항활성의 유무를 적출회장 및 수용체 결합실험으로 검색하였다.

실험재료

시약—수용체 결합실험에 사용한 [2,3-propyl-3,4-³H]Bradykinin은 Du Pont-New England Nuclear에서 구입하였으며 bradykinin, kallidin, [des-Arg⁹]bradykinin, [D-Phe⁷]bradykinin, angiotensin II, TES (Trimethylaminoethanesulfonic acid), DTT(dithiothreitol), polyethyleneimine, 1,10-phenanthroline, baccitracin, bovine serum albumin, chlorcyclizine, cyclozine, meclizine 등은 모두 Sigma로부터 구입하였다. ACE inhibitor인 captopril은 보령제약, homochlorcy-

clizine은 한일약품, buclizine은 한유약품, hydroxyzine은 한국 센트랄제약으로부터 각각 기증을 받았다. GF/B membrane filter는 삼진화학으로부터 구입하였고 그외 기타시약은 시판 특급 혹은 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

기기—Scintillation β counter(Beckman LS-5000 TD), Physiograph (Harvard Apparatus), Ultracentrifuge(Sorvall OTD75B)

실험방법

1) 적출회장시험—S.D. 계열의 수컷 흰쥐(체중 180~200그램)를 1주일동안 실험실 환경에 적응을 시킨 뒤 실험전날 16시간 절식을 시킨 후 본 실험에 임하였다. 개복하여 회장을 적출한 후 50 ml의 Krebs solution이 남아있는 마그누스관에 고정시킨 후 오랜 동안 자동수축능을 유지시키기 위해 carbogen gas(95% oxygen+5% carbondioxide)를 계속 공급하였다. 회장의 자동수축을 관찰하기 위해 1g의 tension을 주었고 이때 레코더의 chart speed는 0.025 cm/sec로 고정시켰다. 소장의 수축운동이 규칙적인 상태에 이르르면 수축운동을 수분간 기록하여 control로 하고 이 상태에서 organ bath에 브라디키닌을 다음의 농도순(10^{-13} → 10^{-12} → 10^{-10} → 10^{-9} M)으로 0.5 ml씩 가한 후 농도에 대한 수축반응을 관찰하였다. 이때 한 농도의 약물을 첨가하여 최고반응을 얻을때까지 기다린 후 수축을 기록하고 bath를 washing하지 않고 계속하여 다음 농도의 브라디키닌을 첨가하여 수축반응을 관

Table 1 Comparison of selected responses to histamine and bradykinin

Tissue or Cell type	Histamine		Bradykinin	
	Receptor	Response	Receptor	Response
Arteries	H ₁	contraction	B ₁	contraction
Arterioles	H ₁	relaxation(via EDRF)	B ₂	relaxation(via EDRF)
	H ₂	relaxation	—	—
Veins	H ₁	contraction	B ₁	contraction
Endothelial cells			B ₂	release of EDRF
Release of mediators	H ₁	release of EDRF	B ₂	increased
Contraction	H ₁	increased permeability	B ₂	permeability
Sensory nerves	f ₁	depolarization(itch, pain)	B ₂	depolarization(pain)
Mast cells	H ₂	decreased release of mediators	?	histamine release

찰하였다. 이어서 Krebs solution으로 bath를 2~3번 씻은 후 소장의 수축이 규칙적인 상태로 회복되면 검체인 homochlorcyclizine(10^{-6} M)을 가하고 7분 후 부터 브라디키닌을 10^{-12} M에서 10^{-8} M 농도범위에서 위와 같은 방법으로 수축반응을 관찰하였다. 계속하여 10^{-5} 및 10^{-4} M의 homochlorcyclizine에 대해서도 같은 방법으로 실험을 하였다. homocyclizine에 대해서도 같은 방법으로 실험을 하였다. homocyclizine 유무에 따라 브라디키닌에 대한 cumulative dose response curve를 그린 후 이 곡선으로부터 homochlorcyclizine의 각 농도에 대한 용량비를 구하여 Schild plot을 그림으로서 이 화합물의 브라디키닌 수용체에 대한 친화력 및 경쟁양상을 관찰하였다.

2) 토끼신장수질로 부터 membrane particulate의 제조-토끼신장의 수질조직을 1 mM 1,10-phenanthroline을 함유하고 있는 25 mM의 TES 완충용액(pH 6.8)에서 homogenation한 후 50,000 g에서 10분간 두 차례 원심분리하여 얻은 침전물을 125배 내지 500배 볼륨의 수용체결합 assay buffer(25 mM TES, 1 mM 1,10-phenanthroline, 140 μ g/ml bacitracin, 1 μ M captopril, 1 mM DTT, 0.1% BSA) 용액에 resuspend 시킨 후 실험당일전까지 -70°C 의 deep freezer에 보관하였다.

3) 브라디키닌수용체 결합실험-총 500 μ l의 assay buffer에서 1 nM의 tritium label된 브라디키닌을 수용체 단백질에 표지시킴으로 브라디키닌 결합부위를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 200 μ g의 membrane protein(수용체 함유)을 동위원소 표지된 브라디키닌과 함께 25°C 에서 90분간 incubation시킨 후 감압하에서 manifold filtration apparatus를 이용하여 Whatman GF/B glass filter를 통해 수용체와 결합한 브라디키닌과 유리형 브라디키닌을 분리하였고 여지는 4 ml의 ice-cold TES buffer용액으로 2~3번 수세하였다. 이렇게 처리한 여지를 scintillation cocktail용액에 담근 후 24시간 후에 베타 counter로 방사능을 측정하였다. 이때 specific binding 수치는 total binding 수치에서 10^{-6} M unlabeled bradykinin 존재하에 얻은 수치인 nonspecific binding 수치를 빼줌으로 계산하였다.

ligand displacement 실험에서는 최고 3.3×10^{-3} M에서 최저 10^{-9} M 농도의 각 ligand 존재하에 위와

같은 방법으로 수용체 결합실험을 실시하였는데 이때 ligand가 없을때를 100% residual specific binding 수치로 하여 각각의 반응백분율을 계산하였다.

4) 실험데이터 처리-메킨토시 IISI기종으로 Compound Associates 회사의 Cricket Graph 1. 3. 2 Software를 사용하여 실험데이터를 도식화 및 계산하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 항히스타민제들의 브라디키닌 길항 활성을 검토하고자 먼저 흰쥐의 적출회장을 이용하여 브라디키닌에 의한 장관 수축반응에 대한 각 검체들의 길항작용을 검토해 본 결과(이 논문에서 data가 언급되어 있지 않음) 각 검체 10^{-5} M 농도에서 가장 큰 억제효과를 나타낸 homochlorcyclizine에 대하여 Schild plot을 그려 이 물질의 pA_2 치를 계산하였다. 그림 1의 용량-반응곡선에서 검체 존재하에 반응곡선이 오른쪽으로 다소 평행이동하는 것을 관찰할 수 있었고 한편 최대반응 높이는 변하지 않았다. 또한 그림 2에서 보듯이 직선의 correlation coefficient는 0.984로 1에 가까워 homochlorcyclizine은 브라디키닌에 대해 경쟁적 길항제로 생각되어지며 이 화합물의 dissociation constant(pA_2)는 6.26이었다.

계속하여 이 히스타민 길항제들의 브라디키닌 수용체에 대한 직접적인 길항여부를 확인하기 위해서 각 검체 10^{-6} M 농도에서 수용체 결합 실험을 실시

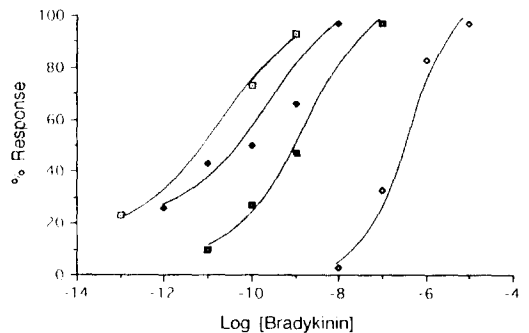


Fig. 1—Antagonistic effect of homochlorcyclizine. Bradykinin dose-response curves were obtained in either the absence(\square) or presence of 10^{-6} M(\blacklozenge), 10^{-5} M(\blacklozenge), and 10^{-4} M(\diamond) homochlorcyclizine.

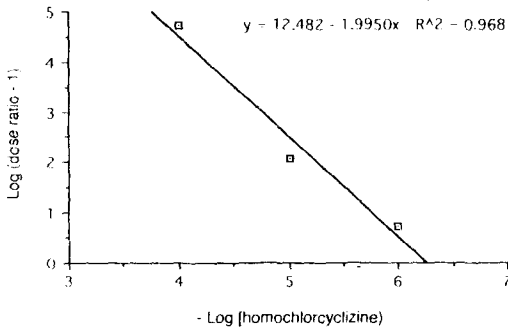
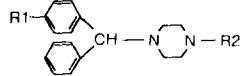


Fig. 2—Schild plot analysis of bradykinin-induced ileal contraction in the presence of homochlorcyclizine. The data were taken from Fig. 1.

Table II—Chemical structures of antihistamine agents containing piperazine moiety and their blocking activities in the bradykinin receptor binding assay



Compounds	R1	R2	Blocking activity (%) [*]
Cyclizine	—	CH ₃	5.2
Chlorcyclizine	Cl	CH ₃	11.5
Homochlorcyclizine ^{**}	Cl	CH ₃	25.1
Meclizine	Cl		22.2
Buclicizine	Cl		12.2
Hydroxyzine	OH	CHOCHOH	14.4

* Data obtained from three separate experiments and each one has done in triplicate

** Homochlorcyclizine has a seven-membered heterocyclic ring instead of six member piperazine ring presented in other antihistamine agents

하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 수용체 결합실험에서도 앞의 적출회장의 결과와 마찬가지로 homochlorcyclizine이 가장 큰 길항활성을 나타내었으나 그 효과는 그리 크지 않았다. 한편 본 수용체 결합실험에서는 토끼 신장의 수질 세포막 particulate를 수용체 source로 사용하였는데 현재까지 알려진 브라디키닌 수용체 종류는 세 종류로 그 약리학적 특성은 다음과 같다. 대부분의 수용체들이 효능제 및 길항제에 의해 분류된 것과 마찬가지로 브라디키닌 수용체도 적출혈관 평활근에 대한 효능제들의 상대적인 친화력에 따라 B₁ 및 B₂형으로 분류하고 있다.⁶⁾ 곧 B₁으로 명

명된 수용체는 bradykinin 및 kallidin의 C-말단이 떨어져 나간 des-Arg 대사체에 친화력이 큰 수용체로 혈관 평활근의 수축반응을 매개한다. 한 예로 토끼 대동맥에 존재하는 B₁ 수용체의 여러 ligand에 대한 친화력은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

des-Arg¹⁰-KD>des-Arg⁹-BK>KD>BK> [Tyr(Me)⁸]-BK

아직 B₁ 수용체가 매개하는 체내반응은 명확하게 알려지고 있지 않은데, 흥미로운 사실은 B₁ 수용체의 생성이 외상이나 병적상태에서 유도된다는 것이다. Regoli¹⁰⁾등이 처음으로 des-Arg⁹-BK에 의한 토끼 장간막 정맥의 수축반응이 in vitro 배양 초기에는 없다가 시간이 흐를수록 증가됨을 관찰하였다. 또한 Barabe등은 시간경과에 따른 효능제에 의한 장간막정맥 수축반응의 증가에 비례하여 [³H]des-Arg⁹-BK의 결합이 늘어남을 관찰하였다. 이는 단백질합성 저해제인 cycloheximide나 RNA 합성저해제인 actinomycin에 의해 저해되므로 B₁ 수용체는 in vitro배양시 DNA로부터 새로이 합성된다는 사실이 입증되었다.¹¹⁾ 한편 내독소(lipopolysaccharide, LPS), 인터류킨 1, 내피세포 유래성장인자(EDGF), porbol ester등을 토끼의 적출 대동맥에 가하니 des-Arg⁹ BK에 대한 수축반응이 증가하고, Triton-X100을 흰쥐에 투여하니 des-Arg⁹-BK에 의한 방광 평활근의 수축력이 증가하며, LPS를 정맥주사 처리시 des-Arg⁹-BK가 저혈압을 유발함을 보아 B₁ 수용체는 조직적출과 배양하는 동안의 외상으로부터 혹은 염증으로 인해 유도 합성되며, 정상적으로 존재하는 키닌의 대사물이 이렇게 유도된 B₁ 수용체에 작용하여 국지적으로 염증반응을 일으키는 것 같다.¹²⁾

한편 브라디키닌의 체내 주요 반응(혈관확장 작용, 혈관투과성의 항진, 평활근의 수축, 통증 유발 등)을 매개하는 것으로 알려진 B₂ 수용체는 B₁형과는 다른 효능제 선택성을 나타낸다. 곧 KD>[Tyr(Me)⁸]-BK>BK>des-Arg¹⁰-KD>des-Arg⁹-BK 순서이다.

1985년 Stewart 그리고 Vavrek 등은¹³⁾ 브라디키닌의 7번 위치의 L-Pro를 D-Phe로 치환한 [Dphe⁷]-BK(NPC361: Nova Pharmaceutical Corporation)이 B₂ 수용체에 의해 매개되는 반응에 선택적으로 차단 효과가 있음을 밝혀내고 그 이후 수많은 NPC361 유도체들이 합성되었다. 최근에는 NPC361 유도체들

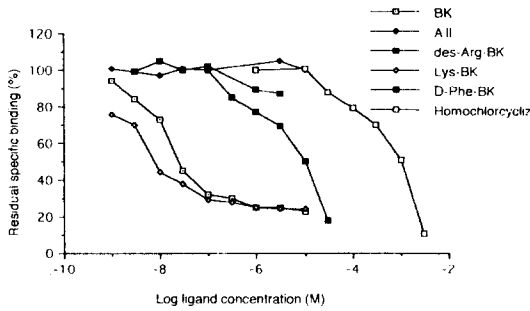


Fig. 3—Inhibition of specific [³H] BK binding to rabbit kidney medulla membrane particulate by various concentrations of BK, angiotensin II, BK analogs, and homochlorcyclizine.

이 브라디키닌 수용체에 대해 부분적인 효능제 활성을 가지고 있고 친화력 또한 크지 못한 단점을 보완하기 위해 브라디키닌의 5, 7번 및 8번 위치의 아미노산을 화학구조가 변형된 아미노산(Thi= Beta(2-thienyl)-Ala; Hyp=4-hydroxy-Pro)으로 치환시킨 새로운 길항제들이 개발되고 있는 실정이다.

한편 1989년 Farmer 등은¹⁴⁾ guinea-pig를 사용한 in vivo 실험에서 B₂ 수용체 길항제로 알려진 NPC567 및 NPC349가 브라디키닌에 의한 기도 수축반응에 차단효과가 없고, 또한 이들 길항제들이 폐에서 동위원소 표지된 브라디키닌의 결합을 55~65% 정도 밖에 치환하지 못하고 기도에서는 거의 치환능력이 없는 것으로 보아 폐의 일부와 guinea-pig 기도에는 새로운 형태의 수용체가 있음이 제시되었고 이를 B₃형 수용체라 명명하였는데 이 수용체 아형의 생화학적, 약리학적인 특성은 아직 알려져 있지 않다. 본 실험에서 밝혀진 흥미로운 사실은 토끼 신장 수질의 경우 그림 3에서 보듯이 B₁ 수용체 효능제인 des-Arg-BK의 경우는 수용체와 결합한 [³H]-BK를 약 20% 이내로 displace시키는 반면 B₂ agonist인 BK나 Lys-BK(kalldin)는 최고농도에서 80%까지 [³H]-BK를 displace시키는 결과로 보아 토끼 신장 수질에는 대략 20%의 B₁, 80%의 B₂ 수용체가 혼재되어 있지 않나 추측이 된다. 그림에서 이미 알려진 BK길항제인 D-phe-BK나 homochlorcyclizine의 경우는 각각 최고 농도에서 80% 이상 [³H]-BK를 치환시키는 것으로 보아 이들 화합물은 B₂형 브라디키닌 수용체에 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

결론

첫째, 적출회장을 이용한 homochlorcyclizine의 브라디키닌 길항 활성실험에서 Schild plot의 결과 이 화합물의 dissociation constant(pA₂ value)는 6.26이었으며 correlation coefficient가 1에 가까운 0.984인 것으로 보아 브라디키닌에 대해 경쟁적 길항제이다.

둘째, 토끼 신장 수질의 브라디키닌 수용체를 이용한 결합실험에서 homochlorcyclizine은 100 μM 농도에서 25%의 길항활성을 나타내었으며 B₂ type의 브라디키닌 수용체에 선택적인 길항이 보여졌다.

감사의 말씀

본 연구는 일부는 보건사회부의 신약개발지원 연구사업의 지원하에 이루어졌기에 지원기관에 감사드립니다.

문헌

- 1) Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., and Rosenfeld, G.: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, **156**, 261 (1949).
- 2) Werle, E.: Discovery of the most important kallikreins and kallikrein inhibitors. In, Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. (Erdös, E.G., ed) *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, vol. 25 Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-6 (1970).
- 3) Erdös, E.G. (ed): Bradykinin, kallidin and kallikrein. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. 25, Suppl. Springer-Verlag, Berlin(1979).
- 4) Peach, M.J., Loeb, A.L., Singer, H.A., and Saye, J.: Endothelium derived vascular relaxing factor. *Hypertension*, **7**, 194 (1985).
- 5) Furchgott, R.F., and Vanhoutte, P.M.: Endothelium-derived relaxing and contracting factors, *FASEB J.* 2007 (1989).
- 6) Regoli, D., and Barabé, J.: Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* **32**, 1 (1980).

- 7) Steranks, L.R., Farmer, S.G., and Burch, R.M.: Antagonists of B₂ bradykinin receptors. *FASEB J.* **3**, 2019 (1989).
- 8) Proud, D., and Kaplan, A.P.: Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 49 (1988).
- 9) Margolius, H.S.: Tissue kallikreins and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 343 (1989).
- 10) Regoli, D.: Kinins. *Br. Med. Bull.* **43**, 270 (1987).
- 11) Regoli, D., Marceau, F., and Barabé, J.: De novo formation of vascular receptor for bradykinin. *Can. J. physiol. pharmacol.* **56**, 674 (1978).
- 12) Goldstein, R.H., and Wall, M.: Activation of protein formation and cell division by bradykinin and Des-Arg⁹-bradykinin. *J. Biol. Chem.* **259**, 9263 (1984).
- 13) Vavrek, R.J., and Stewart, J.M.: Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* **6**, 161 (1985).
- 14) Farmer, S.G., Burch, R.M., Meeker, S.A., and Wilkins, D.E.: Evidence for a pulmonary B₃ bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.* **36**, 1 (1989).