

AS6의 일반약리작용시험

김현진¹ · 최규갑¹ · 도선희¹ · 김은주¹ · 차경희²

¹대전광역시 유성구 장동 100 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

²서울특별시 강남구 대치 3동 997-8 동국제약 주식회사

General Pharmacology of AS6

Hyun-Jin KIM¹, Kyu-Gap CHOI¹, Sun-Hee DO¹, Eun-Joo KIM¹, and Kyung-Hoi CHA²

¹Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 107, Yusong-Ku, Taejeon 305-606, Korea

²Dongkook Pharm. Co., Ltd., 997-8, Daechi-3 Dong, Kangnam-Gu, Seoul, Korea

(Received November 13, 2002 ; accepted October 11, 2002)

Abstract – In this study the general pharmacological profiles of AS6 on the central nervous system, cardiovascular and the other organs were investigated. The dosages given were 0, 250, 500 and 1000 mg/kg and drugs were orally administered. The animals used for this study were mice, rats and guinea pigs. Significant increases ($p < 0.01$) in the charcoal transport capacity were observed at the high dose of 1000 mg/kg and significant increases in retardation of pain threshold were observed in the test using acetic acid in all dosed animals. However, AS6 showed no noticeable effects on general behavior, motor coordination, spontaneous locomotor activity, hexobarbital-induced sleep time, body temperature, analgesic activity in the test using hot plate method and anticonvulsant activity. Furthermore no noticeable effects were observed in cardiovascular functions in the isolated rat heart, contraction and relaxation of the smooth muscle in the isolated guinea ileum, gastric secretion and renal function.

Key words □ AS6, mouse, rat, guinea pig, general pharmacology, central nervous system, cardiovascular and the other organ systems

간장질환은 그 이환율이 세계적으로 증가추세에 있으나 아직까지도 치료할 수 있는 의약품이 뚜렷하게 개발되지 못한 질환으로 전세계적으로 간장질환 치료제의 개발에 많은 노력이 이루어지고 있다(Jie L 등, 1994). 지금까지 발매가 허가된 간보호치료제는 flumecinol (Bogush TA 등, 2001; Turner IB 등, 1994)과 malotilate (Xu Q 등, 1997)로서 그 외에 10개의 화합물이 임상시험단계에 있는 것으로 알려져 있으며, 국내에서는 현재 flavonoid계 화합물인 silybin을 주성분으로 하는 간보호제가 레갈론이라는 상품명으로 시판되고 있다. Silybin은 분리가 어려운 광학 이성질체의 혼합물로서 순수한 단일 물질로의 개발이 힘들어 FDA에 의한 공인된 세계적인 간보호제로 개발되는데 어려운 점이 있으며, 따라서 간보호효과가 뛰어난 순수 단일 물질의 간보호제의 개발이 필요한 실정이라고 할 수 있다.

Centella asiatica는 예로부터 피부병, 나병, 인지능력 향

상 등 여러 가지 만성질환을 위한 민간약으로 사용되어 온 식물로서, Ursane계 triterpene 천연물의 간보호작용에 대한 보고가 증가하고 있어 동국제약(주)에서는 Centella asiatica의 정량추출물의 간보호 효능을 검색하였으며, 그 결과 우수한 간보호효능이 있음을 확인되었고, 정량추출물 중의 한 성분인 asiatic acid를 기본골격으로 하여 150여종의 반합성 유도체를 사용하여 1,2,3차의 구조활성연구를 수행한 결과 단일성분의 새로운 간보호 및 간경화 치료제 후보물질로써 AS6을 도출하였다.

AS6은 마우스에서 사염화탄소에 의해 유도된 간독성에 대해 간독성지표인 GOT, GPT, SDH의 상승을 매우 유효하게 억제시키는 것이 관찰되었으며, 아세트아미노펜간독성에 대해 GPT 상승을 유효하게 억제함을 알 수 있었다. 또한 AS6은 fat storing cells의 증식 억제 능력을 보여 항섬유화 활성을 보여 만성간경화치료제로서의 가능성을 보였다.

본 연구에서는 신약개발 과정중에 있는 AS6에 대한 안전성 평가(safety evaluation)의 일환으로 AS6을 생체에

*To whom correspondence should be addressed.

적용할 때 나타날 수 있는 일반약리에 대한 평가를 수행한 것으로 일반약리에 대한 연구는 약물을 임상적으로 적용할 때 인체에 나타날 수 있는 부작용을 예측하고, 이들 약물을 임상에 도입하기 위한 자료확보는 물론 기초약리 연구에도 기여할 수 있다. 시험은 의약품등의 일반약리시험지침(식품의약품안전청 고시 제 1998-62호, 1998.5.29)에 준하여 실험동물인 마우스, 랫드 및 기니픽을 이용하여 AS6을 임상예정경로인 경구로 투여한 후 일반행동, 중추신경계, 심장순환계 호흡 및 소화기계에 미치는 영향과 기타 장기에 미치는 영향 등을 살펴보았으며 동물에의 투여용량은 예비시험을 실시하여 0, 250, 500, 1000 mg/kg으로 설정하였다.

실험방법

실험동물 및 사육조건

ICR 계통의 특정 병원균 부재(SPF) 마우스, Sprague-Dawley 계통의 랫드는 (주)바이오제노믹스에서, Hartley 계통의 guinea pig은 계룡과학주식회사에서 각각 구입하여 사용하였다. 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구원 안전성연구센터 BS-2동의 6호실에서 사육되었으며, 시험기간중 동물실의 온, 습도는 자동온습도측정기에 의하여 매 시간마다 측정되었고, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(3개월마다 1회)으로 측정되었다. 마우스와 랫드는 실험동물용 고품사료(PMI Nutritional International: 505 North 4th Street Richmond, in 47374, USA)를, 기니픽은 기니픽용 고품사료(퓨리나코리아주식회사: 경기도 평택시 장당동 85-1)를 자유섭취시켰으며, 시험물질 투여전 3시간 동안은 절식시켰다. 물은 상수도를 자외선살균기로 소독시킨 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

시험물질 및 시약

시약으로 ketoprofen, codeine phosphate, pentyleneetetrazole, strychnine, acetylcholine, histamine, BaCl_2 는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, Hexobarbital · Na (Bayer, Leverkusen, Germany), chlorpromazine · HCl (Fluka, Buchs, Swiss), diazepam (Shionogie, Osaka, Japan), acetic acid (동양화학, 서울, 한국), electrode cream (기우메디칼, 서울, 한국), diethyl ether (대정, 인천, 한국), heparin (녹십자), pentobarbital · Na (한림제약) 등을 각각 구매하여 사용하였다. Chlorpromazine · HCl, hexobarbital · Na, acetylcholine, histamine, BaCl_2 는 증류수에 녹였으며, 그 외의 물질은 Tween 80 (1%)으로 현탁하여 사용하였다. 시험물질인 AS6은 tween

80(1%)에 용해한 후 250, 500, 1000 mg/kg의 용량으로 증류수에 현탁하여 경구투여하였다.

사용기기

기기는 motility meter (PAS, San Diego, California, USA), rotarod (Ugo Basile 7600, Comerio-Varese, Italy), thermometer (MGA-III, Tokyo, Japan), hot-plate (Letica, Barcelona, Spain), rodent shocker (HSE, March-Hugstetten, Germany), pH meter (Orion 720A, Beverly, USA), plethysmograph (HSE 855, March-Hugstetten, Germany), organ bath (Letica 13206, Barcelona, Spain), isometric transducer (Harvard, USA), polygraph (Biopack MP 100, Biopack Systems Inc., California, USA), Na/K/Cl analyzer (Ciba coming, Halstead, England), Langen-dorff apparatus (선진, 서울, 한국), Powerlab/800 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia), small animal blood flow meter (Transonic systems Inc., New York, USA), rodent ventilator (TSE, Bad Homburg, Germany), circulation water bath (Jeio Tech., 서울, 한국) 등을 사용하였다.

일반행동에 미치는 영향

동물은 ICR 마우스 암컷(체중 20~24 g), 수컷(체중 30~39 g)을 각 군당 4마리씩 사용하였다. 실험방법은 변형된 Irwin 방법(Irwin 등, 1964)을 사용하였고, 시험물질 투여 전 및 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 실험용 관찰 cage를 이용하여 일반행동을 관찰하였다.

자발운동에 미치는 영향

동물은 수컷 ICR 마우스(체중 30~34 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 각 군별 플라스틱 사육상자(260W×250L×400H)에 방치한 후 motility meter를 이용하여 5분 동안 동물이 움직인 운동량을 시험물질 투여 전 및 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 측정하였다(Svensson과 Thieme, 1969).

Rotarod 시험

동물은 수컷 ICR 마우스(체중 28~34 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실험전날 동물을 rotarod (16 rpm)에서 3분간 훈련시킨 후, 3분동안 rotarod에서 떨어지지 않았던 동물만 시험에 사용하였다. 각 군별로 시험물질 투여 전 및 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 1분동안에 rotarod (16 rpm)에서 떨어진 동물의 숫자를 측정하였다(Dunham과 Miya, 1957).

Hexobarbital 수면시간에 미치는 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 27~33 g)를 각 군당 8

마리씩 사용하였다. 각 군별로 시험물질을 투여한 후 30분 후에 hoxobarbital·Na (70 mg/kg)을 복강투여하고 동물의 정향반사 소실 시점부터 깨어나기까지의 시간을 측정하였다.

체온에 미치는 영향

동물은 ICR 마우스 암컷(체중 20~24 g), 수컷(체중 30~39 g)을 각 군당 4마리씩 사용하였다. 시험물질 투여 전 및 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 체온계(MGA-III)를 항문에 삽입하여 직장내 온도를 측정하였다.

진통작용: Acetic acid로 유발한 writhing 반응의 억제

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 21~37 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별로 투여하고 30분 후에 1% acetic acid를 10 ml/kg의 용량으로 하여 복강투여한 후 10분 후부터 5분간 동물의 전신을 쭉 뻗은 동작인 writhing의 숫자를 측정하였다(Koster 등, 1959).

진통작용: Hot-plate로 유발한 licking 반응

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 23~35 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별로 투여하고 30분 후에 동물을 hot-plate (57°C)에 올려놓은 후 동물이 앞발을 핥는 동작(licking)을 시작하기까지 소요된 시간을 측정하였다.

항경련작용: Pentylenetetrazol 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 27~33 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별로 경구투여하고 30분 후에 pentylenetetrazol (100 mg/kg)을 복강투여한 후 경련을 일으킨 동물수 및 사망동물수를 측정하였다(Swinyard 등, 1952).

항경련작용: Strychnine 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 26~33 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 경구투여하고 30분 후에 strychnine (1 mg/kg)을 복강투여한 후 경련을 일으킨 동물수 및 사망동물수를 측정하였다.

항경련작용: Electroshock 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스(체중 28~35 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 경구투여하고, 30분 후에 동물의 양쪽 귀속에 electroshock (120 mA, 0.3 sec)을 적용한 후 경련을 일으킨 동물수 및 사망동물수를 측정하였다(Woodbury와 Davenport, 1952).

비마취 흰쥐의 혈압 및 심박수에 대한 영향

체중 275~385g인 흰쥐를 pentobarbital·Na (50 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 다음 대퇴동맥과 대퇴정맥에 각각 cannula를 삽입하고 cannula의 다른쪽 끝은 피하를 따라 목뒤로 뽑아낸 후 고정하였고 수술후 동물을 하룻밤동안 안정시킨 후 다음날 대퇴동맥에 삽입한 catheter를 pressure transducer 및 physiograph에 연결해 혈압 및 심

박수를 data acquisition system (Biopak, Model MPI100)을 이용하여 측정하였다. 약 1시간 혈압이 안정된 것을 확인하고 시험물질을 경구투여한 후 20, 30, 60, 90, 120, 240 및 360분까지 일정한 간격으로 측정하여 약물투여전의 혈압 및 심박수에 대한 변화를 백분율로 나타내었다.

적출심장에 미치는 영향

체중 348~397 g인 SD 계통의 랫드를 sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 랫드에 heparin (1000 U/kg, i.v.)을 투여하여 혈전 형성을 방지한 후 심장을 적출하였다. 즉, 기관에 cannula (PE 240)을 삽입하여 rodent ventilator를 이용해 인공 호흡시키며 in situ 상태에서 대동맥 cannula를 통한 역행성 관류(Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(mmol/L): NaCl; 112, KCl; 5, MgSO₄; 1.2, KH₂PO₄; 1, NaHCO₃; 25, CaCl₂; 1.25, Glucose; 11.5, Pyruvate; 2.0)하에 Langendorff apparatus에 재빨리 매달고 심장에 붙어있는 불필요한 조직을 제거하였다. 생리 식염수로 채운 고무풍선(latex balloon)을 매달은 금속 cannula를 좌심방을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 측정하기 위해 압력변환기(pressure transducer)에 연결하였다. 이완기말압력(EDP, end diastolic pressure)은 10 mmHg로 주고 Gottlieb valve를 이용해 정압관류(75 mmHg)를 하여 10~15분 이내 안정화시킨 후 실험을 시작하였다. 심장을 Langendorff 장치에 고정하는 순간부터 실험 전 과정동안 생리액이 담긴 chamber에 심장이 충분히 잠기게 하여 온도가 37.4~37.6°C로 철저히 유지되도록 하였다. AD instrument 프로그램을 실행시키고 적출해 낸 심장을 Langendorff apparatus에 매달고 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer를 대동맥 통하여 역관류시키며 부형제대조군의 data를 측정한 후 이어서 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M의 시험물질 혼합액을 일정한 순서대로 흘려보내, 각 농도별로 data를 측정하였다(Levi 등, 1988). 본 실험에서는 심장기능을 평가하는 parameter로 수축기말 좌심실압(LVP, left ventricular peak systolic pressure), 이완기말 좌심실압(LVEDP, left ventricular end diastolic pressure), LVDP (left ventricular developing pressure), DP (double product)를, 관상혈관 기능을 평가하는 parameter로 관상혈류량(CFR, coronary flow rate)과 그 밖에 심박동수(HR, heart rate) 등을 측정하였다. DP는 working heart와 달리 심박출량(cardiac output)을 측정할 수 없는 적출심장에서 간접적으로 심장의 기능(cardiac performance)을 알아보는 중요한 parameter로서 Watts의 방법에 따라 심박동수에 LVDP를 곱하여 계산하였다(Bolli, 1991; Watts와 Maiorano, 1987). 여기서 LVDP는 수축기말 좌심실압에서 이완기말 좌심실압을 감하여 산출하였다. 관상혈류량은 aortic cannula 위

에 고정된 coronary flow probe(직경 1.0 mm)를 거쳐 flowmeter로 측정하였다.

호흡계에 미치는 영향

동물은 Hartley 계통 guinea pig (305~364 g)을 각 군당 5마리씩 사용하였다. 동물에 시험물질을 경구투여한 후 호흡측정용 사육상자에 방치하고 plethysmometer에 연결하여 시험물질이 동물의 호흡수 및 호흡량에 미치는 영향을 시험물질 투여 전 및 투여 후 30, 60, 120 및 240분에 측정하였다.

Gastrointestinal transport에 미치는 영향

동물은 ICR계 마우스(체중 29~37 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 동물에 경구투여하고 30분 후에 charcoal meal (10%의 arabic gum solution에 5% active carbon을 현탁시켜 조제)을 10 ml/kg으로 경구투여하였다. 30분 후에 장관을 적출하여 전체 소장길이 및 유문부로부터 charcoal meal의 이동거리를 측정하고 백분율을 계산하였다.

위액분비에 미치는 영향

동물은 Sprague-Dawley (SD)계 SPF 수컷 랫드(체중 198~244 g)를 각 군당 5마리씩 사용하였다. 사료와 물은 자유섭취시켰으며, 시험개시 24시간 전에 절식시키고 물은 10시간 전에 절수시켰다. 절식된 동물을 ether 마취시킨 후 유문부를 결찰하고 즉시 십이지장으로 시험물질을 투여한 다음 5시간 동안 방치시켜 위액을 채취하였다. 채취된 위액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 상층액을 수집한 후 위액량, pH, 총산도를 측정하였다(Shay 등, 1945).

기니픽의 적출 회장에 대한 작용

수컷 Hartley계 기니픽(536~607 g) 6마리를 사용하였다. 회장의 적출을 위해 기니픽 후두부를 강타하여 기절시키고 경동맥을 절단하여 실혈시킨 후 소장을 노출하고 맹장과 소장 접합부에서 10~15 cm 되는 곳으로부터 30 cm 가량의 소장(small intestine)을 절단해 내어 Kreb's modified buffer (mmol/L: NaCl; 118.3, KCl; 4.7, MgSO₄; 1.2, KH₂PO₄; 1.2, NaHCO₃; 25, CaCl₂; 1.8, Glucose; 10, EDTA; 0.025)에 담고 syringe를 이용하여 buffer를 관류시켜 장내부의 내용물을 씻어낸 후 longitudinal muscle-myenteric plexus preparation을 제조하였다(Rang, 1964). 적출 회장을 2.0~2.5 cm 길이로 절단해 95% O₂-5% CO₂ 혼합가스로 포화시킨 Kreb's modified buffer가 담긴 organ bath 내에 현수하고 1시간정도 안정화시켰다. 적출 회장을 안정화 시킨 후 시험물질 AS6 (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵

M)에 대한 직접적인 작용 및 시험물질의 5분간 전처치가 acetylcholine (5×10⁻⁷M), histamine (2×10⁻⁶M) 및 BaCl₂ (2×10⁻³M)의 수축작용에 미치는 효과를 측정하였다. 이 때 나타나는 수축력의 변화는 약물투여 전의 수축력을 0, KCl 30 mM에 의한 수축력을 100으로 놓고 이 값에 대한 백분율로 나타내었다.

Urine volume 및 urinary electrolyte에 미치는 영향

시험은 SD계 랫드(체중 180~230 g)를 이용하여 군당 4마리씩 실시하였다. 시험물질 투여 18시간 전에 절식 및 절수시키며 이때 동물 체중의 2.5%에 해당하는 물을 경구투여하였다. 18시간 후 동물 체중의 2.5%에 해당하는 물을 1차 투여하고, 1시간 후 생리식염수를 2차로 투여한 후, 곧바로 시험물질을 경구투여하고, 즉시 동물을 metabolic cage에 넣고 5시간동안 뇨를 수집하여 pH, 뇨량, Na⁺, K⁺, Cl⁻를 측정하였다.

통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 부형제대조군을 기준으로 다중비교 검정법을 실시하였다. 일원배치분산분석을 유의수준 α=0.05로 검정하여 점검결과 유의한 결과가 나타날 경우에는 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's test를 실시하였다. 얻어진 자료 중 뇨검사에 대한 자료를 sample 수가 작아 순위화한 데이터를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis H test를 실시하고, p<0.05인 경우 Dunnett's test를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 일반행동에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여한 후 30, 60, 120, 240 및 360분에서 일반행동을 관찰한 결과 부형제대조군과 비교하여 아무런 이상 증상이나 행동을 보이지 않았다(Table I).

2. 중추신경계에 미치는 영향

자발운동에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여한 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 자발운동량을 측정된 결과 부형제대조군과 비교하여 아무런 증상도 관찰되지 않았다(Table II). 양성대조물질인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 투여후 30분부터 240분까지 유의성있는 자발운동량의 감소를 관찰할 수 있었다.

Rotarod 시험

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여한 후

Table I. Effects of AS6 on general behavior in mice

SEX: ♂, ♀

Compounds	V. Control						AS6 (ml/kg)																	
	0						250				500				1000									
Dose (ml/kg, p.o.)																								
Time (min)	0	30	60	120	240	360	0	30	60	120	240	360	0	30	60	120	240	360	0	30	60	120	240	360
1. Catalepsy	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
2. Traction	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
3. Tremor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
4. Convulsion	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
5. Exophthalmos	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
6. Piloerection	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
7. Salivation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
8. Lacrimation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
9. Diarrhea	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
10. Skin Coloration	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
11. Pinna reflex	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
12. Righting reflex	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
13. Abdominal tone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
14. Tail elevation	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
15. Eyelid	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
16. Locomotion	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
17. Respiration rate	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
18. Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Each number represents the number of positive/tested (1-12).
The mean score; max 8 min 0 (13-17) and number of animals (18).

Table II. Effects of AS6 on spontaneous locomotor activity in mice

Drug	Dose (ml/kg)	Spontaneous locomotor activity (Counts/5 min)					
		0 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
V. Control	0	130.3±39.3	49.0±29.2	63.4±25.6	72.4±39.1	73.6±19.8	46.9±27.5
AS6	250	128.4±41.9	52.6±23.0	81.0±38.9	78.8±30.6	90.8±37.9	48.6±32.3
	500	117.6±51.4	80.1±36.7	44.9±29.7	46.5±22.9	69.8±31.7	49.9±32.4
	1000	113.1±21.9	70.0±33.1	51.1±30.8	39.6±19.6	72.6±30.1	23.9±18.9
Diazepam	10	136.8±50.3	2.8±3.1**	1.1±1.4**	11.4±20.8**	27.6±32.2*	21.5±20.1

Significant difference from control group (**; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.
The test compound was orally administered (n=8).

360분까지의 동물의 운동평형감각을 측정한 결과 부형제 대조군과 비교하여 아무런 영향도 관찰되지 않았다(Table III). 양성대조물질인 diazepam을 6 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 투여 후 30분부터 120분까지 ataxia를 나타냄이 관찰되었다.

체온에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여한 후

360분까지의 체온을 측정한 결과 부형제대조군과 비교할 때 최고 용량인 1000 mg/kg 투여군에서 투여 후 240분에 수컷 동물의 유의성있는(p<0.05) 체온의 증가를 관찰할 수 있었는데, 이는 360분에 다시 회복되었으며 본 증상은 시험물질 투여에 기인한 작용은 아닌 것으로 추정된다. 암컷 동물에서는 모든 시험물질 투여군에서 대조군 동물과 비교하여 유의성있는 체온의 변화는 관찰되지 않

Table III. Effects of AS6 on motor coordination in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Incidence of ataxia (number of mice)					
		0 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
V. Control	0	0	0	0	0	0	0
AS6	250	0	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0
	Diazepam	6	0	3	1	1	0

The test compound was orally administered (n=8).

Table IV. Effects of AS6 on body temperature

Drug	Dose (ml/kg)	Rectal temperature (°C) after administration						SEX; MALE
		0 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	
V. Control	0	38.3±0.3	37.8±0.4	37.8±0.5	36.9±0.1	36.8±0.6	36.7±1.2	
AS6	250	37.5±1.2	37.9±0.1	37.9±0.1	37.2±0.2	37.2±0.2	37.4±0.3	
	500	38.3±0.2	37.4±0.8	37.4±0.7	37.2±0.4	37.3±0.4	37.2±0.5	
	1000	38.3±0.2	38.3±0.3	38.1±0.4	37.8±0.3	37.7±0.4*	37.4±0.4	
Drug	Dose (ml/kg)	Rectal temperature (°C) after administration						SEX; FEMALE
		0 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	
V. Control	0	38.2±0.3	38.1±0.1	37.7±0.5	37.5±0.5	37.2±0.3	37.1±0.1	
AS6	250	38.2±0.1	38.1±0.1	38.0±0.2	37.3±0.4	37.4±0.2	37.3±0.2	
	500	38.2±0.3	38.2±0.3	38.0±0.5	37.5±0.3	37.2±0.5	37.2±0.2	
	1000	38.3±0.1	38.4±0.3	38.3±0.3	37.5±0.6	37.3±0.1	37.2±0.2	

Significant difference from control group (*; p<0.05) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was orally administered (n=4).

Table V. Effects of AS6 on hexobarbital-induced sleep time in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Sleeping time (min)	Control ratio (%)
V. Control	0	33.9± 4.9	100.0
AS6	250	37.6± 5.1	110.9
	500	37.6± 7.7	110.9
	1000	40.4±10.2	119.2
	Chlorpromazine · Cl	6	82.6±33.6**

Significant difference from control group (**; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was orally administered (n=8).

았다(Table IV).

Hexobarbital 수면시간에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 hexobarbital에 의해 유도된 수면시간은 부형제대조군과 비교하여 유의성있는 변화를 보이지 않았으며, 양성대조

Table VI. Effects of AS6 on analgesia using acetic acid and hot-plate method in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Wriths (No)	Licking time (sec)
V. Control	0	22.3±2.4	6.6±2.9
AS6	250	15.4±5.3**	8.3±3.2
	500	14.9±4.1**	7.1±1.7
	1000	13.0±5.5**	8.0±2.4
	Ketoprofen	10	14.3±2.4**
Codeine	100	—	10.8±2.0**

Significant difference from control group (**; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was orally administered (n=8).

물질인 chlorpromazine (6 mg/kg, p.o.) 투여에 의한 수면 시간의 유의성있는 증가를 관찰할 수 있었다(Table V).

진통작용: Acetic acid로 유발한 writhing 반응의 억제

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 모든 투여군에서 유의성있는

($p < 0.01$) 진통작용이 관찰되었다(Table VI). 양성대조물질인 ketoprofen을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서도 유의성있는($p < 0.01$) writhing 반응의 억제를 관찰할 수 있었다.

진통작용: Hot-plate로 유발한 licking 반응

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 진통작용이 관찰되지 않았다(Table VI). 양성대조물질인 codeine을 100 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 licking 반응이 나타나기까지의 소요시간이 유의성있게($p < 0.01$) 증가됨을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: Pentylentetrazol 유발경련에 대한 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다(Table VII). 양성대조물질인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 100%의 항경련작용을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: Strychnine 유발경련에 대한 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다(Table VII). 양성대조물질인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 100%의 항경련작용을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: Electroshock 유발경련에 대한 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다(Table VII).

3. 심장순환기계에 미치는 영향

비마취 흰쥐의 혈압 및 심박수에 대한 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 비마취 흰쥐에 경구투여했을 때 본 시험물질은 부형제대조군과 비교하여 혈압 및 심박수에 미치는 영향은 관찰되지 않았다(Table VIII).

Table VII. Effects of AS6 on convulsion induced by pentylentetrazol, strychnine and electroshock in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	pentylentetrazol			strychnine			electroshock		
		Convulsion (No)	Death (No)	Protection (%)	Convulsion (No)	Death (No)	Protection (%)	Convulsion (No)	Death (No)	Protection (%)
V. Control	0	8/8 ^{a)}	5/8	0	8/8 ^{a)}	1/8	0	8/8 ^{a)}	6/8	0
AS6	250	8/8	8/8	0	8/8	3/8	0	8/8	7/8	0
	500	8/8	7/8	0	8/8	6/8	0	8/8	6/8	0
	1000	8/8	8/8	0	7/8	2/8	12.5	8/8	4/8	0
Diazepam	10	0/8	0/8	100	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	0/8	0/8	100	8/8	0/8	0

a) is the number of positive/tested.

The test compound was orally administered (n=8).

Table VIII. Effects of AS6 on mean arterial pressure and heart rate in anesthetized rats

Drug	Dose (ml/kg)	Mean blood pressure (%)							
		0 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min	360 min
V. Control	0	0.0±0.0	1.9±2.6	1.9±2.5	-3.0±3.0	-2.8±3.5	-2.8±3.6	-2.5±3.3	-1.3±2.4
AS6	250	0.0±0.0	-1.5±2.2	-3.5±1.6	2.3±2.5	-2.4±3.1	-3.8±3.1	-2.8±1.6	0.6±2.1
	500	0.0±0.0	1.5±3.8	-0.4±2.5	1.3±2.6	1.5±1.9	3.0±2.6	-1.5±1.7	-0.1±3.3
	1000	0.0±0.0	4.2±4.8	0.8±4.8	1.1±3.7	-1.1±2.7	-3.3±1.9	-3.7±1.7	-0.2±1.6
Drug	Dose (ml/kg)	Heart rate (%)							
		0 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min	360 min
V. Control	0	0.0±0.0	0.5±1.0	-0.6±2.6	3.9±5.2	3.1±5.5	5.2±5.3	2.4±5.2	1.5±5.4
AS6	250	0.0±0.0	1.2±4.3	1.9±2.2	0.3±2.0	1.6±2.4	2.8±2.4	1.5±3.7	1.3±1.3
	500	0.0±0.0	0.6±2.5	-1.8±2.9	-4.4±3.1	-1.1±2.4	0.0±2.5	-3.7±5.1	-3.7±7.0
	1000	0.0±0.0	-4.7±4.9	-4.9±6.5	0.5±2.1	-4.6±1.4	-4.5±2.5	-0.4±1.8	-2.7±4.0

Each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=4).

Table IX. Effects of AS6 on isolated perfused heart in rats

Drugs	Log[M]	% of pretreatment				
		LVDP	HR	DP	LVEDP	CFR
V. Control	0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
AS6	-7	96.8±3.4	100.2±0.7	97.0±3.9	96.7±3.9	100.0±0.0
	-6	100.9±5.1	101.6±1.3	102.7±5.9	101.3±5.4	98.2±1.9
	-5	103.8±6.2	101.0±1.4	104.9±6.6	103.6±3.4	107.4±5.5

Each value represents the mean±S.D. (n=5).

Table X. Effects of AS6 on respiration in guineapigs

Drugs	Dose (ml/kg)	Base line (BPM)	Respiration (rate/min)				
			0	30	60	120	240
V. Control	0	115.0±2.6	0.0±0.0	-8.4±3.7	-8.6±1.7	-6.3±0.7	-4.6±1.5
AS6	250	112.5±6.8	0.0±0.0	-2.3±2.9	-6.4±4.0	-4.9±3.9	-4.3±4.4
	500	114.6±5.2	0.0±0.0	-3.9±4.6	-4.7±3.4	-7.8±6.1	-11.1±5.6
	1000	107.7±3.3	0.0±0.0	-1.5±3.9	-4.6±4.7	-2.4±5.6	0.6±3.8
Drugs	Dose (ml/kg)	Base line (BPM)	Respiration (rate/min)				
			0	30	60	120	240
V. Control	0	3.6±0.2	0.0±0.0	-15.1±8.5	-13.4±2.2	-23.6±8.4	-24.1±7.6
AS6	250	3.1±0.2	0.0±0.0	-11.8±8.8	-1.2±4.9	-9.3±5.2	-7.4±5.2
	500	3.4±0.2	0.0±0.0	-13.9±11.7	-15.7±10.8	-8.5±4.2	-14.5±6.0
	1000	3.2±0.3	0.0±0.0	-14.4±12.8	-12.8±5.0	-16.1±5.1	14.8±3.3

Each value represents the mean±S.E.M.

The test compound was administered intravenously (n=4).

적출심장에 미치는 영향

AS6을 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 농도로 적출된 심장에 처치한 후 수축기말 좌심실압(LVP, Left ventricular pressure), 이완기말 좌심실압(LVEDP, Left ventricular end diastolic pressure), 좌심실압(LVDP, left ventricular developing pressure), DP(double product), 관상혈류량(CFR, coronary flow rate), 심박동수(HR, heart rate)을 측정하여 결과 본 시험물질은 심장기능 및 관상혈관기능에 아무런 영향을 주지 않음을 알 수 있었다(Table IX).

Table XI. Effects of AS6 on intestinal transport in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Licking time (sec)
V. Control	0	60.3±8.7
AS6	250	69.0±9.1
	500	66.9±8.7
	1000	75.1±5.9**
Hyoscyamine	200	33.4±8.4**

Significant difference from control group (**; $p<0.01$) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

4. 호흡계에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 기니픽에 경구투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 호흡수 및 호흡량에 아무런 영향도 주지 않음을 알 수 있었다(Table X).

5. 소화기계에 미치는 영향

Gastrointestinal transport에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 경구투여한 후 charcoal 수송능을 측정하여 결과 1000 mg/kg군에서 유의성

Table XII. Effects of AS6 on intestinal transport in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Volume (ml)	pH	Total acidity (μEq)
V. Control	0	7.6±0.9	1.39±0.11	562.1±161.0
AS6	250	6.6±1.0	1.65±0.69	393.7± 84.7
	500	6.5±1.0	1.46±0.17	417.1±102.8
	1000	6.5±0.6	1.59±0.20	422.5± 75.0
Atropine	1	3.0±0.6*	1.50±0.20	199.9± 54.3***

Significant difference from control group (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=5).

Table XIII. Effects of AS6 on isolated guinea pig ileum

Drugs	Log [M]	Contractile responses (% of pre-drug response)			
		Alone	Acetylcholine	Histamin	BaCl ₂
		Mean	Mean	Mean	Mean
V. Control	0	0.00±0.0	148.0±19.7	136.0±29.1	202.9±49.1
AS6	-7	0.00±0.0	145.5±19.3	137.7±22.2	202.3±46.4
	-6	0.00±0.0	146.3±21.5	138.2±22.5	164.1±26.5
	-5	0.00±0.0	150.1±22.1	140.9±26.0	197.0±45.1

Each value represents the mean±S.D. (n=8).

Table XIV. Effects of AS6 on renal function in rats

Drugs	Dose (ml/kg)	pH	Urine volume (ml)	Na ⁺ (mmol/l)	Cl ⁻ (mmol/l)	K ⁺ (mmol/l)
V. Control	0	7.0±0.0	5.99±0.92	92.92±11.83	137.08±24.73	26.25±2.57
AS6	250	7.0±0.0	7.29±0.61	102.67±20.02	134.75±17.01	28.25±3.60
	500	7.0±0.0	7.13±0.15	112.42± 5.76	134.67± 1.94	17.33±2.83
	1000	7.0±0.0	6.66±0.29	108.83± 8.65	144.75±11.54	22.17±4.61
Furosemide	15	7.5±0.0	9.99±1.41**	100.33± 4.78	151.25± 5.32	22.83±6.40

Significant difference from control group (**; p<0.01) and each value represents the mean±S.D. The test compound was administered intravenously (n=5).

있는(p<0.01) charcoal 수송능 증가가 관찰되었다(Table XI). 또한 양성대조약물인 hyoscyamine (200 mg/kg p.o.)을 투여한 동물에서는 charcoal 이동율이 유의성있게 감소함을 관찰할 수 있었다.

위액분비에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 투여한 후 위액분비량, pH, 총산도를 측정했을 때, 부형제대조군과 비교하여 아무런 변화도 관찰되지 않았다(Table XII).

6. 기타 장기에 미치는 영향

기니픽의 적출 회장에 대한 작용

기니픽 적출 회장의 longitudinal muscle-myenteric plexus preparation에 대해 AS6 (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M)은 어떠한 유의성 있는 직접적인 수축, 이완작용을 나타내지 않았으며, AS6을 5분간 전처치하였을 때 acetylcholine (5 × 10⁻⁷ M), histamine (2 × 10⁻⁶ M), BaCl₂ (2 × 10⁻³ M)에 의해 유발된 수축에 대하여도 아무런 영향을 주지 않았다(Table XIII).

Urine volume 및 urinary electrolyte에 미치는 영향

AS6을 250, 500 및 1000 mg/kg으로 투여한 후 뇨 pH, 뇨량, 뇨전해질(Na⁺, K⁺, Cl⁻) 배설량을 측정한 결과 대조군 동물과 비교하여 아무런 영향도 미치지 않음을 알 수 있었다(Table XIV). 또한 양성대조군인 furosemide (15 mg/kg p.o.) 투여군에서는 뇨량이 유의성있게 증가함을 관찰할 수 있었다.

시험물질인 AS6의 일반약리작용, 즉 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 호흡계, 소화기계 및 기타 장기에 미치는 영향을 검색하기 위하여 마우스, 랫트 및 기니픽을 이용하여 0, 250, 500, 1000 mg/kg의 용량으로 각각 경구 투여하여 실험한 결과, AS6은 최고용량인 1000 mg/kg 투여군에서 charcoal 수송능의 증가 작용을 나타내었는데 이는 AS6가 고용량에서 소화관 운동에 대해 choline 작용성으로 촉진적으로 작용하는 것에서 기인하였다고 사료된다. 또한 모든 투여군에서 acetic acid 유발 통증에 대해 유의성있는 진통작용을 나타내었으나 hot-plate 유발 진통시험에서는 모든 투여군에서 아무런 영향이 나타나지 않았는데, 이러한 현상으로부터 본 시험물질에 소염 진통계의 진통작용이 있으나 중추신경계 진통작용은 없는 것으로 판단된다. 또한 본 시험물질은 일반증상 및 행동, 수면시간 연장, 자발운동량, 운동평형감각 및 항경련작용 등의 중추신경계 작용에는 영향을 미치지 않았다. 또한 혈압, 심박수, 적출심장에 기초한 심장순환계 효과 및 호흡작용, 적출 회장에 의한 평활근의 수축, 이완작용, 위액분비작용, 뇨배설작용 등에는 특이한 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

참고문헌

Bogush T.A., Bogush E.A., Durnov L.A. and Syrkin A.B. (2001), Reducing of hepatotoxicity of antineoplastic

- chemotherapy and concomitant viral infection through control of liver metabolism: from experiment to clinical practice. *Vopr Onkol.*, 47(6), 662-671.
- Bolli, R. (1991). Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 5, 249-268.
- Dunham, W.W. and Miya, T.S. (1957). A note on a simple apparatus of detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Ass.*, 10, 208-209.
- Irwin, S. In., Nodine, J.H. and Siegler, P.E. (1964). Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation. Yearbook medical publishers, *Chicago*, 36-54.
- Jie Liu, Yaping Liu, Qing Mao and Curtis D. Klassen (1994). The effects of 10 terpenoid Compounds on Experimental Liver Injury in Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 22, 34-40
- Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, 18, 412-418.
- Levi, Y., Hershfield, M.S., Fernandez-Mejia, C., Palmer, S.H., Scudicry, D., Berger, M. and Sorensen, R.U. (1988). Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: Response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *J. Pediatr.*, 113, 312
- Rang, H.P. (1964). Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 27, 256-375
- Svensson, T.H. and Thieme, G. (1969). An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. *Psychopharmacologia (Berl.)*, 14, 157-163.
- Swinyard, E.A., Brow, W.C. and Goodman, L.S. (1952). Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 106, 319-330.
- Turner I.B., Rawlins M.D., Wood P. and James O.F. (1994). Flumecinol for the treatment of pruritus associated with primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.*, 8(3), 337-342.
- Watts, J. and Maiorano, L. (1987). Effect of diltiazem upon globally ischemic rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.*, 138, 335-342.
- Woodbury, L.A. and Davenport, V.D. (1952). Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 92, 97-107
- Xu Q., Lu J., Wang R., Wu F., Cao J. and Chen X. (1997). Liver injury model induced in mice by a cellular immunologic mechanism-study for use in immunopharmacological evaluations. *Pharmacol Res.*, 35(4), 273-278