

## 응답 성분 Ursodeoxycholic Acid 유도체들의 생물활성

차배천\*

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

### Biological Activities of Ursi Fel's Component Ursodeoxycholic Acid and Its Derivatives

Bae Cheon Cha\*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 26339, Korea

**Abstract** – Ursi Fel's component ursodeoxycholic acid (UDCA), a traditional medicine, is used for the treatment of hepatic diseases. UDCA derivatives prepared by conjugation with antioxidant moiety such as maltol, sesamol, eugenol, mesitol and 3,4-(methylenedioxy)aniline were expected to have various biological activity caused by synergistic effect of UDCA. Therefore, in this study, it was conducted the study of the manufacture of the UDCA derivatives and their biological activity. As a result, UDCA derivatives showed weak antioxidant activity in TBA method *in vitro* compared to original agents. SJ-505, SJ-502 and SJ-504 showed the effect of reducing ALT, AST, sorbitol dehydrogenase and  $\gamma$ -glutamyltransferase in  $\text{CCl}_4$ -induced liver injury experiment *in vivo*, even if the effects are weaker than UDCA and silymarin of the control group.

**Keywords** – Ursodeoxycholic acid (UDCA), Maltol, Sesamol, Eugenol, Mesitol, 3,4-(Methylenedioxy)aniline, UDCA derivatives, Antioxidant, Hepatic protective effect

수명 연장에 따른 노년층의 증가로 성인병의 발생이 증가되고 있으며, 그 발병 원인 또한 점차 다양화되고 있는 추세이다. 최근에는 성인병의 발생 원인이 환경변화에 따른 환경오염, 약물남용 등의 다양한 발병 원인 외에도 활성산소 즉 자유라디칼에 의해 대부분의 질환 즉 암, 관절염, 노화, 간장 질환 등과 같은 성인병이 유발된다고 보고하고 있다.<sup>1-3)</sup> 특히 최근에는 점차 서구화된 식생활 습관과 다양한 스트레스로 인한 지방간, 간염, 간담도 질환과 같은 간 장해 질환과 함께 B형 및 C형 간염 바이러스에 의한 만성 간염과 간암은 새로운 간 질환으로 대두되고 있지만 이들 간 질환들에 대한 특효약이나 효과적인 치료법은 아직도 제시되어지고 있지 않지만,<sup>4)</sup> 현재 다양한 간 질환에 임상적으로 널리 사용되는 약물에는 silymarin, DDB(biphenyl dimethyl dicarboxylate),<sup>5)</sup> arginine, glutathione 등이 있으며 그리고 그 중의 하나로서 ursodeoxycholic acid(UDCA)가 있다.

UDCA는 인간의 담즙에서도 미량 검출되고 chenodeoxycholic acid(CDCA), deoxycholic acid(DCA) 등과 함께 동물

특히 곰의 담즙에 함유되어 있는 주요한 담즙산 중의 하나이다.<sup>6)</sup> 특히 웅담(*Ursus arctos* Linne)의 주요 활성성분으로서 알려진 UDCA는 주로 간 기능 장애와 같은 간 질환, 소화기계 및 피부질환의 치료와 예방에 효과적인 것으로 알려져 있으며,<sup>7,8)</sup> 이담작용,<sup>9)</sup> 간 혈류 증가 작용,<sup>10)</sup> 지방의 흡수 촉진 억제작용<sup>11)</sup> 및 미세담도를 통한 노폐물 배설작용<sup>12)</sup> 이 보고되어져 있다. 또한 Kawamura 등<sup>13)</sup>은 UDCA는 수침구속스트레스에 의해 유발된 궤양을 억제시키고, 위 점막의 지질과산화를 억제 한다고 보고하였으며, 그 외에 해독, 항염증 및 항스트레스 효과가 있는 것으로 보고되어져 있다.<sup>14-16)</sup> 최근에는 항암효과와<sup>17,18)</sup> 노화 연관 비만의 저하 효과<sup>19)</sup>에 대하여서도 연구되어져 있다.

본 연구는 다양한 간 질환에 효과를 나타내는 새로운 간 질환 치료 약물을 개발하기 위한 연구의 하나로 현재 다양한 간 질환에 널리 사용되고 있는 UDCA를 모핵으로 하는 다수의 유도체를 검토하고자 하였다. 지금까지 UDCA 유도체에 대한 연구로는 항암활성을 위한 *N*-sulfonyl-3,7-dioxo-5 $\beta$ -cholan-24-amides류의 UDCA 유도체 연구,<sup>20)</sup> 새로운 glucocorticoid receptor 조절제로서의 UDCA amide류의 유도체 연구,<sup>21)</sup> 전립선암에 효과를 발현하는 L-phenyl alanine

\*교신저자(E-mail): bccha@sangji.ac.kr  
(Tel): +82-33-730-0554

benzyl ester의 UDCA 유도체 연구,<sup>22)</sup> 임상적 응용을 위한 기초 연구로서 5-aminosalicylic acid, *p*-aminobenzoic acid 와 L-lysine 등을 결합시킨 UDCA 유도체 연구<sup>23)</sup> 등이 보고되어져 있다. 이들 연구들은 대부분 아민을 가진 화합물을 결합시킨 amide conjugate UDCA 유도체들과 이들의 생물 활성에 관한 연구로서 항산화 활성 성분을 결합시킨 UDCA 유도체 연구는 보고되어져 있지 않다. 이에 최근 간 질환과 같은 성인병 발생의 가장 큰 원인으로 보고되어지고 있는 활성산소를 제거하는데 관여하여 모핵인 UDCA와 함께 다양한 간 질환의 치료 효과를 상승시킬 수 있을 것으로 기대되는 항산화 활성 화합물을 선택하여 conjugate화 시켜 UDCA 유도체를 제조하고, 이들 유도체들에 대해 NMR 등의 기기분석을 이용하여 그들의 구조를 확인하고 동시에 이들 유도체들에 대해 다양한 생물 활성을 검토한 결과 다음과 같은 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**재료 및 기기** - <sup>1</sup>H-NMR spectra는 Bruker AC300 spectrometer를 이용하여 TMS를 내부표준 물질로 사용하여 측정하였으며 chemical shift는  $\delta$  unit로 나타내었다. Infrared spectra는 MB-100 FT-IR 분광광도계를 사용하여 KBr disk 법으로 측정하였고, 질량 spectra는 Finnigan Mat TSQ-700을 사용하여 측정하였고 측정 시 ion electron volt는 70 eV였다. Melting point는 Mettler FP 5 용점측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. 유도체화 시약인 maltol, sesamol, eugenol, mesitol 및 3,4-(methylenedioxy)aniline과 활성 측정 시약인 TBA 등은 Sigma-Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며 conjugate용 시약 및 시액은 모두 특급시약을 기타 용매는 특급 및 1급을 사용하였다.

**UDCA 유도체의 제조** - Fig. 1에 나타낸 것과 같이 ursodeoxycholic acid(4.00 g, 0.01 mol)를 dimethylformamide 20 ml에 녹인 후 1,1-carbonyldiimidazole(2.48 g, 0.015 mol) 및 DMAP(dimethylaminopyridine, 0.12 g, 0.001 mol)를 가하여 30 분간 교반 시킨 후 maltol(1.30 g, 0.01 mol)을 가하여 12 시간 실온에서 교반하였다. Conjugate화 생성물을 물로 희석시킨 후 EtOAc를 가하여 분배시켜 EtOAc 층을 얻고 5% HCl, 포화 중조, 포화 NaCl 순서로 세척한 후 MgSO<sub>4</sub>로 탈수한 후 농축하여 EtOAc 잔사를 얻었다(3.55 g). 얻어진 UDCA 유도체 생성물을 hexane:acetone = 1:1로 column chromatography 후 재결정하여 SJ-501(1) 3.32 g(수율 66.4%)을 얻었다. 동일한 제조 방법으로 sesamol 1.40 g(0.01 mol)을 conjugate화 시켜 얻어진 유도체 생성물을 hexane:acetone = 2:1로 column chromatography 후 재결정하여 SJ-502(2) 3.20 g(수율 62.5%)을 얻었다. 계속하여 동일한 제조 과정을 통해 eugenol 1.67 g(0.01 mol)을 conjugate화 시킨 후 얻어진

유도체 생성물을 hexane:acetone = 2:1로 column chromatography 후 재결정하여 SJ-503(3) 4.50 g(수율 83.6%)을 얻었으며, mesitol 1.39 g(0.01 mol)을 conjugate화 시켜 얻어진 유도체 생성물을 hexane:acetone = 2:1로 column chromatography 후 재결정하여 SJ-504(4) 3.80 g(수율 74.5%)을 얻었다. 아민 화합물인 3,4-(methylenedioxy)aniline도 동일한 제조법을 사용하여 1.40 g(0.01 mol)을 conjugate화 시켜 얻어진 유도체 생성물을 hexane:acetone = 2:1로 column chromatography 후 재결정하여 SJ-505(5) 3.28 g(수율 64.2%)을 얻었다.

SJ-501 (1) - White powder; m.p. 103-105°C; UV:  $\lambda_{max}$  (EtOH): 251, 206; IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 1767 (ester); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.60 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-5'), 6.34 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-6'), 3.83 (2H, m, 3 $\beta$ -H and 7 $\alpha$ -H), 2.19 (3H, s, 7'-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.63 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); EI-MS: *m/z* 500 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-125]<sup>+</sup>

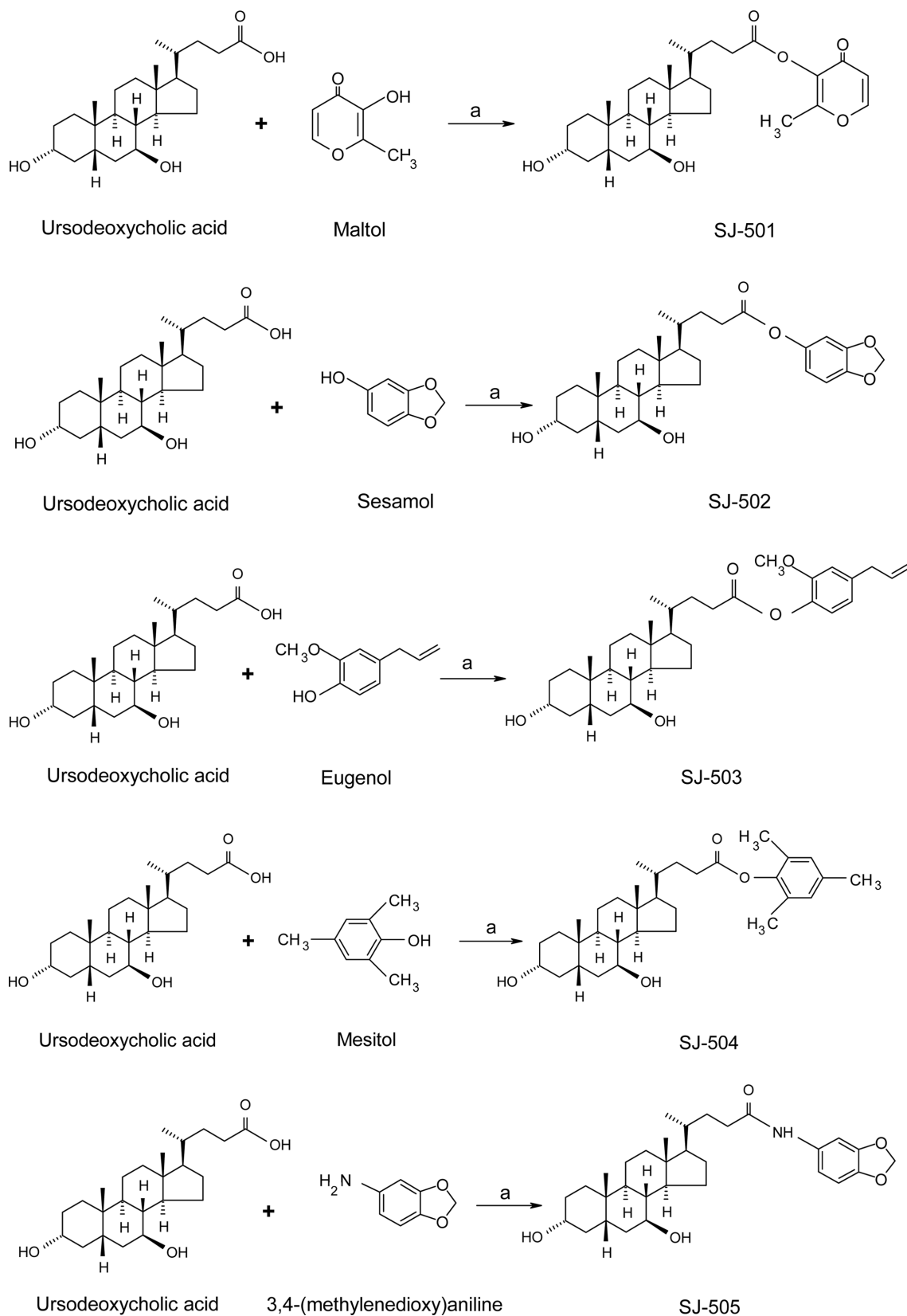
SJ-502 (2) - White powder; m.p. 78-79°C; UV:  $\lambda_{max}$  (EtOH): 287, 235; IR (KBr) $cm^{-1}$ : 1762 (ester); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.54-6.88 (3H, m, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 5.99 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 3.81 (2H, m, 3 $\beta$ -H and 7 $\alpha$ -H), 0.93 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.62 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); EI-MS: *m/z* 512 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-137]<sup>+</sup>

SJ-503 (3) - White powder; m.p. 77-78°C; UV:  $\lambda_{max}$  (EtOH): 275, 205; IR (KBr) $cm^{-1}$ : 1767 (ester); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.65-6.83 (3H, m, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 5.94 (1H, m, H-8'), 5.06 (2H, m, H-9'), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (2H, m, 3 $\beta$ -H and 7 $\alpha$ -H), 3.29 (2H, d, *J*=6.0 Hz, H-7'), 0.92 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.65 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); EI-MS: *m/z* 538 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-163]<sup>+</sup>

SJ-504 (4) - White powder; m.p. 92-94°C; UV:  $\lambda_{max}$  (EtOH): 266, 215; IR (KBr) $cm^{-1}$ : 1751 (ester); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.81 (2H, s, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 3.80 (2H, m, 3 $\beta$ -H and 7 $\alpha$ -H), 2.38 (3H, s, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.36 (3H, s, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.32 (3H, s, Ph-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.63 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); EI-MS: *m/z* 510 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-135]<sup>+</sup>

SJ-505 (5) - Light yellow powder; m.p. 148-150°C; UV:  $\lambda_{max}$  (EtOH): 296, 257; IR (KBr) $cm^{-1}$ : 1669 (amide); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.61-7.30 (3H, m, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 5.89 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 3.80 (2H, m, 3 $\beta$ -H and 7 $\alpha$ -H), 0.90 (3H, d, *J*=6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.62 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); EI-MS: *m/z* 511 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-136]<sup>+</sup>

**UDCA 유도체의 항산화 효과** - UDCA 유도체의 *in vitro* 항산화 활성은 Masugi<sup>24)</sup> 등의 방법을 약간 변형하여 다음



**Fig. 1.** Preparation of SJ-501, SJ-502, SJ-503, SJ-504 and SJ-505.

과 같이 실험하였다. 90-170 g 정도의 웅성 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 이용하여 흰쥐의 간을 적출하고, 간 내의 혈액을 생리식염수로 세척 한 후 간 중량 1 g 당 0.05 M 인산완충액(pH 7.4) 5 ml를 가하여 homogenation한 후 이액 0.3 ml와 10% DMF 생리식염수에 녹인 검액 0.1 ml를 혼합하고 37.5°C 항온조에서 3 시간 반응시킨 후 TBA 시약 3.6 ml를 가하고 98°C 수욕 상에서 1 시간 동안 가열하였다. 실온으로 식힌 후 부탄올 4 ml를 가하여 진탕하고 10분간 원심분리(rpm 3000)하여 부탄올 층을 취하여 534 nm에서 생성되는 malondialdehyde 양을 측정하였다. 가해진 TBA 시약은 thiobarbituric acid 0.3%, sodium dodecyl sulfate 0.4%가 되도록 7.5% 초산 완충액(pH 4.0)에서 사용 시에 제조하여 사용하였다.

**UDCA 유도체의 간 보호 효과** - 실험동물은 일정한 조건(온도 : 20±1°C, 습도 : 55±3%, 명암 : 12 시간 light/dark cycle)로 1 주간 적응시킨 체중 200±10 g의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐를 대조군, 간 장애 모델군 및 약물 효과 검토군으로 크게 세군으로 나눈 뒤, 각 군은 6마리로 하여 실험을 실시하였다. 투여 용량 및 방법은 약물은 100 mg/kg을 경구로 일주일 간 투여하고, 투여 마지막 날 CCl<sub>4</sub> : olive oil(1 : 4 v/v)을 100 g 당 0.2 ml 씩 복강 내에 투여하고 24 시간 절식 시킨 후 ether로 마취시킨 흰쥐의 복부를 절개하여 하대 정맥을 통하여 채혈하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30 분간 방치 후 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 Reitman-Frankel법<sup>25)</sup> 이용한 transaminase 함량 측정은 (주)아산제약으로부터 구입한 진단용 kit 시약을 사용하여 혈청 내 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), sorbitol dehydrogenase 및  $\gamma$ -glutamyltransferase 효소 활성을 측정하였다. 대조군은 동일 용량의 생리식염수와 olive oil을 투여하였다. 본 연구들은 상지대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 윤리 규정을 준수하여 실시하였다.

**통계학적 분석** - 생물학적 실험의 통계처리는 Student's t-test를 이용하였으며  $p < 0.05$  일 때만 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

**UDCA 유도체** - 다양한 성인병을 유발하는 활성 산소를 소거하여 UDCA의 간 질환 치료에 상승효과를 나타낼 것으로 기대하여 결합시킨 항산화 활성 물질은 인삼에 함유된 것으로 알려진 항산화 활성 물질인 maltol,<sup>26)</sup> 참깨로부터 얻어지는 천연 항산화 성분 sesamol<sup>27)</sup>과 정유에 함유된 항산화 활성 성분인 eugenol<sup>28)</sup>과 함께 기존 연구에서 항산화 활성이 있는 것으로 판명된 mesitol<sup>29)</sup> 및 sesamol과 구조 유사성 의해 항산화 활성이 기대되어지는 3,4-(methylenedioxy)

aniline를 결합시켜 UDCA 유도체를 제조하였다.

UDCA 유도체들인 SJ-501부터 SJ-505의 제조에 있어서 일반적인 ester화 시약인 DCC(1,3-dicyclohexylcarbodiimide)를 사용하여 conjugate화를 검토한 결과 결합 능력이 약한 페놀성 수산기와 conjugate화이므로 수율에 문제가 있었다. 따라서 본 유도체화 연구에서는 보다 강력한 ester화 시약으로 알려진 1,1-carbonyldiimidazole을 에스테르화 중간체 시약으로 사용하였고 DMAP를 촉매로 하여 SJ-501에서 SJ-505까지 5종의 UDCA 유도체를 제조하였다.

제조된 UDCA 유도체 SJ-501은 백색 분말로 <sup>1</sup>H-NMR에 있어  $\delta$  0.63, 0.88 및 0.91에서 UDCA의 methyl 유래의 피크가  $\delta$  2.19에서 maltol의 methyl 피크와 6.34 및 7.60에서 olefin 피크가 관측되고, IR에서 UDCA의 carboxylic acid 유래 1710 cm<sup>-1</sup>의 밴드<sup>30)</sup>가 1767 cm<sup>-1</sup>로 ester 유래의 밴드로 이동한 것이 확인되어짐에 따라 UDCA에 maltol이 ester 결합하였음을 추정할 수 있었고, 질량분석의 결과 500에서 M<sup>+</sup>가 확인되어짐에 의하여 그의 구조를 명확히 하였다.

SJ-502는 백색 분말로 <sup>1</sup>H-NMR에 있어  $\delta$  0.62, 0.87 및 0.93에서 UDCA의 methyl 유래의 피크가  $\delta$  5.99에서 sesamol의 methylene 피크와 6.54-6.88에서 벤젠환 수소 피크가 관측되고, IR에서 SJ-501과 유사하게 1762 cm<sup>-1</sup>에서 ester 유래의 밴드가 관측되어짐에 따라 UDCA에 sesamol이 ester 결합하였음을 추정하였고, 질량분석의 결과 512에서 M<sup>+</sup>가 확인되어짐에 의하여 그의 구조를 명확히 할 수 있었다.

SJ-503은 백색 분말로 <sup>1</sup>H-NMR에 있어  $\delta$  0.65, 0.88 및 0.92에서 UDCA의 methyl 유래의 피크가  $\delta$  3.83에서 eugenol의 methoxy 유래의 피크가 관측되고, IR에서 SJ-501과 유사하게 1767 cm<sup>-1</sup>에서 ester 유래의 밴드가 관측되어짐에 따라 UDCA에 eugenol이 ester 결합하였음을 알 수 있었고, 질량분석의 결과 538에서 M<sup>+</sup>가 확인되어짐에 의하여 구조를 명확히 하였다.

SJ-504는 백색 분말로 <sup>1</sup>H-NMR에 있어  $\delta$  0.63, 0.88 및 0.91에서 UDCA의 methyl 유래의 피크가  $\delta$  2.32, 2.36 및 2.38에서 mesitol의 phenyl methyl 유래의 피크가 관측되고, IR에서 SJ-501과 유사하게 1751 cm<sup>-1</sup>에서 ester 유래의 밴드가 관측되어짐에 따라 UDCA에 mesitol이 ester 결합하였음을 추정할 수 있었고, 질량분석의 결과 510에서 M<sup>+</sup>가 확인되어짐에 의하여 그의 구조를 명확히 할 수 있었다.

SJ-505는 미황색 분말로 <sup>1</sup>H-NMR에 있어  $\delta$  0.62, 0.87 및 0.90에서 UDCA의 methyl 유래의 피크가  $\delta$  5.89에서 3,4-(methylenedioxy)aniline의 methylene 유래의 피크가 관측되고, IR에서 UDCA의 carboxylic acid 유래 1710 cm<sup>-1</sup>의 밴드가 1669 cm<sup>-1</sup>의 amide 유래의 밴드로 이동되어짐이 확인되어짐에 따라 UDCA에 3,4-(methylenedioxy)aniline이 amide 결합하였음을 추정할 수 있었고, 질량분석의 결과 511

**Table I.** Antioxidant effects of UDCA derivatives on TBA method

Group	Inhibition ratio(%)			
	Concentration	1.6×10 <sup>-6</sup> M	1.6×10 <sup>-5</sup> M	1.6×10 <sup>-4</sup> M
UDCA		37.1	44.6	55.6
Maltol		32.8	61.5	62.7
Sesamol		41.6	56.8	62.5
Eugenol		27.7	46.3	62.5
Mesitol		44.2	50.8	55.4
3,4-(methylenedioxy)aniline		25.2	45.2	57.6
SJ-501		24.5	37.5	49.7
SJ-502		28.1	42.8	55.7
SJ-503		26.5	42.3	53.8
SJ-504		24.3	40.3	57.7
SJ-505		20.7	40.3	57.7
BHA		23.6	53.5	73.9

Inhibition(%) of MDA(malondialdehyde) generation in rat liver homogenate *in vitro* on TBA method.

에서 M<sup>+</sup>가 확인되어짐에 의하여 그의 구조를 명확히 할 수 있었다.

**UDCA 유도체의 항산화 효과** – Table I에 나타난 바와 같이 UDCA 유도체 SJ-501, 502, 503, 504 및 505의 *in vitro*에서의 항산화 활성 효과 실험에서는 유도체 5종은 1.6×10<sup>-6</sup>M의 저농도에서는 20.7% 억제율을 보인 SJ-505를 제외하고는 23.6%의 억제율을 보인 BHA보다 높은 항산화 활성을 보였으나 모핵인 UDCA와 유도체화에 사용된 항산화 활성 물질들보다는 항산화 활성이 낮은 경향을 보였다. 1.6×10<sup>-5</sup>M의 중간 농도에서는 53.5%의 억제율을 나타내는 대조군인 BHA와 모핵인 UDCA 및 항산화 활성 물질보다 낮은 항산화 활성을 보였다. 1.6×10<sup>-4</sup>M의 고농도에서는 73.9%의 억제율을 나타내는 대조군인 BHA와 항산화 활성 물질보다는 모두 낮은 항산화 활성 보이고 있으나 SJ-502, 503 및 504는 모핵인 UDCA와 유사한 항산화 활성을 보였으며 농도의 증가에 따라 항산화 활성도 증가하는 결과를 보였다. 이 실험 결과 모핵인 UDCA도 단일 성분들과 유사한 항산화 활성을 보임에 의해 UDCA도 항산화 활성이 있음을 보고한 기존의 연구 결과<sup>31)</sup>와 일치하였다. 한편 유도체화에 사용된 항산화 활성 물질들이 UDCA와 ester 결합을 하더라도 체내의 효소에 의한 ester 결합의 가수분해에 의해 분리되어져 UDCA와 함께 항산화 활성의 상승효과를 나타내리라는 기대와는 달리 UDCA 유도체들은 ester 결합에 의해 항산화 활성에 관여하는 phenolic hydroxy기가 존재하지 않음에 의해 항산화 활성이 감소되는 것으로 추정되며, 향후 *in vivo* 실험 등에 의해 체내에서 ester 결합의 개열이 일어나면 항산화 활성이 어떻게 변화하는지 등을 보다 심도 있게 연구할 필요가 있는 것으로 사료되었다.

**UDCA 유도체의 간 보호 효과** – CCl<sub>4</sub>로 간 상해를 입힌 흰쥐에 UDCA 유도체들을 경구 투여하여 혈장 AST, ALT, sorbitol dehydrogenase 및  $\gamma$ -glutamyltransferase 효소 활성을 측정하여 간 상해 회복에 미치는 UDCA 유도체들의 효과를 관찰하였다. 그 결과 Table II와 III에서의 혈액 중의 ALT 및 AST의 수치를 비교 검토한 결과 normal군의 ALT 활성이 37.4 unit/ml, AST의 활성이 61.7 unit/ml인데 반하여 CCl<sub>4</sub>로 간 상해를 입혔을 경우 89.9 unit/ml와 186.4 unit/ml

**Table II.** Effect of UDCA derivatives on the serum ALT activity in CCl<sub>4</sub>-treated rat

Group	Dose (mg/kg)	Content
		Karmen unit/ml
Normal		37.4±4.96 <sup>d</sup>
CCl <sub>4</sub>		89.9±5.67 <sup>a</sup>
UDCA	100	63.9±4.12 <sup>bc</sup>
SJ-501	100	91.3±8.56 <sup>a</sup>
SJ-502	100	67.8±4.13 <sup>b</sup>
SJ-503	100	88.7±6.23 <sup>a</sup>
SJ-504	100	70.3±5.16 <sup>b</sup>
SJ-505	100	65.2±5.10 <sup>bc</sup>
Silymarin	100	56.3±3.42 <sup>c</sup>

Rats were orally administered of compounds daily for one week and then 0.2 ml of carbon tetrachloride(1:4 CCl<sub>4</sub> : olive oil) was intraperitoneally injected once a day. Rats were decapitated 24 hr after the injection of CCl<sub>4</sub> treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different from normal ( $p<0.05$ ).

**Table III.** Effect of UDCA derivatives on the serum AST activity in CCl<sub>4</sub>-treated rat

Group	Dose (mg/kg)	Content
		Karmen unit/ml
Normal		61.7±8.34 <sup>c</sup>
CCl <sub>4</sub>		186.4±19.2 <sup>a</sup>
UDCA	100	93.2±8.17 <sup>cd</sup>
SJ-501	100	174.2±10.3 <sup>a</sup>
SJ-502	100	114.3±8.26 <sup>b,c</sup>
SJ-503	100	180.3±10.7 <sup>a</sup>
SJ-504	100	130.6±8.24 <sup>b</sup>
SJ-505	100	104.2±9.46 <sup>c</sup>
Silymarin	100	83.2±8.54 <sup>d</sup>

Rats were orally administered of compounds daily for one week and then 0.2 ml of carbon tetrachloride(1:4 CCl<sub>4</sub> : olive oil) was intraperitoneally injected once a day. Rats were decapitated 24 hr after the injection of CCl<sub>4</sub> treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different from normal (*p*<0.05).

로 약 2.4배와 3.0배 상승하여 간 장애가 발생하였음을 알 수 있었다. SJ-505를 경구 투여한 경우 ALT level이 65.2 unit/ml, AST level이 104.2 unit/ml로 모핵인 UDCA의 ALT level 63.9 unit/ml, AST level 93.2 unit/ml와 대조군으로 사용한 silymarin의 ALT level 56.3 unit/ml와는 유의성의 차이가 없는 유사한 효과를, AST level은 silymarin의 83.2 unit/ml 보다는 미약하나 CCl<sub>4</sub> 유발 간 장애군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다. SJ-502와 SJ-504도 모핵인 UDCA와는 유사한 효과를 대조군인 silymarin의 보다는 약하나 유의성 있게 ALT와 AST를 감소시키는 효과를 나타내었지만, SJ-501과 SJ-503은 전혀 효과를 보이지 못하였다. 또한 Table IV와 V의 sorbitol dehydrogenase 및  $\gamma$ -glutamyltransferase 효소 활성에 있어서도 SJ-505가 모핵인 UDCA와 대조군인 silymarin의 보다는 약하나 CCl<sub>4</sub> 유발 간 장애군에 비해 유의성 있게 가장 우수한 감소 효과를 보였고, SJ-502와 SJ-504도 유의성 있는 감소 효과를 보였지만, SJ-501과 SJ-503은 오히려 CCl<sub>4</sub> 유발 간 장애군에 비해 level 수치가 증가하는 결과를 보였다.

이상의 실험 결과 인위적으로 자유라디칼을 생성하여 간 장애를 유발하는 대표적인 독성물질인 CCl<sub>4</sub>로 유발시킨 간 장애에 대해 발생한 자유라디칼을 소거하는 효과를 지닌 항산화 활성 성분들을 결합시켜 UDCA의 간 보호 효과의 증가를 기대하였던 UDCA 유도체들은 전반적으로 모핵인 UDCA와는 유사 또는 약간 미흡한 효과를 그리고 대조군인 silymarin보다는 미흡한 효과를 나타내었지만, 유도체들 중 가장 우수한 간 보호 효과를 보인 SJ-505는 지금까지 UDCA

**Table IV.** Effect of UDCA derivatives on the serum sorbitol dehydrogenase activity in CCl<sub>4</sub>-treated rat

Group	Dose (mg/kg)	Content
		mU/ml
Normal		17.2±3.17 <sup>d</sup>
CCl <sub>4</sub>		61.4±7.23 <sup>b</sup>
UDCA	100	28.9±3.89 <sup>d</sup>
SJ-501	100	66.8±8.24 <sup>a,b</sup>
SJ-502	100	45.6±3.59 <sup>c</sup>
SJ-503	100	70.2±5.13 <sup>a</sup>
SJ-504	100	48.6±3.12 <sup>c</sup>
SJ-505	100	40.0±2.67 <sup>c</sup>
Silymarin	100	25.6±3.59 <sup>d</sup>

Rats were orally administered of compounds daily for one week and then 0.2 ml of carbon tetrachloride(1:4 CCl<sub>4</sub> : olive oil) was intraperitoneally injected once a day. Rats were decapitated 24 hr after the injection of CCl<sub>4</sub> treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different from normal (*p*<0.05).

**Table V.** Effect of UDCA derivatives on the serum  $\gamma$ -glutamyltransferase activity in CCl<sub>4</sub>-treated rat

Group	Dose (mg/kg)	Content
		mU/ml
Normal		28.9±5.16 <sup>c</sup>
CCl <sub>4</sub>		230.4±19.6 <sup>a</sup>
UDCA	100	92.4±8.97 <sup>d</sup>
SJ-501	100	250.6±20.8 <sup>a</sup>
SJ-502	100	150.6±10.6 <sup>b,c</sup>
SJ-503	100	241.7±13.7 <sup>a</sup>
SJ-504	100	158.9±11.3 <sup>b</sup>
SJ-505	100	130.2±9.46 <sup>c</sup>
Silymarin	100	80.9±8.57 <sup>d</sup>

Rats were orally administered of compounds daily for one week and then 0.2 ml of carbon tetrachloride(1:4 CCl<sub>4</sub> : olive oil) was intraperitoneally injected once a day. Rats were decapitated 24 hr after the injection of CCl<sub>4</sub> treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different from normal (*p*<0.05).

의 유도체화 연구들이 amide형의 결합 형태로 유도체를 합성하여 다양한 생물활성을 발휘한 연구 결과들과<sup>20-23)</sup> 유사한 amide 결합 형태라는 것에 주목할 만하며, 산화적 스트레스와 염증 매개체 조절에 의해 간독성을 개선시키는 효과가 있는 것으로 보고된 sesamol<sup>32)</sup>을 결합시킨 SJ-502와 SJ-504도 미약하지만 간 보호 효과가 확인되었으나, 우수한

항산화 활성에 의해 UDCA의 간 보호 효과의 상승 작용을 기대하였던 SJ-501과 SJ-503은 전혀 간 보호 효과를 나타내지 못하였는데 이는 항산화 효과 실험에서와 같이 UDCA 유도체들의 생체 내에서의 ester 결합의 개열 속도에 의해 효과의 차이가 발생한 것으로 추정됨으로서 이들 유도체들의 구조를 바탕으로 structure-activity relationship(구조-활성 상관관계) 연구에 의한 약효 증대연구가 필요할 것으로 사료되었다.

## 결 론

UDCA의 간 보호 효과의 증가를 위해 항산화 활성 성분을 conjugate화 시킨 UDCA 유도체 5종(SJ-510, 502, 503, 504 및 505)을 제조하고 그들의 항산화 활성과 간 보호 효과를 확인한 결과, conjugate화에 의해 항산화 활성 moiety의 소실로 항산화 활성은 단일 성분에 비해 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 간 보호 효과에 있어서는 SJ-505, SJ-502 및 SJ-504는 UDCA와 ALT 및 AST level에서는 유사한 효과를 그리고 대조군인 silymarin의 효과 보다는 전반적으로 약하나 CCl<sub>4</sub> 유발 간 상해군에 비해 유의성 있게 ALT, AST, sorbitol dehydrogenase 및  $\gamma$ -glutamyltransferase를 감소시키는 효과를 나타내었지만 SJ-501과 SJ-503은 전혀 효과를 보이지 못하였다. 특히 amide 결합 유도체인 SJ-505는 UDCA와 대조군인 silymarin과 ALT level은 유사 그리고 AST level에서는 UDCA와는 유사하고 대조군인 silymarin보다는 약하고, sorbitol dehydrogenase 및  $\gamma$ -glutamyltransferase에서는 UDCA와 대조군인 silymarin보다 약하나 유도체 중 가장 우수한 효과를 보였는데 이는 amide 결합이 ester 결합에 비해 체내 효소에 의한 결합 개열 속도가 빨라서 유도체 중 가장 우수한 효과를 발현한 것으로 추정되었다.

## 인용문헌

- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* **42**: 569-605.
- Ceratti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet*. **344**: 862-863.
- Schwarz, K. B. (1996) Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 641-649.
- Moon, J. O. and Park, J. H. (1997) Screening of the hepatoprotective drugs from folk medicines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**: 156-161.
- Kang, J. K., Jung, E. Y. and Nam, S. Y. (2001) Single dose oral toxicity study of a new hepatotherapeutic agent GODEX (HEPADIF-S) in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **9**: 140-142.
- Yamaguchi, S., Qian, Z. Z. and Nohara, T. (1998) Bile acids of Fel Ursi. *Chem. Pharm. Bull.* **46**: 1653-1655.
- Zhang, H. Y., Chen, Y. D. and Zhuang, G. L. (1996) Pharmacological action of bear bile extract in mice. *Chinese Trad. Herb. Drugs* **27**: 10-12.
- Jin, Z. G., Zhang, T. Y., Liang, W. B. and Liang, C. G. (1997) Effects of bear bile injection on blood lipid. *Chinese Trad. Herb. Drugs* **28**: 4-5.
- Kitami, K. and Kanai, S. (1982) Effect of ursodeoxycholic acid on the bile flow in the rat. *Life Sci.* **31**: 1973-1985.
- Ward, A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M. and Avery, G. S. (1984) Ursodeoxycholic acid: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **27**: 95-131.
- Lanzini, A. and Northfield, T. C. (1988) Effect of ursodeoxycholic acid on biliary lipid coupling and on cholesterol absorption during fasting and eating in subjects with cholesterol gallstones. *Gastroenterology* **95**: 408-416.
- Roslyn, J. J., Abedin, M. Z., Strichartz, S. D., Abdou, M. S. and Palant, C. E. (1989) Regulation of gallbladder ion transport: role of bile lipids. *Surgery* **105**: 207-212.
- Kawamura, T., Koizume, F. and Ishimori, A. (1989) Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **86**: 2373-2378.
- Chen, X., Xu, J., Zhang, C., Yu, T., Wang, H., Zhao, M., Duan, Z. H., Zhang, Y., Xu, J. M. and Xu, D. X. (2011) The protective effects of ursodeoxycholic acid on isoniazid plus rifampicin induced liver injury in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **659**: 53-60.
- Park, S. Y., Woo, J. S., Jung, Y. J., Won, T. J., Huh, Y. J., Lee, C. W., Kim, H. S., Joo, S. S., Lee, D. I. and Hwang, K. W. (2008) Anti-inflammatory effects of UDCA on splenocytes exposed to PMA/ ionomycin. *Biomol. Ther.* **16**: 126-131.
- Cho, T. S., Lee, J. C., Cho, S. I. and Lee, S. M. (1998) A study on anti-stress activities of cholic acid derivatives. *J. Appl. Pharmacol.* **6**: 232-241.
- Tschirme, A., Haehling, S. von., Palus, S., Doehner, W., Anker, S. D. and Springer, J. (2012) Ursodeoxycholic acid treatment in a rat model of cancer cachexia. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**: 31-36.
- Liu, H., Xu, H. W., Zhang, Y. Z., Huang, Y., Han, G. Q., Liang, T. J., Wei, L. L., Qin, C. Y. and Qin, C. K. (2015) Ursodeoxycholic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma xenografts in mice. *World J. Gastroenterol.* **21**: 10367-10374.
- Oh, A. R., Bae, J. S., Lee, J. H., Shin, E. J., Oh, B. C., Park, S. C. and Cha, J. Y. (2016) Ursodeoxycholic acid decreases age-related adiposity and inflammation in mice. *BMB Rep.* **49**: 105-110.
- Ren, J., Wang, Y., Wang, J., Lin, J., Wei, K. and Huang, R. (2013) Synthesis and antitumor activity of *N*-sulfonyl-3,7-dioxo-5 $\beta$ -cholan-24-amides, ursodeoxycholic acid deriva-

- tives. *Steroids* **78**: 53-58.
21. Sharma, R., Prichard, D., Majer, F., Byne, A. M., Kelleher, D., Long, A. and Gilmer, J. F. (2011) Ursodeoxycholic acid amides as novel glucocorticoid receptor modulators. *J. Med. Chem.* **54**: 122-130.
  22. Choi, Y. H., Im, E. O., Suh, H. S., Jin, Y. S., Yoo, Y. H. and Kim, N. D. (2003) Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells. *Cancer Lett.* **199**: 157-167.
  23. Konishi, T. (2000) Basic studies on the utility of ursodeoxycholic acid derivatives for clinical medicine. *Yakugaku Zasshi* **120**: 1-15.
  24. Masugi, F. and Nakamura, T. (1977) Measurement of thio-barbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamin* **51**: 21-29.
  25. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) Estimation of glutamate oxaloacetate transaminase in the serum of liver disease patients. *Am. J. Clin. Path.* **28**: 56-63.
  26. Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N. (1985) Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng(V) : The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem. J.* **4**: 337-340.
  27. Kanimozhi, P. and Prasad, N. R. (2009) Antioxidant potential of sesamol and its role on radiation-induced DNA damage in whole-body irradiated Swiss albino mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **28**: 192-197.
  28. Nam, H. and Kim, M. M. (2013) Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **55**: 106-112.
  29. Cha, B. C. (2000) Synthesis of mefenamic acid derivatives and antioxidative and anticoagulant activities. *J. Appl. Pharmacol.* **8**: 349-353.
  30. Ma, X. and Cao, X. (2014) Separation of ursodeoxycholic acid by silylation crystallization. *Bioresour. Bioprocess.* **1**: 5-12.
  31. Lapenna, D., Ciofani, G., Festi, D., Neri, M., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A. and Cucurullo, F. (2002) Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem. Pharmacol.* **64**: 1661-1667.
  32. Jnaneshwari, S., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Sundaram, M. S., Santhosh, M. S., Sunitha, K., Shankar, R. L., Kemparaju, K. and Girish, K. S. (2014) Sesamol ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress and inflammatory mediators. *Anticancer Agents Med. Chem.* **14**: 975-983.

(2017. 2. 6 접수; 2017. 3. 3 심사; 2017. 3. 14 게재확정)