

Daidzein의 抗炎作用과 그 作用機轉에 관한 研究(I)

許仁會·李相俊·金滢春*

中央大學校 藥學大學·*江原大學校 藥學科

(Received April 6, 1987)

Studies on the anti-inflammatory activity and its mechanism of daidzein

In Hoi Huh, Sang Joon Lee and Hyung Chun Kim*

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 151 and Department of
Pharmacy, *Kang Weon National University, Chun Cheon 200, Korea

Abstract—Daidzein and its methyl derivatives were synthesized and their anti-inflammatory activities were examined. Daidzein suppressed the carrageenin-induced edema, but its methyl derivatives showed decrease or abolition of the anti-inflammatory effect. Daidzein did not significantly suppress the complete Freund's adjuvant-induced arthritis, and the mixed phlogistics (histamine+serotonin)—induced edema. Daidzein inhibited the leukocyte emigration and protein exudation when it was administered into the CMC pouch at low doses (5, 25mg/pouch). Daidzein significantly suppressed the cotton-pellet granuloma formation.

Flavonoids는 coumarin과 유사한 benzo- γ -pyrone 誘導體로 여러 식물에 存在하고 있으며, 약 500여종이 알려져 있다. 최근 flavonoids를 함유한 제제가 生理活性成分으로서 인간의 질병을 치료하기 위하여 사용되어 오고 있다.¹⁾

Flavonoids의 生理活性을 보면 polymers²⁾ 및 heavy metal ions³⁾과 강한 親和性을 나타내며, free radical scavenger^{4~7)}로서도 작용한다.

Flavonoids는 炎症과 관련하여 hyaluronidase, cyclic-AMP phosphodiesterase 및 hydroxylase 등의 酵素活性을 억제하며¹⁾, 炎症機轉과 관련이 깊은 Cu⁺⁺에 대한 강한 親和性을 갖고 있다.³⁾

이 외에 mast cell의 脫顆粒을 억제하며^{8~9)} lipoxygenase 活性의 억제¹⁰⁾, leukocyte function¹¹⁾에의 작용, 血小板凝集活性¹²⁾의 억제 등이 抗炎活性과 관련이 된다고 알려졌다.

또 flavonoids는 炎症으로 인한 局所痛症 및 發熱을 消失시키는데, 이 作用은 phospholipase A₂와 PG cyclooxygenase의 억제에 의한 PGs 합성억제로 해석된다.¹⁾

Egan¹³⁾ 등은 페놀性 化合物이 free radical scavenger로서 작용하므로써 抗炎作用을 갖는다고 보고하였다.

이에 비해 isoflavonoids는 구조적으로 flavonoids와 관련이 되나 제배열된 C₁₅골격을 가지고, flavonoids와는 달리 구별되며, 3-phenylchroman의 유도체로서 간주된다.¹⁴⁾

Isoflavonoids중 가장 많이 존재하는 것이 isoflavones이며, 현재 160여종의 isoflavone aglycones이 알려져 있다.¹⁴⁾ Isoflavones의 알려진 生理作用으로는 estrogenic effect가 보고되어 있으며, 또한 fungicidal effect도 알려져 있다.¹⁵⁾ isoflavones중 비교적 단순한 구조를 가진 것으로는 daidzein이 있다.

Daidzein은 칩 뿌리의 주성분이며, Shibata¹⁶⁾와 Nakamoto¹⁷⁾ 등에 의해 antispasmodic activity가 보고 되었고, 또한 estrogenic effect,^{18~19)} soya-bean lipoxygenase 억제, 抗溶血作用 등도 보고되어 있다.²⁰⁾

減壓 酸素低下狀態에서 致死에 대한 抵抗性을 관찰한 결과 有意性이 있다고 보고되었고²¹⁾, 최근 Jha²²⁾ 등도 in vitro에서 daidzein의 microsomal lipid peroxidation 억제 작용을 보고하였다.

以上과 같이 daidzein의 藥理作用이 대부분 밝혀졌으나, daidzein의 抗炎效果에 대한 것은 보고된 바 없으며, 한편 lipid peroxidation 억제

및 抗酸化活性 등으로 보아 抗炎症作用 등이 기대되므로 抗炎症作用을 관찰한 결과 有意性있는 결과를 얻었기에 보고코자 한다.

實驗 方法

器機—UV-spectrophotometer는 Hitachi model 200-20을 IR-spectrophotometer는 Perkin-Elmer 710B를 사용하였으며, NMR spectrophotometer는 Bruker 80MHz를 Elemental Analyzer는 Perkin-Elmer를 사용하였다.

試藥 및 試料—Carrageenin은 Sigma type IV를, complete Freund's adjuvant는 Difco社 것을 사용하였고, 그 외의 시약은 一級試藥을 사용하였다.

Rat 및 Mouse에 經口投與—Daidzein, 4'-methyl daidzein, dimethyl daidzein을 각각 일정량 취하여 유방에 넣고 tween 80소량 및 蒸溜水를 가해 유방으로 갈아 완전히 분쇄한 후 동량의 1% CMC 용액을 가해 全質이 均等하게 만들어 투여량에 관계없이 5ml/kg으로 하여 투여하였다.

Rat에 腹腔內投與—Daidzein을 0.5% CMC 생리식염수액에 현탁하여 투여량에 관계없이 2.5 ml/kg으로 하여 腹腔內 투여하였다.

CMC pouch內 投與—Daidzein을 2% CMC용액에 투여량만큼 2% CMC용액에 현탁하여 5ml/Rat씩 air pouch로 注入하였다.

Arachidonic acid 및 carrageenin 混合起炎劑調劑—2% carrageenin용액을 하루전에 제조하여 충분히 均質化시키고, 따라서 arachidonic acid 200mg을 ethanol 10ml에 용해한 후 0.2% Na₂CO₃용액을 가해 100ml로 하였다. 2% carrageenin용액과 同量의 arachidonic acid 용액을 합해 起炎劑로 하여, 0.1ml/hind paw 注入하였다.

Histamine 및 Serotonin 混合起炎劑調劑—생리식염수로 histamine 2HCl 30μg/5μl 용액으로 만들고, 따라서 생리식염수액으로 serotonin creatinin sulfate 0.3μg/5μl 용액을 만들어 두 용액을 同量합하여 mouse에 10μl/hind paw를 注入하였다.

실험동물—實驗用 rat(Sprague-Dawley系)를 一定한 實驗室에서 同一한 條件으로 2週이상 飼育시킨 것중 100~200g의 雄性을 한군에 6마리씩 使用하였으며 Carrageenin pouch法에 使用한 동물은 體重을 100~130g으로 제한하였고, Complete Freund's adjuvant 浮腫實驗에는 120~150g의 female rat를 사용하였다, 또한 mouse는 20~30g의 ddy系 雄性을 한군에 6마리씩 使用하였다.

Daidzein 및 그 Methyl誘導體의 合成 및 確認—Daidzein과 그 methyl誘導體를 Shao²¹⁾ 등의 方法에 의해 合成하였다.

合成한 daidzein 및 그 誘導體에 대해서 IR스펙트럼, H¹-NMR스펙트럼, 원소분석으로 同定하였다.

Carrageenin 誘發浮腫에 대한 抗炎症作用—Winter²³⁾ 등의 方法에 따라 24시간 絶食시킨 150~200g의 雄性 rat에 피검약물 투여 1時間後 기염제로 1% carrageenin 生理食鹽液 0.1ml를 rat의 right hind paw에 피하주사하고, 주사후 每時間마다 浮腫을 일으킨 hind paw의 malleolus latera까지의 volume을 測定하여 부종율과 부종억제율을 산출하였다.

Complete Freund's adjuvant誘發浮腫 抑制作用²⁴⁾—체중 120~150g의 female rat에 complete Freund's adjuvant를 0.1ml씩 right hind paw피하에 주사하여 adjuvant 관절염을 일으켰다. 被檢藥物은 adjuvant주사 3.5時間 前에 1回 및 주사 다음날부터 1日 1回 3주간 투여하였고 관절염 증상은 hind paw의 volume을 測定하여 부종율과 부종억제율을 산출하였다. 또 adjuvant 주사후 21일째 rat으로부터 血液을 採取하여 serum中 ceruloplasmin 농도²⁵⁾를 測定하였다.

Histamine 및 Serotonin誘發浮腫 抑制作用—원칙적으로 Oyanagui方法²⁶⁾에 따랐으며 25~30g의 mouse에 serotonin creatinin sulfate와 histamine 2HCl을 混合起炎劑로 사용하였다. 기염제는 serotonin creatinin sulfate 0.3μg + histamine 2HCl 30μg/10μl/hind paw로 생리식염수액에 용해하여 right paw에 피하주사 하였고 기염제 주사후 12分, 30分, 1, 2, 3, 4시간 후에 양쪽 발의 두께를 dial thickness gauge로 測定하여 부종율 및

抑制率을 산출하였다. 被檢藥物은 기염제 주사 30分前에 經口 및 복강내로 투여하였다.

Carrageenin 및 Arachidonic acid 混合起炎劑에 의한 부종억제작용—Masumoto²⁷⁾ 등의 方法에 따라 체중 150~200g의 雄性 rat를 24시간 絶食시키고 被檢藥物을 經口投與한 후 1時間에 1,000 μ g/ml의 arachidonic acid를 함유하는 1% carrageenin溶液을 0.1ml씩 right hind paw의 피하에 주사하여 注射後 每 時間마다 부종을 일으킨 hind paw의 volume을 測定하여 부종율과 억제율을 算出하였다.

Rat CMC pouch法에 의한 白血球遊走 및 蛋白質 浸出作用

實驗方法—체중 120~150g의 雄性 rat의 背部皮下에 공기(air) 5cc를 注入하여 낭(air sac)을 만들고 24시간후 공기 낭속에 2% CMC 生理食鹽液 5ml를 주입하였다. CMC 주입 6시간 후에 pouch내에서 삼출액을 1.0ml씩 採取하여 白血球數 및 단백질량을 測定하였다. 또 Nakagawa²⁸⁾ 등의 方法을 수정하여 CMC 주입 20시간 후에 血液을 取하여 serum中 ceruloplasmin을 測定하였다.

단백질 定量²⁹⁾—삼출액 0.2ml를 取해 test tube에 넣고 ethanol 4ml를 넣어 단백질 및 CMC를 침전시키고 3,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 따라 버리고, 다시 ethanol 4ml를 가해 침전물을 세정하여 원심분리한 다음 ethanol을 따라 버리고 H₂O적량 및 0.1N-NaOH용액 0.2ml씩을 加해 용해한 후 bovine serum albumin을 standard로 使用하는 Lowry法에 의하여 단백질을 定量하였다.

白血球數 測定—현미경을 이용하여 mm³당 백혈구數를 測定하였다.

Cotton pellet 肉芽腫形成抑制作用³⁰⁾—체중 150~200g의 雄性 rat에 pentobarbital sodium (40mg/kg, I.P.)을 투여하여 마취를 시킨 다음 背部皮下에 35 \pm 1mg의 滅菌(121°C, 20分 Autoclave) cotton ball을 左右로 하나씩 삽입하고 수술 직후부터 被檢藥物을 1日 1回 5日間 투여하고 마지막날 肉芽腫을 떼내어 重量이 一定하게 될 때까지 60°C에서 건조한다. 건조 중량으

로부터 35mg을 빼준 것을 肉芽腫 重量으로 하였다.

結果 및 考察

Daidzein 및 그 methyl 誘導體의 確認—Daidzein 및 그 methyl 誘導體의 분석학적 특성치를 보면 Table I과 같다.

Daidzein 이 carrageenin 誘發浮腫에 미치는 效果—Daidzein 100mg 및 200mg/kg을 經口投與한 結果 daidzein 100mg/kg은 기염제 주사후 3 및 4시간에만 有意性있는 浮腫抑制效果를 나타냈으며, 200mg/kg에서는 aspirin 200mg/kg 經口投與時보다는 약간 效果가 덜하나 기염제 주사후 2시간부터 有意性있는 浮腫抑制效果를 나타냈다. Daidzein 200mg/kg 투여군에서는 6時間후에 최고부종억제율 47.1%를 관찰하였다. 每 時間마다의 부종율 및 억제율은 Table II와 같다.

위 結果로부터 daidzein 200mg/kg 투여군에서 有意性있는 부종억제효과를 관찰하였다. Hirafuji³¹⁾ 등에 의하면 케놀성 화합물의 hydroxyl基가 PGs 생합성에 관여되므로서 항염효과를 나타낸다고 보고하여, daidzein의 부종억제효과가 구조中 hydroxyl基에 의해 관여되는지를 檢討하기 위하여 두개의 hydroxyl基中 하나 및 두개를 methylation시킨 化合物로 carrageenin 유발부종억제 實驗을 行하였다.

Daidzein 및 그 methyl 誘導體의 carrageenin 誘發浮腫抑制效果—Daidzein 200mg/kg 經口投與로 有意性있는 浮腫억제효과를 관찰하였으므로 4'-methyl daidzein 및 dimethyl daidzein의 경우도 200mg/kg 經口投與로 하여 carrageenin 유발부종억제효과를 관찰한 結果는 Table III와 같다.

4'-methyl daidzein의 경우 carrageenin 주사 1시간 및 2시간후에 有意性은 없으나 抑制效果를 나타냈으나 3시간후 부터는 浮腫抑制效果가 전혀 없음을 관찰하였다. 또한 dimethyl daidzein의 경우도 carrageenin 주사 1시간 후에는 有意性은 없으나 抑制效果를 나타냈고 2시간 후부터는 오

Table I—Analytical and physical data of daidzein and its methyl derivatives.

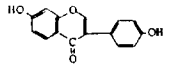


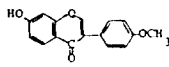


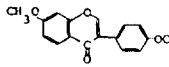


Compounds	M.P. (°C)	yield (%)	I R' (KBr) (cm ⁻¹)	H'-N M R (DMSO) (ppm)	Elemental analysis, Wt. %					
					calculated			observed		
					C	H	O	C	H	O
	320	22.5	1640ν, C=O 3000-3400ν, -OH	6.7-7 (m, 4H, phenyl) 7.3-8 (m, 3H,  8.3 (s, 1H,  9.6 (s, 1H, 4'-hydroxy) 10.6 (s, 1H, 7-hydroxy)	70.86	3.96	25.17	70.84	4.14	25.02
	250-254	34.4	1620ν, C=O 3250-3500ν, -OH	3.7 (s, 3H, -OCH ₃) 6.7-7 (m, 4H, phenyl) 7.3-8 (m, 3H,  8.3 (4's, 1H, 4'  10.6 (s, 1H, 7-hydroxy)	71.64	4.51	23.85	71.79	4.53	23.68
	156-159	09.0	1510ν, C=C aromatic 1640ν, C=O	3.7-3.9 (d, 6H, -OCH ₃ , -OCH ₃) 6.7-7 (m, 4H, phenyl) 7.3-8 (m, 3H,  8.3 (s, 1H, 	72.33	5.00	22.67	72.63	5.08	22.29

Table II—Anti-inflammatory activity of daidzein on carrageenin induced edema of the rat paw.

Drugs	Dose mg/kg, p.o.	No. of Animals	Time (hours)					
			1	2	3	4	5	6
Control		6	53.8±6.3 ⁺	72.6±8.6	85.1±7.8	85.6±8.2	84.8±8.3	86.9±10.0
Aspirin	200	6	32.8±5.9* (39.0) [†]	32.1±6.1** (55.8)	36.8±6.4** (56.8)	35.2±6.6** (58.9)	36.6±5.0** (56.8)	37.5±5.4** (56.8)
Daidzein	100	6	45.9±5.1 (14.7)	62.4±8.4 (14.0)	66.3±6.7 (22.1)	59.3±5.1* (30.7)	62.9±4.9* (25.8)	60.1±7.9 (30.8)
Daidzein	200	6	37.8±7.0 (29.7)	44.0±8.1* (39.4)	51.1±6.9** (40.0)	48.8±7.0** (43.0)	46.3±6.0** (45.4)	46.0±5.7** (47.1)

+ : mean values±S.E. † : percent of inhibition. Significantly deviated from control; *p<0.05, **<0.01

Table III—Anti-inflammatory activity of daidzein and its methyl derivatives on carrageenin induced edema of the rat paw.

Drugs	Dose mg/kg p.o.	No. of Animals	Time (hours)				
			1	2	3	4	5
Control		6	27.6±2.5 ⁺	31.7±1.9	36.5±5.7	47.8±6.1	39.3±4.3
Daidzein	200	6	16.2±5.5* (41.3) [†]	16.5±4.5* (48.3)	19.7±2.9* (46.0)	26.9±6.4 (43.7)	21.7±5.5 (44.8)
4'-Methyldaidzein	200	6	23.0±2.9 (16.7)	24.7±5.5 (22.1)	37.9±10.1 —	44.7±10.1 (6.5)	41.9±13.0 —
Dimethyldaidzein	200	6	21.0±1.0 (23.9)	40.1±4.2 —	50.4±9.5 —	55.3±13.7 —	49.4±6.8 —

+ : mean values±S.E. † : percent of inhibition. Significantly deviated from control; *p<0.05

Table IV—Anti-inflammatory activity of daidzein on complete freund's adjuvant induced edema of the rat paw.

Drugs	Dose mg/kg p.o.	No. of Animals	5hrs	1day	2	3	5	7	9
Control		6	45.2±4.1 ⁺	78.0±6.4	70.4±3.4	109.5±9.1	104.4±13.4	67.1±15.2	59.8±16.0
Naproxen	80	6	38.2±0.9	56.1±5.8*	54.6±9.5	61.6±7.3**	58.4±11.1*	63.5±9.8	56.9±10.7
Daidzein	100	6	55.3±6.0	89.3±8.2	85.6±8.6	104.0±4.1	97.4±6.0	65.7±5.5	60.5±7.4
Daidzein	200	6	55.3±3.4	71.4±6.5	69.2±4.5	94.5±7.0	91.7±8.4	52.0±3.8	53.7±4.0
Normal Control		6	—	—	—	—	—	0.59%	—

Drugs	Dose mg/kg p.o.	No. of Animals	11	13	15	17	19	21	Ceruloplasmin (u/ml)
Control		6	53.3±12.5	52.6±7.2	45.3±6.2	38.7±5.9	42.9±6.2	43.5±4.0	0.315±0.034*
Naproxen	80	6	47.2±10.1	43.5±6.7	53.5±3.6	52.3±2.7	52.4±2.8	49.9±6.4	0.171±0.068
Daidzein	100	6	51.7±7.3	49.5±6.4	48.4±5.1	40.8±4.6	41.0±5.0	36.9±4.1	0.252±0.040
Daidzein	200	6	49.0±8.5	42.7±6.5	38.4±4.0	35.5±4.7	44.0±6.0	43.8±4.6	0.189±0.030*
Normal Control		6	—	—	1.93%	—	—	4.76%	0.196±0.027

+ : mean values±S.E.

Significantly deviated from control: *p<0.05, **p<0.01

Significantly deviated from normal control: *p<0.05

히러 有意性은 없으나 약간의 促進效果를 나타냈다. 이상의 結果로부터 부종억제 효과는 hydroxyl基가 重要하다는 것을 알수 있으며 daidzein의 hydroxyl基는 특히 phase II에 관련이 됨을 알수 있었다.

Daidzein의 complete Freund's adjuvant 起炎에 미치는 效果—Complete Freund's adjuvant 關節炎은 人間の 關節염과 유사한 症狀을 나타내며 慢性炎症의 代表的인 實驗方法이다.

Table IV에서 보는 바와 같이 daidzein 100mg 및 200mg/kg 그리고 naproxen 80mg/kg을 1日 1回 21日間 經口投與한 結果 naproxen 80mg/kg 投與群에서는 投與後 1, 3, 5日 後에는 浮腫이 有意性있게 抑制되었으며 7日 後부터 13日까지는 有意性은 없었으나 약간의 抑制를 나타냈다. 그러나 15日 이후는 有意性은 없었으나 약간 促進되는 現狀을 나타냈다. 또한 daidzein 100mg 및 200mg/kg 投與群에서는 有意性은 없었으나 전반적으로 약간의 抑制效果를 나타냈으며 投與 마지막날 rat로 부터 血液을 채취하여 serum중 炎症과의 관련이 많이 보고된³²⁻³³⁾ ceruloplasmin을 측정하였다. Ceruloplasmin直는 炎症誘發時

血中 농도가 증가되며 抗炎症劑의 투여로 염증의 소실과 용량의존적으로 감소됨이 보고되어 있다. 또한 血中 ceruloplasmin은 Fe대사와 밀접한 관련을 가지고 있다. Complete Freund's adjuvant誘發浮腫時 血中 ceruloplasmin直는 정상 대조군에 비해 有意性있게 相乘했으며 naproxen 投與群에서는 0.171μ/ml로 起炎대조군 0.315μ/ml보다 약 45.5%抑制 效果를 나타냈으나 유의성은 없었고 daidzein 100mg/kg 投與群에서도 유의성은 없으나 起炎대조군보다 20% 억제 현상을 관찰하였다. Daidzein 200mg/kg 투여군에서는 0.189μ/ml로 起炎 대조군보다 40% 抑制 되었으며 이 직는 정상 대조군 0.196μ/ml와 거의 같았다. 이 결과로부터 내인성 항염증 효과가 있음이 시사된다.

Daidzein의 histamine 및 serotonin 混合起 炎劑誘發 浮腫에 미치는 效果—生體內 amines이 炎症 초기에 관련이 되며 in vivo에서의 實驗方法이 많이 보고되어 있어 이 炎症 媒介物을 胃 部에서 주입후 이들로 인해 생긴 炎症 反應에 대한 daidzein의 影響을 검토한 結果는 Table V와 같다.

Table V—Anti-inflammatory activity of daidzein on histamine-serotonin induced edema of the mice paw.

Drugs	Dose mg/kg	Route of Admi.	No. of Animals	Time(hours)					
				0.2	0.5	1	2	3	4
Control			6	41.5±4.2 ⁺	48.9±2.4	36.4±1.6	28.1±4.0	21.0±3.1	15.7±3.1
Daidzein	100	P.O.	6	44.3±3.1 (---) [†]	52.3±2.2 (—)	37.7±3.5 (—)	23.6±2.9 (16.0)	19.7±3.3 (6.2)	13.3±1.9 (15.3)
Daidzein	200	P.O.	6	41.6±1.5 (—)	46.3±2.9 (5.3)	33.6±2.2 (7.7)	20.5±2.7 (27.0)	20.9±4.0 (—)	12.6±1.0 (19.7)
Daidzein	50	I.P.	6	31.6±3.8 (23.9)	43.1±6.2 (11.9)	36.7±2.6 (—)	24.4±1.0 (13.2)	18.6±4.0 (11.4)	10.1±0.4 (35.7)
Daidzein	100	I.P.	6	31.0±4.7 (25.3)	39.1±4.6 (20.0)	34.1±2.9 (6.3)	25.4±2.9 (9.6)	18.1±2.8 (13.8)	8.3±1.4 (47.1)
Daidzein	200	I.P.	6	36.2±2.2 (13.3)	47.6±2.3 (—)	37.9±2.7 (—)	26.8±3.1 (4.6)	17.2±2.2 (18.1)	10.2±1.1 (45.2)
Chlorpheniramine maleate	25	P.O.	6	41.8±3.3 (—)	50.3±2.1 (—)	30.0±2.2 (17.6)	16.0±2.2 (43.1)	12.1±2.1 (42.4)	6.3±2.1 (59.9)
Hydrocortisone	5	P.O.	6	45.7±3.1 (—)	50.1±2.7 (—)	34.4±2.2 (5.5)	23.5±2.0 (16.4)	10.6±1.9 (49.5)	8.1±2.2 (48.4)

+ : mean values±S.E.

† : percent of inhibition

Significantly deviated from control: *p<0.05, **p<0.01

위 結果로 부터 daidzein 100mg 및 200mg/kg 經口投與群에서는 초기에는 억제효과를 나타내지 않았으나 100mg/kg의 경우는 2시간 후부터 유의성은 없으나 약간의 억제 효과를 나타냈고, 200mg/kg도 2시간 후에 억제 효과를 나타냈다. 또한 daidzein 50, 100, 200mg/kg 腹腔內 投與群에서는 起炎劑 주사후 12分 後부터 억제를 나타내다가 점점 감소되며 다시 2시간 이후에 억제 효과를 나타냈다. 이 結果로 부터 腹腔內 投與에 의한 浮腫 抑制 作用은 1시간 전의 phase I 과 2시간 이후의 phase II 로 나눌 수 있다. 이 경우 daidzein 200mg/kg 投與群은 phase I 에서는 daidzein 50mg 및 100mg/kg 投與群보다 낮았으나 phase II 에서는 용량의존적으로 浮腫이 억제되었다. Oyanagui²⁵⁾에 의하면 serotonin 과 histamine 부종유발 mice에 dexamethasone 1mg/kg을 皮下 투여한 結果 1시간 까지는 전혀 浮腫이 억제되지 않았으나 1시간 이후부터 持續的인 부종 억제 효과를 관찰하였다. 본 실험에서도 hydrocortisone 5mg/kg 經口投與時 1시간 후부터 부종 억제를 나타냈으며 항히스타민제인 chlorpheniramine maleate 25mg/kg 투여군에서도 1시간 후부터 강한 부종 억제를 일으켰다.

이 사실로 부터 daidzein 투여에 의한 phase II 부종 억제 작용은 다른 항염 작용의 관련이 기대된다. 또 같은 실험 모델에서 강력한 PG합성 억제제인 indomethacin과 free radical scavenger인 D-mannitol 및 benzoic acid 投與로 전혀 浮腫抑制를 일으키지 못한 점으로 미루어 daidzein 腹腔內 投與時 phase I 부종 억제는 antihistamine 및 antiserotonin 效果일 것으로 推測된다.

Daidzein의 carrageenin 및 arachidonic acid 混合起炎誘發 rat浮腫에 미치는 效果—이 實驗 모델은 非—steroid性 抗炎症藥中 PG合成 억제제의 작용을 보기 위한 實驗으로 carrageenin 단독보다 0.5~2시간에 약 2배의 부종을 일으킨다. 이것은 arachidonic acid로 부터 합성된 PG가 염증반응을 증가시키는 것으로 시사되며²⁷⁾, daidzein 200mg/kg을 經口投與한 結果 30分에 有意性은 없으나 13.2%의 억제를 나타냈으며 그후에는 거의 부종억제를 나타내지 못했다 (Table VI).

그러나 PG합성 억제제인 aspirin은 100mg/kg의 경구투여로 처음 30分 및 1시간에 有意性있는 부종 억제 작용을 나타내었고, 2시간 이후에도 有意性은 없으나 부종 억제 작용을 나타냈다.

Table VI—Anti-inflammatory activity of daidzein on mixed phlogistics (carrageenin-arachidonic acid) induced edema of the rat paw.

Drugs	Dose mg/kg p.o.	No. of Animals	Time(hours)						
			0.5	1	2	3	4	5	6
Control		6	67.2±9.3 ⁺	86.5±1.4	102.6±11.8	110.8±11	95.9±13.6	94.2±11	86.8±10.1
Aspirin	100	6	19.6±0.4** (70.8) [#]	30.1±2.8** (65.2)	75.5±10.9 (26.4)	86.7±9.9 (21.8)	83.1±7.0 (13.3)	75.7±5.9 (19.9)	64.7±6.5 (25.5)
Daidzein	200	6	58.3±4.1 (13.2)	83.1±6.4 (3.9)	104.1± 8.1 —	99.2±6.3 (10.5)	96.7±4.4 —	88.4±6.7 (6.2)	82.4±5.8 (5.1)

+ : mean values±S.E. † : percent of inhibition
Significantly deviated from control: **<0.01

Table VII—Effect of daidzein on leukocyte emigration, protein exudation and ceruloplasmin induced by CMC in rat.

Drugs	Dose(mg/pouch)	No. of Animals	Protein(mg/ml)	Leukocyte(EA/mm ³)	Ceruloplasmin(u/ml)
Control		6	8.80±0.58 ⁺	9,700±1,602	0.234±0.024
Naproxen	5		8.23±0.32 (6.5) [#]	10,050±1,248 (-3.6)	0.291±0.073
Daidzein	5	6	7.47±0.94 (15.1)	5,962±1,265 (38.5)	0.256±0.047
Daidzein	25	6	8.49±0.55 (3.5)	8,125± 371 (16.2)	0.234±0.018
Daidzein	50	6	10.21±0.53 (-16.0)	6,240±1,066 (35.7)	0.253±0.024

+ : mean values±S.E. † : percent of inhibition

이 결과로부터 daidzein은 PG合成 抑制에 의한 浮腫 抑制作用은 거의 없음을 알 수 있었다.

Daidzein의 rat CMC pouch法에 의한 白血球遊走, 蛋白質浸出 및 血中ceruloplasmin에 미치는 效果—Daidzein 5mg, 25mg, 50mg/pouch 및 naproxen 5mg/pouch 投與가 rat CMC 浸出液 中 白血球遊走 및 蛋白質浸出에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Table VII과 같다.

白血球遊走의 경우 daidzein 5mg, 25mg, 50mg 투여군에서 有意性 및 用量 의존성없이 억제 효과를 나타냈으며, naproxen 5mg 투여군에서는 전혀 억제를 나타내지 않았다. 蛋白質浸出의 경우는 用量 의존적으로 촉진되는 경향을 나타내 5mg 및 25mg 투여군에서 대조군에 비해 15.1% 및 3.5% 억제 효과를 나타냈고, naproxen 투여군에서도 有意性은 없으나 6.5% 억제시켰다. 그러나 daidzein 50mg 투여군에서는 촉진 효과를 나타냈다. 또, Nakagawa²⁸⁾ 등에 의

하면 carrageenin pouch法에 의한 起炎時 carrageenin 주입 20시간 후 steroid劑가 用量依存的으로 ceruloplasmin 直를 감소시킨다고 보고하여 이 實驗에 적용하여 血中 ceruloplasmin直를 측정해 본 結果 정상 대조군 196μ/ml에 비해 약간씩 상승되었으며 약물 투여에 의한 영향은 없었다.

Daidzein의 cotton pellet 肉芽腫形成抑制效果—Cotton pellet 肉芽腫形成抑制實驗 모델은 steroid性 抗炎症藥의 약효평가를 위한 것이나 非-steroid性 抗炎症藥도 비특이적으로 억제를 일으킨다. Daidzein 200mg/kg 經口 및 100mg과 200mg/kg 腹腔內投與로 肉芽腫 形成抑制作用을 관찰한 結果는 Table VIII와 같다. 대조군에 대한 억제율을 보면 daidzein 200mg/kg 經口投與로 有意性은 없었으나 7.5%의 抑制效果를 나타냈으며, 腹腔投與의 경우는 100mg/kg이 38.8%, 200mg/kg이 51.5%로 대조군에 비해 有意性있

Table VIII—Effect of daidzein on cotton-pellet induced granuloma formation in rats.

Drugs	Dose mg/kg/day	Route of Admin.	No. of Animals	Dry granuloma tissue	
				Weight(mg)	inhibition(%)
Control		P.O.	6	69.52±5.56 ⁺	—
Daidzein	200	P.O.	6	64.30±3.27	7.5
Naproxen	30	I.P.	6	42.76±3.70**	38.5
Daidzein	100	I.P.	6	42.58±4.64**	38.8
Daidzein	200	I.P.	6	34.00±3.55**	51.1

+ : mean values±S.E.

Significantly deviated from control: **<0.01

게 抑制되었고, 특히 200mg/kg의 경우는 肉芽腫을 거의 인식하지 못했다. 한편 naproxen 30 mg/kg 腹腔投與群에서는 대조군에 비해 38.5%의 抑制를 나타냈다.

結 論

Daidzein 및 그 methyl誘導體를 合成하여 抗炎症作用을 관찰한 바, 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Daidzein 200mg/kg 경구투여로 有意性이 있는 급성염증浮腫抑制 效果를 관찰하였으며, 이 抗炎症 效果는 구조중 수산기의 methylation에 의해 감소 또는 소실되었다.

2. 만성염증 실험 model인 complete Freund's adjuvant 유발부중에 대해서는 daidzein 200mg/kg에서 有意성은 없었으나 전반적으로 억제효과를 나타냈으며, 100mg/kg 및 200mg/kg 경구투여군에서 내인성 염증인자인 serum中 ceruloplasmin의 감소를 나타냈다.

3. Histamine 및 serotonin 혼합기염증 model에 대해서는 daidzein경구 투여로 거의 억제효과가 없었으나 50, 100, 200mg/kg 복강 투여시 phase I에서의 antihistamine, antiserotonin 효과를 관찰하였다.

4. Carrageenin 및 arachidonic acid 혼합기염증 model에 의해서 daidzein 200mg/kg 경구투여로 억제효과를 나타내지 못해 P.G합성 억제가 관여하지 않은 것으로 사려된다.

5. Rat CMC pouch model에서 daidzein 5, 25 mg/pouch 투여로 단백질 침출이 억제되었으나, 50mg/kg 투여로는 촉진작용을 관찰하였으며,

백혈구 유출억제 작용은 용량 의존성은 없었으나 억제 효과를 나타냈다.

6. Cotton pellet 육아종형성 억제작용을 검토한 결과 daidzein 복강 투여로 有意性있는 억제작용을 나타냈다.

文 獻

- Havsteen, B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141(1983).
- Havsteen, B.: Biochemical effect of flavonoids. *Z. Lebensmunters Forsch.* **179**, 36(1980).
- Thompson, M., Williams, C.R. and Elliot, G. E.P.: Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chem. Acta* **85**, 375(1976).
- Ueno, I., Kohno, M., Haraikawa, K. and Hirono, I.: Interaction between quercetin and superoxide radicals. *J. Pharm. Dyn.* **7**, 798(1984).
- Bindoli, A., Cavallini, L., Siliprandi, N.: Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria & microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 2405(1977).
- Valenzuela, A., Lagos, C., Schmitt, K. and Videla, L.A.: Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2209(1985).
- Niebes, P., Ponard, G.: Stabilization of rat live lysosomes by (+)-cyanidanol-3 in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 905(1974).

- 8) Fewtrell, C.M.S. and Gomperts, B.D.: Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* **265**, 635(1977).
- 9) Bronner, C. and Landry, Y.: Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cell. *Agents and Actions* **16**, 147 (1985).
- 10) Sekiya, K. and Okuda, H.: Selective inhibition of platelet lipoxigenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1090(1982).
- 11) Long, G.D., Dechatelet, L.R., O'Flaherty, J.T., McCall, C.E., Bass, D.A., Shirley, P.S. and Parce, J.W.: Effects of Quercetin on Mg-dependent ATPase and the metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **57**, 561(1981).
- 12) Landolfi, R., Mower, R.L. and Steiner, M.: Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1525(1984).
- 13) Egan, R.W., Paxton, J. and Kuehl, F.A.: Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.* **251**, 7329 (1976).
- 14) Dewick, D.M.: Isoflavonoids. The Flavonoids, Chapman & Hall, New York, 535(1982).
- 15) 稻垣 勲: 植物色素·植物化学 4th Ed. 醫齒藥出版社, 186(1972).
- 16) Shibata, S., Harada, M. and Murakami, T.: Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. *Yakugaku Zasshi* **79**, 863 (1959).
- 17) Nakamoto, H., Iwasaki, Y. and Kizu, H.: The study of aqueous extract of Puerariae radix IV. *Yakugaku Zasshi* **97**, 103(1977).
- 18) Cheng, E.W., Yoder, L., Story, C.D. and Burroughs, W.: Estrogenic activity of some naturally occurring isoflavones. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **61**, 652(1955).
- 19) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A. and Saba, N.: Estrogenic activity of soybean products. *Food Cosmet. Toxicol.* **18**, 425(1980).
- 20) Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Birk, Y.: Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 1174(1976).
- 21) Shao, G., Mo, R., Wang, G., Zhang, D., Yin, Z.: Studies on the synthesis and structure-biological activity relationships of daidzein and its derivatives. *Acta Pharm.* **15**, 538(1980).
- 22) Jha, H.C., Recklinghausen, G.V. and Zilliken, F.: Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1367(1985).
- 23) Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W.: Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 544(1962).
- 24) Takagi, K. and Lee, E.B.: Pharmacological studies on platycodon grandiflorum A. Dc. II. *Yakugaku Zasshi* **92**, 961(1972).
- 25) Schosinsky, K.H., Lehmann, H.P. and Beeler, M.F.: Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by the use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin. Chem.* **20**, 1556 (1974).
- 26) Oyanagui, Y.: Steroid-like anti-inflammatory effect of superoxide dismutase in serotonin-, histamine- and kinin-induced edema of mice. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1791(1981).
- 27) Masumoto, S. and Masuda, C.: Inhibitory effect of 2-(2-fluoro-4-biphenyl) propionic acid on prostaglandin synthesis. *Folia Pharmacol. Japan.* **72**, 1025(1976).
- 28) Nakagawa, H., Suzuki, K., Yamaki, K. and Tsurufuji, S.: Changes in functional ceruloplasmin concentrations of plasma and exudate and the effect of exogenous ceruloplasmin on the carrageenin-induced inflammation in rats. *J. Pharm. Dyn.* **7**, 755(1984).
- 29) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Furr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 264(1951).
- 30) Shimizu, M., Nakamura, H., Motoyoshi, S. and Yokoyama, Y.: Pharmacological studies on 1-Methyl-5-p-toluoylpyrrole-2-acetic acid(tolmetin), a new anti-inflammatory agents, in experimental animals. **10**, 293(1975).

- 31) Hirafuji, M. and Ogura, Y.: Lipid peroxidation modifies the effect of phenolic anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 933(1985).
- 32) Conforti, A., Franco, L., Milanino, R. and Velo, G.P.: Copper and ceruloplasmin concentrations during the acute inflammatory process in the rat. *Agents and Actions.* **12**, 303(1982).
- 33) Conforti, A., Franco, L., Milanino, R. and Velo, G.P.: Serum copper concentration and ceruloplasmin activity during carrageenin foot oedema in rat. *Br. J. Pharmacol.* **72**, 137(1981).