

## 2-Chloro-3-(p-carboxyanilino)-1, 4-naphthoquinone 유도체의 용혈기전에 관한 연구

최병기 · 조정희 · 배경아\* · 정세영\*

동덕여자대학교 약학대학 · 경희대학교 약학대학\*

### Studies on the hemolytic mechanism of the 2-Chloro-3-(p-carboxyanilino)-1, 4-naphthoquinone derivatives

Byung Ki Choi, Jung Hee Jo, Kyong Ah Bae\*, Se Young Choung\*

College of Pharmacy, Dongduck Women's University

College of Pharmacy, Kyung Hee University\*

#### ABSTRACT

In order to evaluate the anticancer activity of 1,4-naphthoquinone derivatives, several 1,4-naphthoquinone derivatives were newly synthesized and subjected to mouse leukemia p-388 cell line by MTT cytotoxicity assay. Among the several 1,4-naphthoquinone derivatives, YC-001 has showed the most potent anticancer activity.

To determine the safety of YC-001, hematotoxicity was tested. YC-001 induced hemolysis increased with both concentration and time dependent manner. The mechanism of hemolysis considered to be the generation of oxygen free radicals and lipid peroxydation of erythrocyte membrane which composed of phospholipids. Also methemoglobin, oxidized form of hemoglobin, was formed by YC-001.

#### 서 론

Quinone계 화합물은 항균작용, 항암작용, 항혈액응고작용 및 항염증작용 등의 광범위한 생리활성이 있음이 보고되고 있다.<sup>1,2)</sup> Quinone계 화합물 중 benzoquinone 유도체는 이미 약물로 개발되어 항균제로 사용되고 있으며 1,4-naphthoquinone 유도체는 최근 그 약리활성이 활발히 검토되고 있다.<sup>3-6)</sup>

Quinone계 항균 및 항암제로는 adriamycin, daunomycin, bleomycin, carboquinone 등이 우수한 약효 때문에 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 quinone계 화합물은 DNA와 결합한 다음 oxygen free radical 생성에 의해 DNA의 이중나선구조 중의 일부분을 절단하여 세포독성이 나타난다는 점에서, 항암작용뿐만 아니라 산소가 많이 존재하는 조직에서 oxygen free radical을 다량 생성하여 심장, 폐 및 신장독성을 강하게 나타낸다.<sup>7-15)</sup>

실제로 이들 항암제는 세포막을 쉽게 통과하여 조직에서 활성산소를 생성하고, superoxide dismutase나 catalase를 저하시켜 암세포를 공격한다.

이중 adriamycin은 Burkitt's lymphoma 배양 세포를 1기압하에서 보다 3기압하에서 배양하는 것이 DNA합성이나 세포분열이 더 잘 억제한다고 하였으며,<sup>16)</sup> 또한 mitochondria의 NADH탈수효소에 의해 semiquinone radical이 생성하여 이것이 superoxide anion 및 hydroxy radical을 생성한다고 한다.<sup>17)</sup>

Quinone계 항암제는 항암작용이나 심근에 대한 부작용의 기전으로  $Fe^{+3}$ -ADP와 perferyl형 복합체 ( $O_2 \cdots Fe^{+3}$ -ADP-Quinone화합물)가 생성되고 이 복합체에 의한 지질과산화반응이 일어나서 부작용이 일어난다고 하였다.<sup>18)</sup>

실제로 mitomycin C는 핵산 근처에서 미량금속의 도움을 받아 hydroxy radical을 생성시켜 핵산을 손상시키며,<sup>19)</sup> 또한 microsome의 NADPH p-450 reductase에 의해 semiquinone형을 생성하고 이것들이 superoxide anion을 생성하는 것을 볼 수 있다.<sup>20)</sup>

또한 일반적으로 quinone계 화합물을 세포내 mitochondria의 respiratory chain의 전자전달체인 coenzyme Q와 구조유사성으로 coenzyme Q와 경쟁적으로 전자를 받아들인다. 이 받아들인 전자는 산소환경 중에서 산소에서 전달함으로써 oxygen free radical이 생성되고 respiratory chain의 전자전달체는 전자가 탈취되므로 전자전달이 차단되고 oxidative phosphorylation 즉 ATP 생산의 저하를 초래하여 빠른 속도로 증식하는 과정에서 ATP를 대량 소비하는 암세포가 정상세포보다 더 민감한 세포독성을 나타나게 된다.<sup>21~27)</sup>

그 외에 1,4-naphthoquinone 유도체의 항생물질인 rifamycin은 간장, 신장 및 혈액독성을 나타낸다.

Quinone 유도체의 항염증작용에 대하여는 산화·환원 매개체로 작용하는 과정에서 과산화물의 일종인 prostaglandin, lenkotriene의 생합성을 억

제한하는 것이 예상되고 있으나 염증에 관여하는 세포가 macrophage, neutrophil, platelet 등 다양하다는 점에서 이들 세포들의 활성을 억제시킬 가능성도 보고하고 있다.<sup>28~30)</sup> 또한 1,4-naphthoquinone 유도체는 광범위한 세포독성 및 항암작용이 나타난다고 보고되어 있다.<sup>1)</sup>

위와 같은 관점에서 새로 합성된 1,4-naphthoquinone 유도체인 2-chloro-3-(p-carboxyanilino)-1,4-naphthoquinone(이하 YC-001), 2-chloro-3-(p-nitroanilino)-1,4-naphthoquinone(이하 YC-008) 및 2-chloro-3-(p-methylanilino)-1,4-naphthoquinone(이하 YC-012)을 암세포인 mouse leukemia p-388에 대해 세포독성을 본 결과 YC-001과 YC-008에서 adriamycin과 유사한 정도의 항암성을 볼 수 있었다.

이들 화합물을 의약품으로 사용하기 위하여 Ryu 등<sup>31)</sup>에 의해 측정된  $LD_{50}$ 값은 경구투여시 1,000mg/kg으로 거의 독성이 없는 물질이라는 결과를 나타냈다.

그러나 고용량투여시 장관을 통해서 흡수되었을 때 제일 먼저 접하게 되며 표면적이 가장 큰 혈구세포인 적혈구에 대한 용혈독성을 나타낼 수 있으므로 적혈구에 대한 용혈발현여부와 독성기전을 검토하였으며 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 실험방법

### 1. 실험동물

150~200g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 서울대학교 중앙동물사육장으로부터 분양받아 1주일간 기본사료로 적응시킨 다음 실험에 사용하였다.

### 2. 항암실험

YC-001, YC-008, YC-012 및 adriamycin을 일정한 양 취하여 메탄올에 녹이고 계열 희석한 다음 96 well titer plate에 200 $\mu$ l씩 시료를 채운다. 용매를 감압하에서 모두 날려 보내고 cell수  $1 \sim 2 \times 10^4$ /well이 되도록 RPMI 1640배지에 suspension한

mouse leukemia p-388 cell 200 $\mu$ l을 가하여 주고 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 여기에 50 $\mu$ l MTT 용액을 넣고 4시간 배양시켜 2,000rpm에서 15분간 96 well titer plate를 원심분리하여 상정액은 버리고 침전된 leukemia p-388에 DMSO 50 $\mu$ l을 넣어 용해시킨 다음 Elisa Reader로 495nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>32)</sup>

### 3. 적혈구 용혈실험

#### 1) 적혈구 분리

SD계 rat에서 헤파린처리한 주사기를 이용하여 심장채혈하고 Tris buffer용액 3ml을 넣어 1,500rpm에서 10분간 3회 원심분리하여 buffy coat를 제거한 다음 적혈구만을 분취하였다. 적혈구를 hemacytometer로 cell count하여 4 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml로 만들었다.

#### 2) 용혈실험

적혈구에 일정량의 YC-001 또는 YC-001 및 radical scavenger인 BHA, BHT, Vit. C, thiourea, mannitol 및 GSH를 1, 10mM 가하고 catalase 및 SOD는 100, 200 및 400unit가 되도록 가하여 최종부피가 1ml 되도록 만들었다. 위의 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액 700 $\mu$ l을 취하고 증류수를 넣어 3ml로 한 다음 헤모글로빈의 양을 415nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

### 4. Malondialdehyde (MDA) 측정

적혈구에 YC-001 또는 YC-001 및 radical scavenger인 BHA를 0.01, 0.1, 1, 10mM, Vit. C는 0.1, 10, 50, 100mM이 되도록 가하였으며 총부피는 0.5ml로 하였다. 이 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 검량선을 구하기 위한 표준액은 tetraethoxypropane(TEP)을 ml당 0.625, 1.25, 5 및 10 $\mu$ g으로 만들었다. 시료와 TEP용액에 10% sodium dodesyl sulfate 0.4ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 가용화하였다. 여기에 0.1N HCl 2ml와 0.67% thiobarbituric acid 1ml을 넣어 혼합한 다음 끓는 수욕 중에서 50분간 가열한다. 빙수욕에서 반

응을 중지시켜 5ml 부탄올로 추출하고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 부탄올층을 취하여 585nm에서 흡광도를 측정하여 TEP를 이용한 검량곡선으로부터 MDA생성량을 측정하였다.

### 5. Methemoglobin 측정

SD계 rat에서 심장채혈한 혈액으로부터 적혈구를 분리하고, 10<sup>9</sup> cell의 적혈구에 대하여 0.5mg/ml의 YC-001을 가하여 일정용량으로 하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 시료로 사용하였다. 이 시료를 가지고 Kampen법<sup>33)</sup>에 따라 methemoglobin의 양을 측정하였다.

### 6. 인지질 정량

적혈구 10<sup>8</sup> cell에 YC-001 일정량을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 물·에탄올·클로르포름이 0.8 : 2 : 1 되도록 메탄올과 클로르포름을 넣고 가끔 흔들어 주면서 30분간 실온에서 방치하였다. 상정액을 흡인 여과하고, 추출액을 물·메탄올·클로르포름이 1 : 1 : 1 되도록 클로르포름과 물을 넣었다. 이 추출액에서 하층인 클로르포름층을 취하여 증발시킨 다음 물을 완전히 제거하기 위하여 벤젠을 소량 넣고 증발 농축하였다. 이 잔류물에 클로르포름 소량을 넣어 녹이고, 여지로 불용물을 여과하여 인지질 분획을 얻었다.

TLC plate(Merck 5553)에 추출한 인지질을 소량의 클로르포름에 녹여 점적하였다. 1차 전개용매는 클로르포름·메탄올·28% 암모니아수(65 : 35 : 5)을 사용하였으며 1차 전개한 다음 풍건하여 충분히 용매를 휘산시켰다. 2차 전개용매는 클로르포름·아세톤·메탄올·초산·물(10 : 4 : 2 : 2 : 1)을 사용하여 전개하고 용매를 휘산시킨 다음 I<sub>2</sub> chamber에 넣어 발색되는 부분을 TLC plate에 표시하고 긁어내어 인지질 정량을 실시하였다.

TLC plate에서 채취한 시료를 분해시약\* 0.7ml에 넣고 draft에서 가스버너로 시험관을 흔들면서 가열하였다. 용액이 황색으로 되면 실온에 방치하여 냉각시키고, 증류수 0.5ml 및 1% 몰리브덴산 암모늄 4ml로 넣어 잘 혼합한다. 다시 환원시약\*\*

0.2ml를 넣고 잘 혼합하여 10분간 비등수욕 중에서 가열하고 식힌 다음 750nm에서 흡광도를 측정하였다.

따로 인정량용표준액 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 또는 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 을 가지고 검량선을 작성하였다.

\*분해시약 : 60% HClO<sub>4</sub>와 동량의 진한 황산용액

\*\*환원시약 : 0.25g의 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid와 1g의 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>을 유발에서 섞고 15% NaHSO<sub>3</sub> 100ml에 녹여 여과한 여액을 갈색병에 보관(진한 황색이 나타나면 다시 조제).

실험결과 및 고찰

1. 항암작용

*In vitro*에서 mouse leukemia p-388 cell에 대한 항암력을 측정한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 1,4-naphthoquinone의 2번 위치에 Cl, 3번 위치에 p-carboxyanilino기가 치환된 YC-001과 2번

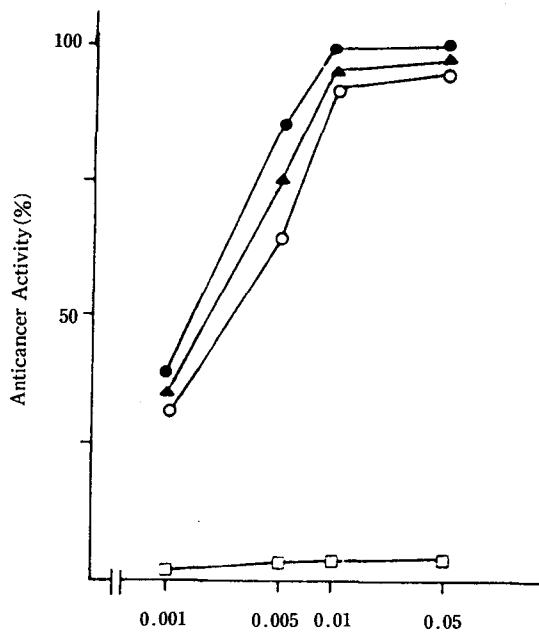


Fig. 1. Anticancer activity of 1,4-naphthoquinone derivatives *in vitro*  
 [○]; YC-001, [▲]; YC-008,  
 [□]; YC-012, [●]; Adriamycin

위치에 Cl, 3번 위치에 p-nitroanilino가 치환된 YC-008에 있어 adriamycin과 비슷한 정도의 강한 항암활성이 나타났다.

2. 용혈작용

*In vitro*에서 heparin으로 심장 채혈하여 분리한 적혈구에 대한 용혈독성여부를 검토하였다.

적혈구 4×10<sup>8</sup> cell에 대하여 0.1mg/ml에서 YC-001, YC-008 및 YC-012 모두 20% 이하의 용혈작용을 나타내었으며 0.5mg/ml의 고농도에서 YC-001과 YC-008이 40% 정도의 용혈독성을 나타내는데 비하여 YC-012는 거의 용혈을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

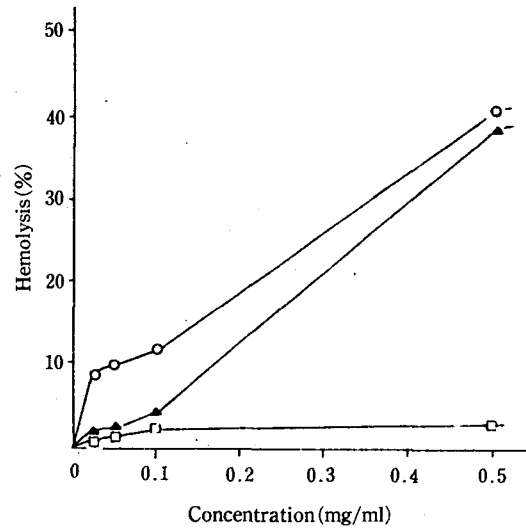


Fig. 2. Hemolytic activity of 1,4-naphthoquinone derivatives  
 [○]; YC-008, [▲]; YC-001, [□]; YC-012

실제 의약품으로 사용되는 항암제나 항생물질의 경우도 대개 비슷한 정도의 용혈독성을 보이면서도 크게 부작용이 없는 것과 YC-001을 경구투여시 LD<sub>50</sub>값이 kg당 1,000mg이라는 점에서도 혈액내 유입시 빠른 속도로 확산될 가능성을 예상할 수 있다. Fig. 3은 YC-001의 농도에 따른 용혈독성의 변

화를 본 것으로 Fig. 2와 일치하는 것을 알았다.

배양시간의 변화에 따른 용혈을 본 결과 0.5mg/ml의 농도에서 20분 경과되었을 때 거의 40%에 가까운 용혈이 있었으며 그 후 plateau가 됨을 알았다 (Fig. 4).

따라서 YC-001은 적혈구에 대하여 농도 및 시간 의존적으로 용혈작용을 나타내었다.

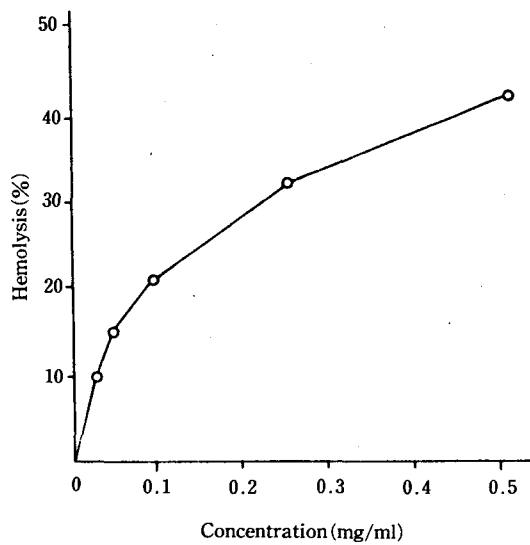


Fig. 3. Concentration dependent hemolytic activity of YC-001.

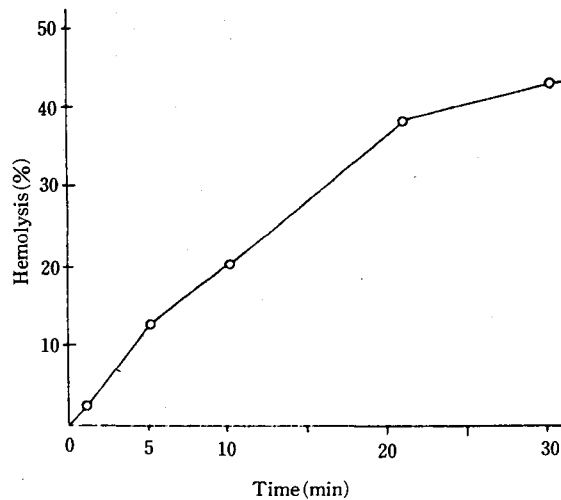


Fig. 4. Time dependent hemolytic activity of YC-001.

### 3. 과산화지질 생성

YC-001의 용혈 독성기전에 대하여는 그 분자구조 속에 quinone핵을 가지고 있고 이 quinone 핵의 산소가 환원되었다가 다시 산화되는 과정에서 전자를 방출하게 되어 주변의 산소분자를 superoxide anion으로 생성할 수 있으리라 생각되어 oxygen free radical에 의한 과산화지질여부를 검토하였다.

적혈구세포막에 존재하는 지질에 과산화가 진행되면 과산화지질의 최종분해물인 MDA가 생성되며 세포막을 이루는 지질의 양이 감소함으로써 혈구세포막의 손상이 일어나서 용혈이 일어나게 되므로 YC-001에 의한 MDA 생성량과 용혈의 상관성을 보았다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 YC-001의 농도변화에 따른 MDA 생성량을 검토한 결과, 용혈이 전혀 없는 0.01mg/ml에서도 MDA 생성량이 1µg/ml 정도 생성되는 것을 볼 수 있으나, 이는 적혈구에 주는 손상이 이 정도의 생성까지는 세포의 생사에 큰 영향을 주지않는 것을 뜻한다.

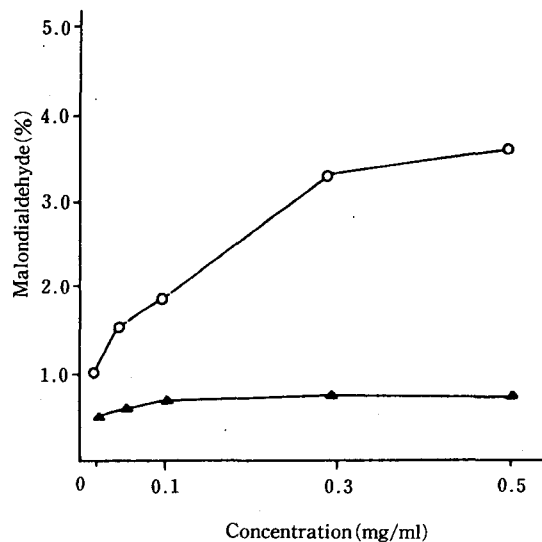


Fig. 5. Lipid peroxidation induced by YC-001. [○]; YC-001, [▲]; Control

**Table I. Effect of various radical scavengers on hemolysis of YC-001**

Radical scavengers	Concentration (mM)	Hemolysis (%)
None	0.3	57
BHA	1.0	53
	10	19
Vit. C	1.0	27
	10	8
Thiourea	1.0	47
	10	31
Vit. E	1.0	41
	10	19
Mannitol	1.0	52
	1.0	38
GSH	1.0	48
	10	45
Catalase	200 unit	0
	400 unit	0
SOD	200 unit	0
	400 unit	0

BHA; Butylated hydroxyanisol, Vit. C; Ascorbic acid, Vit. E; dl- $\alpha$ -Tocopherol acetate, GSH; Reduced glutathione, SOD; Superoxide dismutase

용혈이 15% 정도 일어나는 0.05mg/ml에서 1.5 $\mu$ g/ml, 0.3mg/ml에서 3.2 $\mu$ g/ml로 1.5배 및 3.2배로 증가함에 따라 용혈이 15 및 35%로 증가함으로써 용혈과 과산화지질 생성량 사이에 상관성이 있음을 알았다.

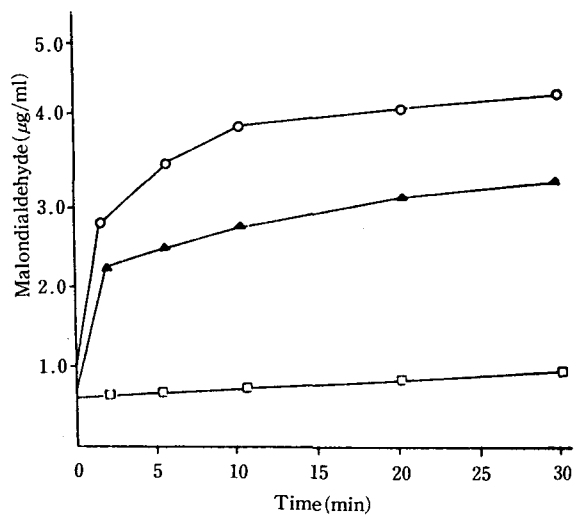
과산화물의 생성원인 물질인 oxygen free radical (superoxide anion, hydroxyl radical, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, singlet oxygen)의 제거에 의해 MDA 생성량과 용혈이 동시에 억제될 것이라는 가정하에 다음으로 oxygen free radical 제거제인 radical scavenger<sup>34-36)</sup>를 이용하여 용혈억제실험을 실시하였다.

Table I에서와 같이 항산화제인 BHA, BHT, Vit. C 및 Vit. E는 oxygen free radical의 종류에 관계없이 scavenger하는 물질로 실제 용혈억제에 있어서도 가장 우수한 효과를 보여주었다. 반면에 주로 hydroxyl radical을 제거하는 thiourea, mannitol에 있어서는 이들보다 못하나, YC-001 단독투여일 때의 약 반정도 용혈을 보였으며,

glutathione은 용혈억제를 거의 나타내지 않았다. 한편 superoxide anion만을 제거하는 효소인 superoxide dismutase는 100unit에서는 별 변화가 없었으나 200unit 및 400unit를 사용한 경우에는 용혈을 완전히 억제하였다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 제거하는 catalase에 의해서도 100 unit에서는 별 변화가 없으나 200unit 및 400unit에서 용혈을 완전히 억제하는 것으로 보아 YC-001에 의해 oxygen free radical이 생성되며 이것이 용혈과 직접 연관이 된다는 것을 확인하였다.

다음으로 용혈억제작용이 컸던 항산화제인 BHA를 이용하여 YC-001에 의한 MDA 생성에 대한 영향을 검토하였다.



**Fig. 6. Effect of Butylated hydroxyanisol on YC-001 stimulated lipid peroxidation**  
[□]; YC-001, [▲]; YC-001+BHA, [○]; Control

Fig. 6에서와 같이 YC-001 0.3mg/ml의 농도에서 YC-001을 단독 투여하여 37°C에서 배양하면 10분 경과시 3.7 $\mu$ g/ml의 MDA가 생성되었으며 그 후 plateau을 이루고 있음을 알았다. 이 때 BHA와 YC-001을 같이 배양하면 37°C에서 10분 경과시, YC-001 단독투여인 때에 비하여 약 30%의 MDA 생성량의 저하를 보였으며 그 후에도 그 차는 지속되었다. 항산화제인 BHA에 의한 MDA 생

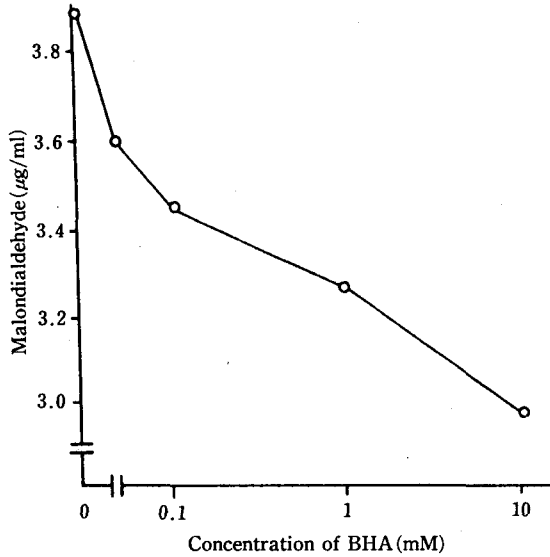


Fig. 7. Concentration dependent inhibition of lipid peroxidation by Butylated hydroxyanisol.

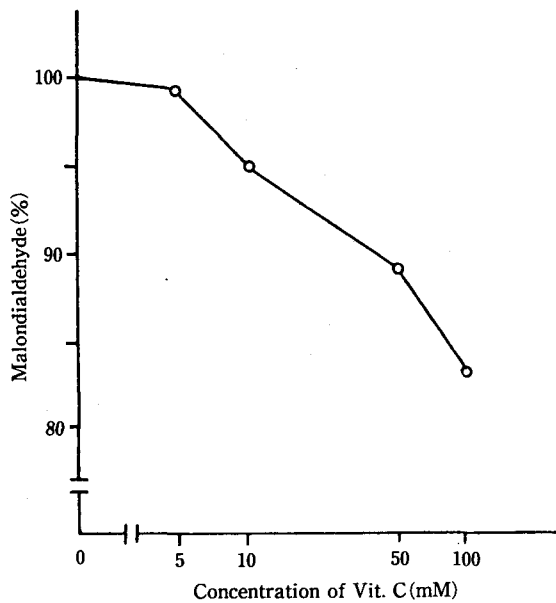


Fig. 8. Concentration dependent inhibition of lipid peroxidation by Vit. C.

성억제가 농도의존적인가를 보기 위하여 0.01mM에서 10mM까지의 BHA를 가하였을 때의 MDA 생성억제를 보았다.

Fig. 7에서 보는 바와같이 YC-001 단독 투여일 때에 비하여 BHA의 양을 증가시키는데 따라 MDA 생성량이 급속히 감소되어, 10mM BHA에서는 YC-001 단독일 때에 반하여 약 25% 정도의 MDA 생성억제가 나타났다. 같은 실험을 Vit. C에 대하여 실시한 결과 100mM에서 20% 정도의 MDA 생성억제를 Fig. 8에서와 같이 보였다.

#### 4. Methemoglobin 생성

대부분의 경우 oxygen free radical의 생성은 양적인 차이는 있으나 methemoglobin을 생성시키며 이의 생성에 따른 O<sub>2</sub> 결합의 약화로, 또한 methemoglobin을 oxyhemoglobin으로 만드는데 소비되는 glutathione의 감소로 적혈구내의 환원적 환경이 산화적 환경으로 바뀔에 따른 세포내 homeostasis의 파괴로 인한 용혈도 생각할 수 있으므로 YC-001에 의한 methemoglobin 생성량을 검토하였다.

Table II에서와 같이 YC-001 단독일 때 10<sup>9</sup> cell의 적혈구에 대하여 0.5mg/ml의 농도에서는 90%에 가까운 methemoglobin 생성을 보였으며, control에 있어서는 2% 정도의 methemoglobin 생성을 보였다. BHA 및 Vit. C 중의 항산화제에 의한 methemoglobin 생성억제 여부를 본 결과 10mM

Table II. Inhibition of methemoglobin synthesis by radical scavengers

Radical scavengers	Methemoglobin (%)
Control	2
YC-001	87
1mM Butylated hydroxyanisol	48
10mM Butylated hydroxyanisol	15
1mM Ascorbic acid	45
10mM Ascorbic acid	0

의 BHA, 10mM Vit. C에 의하여 methemoglobin 생성의 현저한 저하를 볼 수 있었다.

### 5. 적혈구 막지질의 성분변화

YC-001에 의하여 과산화지질의 분해산물인 MDA 및 superoxide anion 생성과 적혈구막에 존재하는 각 인지질의 성분함량변화를 검토하여 적혈구막 손상과의 상관성을 규명하고자 하였다. 적혈구막은 내막과 외막의 이중막으로 이루어져 있으며, 외막에는 phosphatidyl choline(PC)과 spinogmyelin(SM)이, 내막에는 phosphatidyl ethanolamine(PE), phosphatidyl serine(PS)과 phosphatidyl inositol(PI)이 비대칭으로 인지질의 대부분을 차지하고 있다. 내막과 외막 전부에 존재하는 인지질의 양적크기는 PC>PE=SM>PS>PI의 순으로 존재한다. Oxygen free radical에 의하여 공격받는 인지질의 부위는 불포화지방산을 많이 갖고 있는 2번 위치에 해당한다. 2번 위치의 지방산불포화도는 PC와 PE가 단연 우세하며 SM, PS 및 PI는 이들에 비하여 낮은 편이다.

실제 YC-001 단독으로 가하였을 때의 인지질 성분함량변화를 TLC로 전개하여 PC와 PE를 정량한 결과 각각 양적으로 약 50% 정도 감소되어 있었으며, PS, PI 및 SM은 영향을 별로 받지 않았다(Table III).

Table III. Composition of phospholipid contents in YC-001 treated erythrocytes

	PC(%)	PE(%)	PS+PI(%)	SM(%)
Control	48	23	15	14
YC-001	23	11	16	15

이는 용혈독성의 직접적인 요인이 인지질의 2번 위치가 과산화되어 분해되고, lysophosphatidyl choline과 lysophosphatidyl ethanolamine의 양이 증가하여 이들 lyso체끼리 micelle을 형성하여 막으로부터 분리되어 나가므로 세포막 손상이 일어나는 것을 시사하여 주었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 YC-001에 의한 적

혈구용혈은 YC-001의 oxygen free radical 생성에 따른 인지질의 과산화와 lyso체의 생성에 의한 적혈구막 손상이 주원인이며, methemoglobin 생성에 의한 산소운반능 저하로 인한 세포내 산화적 환경도 한 요인으로 작용하는 것을 알았다.

### 결 론

새로 합성된 1,4-naphthoquinone 유도체인 2-chloro-3-(p-carboxyaniline)-1,4-naphthoquinone(YC-001)의 항암작용과 용혈, 독성을 평가하고 그 기전을 검토하였다. 그 결과를 종합하면

1. YC-001은 mouse leukemia p-388 cell에 대하여 adriamycin과 유사한 항암작용을 나타내었다.
2. YC-001은 농도 및 시간의존적으로 용혈독성을 나타내었다.
3. YC-001은 적혈구내의 methemoglobin 생성 및 malondialdehyde의 생성을 유의성있게 증가시켰으며, free radical scavenger인 BHA, Vit. C, SOD 및 catalase와 병용시 억제되었다. 이러한 결과는 YC-001이 oxygen free radical의 생성에 의해 적혈구막의 지질과산화를 초래함으로써 용혈독성을 나타낸 것을 의미한다.

### 참 고 문 헌

1. Wurm, G. and Geres, U.: *Pharmazeutische Zeitung*, 127, Jahrgang, Nr., 40, 7, 2109 (1982).
2. Wurm, G., Geres, U. and Schmidt, H.: *D. Apotheker Zeitung*, 43, 2045 (1980).
3. Lown, J.W.: *Molecular and Cellular Biochemistry*, 55, 17-40 (1983).
4. Phayer, W.S.: *Chem. Biol. Interactions*, 19, 265-278 (1977).
5. Goodman, J. and Hochstein, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 797-803 (1977).
6. Lown, J.W., Sim, S.K., Majumdar, K.C. and Chang, R.Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*



- 76, 706-710 (1977).
7. Begleiter, A. : *Biochem. Pharm.*, 34, 15, 2629-2636 (1985).
  8. Begleiter, A. and Blair, G.W. : *Cancer Res.*, 44, 78 (1984).
  9. Begleiter, A. : *Cancer Res.*, 43, 481-484 (1983).
  10. Bachur, N.R., Gee, M.V. and Friedman, R.D. : *Cancer Res.*, 42, 1078-1081 (1982).
  11. Lown, J.W., Sim, S.K., Majumdar, K.C. and Chang, R.Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 705-710 (1977).
  12. Lown, J.W. and Chan, H.H. : *Can. J. Biochem.*, 56, 1042-1047 (1978).
  13. Lown, J.W., Chem, H.H., Plambeck, J.A. and Acton, E.M. : *Biochem. Pharmacol.*, 28, 2563-2568 (1979).
  14. Lown, J.W., Begleiter, A., Johnson, D. and Morgan, A.R. : *Can. J. Biochem.*, 54, 110-119 (1976).
  15. Mori, K., Hama, S., Kato, F., Okamoto, T., Kishi, T. and Sayo, H. : *Chem. Pharm. Bull.*, 38(4), 1100-1103 (1990).
  16. Wheeler, R.H., Dirks, J.W., Lunardi, I., Nemiroff, M.J. : *Cancer Res.*, 39, 370 (1979).
  17. Mimnaugh, E.G., Trush, M.A., Bhatnagar, M., Gram, T.E. : *Biochem. Pharmacol.*, 34(6), 847 (1985).
  18. 中野稔, 「活性酸素」, 八木, 中野監修, p. 222, 醫齒藥出版 (1987).
  19. Lown, J.W., Sim, S.K. and Chen, H.H. : *J. Biochem.*, 56, 1042 (1987).
  20. Gupta, V. and Costanzi, J. : *J. Cancer Res.*, 47, 2407 (1987).
  21. Mori, K., Tarashita, C., Fukumaga, Y., Okamoto, T., Kishi, T. and Sayo, H. : *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 221 (1989).
  22. Roberts, H., Choo, W.M., Smith, S.C., Marzuki, S., Limnane, A.W., Porter, T.H. and Folkers, K. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 191, 306 (1978).
  23. Gu, L.Q., Yu, L. and Yu, C.A. : *J. Biol. Chem.*, 264, 4506 (1989).
  24. Phelps, D.C. and Crane, F.L. : *Biochem.*, 14, 116 (1975).
  25. Howland, J.L., Lichtman, J.W. and Settlemine, C.T. : *Biochem. Biophys. Acta.*, 314, 154 (1973).
  26. Betina, V. and Kuzela, S. : *Chem. Biol. Interactions*, 62, 179-189 (1987).
  27. Betina, V., Sedmera, P., Vokoum, J. and Podojil, M. : *Experientia*, 42, 196 (1986).
  28. Phayer, W.S. : *Chem. Biol. Interactions*, 19, 265-278 (1977).
  29. Goodman, J. and Hochstein, P. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 797-803 (1977).
  30. Lown, J.W., Sim, S.K., Majumdar, K.C. and Chang, R.Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 705-710 (1977).
  31. Ryu, C.K. : *Yakhak Hoeji*, 32(4), 245 (1988).
  32. Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. : *Cancer Res.*, 47, 936 (1987).
  33. Kampen, E.J. and Zijlstra, W.G. : *Clin. Chem.*, 8, 141 (1965).
  34. Niki, E. : *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-253 (1987).
  35. Minami, M. and Yoshikawa, H. : *Clin. Chem.*, 92, 337 (1979).
  36. Fuzii, S., Dale, G.L. and Beutler, E. : *Blood Vol.* 5(63), 1096-1101 (1984).