

## 1,2-Benzothiazine 계열 새로운 항염진통제에 대한 약리작용 및 대사효소발현 유형의 연구

김상건\*# · 조주연\*\* · 권순경\*\*\* · 이은방\*\*\*\*

\*서울대학교 약학대학, \*\*서울대학교 의과대학,  
\*\*\*덕성여자대학교 약학대학, \*\*\*\*서울대학교 천연물과학연구소  
(Received April 15, 2000)

### Studies on Synthetic 1,2-Benzothiazine Anti-inflammatory Agents: Pharmacological Effect and the Expression of Xenobiotic-metabolizing Enzymes

Sang Geon Kim\*#, Joo Youn Cho\*\*, Soon-Kyung Kwon\*\*\* and Eun Bang Lee\*\*\*\*

\*College of Pharmacy, Seoul National University

\*\*College of Medicine, Seoul National University,

\*\*\*College of Pharmacy, Duksung Women's University and

\*\*\*\*Natural Products Research Institute, Seoul National University

**Abstract** — Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes can be altered by xenobiotics, which represents changes in the production of reactive metabolic intermediates as well as toxicities in tissues. Metabolic intermediates derived from xenobiotics are considered to produce the reactive oxygen species including drug free radicals and hydroxyl free radicals, which would be ultimately responsible for drug-induced toxicities. The effects of 1,2-benzothiazine anti-inflammatory agents on the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes including major cytochrome P450s, microsomal epoxide hydrolase (mEH) and glutathione S-transferase (GST) were studied in the liver with the aim of providing the part of information on potential production of reactive metabolites and hepatotoxicity by the agents. The synthetic compounds 24, 36 and 39 exhibited anti-inflammatory effects in rats as assessed by the Randall-Selitto method. The anti-inflammatory effect was detected as early as at 30 min after gavaging the agents with the ED<sub>50</sub> being noted at 80 mg/kg, which was comparable to that of ibuprofen. Treatment of rats with each compound (100 mg/kg, 3d) resulted in no significant induction in the immunochemically-detectable cytochromes P450 1A1/2, P450 2B1/2, P450 2C11 and P450 2E1. Changes in the mEH expression were also minimal, as evidenced by both Western blot and Northern blot analyses. Hepatic GST expression was slightly increased by the agents: GST Ya protein and mRNA expression was 1.5-fold increased after treatment with compounds 24 and 39, whereas GST Yb1/2 and Yc1/2 mRNA levels were elevated 2- to 3-fold. In summary, the effects of the synthetic 1,2-benzothiazines on the expression of major P450, mEH and GST were not significant, providing evidence that metabolic activation of the agents, potential drug interaction and hepatotoxicity would be minimal.

**Keywords** □ 1,2-benzothiazine anti-inflammatory agents, cytochrome P450, microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase, metabolizing enzymes, expression.

독성물질의 활성화 및 해독화에 관련된 효소는 간조직을 비롯하여 체내의 여러 장기에 존재한다. 이들 해

독화 효소는 xenobiotics 투여에 의하여 발현이 변화될 수 있고, 이들 효소의 발현변화는 약물의 부작용 및 독성과 관련된다.<sup>1)</sup> 대사효소에 의한 약물의 변환과정 중 대사중간체의 형성은 독성 및 유해작용을 상승시켜 약물로서의 가치를 감소시킬 수 있다.<sup>2)</sup> 이때

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7840 (팩스) 02-872-1795

Phase I 효소계의 활성증가나 내인성 방어물질의 고갈이 조직독성을 증가시키기도 한다.<sup>1)</sup> Phase II 효소계의 활성 및 발현의 증가는 일반적으로 해독능력을 향상시켜 조직을 보호한다.<sup>3)</sup> 따라서 약물개발에 있어서 후보약물에 의한 해독화 효소의 발현 및 유전자 조절 기전을 규명하고, 필요한 관능기를 치환하므로써 대사효소발현을 최소화하고, 전임상단계에서 독성을 극소화한 후보약물을 개발하는 것이 약물연구개발의 중요한 단계가 된다.

본 연구에서는 1,2-benzothiazine 계열의 새로운 항염진통 후보물질을 합성하여 이들 후보물질의 소염작용을 일차적으로 검색하고, 약리작용의 검색과 함께 이들 물질을 과량으로 투여하였을 때 간조직중에서 변화될 수 있는 대표적인 약물대사효소의 발현을 관찰하였다. 궁극적으로는 항염효능이 우수한 물질을 일차적으로 검색하고, 이들로부터 독성 및 부작용을 최소화한 약물을 개발하는데 목표를 두었다. 본 연구에서 합성한 후보약물 3종을 이용하여 약효발현용량의 약 50배를 rat에 투여하였을 때 간조직중의 일차 산화효소계 및 Phase II 포합효소의 발현에 미치는 효과는 최소로 나타났다. 따라서 이들 약물에 의한 독성발현의 가능성은 낮을 것으로 예측된다.

### 실험방법

**시약** - [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP(3000 Ci/mmol)은 Amersham (Arlington Heights, IL, U.S.A.)에서 구입하였다. Biotinylated goat anti-rabbit IgG, streptavidin horseradish peroxidase, random prime labeling과 5'-end labeling kits는 BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Mouse anti-rat cytochrome P450 1A1/2, P450 2B1/2 및 P450 2C11의 면역화학적 분석은 본 실험실에서 사용하여 온 항체를 이용하였다. Glutathione S-transferase(GST) 항체는 Biotrin International(Dublin, Ireland)에서 구입하였다.

**후보약물의 합성** - 1,2-Benzothiazine계 항염진통 후보약물인 compounds 24, 36 및 39는 Kwon과 Park이 보고한 방법으로 합성하였다.<sup>4)</sup>

**실험동물** - 웅성 Sprague-Dawley 랫드(150~220 g)를 실험에 이용하였으며, 사육실은 평균 온도 22°C, 습도 50%로 유지하고 물과 사료(삼양사료, 서울, 한국)는 무제한 공급하였다. 동물을 처사시키기 전에 16시

간 절식하였다. 군당 2마리씩 합쳐서 사용하였고 2회 반복실험하였다.

**항염약리효과** - 항염약리효과는 Randall-Sellitto의 방법에 따라 rat paw edema의 소실정도로 측정하였다.<sup>5)</sup>

**Microsome과 cytosol 분획의 분리** - 간조직중의 대사효소 발현을 단백질 수준에서 관찰하기 위하여 화합물 24, 36 및 39를 각각 1일 100 mg/kg의 용량으로 3일간 경구투여하였다. 약물을 최종투여한 후 24시간에 간조직을 적출하여 분쇄한 후 100,000 g에서 90분간 초원심분리하여 침전물인 microsome 분획과 cytosol 분획을 분리하였으며, microsome 분획은 50 mM Tris-acetate buffer(50 mM Tris-acetate, 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.4 with Tris base)에 분산시킨 후 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하고, 단백질은 Lowry 방법으로 정량하였다.

**면역화학적 분석** - Laemmli 방법에 따라 Mighty Small II SE 250장치를 사용하여 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하였다.<sup>6)</sup> Microsome 단백질은 7.5% gel에서 분획화하였고 cytosol 단백질은 12% gel에서 분리하였다. 단백질을 nitrocellulose 종이에 전이시킨후 cytochrome P450 2E1, mEH 및 GST의 면역화학적 분석을 실시하였다. 간단히 설명하면 rabbit anti-rat P450 2E1, microsomal epoxide hydrolase(mEH) 및 GST 항체를 phosphate buffered saline에 희석하여 비닐백에 넣어 봉한후 밤새 흔들며 주면서 결합시킨 후, 이차항체로 biotinylated goat anti-rabbit IgG와 반응시키고, 발색을 위하여 streptavidin-horseradish peroxidase를 넣어 1시간 정도 반응시켰다. Cytochrome P450 1A1/2, P450 2B1/2 및 P450 2C11의 면역화학적 분석은 mouse anti-rat cytochrome P450 1A1/2, P450 2B1/2 및 P450 2C11 항체를 일차항체로 사용하였고 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG를 이차항체로 사용하여 BCIP/NBT를 이용하여 발색하였다.<sup>7,8)</sup>

**RNA 분리 및 Northern blot 분석** - 간조직중의 대사효소 발현을 total RNA 수준에서 경시적으로 관찰하기 위하여 화합물 24, 36 및 39를 각각 1일 100 mg/kg의 용량으로 경구투여한 후 12, 24 및 72시간에 간을 적출하여 간에서의 total RNA를 thiocyanate-phenol-chloroform 추출법에 따라 분리하였다.<sup>9)</sup>

Total RNA를 분리하여 sample dilution buffer (50% formamide, 2.2M formaldehyde in 1×OPS)에 넣어 희석한 후 2.2M formaldehyde/1% agarose gel을 이용하여 MOPS buffer를 running buffer로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel에 존재하는 RNA를 모세관 확산에 의하여 nitrocellulose지에 전이시켰다. mEH 및 GST Ya, Yb1, Yb2, Yc1, Yc2 cDNA를 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP로 random prime labelling하여 probe로 사용하였다. 50% deionized formamide, 5× Denhardt's solution(0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin), 0.5% SDS, 0.5 mg/ml ssDNA, 5×SSPE(1×SSPE:0.15M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.4)를 함유한 hybridization buffer에 nitrocellulose paper를 넣고 42°C에서 2~6시간 prehybridization한 후 probe를 넣고 동일조건에서 18시간 동안 incubation하였다. 2×Standard saline citrate(SSC)/0.1% SDS 및 0.1×SSC/0.1% SDS로 상온에서 15분간 각 2회씩 세척하고 0.1×SSC/0.1% SDS로 55°C에서 1시간 동안 세척하였다. Hybridization이 끝난 nitrocellulose지를 Kodak X-Omat AR film에 -70°C에서 피폭시킨 후 현상하였다. 현상된 film은 Scanning Densitometer를 이용하여 scanning하였다.<sup>10)</sup>

### 실험결과

1,2-Benzothiazine 계열 후보물질의 항염작용 : 1,2-Benzothiazine 계열의 새로 합성된 물질의 항염효과를 검색하기 위하여 Randall-Selitto방법으로 시험하였다.

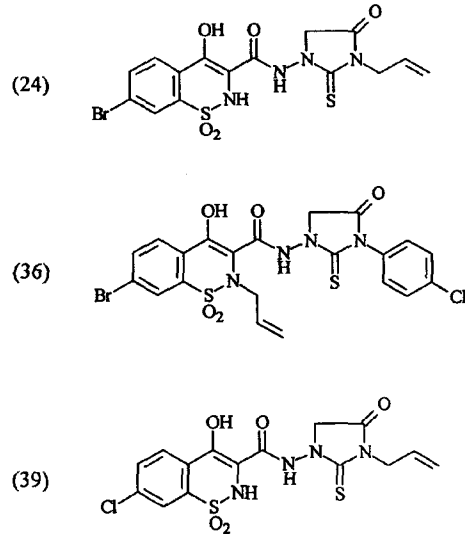


Fig. 1 - Chemical structures of compounds 24, 36 and 39.

약효검색에 사용한 약물의 구조는 Fig. 1에 나타냈다. 검색한 3종의 후보약물은 모두 항염효과를 나타냈으며, 약물 36은 경구로 약물을 투여한 후 30 분만에 항염 작용을 보였다(Table I). 50% 유효약용량은 80 mg/kg으로 나타났다(Table II). 따라서, 약물 36은 대조약물로 사용한 ibuprofen과 유사한 항염효과를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 긍정적인 약리효과에 근거하여 이들 약물을 치료용량의 약 50배 용량으로 3 일간 연용하였을 때 간조직중의 cytochrome P450, mEH 및 phase II 포합효소 발현 변화의 유무를 다음과 같이 검색하였다.

후보약물이 주요 cytochrome P450의 발현에 미치

Table I - Effect of the synthetic 1,2-benzothiazine compounds on the edema induced in rat paw, as assessed by Randall-Selitto method

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of animals	30 min			60 min			90 min
			Inflamed	Non-inflamed	Protected (%)	Inflamed	Non-inflamed	Protected (%)	Lesion index (mm)
Control	--	8	70.0 <sup>##</sup> ± 23.7	129.4 ± 35.7	--	80.9 <sup>#</sup> ± 20.7	116.3 ± 25.6	--	0.1 ± 3.2
Compound 24	5	8	87.5 ± 12.7	126.9 ± 32.5	0.0	95.6 ± 22.4	138.1 ± 32.8	12.5	1.0 ± 4.7
Compound 36	5	8	91.6 ± 25.4	127.5 ± 27.2	12.5	102.8* ± 15.5	123.8 ± 30.4	12.5	1.0 ± 4.2
Compound 39	5	8	101.3* ± 19.6	140.0 ± 36.6	12.5	97.2 ± 27.8	118.1 ± 28.7	12.5	1.0 ± 4.8
Piroxicam	5	8	102.5* ± 27.7	124.4 ± 30.9	50.0	108.8* ± 33.2	122.5 ± 18.4	25.0	4.3 ± 11.8

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from the control animal group (\*p<0.05)

Significantly different from the non-inflamed control group (\*p<0.01, ##p<0.001)

Pain threshold was determined at 30 and 60 mins after the drug treatment.

**Table II** – Dose-related effect of the synthetic 1,2-benzothiazine compounds on the edema induced in rat paw, as assessed by Randall-Selitto method

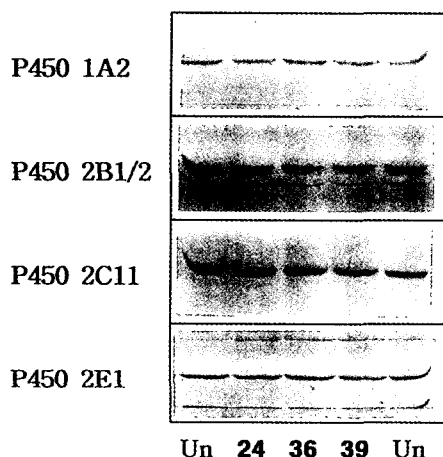
Treatment	Dose (mg/kg,po)	No. of animals	30 min			60 min		
			Inflamed	Non-inflamed	Protected (%)	Inflamed	Non-inflamed	Protected (%)
Control	--	10	71.7 <sup>##</sup> ± 4.6	141.0 ± 12.4	--	87.3 <sup>#</sup> ± 5.9	135.0 ± 11.2	--
	5	10	79.5 ± 5.3	121.5 ± 12.5	10	91.5 ± 7.8	136.0 ± 10.6	10
Compound 36	15	10	81.2 ± 6.5	125.0 ± 13.4	20	96.8 ± 7.6	144.0 ± 7.5	20
	45	10	93.0* ± 6.2	138.5 ± 9.7	40	106.3* ± 4.8	155.5 ± 8.3	20
	135	10	109.8*** ± 6.5	151.0 ± 12.2	60	122.2*** ± 4.3	162.0 ± 10.4	50
	5	10	92.0* ± 7.4	156.0 ± 9.4	30	80.5 ± 8.4	137.5 ± 10.0	10
Compound 39	15	10	91.2* ± 7.1	136.5 ± 11.3	30	96.0 ± 5.2	151.5 ± 10.8	10
	45	10	103.0* ± 10.0	153.0 ± 13.7	40	118.8** ± 9.1	160.5 ± 12.6	50
	135	10	122.9*** ± 6.9	182.5 ± 7.8	80	110.8** ± 5.2	163.0 ± 6.9	20
	60	10	78.3 ± 4.3	132.4 ± 4.6	0	90.3 ± 4.3	130.3 ± 5.3	0
Ibuprofen	150	10	104.1** ± 10.0	129.8 ± 6.8	60	108.2 ± 7.7	132.3 ± 4.2	40
	375	10	125.0*** ± 7.7	134.7 ± 7.1	80	116.2** ± 5.9	130.3 ± 9.5	70

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from the control animal group (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

Significantly different from the non-inflamed control animal group (<sup>#</sup>p<0.01, <sup>##</sup>p<0.001)

Pain threshold was determined at 30 and 60 mins after the drug treatment.

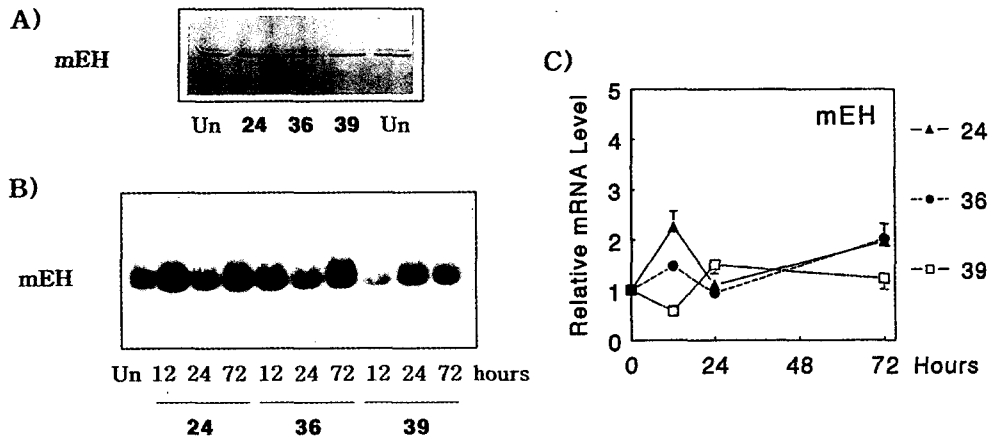


**Fig. 2** – Effects of compounds 24, 36 and 39 on the cytochrome P450 levels in the liver. Immunoblot analyses of rat hepatic microsomal proteins were carried out with mouse anti-rat P450 1A2, P450 2B1/2, P450 2C11 and P450 2E1 antibodies. The lanes are associated with hepatic P450 proteins in untreated rats (Un) or rats gavaged with compounds 24, 36 or 39 at the dose of 100 mg/kg per day for 3 days. Each lane contained 10 µg of microsomal proteins. Results were confirmed by multiple immunoblottings with different microsomal preparations.

는 영향 : 1,2-Benzothiazine 계열의 새로운 항염진통제에 의한 cytochrome P450 1A1/2, P450 2B1/2, P450

2C11, P450 2E1의 발현변화를 관찰하기 위하여 합성한 약물 24, 36 및 39을 1일 100 mg/kg의 용량으로 각각 3일간 경구투여한 후 간조직중의 마이크로솜 분획을 이용하여 면역화학적 분석을 실시하였다. 3종의 화합물은 모두 공통적으로 간조직중의 cytochrome P450 1A1/2, P450 2B1/2, P450 2C11, P450 2E1의 발현을 변화시키지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 효과는 cytochrome P450 효소의 유도발현으로 인하여 발생할 수 있는 약물독성의 증가, 다른 약물과 병용투여 할 때에 약물의 상호작용에 의하여 일어날 수 있는 약효의 과잉증가 또는 감소, 간독성 발생등이 이들 후보 약물을 투여할 때는 배제될 수 있을 것으로 예측된다.

Microsomal epoxide hydrolase의 발현에 미치는 영향 : 후보약물이 간조직중의 microsomal epoxide hydrolase(mEH)의 발현변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 면역화학적 분석 및 Northern blot 분석을 실시하였다. 검색한 3종의 화합물은 사용한 dose regimen하에서 공통적으로 microsomal epoxide hydrolase의 발현에 약한 영향을 미치는 것으로 나타났다. mEH 단백질의 발현에서는 약한 변화만을 인식할 수 있었고, mEH mRNA의 발현에서는 약물을 3일간 연용하였을 때 약 2~3배의 mRNA 증가를 나타내 소폭의 변화만을 인정할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 이들



**Fig. 3** – The expression of mEH in the liver by compounds **24**, **36** and **39**. Panel A) Immunoblot analysis of mEH in the hepatic microsomes isolated from rats treated with compounds **24**, **36** or **39** for 3 days (100 mg/kg/day, po). Each lane was loaded with 5  $\mu$ g of rat liver microsomes. Panel B) Northern RNA blot analysis of hepatic mEH mRNA level at 12, 24 or 72 h after treatment with compounds 24, 36 or 39 at the daily dose of 100 mg/kg. Un represents the zero time point. Panel C) Relative changes in mEH mRNA levels. mEH mRNA levels were assessed by scanning densitometry of the Northern blots followed by normalization. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. with three determinations.

후보약물을 연용할 때 일차산화효소의 활성화에 의하여 생길 수 있는 oxidative stress의 발생은 없을 것으로 사료된다.

Glutathione S-transferase subunit의 발현에 미치는 영향: 3종의 화합물투여 후 major glutathione S-transferase subunit Ya, Yb1/2, Yc1/2의 발현변화를 면역화학적 방법 및 유전자 발현수준에서 측정하였다. 3종의 후보약물중 약물 24와 39는 GST Ya를 단백질 수준에서는 약 1.5배, mRNA수준에서도 약 2배의 미약한 증가만을 유도하였다(Fig. 4). Glutathione S-transferase subunit Yb1/2, Yc1/2 mRNA에서는 최고 2~3배의 변화만을 나타내 이들 약물에 의한 GST의 발현은 극히 제한적인 것으로 나타났다(Fig. 4). 종합하면, 3종의 후보약물들은 이들 해독효소의 발현에 미치는 효과가 일부 있었으나 최소한의 변화로만 인정되었다.

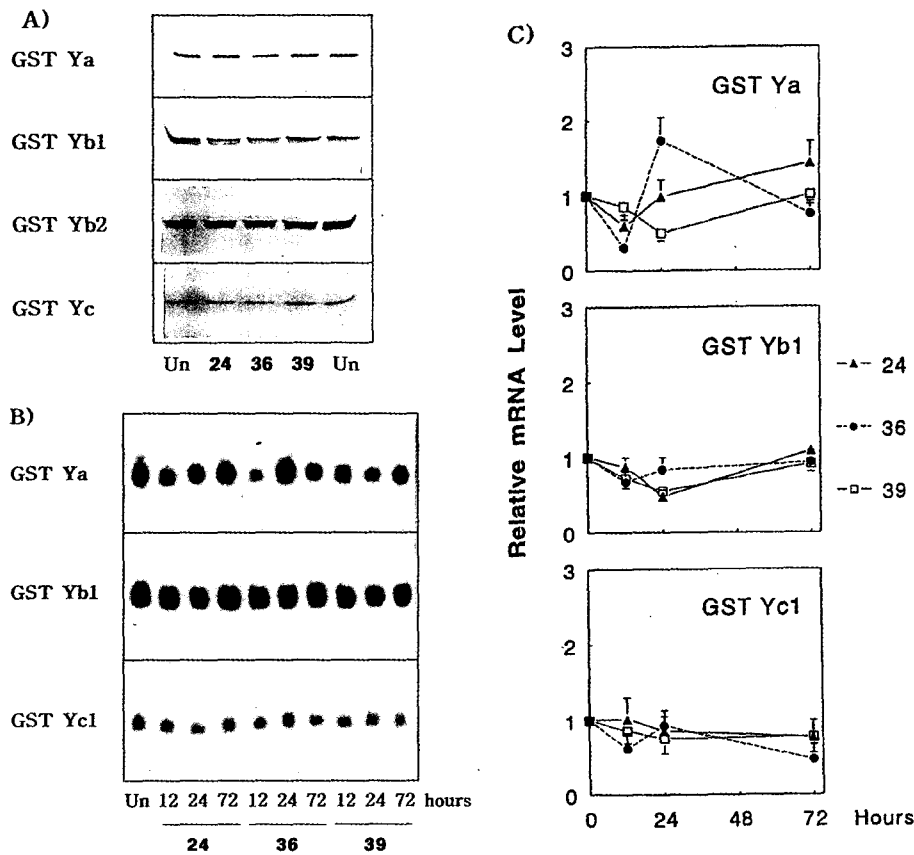
## 고 찰

본 연구에서는 1,2-benzothiazine 계열의 항염진통제를 합성하여 이들의 약리 작용 및 간조직중의 대사효소의 발현에 미치는 효과를 검증하였다. 약물을 성공적으로 개발할 때 소요되는 막대한 비용을 고려할 때

전임상단계에서의 효율적인 약효의 검색, 조직중의 대사효소 발현, 부작용 및 독성의 예측은 필수적인 약물 개발의 단계로 평가할 수 있다. 본 연구에서 합성한 후보약물은 1,2-benzothiazine을 모핵으로 하는 약물로써 piroxicam에서 빈발하는 위산 분비효과를 적게 갖는 것으로 나타나 약효 및 독성시험의 결과가 긍정적인 경우는 약물로써의 충분한 개발가치를 갖는다.

연구결과에 따르면 검색한 화합물을 1일 100 mg/kg의 용량으로 각각 3일간 경구투여하였을 때 3종의 화합물 모두가 공통적으로 P450 1A1/2의 발현을 변화시키지 않았다. 따라서 이들 후보약물은 많은 benzimidazole계열의 화합물이 갖을 수 있는 P450 1A subfamily의 유도증가를 일으키지 않으므로 polycyclic aromatic hydrocarbon에 의하여 유발되는 chemical carcinogenesis에 관여하는 효소발현에는 영향이 없는 것으로 나타났다.<sup>1)</sup> 후보 약물은 또한 간조직중의 P450 2E1의 발현에 전혀 영향을 미치지 않았으므로 acetaminophen 및 유기용매등 소분자화합물에 의하여 발생할 수 있는 약물독성의 증가, 소분자구조의 다른 약물과 병용투여 할 때에 발생할 수 있는 약물상호작용, 이로인한 간독성 발생의 가능성을 배제할 수 있다.<sup>1,2)</sup>

이들 약물은 phenobarbital 유도형 산화 대사효소인



**Fig. 4** - Effects of compounds 24, 36 and 39 on the hepatic glutathione S-transferase levels. Panel A) Immunoblot analyses of GST subunits Ya, Yb1, Yb2 and Yc levels in the hepatic cytosol produced from rats treated with compounds 24, 36 or 39 for 3 days (100 mg/kg/day, po). Each lane was loaded with 1, 3, 3 or 2  $\mu$ g of rat liver cytosolic proteins for GST Ya, Yb1, Yb2 or Yc immunoblottings, respectively. Panel B) Northern blot analyses of hepatic GST Ya, Yb1, or Yc1 mRNA levels at 12, 24 or 72 h after treatment with compounds 24, 36 or 39 at the daily dose of 100 mg/kg. Un is the zero time point. Panel C) Changes in GST Ya, Yb1, or Yc1 mRNA levels relative to untreated animals. GST Ya, Yb1, or Yc1 mRNA levels were assessed by scanning densitometry of the Northern blots followed by normalization. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. with three determinations.

P450 2B1/2의 발현에 미치는 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. Hydantoin moiety를 갖는 많은 화합물이 P450 2B1/2(phenobarbital-inducible forms)를 유도하는 부작용을 갖고 있는 것과는 달리 검색한 후보 약물은 P450 2B1/2의 발현에 미치는 효과가 거의 없어 약물을 연용함에 따라 발생할 수 있는 대사증가에 따른 약효의 감소(tolerance)가 없을 것으로 추정된다.

한편 이들 약물은 microsomal epoxide hydrolase의 유도발현에 미치는 효과가 약한 것으로 나타났다. 현재 임상적으로 사용하는 화합물 중에도 이 효소를 유도 발현하는 약물이 많이 알려져 있다.<sup>7)</sup> Microsomal epoxide hydrolase는 다양한 화합물에 의하여

유도발현되며,<sup>11,12)</sup> 절식, 임신, 성숙등의 생리적인 변화상태에서도 발현에 현저한 변화가 일어난다.<sup>13,14)</sup> 특히 일차산화가 일어난 후에 발생하는 reactive oxygen species, drug free radical 등의 prooxidant 또는 antioxidant에 의하여 현저한 전사유도발현이 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 따라서 이 효소의 유도 증가는 화합물에 의한 reactive intermediates의 생성을 추정하게 하는 지표효소로서의 가치도 갖는다. 본 연구에서 검색한 3종의 화합물은 모두 epoxide hydrolase의 발현에 약한 영향을 주었으므로 후보약물이 대사과정을 거쳐 반응성 중간체를 형성하는 가능성이 낮은 것으로 추정할 수 있다. Epoxide hydrolase

와 함께 포합과정에 참여하는 주된 효소로서 GST를 들 수 있는데 후보약물들은 모두 GST의 유도발현에 약한 효과만을 나타내므로 반응성 중간체의 형성이 낮은 가능성을 뒷바침해주고 있다.<sup>16,17)</sup>

본 연구의 결과는 약물개발 및 연구차원에서 의의가 있는 1,2-benzothiazine 계열 화합물의 효과 및 관련된 대사연구의 자료로 이용될 수 있다. 본 연구의 결과에 따라 3종의 1,2-benzothiazine 계열의 새로운 항염진통제가 효소발현에 최소의 영향을 미치므로 이 계열 화합물에서 우려될 수 있는 대사효소의 유도발현이 발생하지 않아 후보약물이 갖을 수 있는 대사와 관련된 독성은 극히 적을 것으로 예상된다. 이러한 결과는 이들 약물의 개발에 긍정적인 결과로 사료되며, 향후 이들 약물의 대사경로추정, 대사물규명 등의 관련된 연구를 진전시킬 필요성이 있다. 본 연구에서 사용한 대조화합물인 piroxicam은 pyridine치환체를 갖고 있으므로 ring hydroxylation, glucuronide conjugation이 일어나 urine으로 60%배설되나,<sup>18)</sup> 본 후보화합물들은 1,2-benzothiazine 유도체인 piroxicam과는 전혀 다른 대사 및 배설경로를 갖을 것으로 예측된다. 본 연구 및 검색결과를 종합하면, 새로운 항염진통 후보물질은 항염작용이 우수한 것으로 나타났고, 다량의 약물을 투여할 경우에도 간조직중 대사효소계에 미치는 효과가 최소인 것으로 밝혀졌다.

연구과정에서 항염 및 진통작용이 모두 우수한 후보물질을 추가로 합성하였으며, 이들 후보약물에 의한 간조직중의 대사효소의 발현을 약효와 병행하여 검색하고자 한다. 후보약물에 의하여 발생할 수 있는 독성 및 부작용을 전임상단계에서 효과적으로 예측할 수 있도록 증폭된 조직독성발현에 미치는 약물의 작용을 검색하는 것이 향후 연구개발의 단계이다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료 기술 연구과제 HMP-96-D-1-0041에 의하여 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

### 문 헌

- Hodgson, E. and Levi, P. E. : *Biochemical toxicology* 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, p. 75 (1994).
- i. b. i. d.*, p. 219.
- i. b. i. d.*, p. 114.
- Kwon, S. K. and Park, M. S. : Some new 1,2-benzothiazine derivatives with analgesic and anti-inflammatory activities. *Arzeim.-Forsch (Drug Res.)* **46**, 966 (1996).
- Sedgwick, A. D. and Lees, P. : A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions* **18**, 339 (1986).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- Kim, S. G. : Transcriptional regulation of rat microsomal epoxide hydrolase gene by imidazole antimycotic agents. *Mol. Pharmacol.* **42**, 273 (1992).
- Kim, S. G., Chung, H. J. and Cho, J. Y. : Molecular mechanism of alkyl sulfide-modulated carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: The role of CYP2E1, CYP2B and glutathione S-transferase expression. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **277**, 1058 (1996).
- Puissant, C. and Houdebine, L.-M. : An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* **8**, 148 (1990).
- Kim, S. G. and Cho, M. K. : Expression of glutathione S-transferases Ya, Yb1, Yb2, Yc1, Yc2 and microsomal epoxide hydrolase genes by thiazole, benzothiazole, benzothiadiazole. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1831 (1996).
- Seidegard, J. and DePierre, J. W. : Microsomal epoxide hydrolase properties, regulation and function. *Biochem Biophys Acta* **695**, 251 (1983).
- Kim, N. D., Kim, S. G. and Kwak, M. K. : Enhanced expression of rat microsomal epoxide hydrolase gene by organosulfur compounds. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 541 (1994).
- Kim, S. G. : Expression of rat microsomal epoxide hydrolase during pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1593 (1995).
- Kim, S. G. and Kim, Y. H. : Gender-related expression of rat microsomal epoxide hydrolase during maturation: post-transcriptional regulation. *Mol. Pharmacol.* **42**, 75 (1992).
- Hayes, J. D. and Pulford, D. J. : The glutathione S-

- transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemo-protection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 445 (1995).
- 16) Meeks, R. G., Harrison, S. D. and Bull, R. J. : *Hepatotoxicology*, CRC Press Inc., Bosca Raton, p. 401 (1991).
- 17) Sies, H. : *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*, Academic Press, San Diego, p. 245 (1991).
- 18) Gillman, A. G., Rall, T. W. Nies, A. S. and Taylor, P. : *Pharmacological Basis of Therapeutics* 8th ed., Pergamon press, New York, p. 668 (1985).