

창상치료후보물질 AS2-006A의 일반약리연구

정혜진¹ · 조민경¹ · 손문호^{1,2} · 강건욱¹ · 최성희¹ · 김혜정¹ · 이해경¹ · 박형근¹ · 주상섭¹ · 김상건^{1*}
¹서울대학교 약학대학 신의약품개발연구센터, ²동아제약 연구소

General Pharmacology of AS2-006A, A New Wound Healing Agent

Hye Chin Chung¹, Min Kyung Cho¹, Moon Ho Son^{1,2}, Keon Wook Kang¹, Sung Hee Choi¹,
Hye Jung Kim¹, Ae Kyung Lee¹, Hyung Keun Park¹, Sang Sup Jew¹ and Sang Geon Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, and

²Dong-A Pharmaceutical Research Laboratories, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received August 16, 2000)

(Accepted August 28, 2000)

ABSTRACT: The therapeutic effect of AS2-006A, a derivative of asiaticoside, has been studied and is being developed as a new wound-healing agent. In the present study, the general pharmacological effects on 1) central nervous system, 2) autonomic nervous system, 3) respiratory system, 4) gastrointestinal system, 5) cardiovascular system, and 6) urinary system were assessed in experimental animals and in vitro models. 1. In vivo animal study: External applications of the 1% gel ointment of AS2-006A to rats at the doses of 200, 600 or 2000 mg/kg body weight showed no observable pharmacological effects. The effects on the central nervous system were assessed by observation of behavior, hexobarbital-induced sleeping time, pentetrazole-induced convulsion assay, body temperature measurements, and observations on spontaneous activity and catalepsy. The gel ointment exhibited no effects on the cardiovascular system (i.e. blood pressure and heart rate), renal physiology (i.e. urine volume and electrolytes excretion) and gastrointestinal physiology (i.e. intestinal charcoal propulsion and gastric mucosal irritation). 2. In vitro experiments: The effects of AS2-006A on the physiology of smooth and cardiac muscles were assessed. Muscle contractions were isotonic and isometrically measured in organ chambers using a physiograph. Cumulative additions of AS2-006A (10^{-9} ~ 10^{-5} M) induced no changes in the tension of isolated guinea pig ileum and tracheal muscles. AS2-006A only slightly increased contractility of rat atrial and papillary muscles at 10^{-2} M, which was not statistically different from control. These data showed that the gel ointment of AS2-006A could be externally applied as a wound-healing agent with no potential side effects.

Key Words : AS2-006A, Asiaticoside, Wound-healing, General pharmacology

I. 서 론

Asiaticoside는 *Centella asiatica*에서 추출된 천연물로서 화상 및 창상으로 인한 손상을 보호하거나 치유속도를 향상시키므로 옛부터 피부질환에 널리 사용되어 왔다(Shim *et al.*, 1996). 1990년대에 연구된 asiaticoside 화합물의 약리기전은 피부세포에서 collagen을 비롯한 세포외기질(extracellular matrix)의 생성을 변화시키는 것이 포함된다. *Centella asiatica*에서 추출된 또 다른 성분인 madecasol을 랫트의 상처에 국소적으로 도포하였을 때 육아형성증식, 장력의 강화 및 화상에 의한 피부손상을 방어하는 것으로

나타났다(Maquart *et al.*, 1999; Lawrence, 1967; Rosen, 1967).

본 신의약품개발연구소와 동국제약에서는 개선된 창상 치료제를 개발하고자 *Centella asiatica*의 정량추출물중 aglycone부분인 asiatic acid를 기본모핵으로 150종의 유도체를 합성하여 구조활성을 연구한 결과 후보물질인 AS2-006A를 도출하였다. 도출된 AS2-006A는 기존의 추출혼합물인 마테카솔에 비하여 상처치유기간이 짧고 상처 부위가 강하게 접합이 되며 특히 상처치유의 상흔이 적게 남아 치료제로의 개발가능성이 높다. AS2-006A는 창상치유와 상흔억제작용을 가질 뿐만 아니라 세포보호 또는 사멸효능, 체내 항산화물의 생성 증가, β -amyloid에 길항하는 뇌세포 보호효능(Mook-Jung *et al.*, 1999), 간독성 물질

*To whom correspondence should be addressed

에 대한 방어효과(Liu, 1994) 및 치매치료 효능을 가질 가능성이 제시되었다(Jew *et al.*, 2000).

본 연구에서는 창상치료작용을 갖는 AS2-006A를 생체에 적용할 때 나타날 수 있는 일반약리작용을 검색하는데 목표를 두었다. 일반약리작용에 대한 연구는 약물을 임상적으로 적용할 때 인체에 나타날 수 있는 부작용을 예측하고, 이들 약물을 임상에 도입하기 위한 자료확보는 물론 기초약리 연구에도 기여할 수 있다. 본 제제는 개발되었을 때 피부도포용 gel 제제로 개발 될 것으로 예상되므로 본 연구에서는 1% 피부도포용 gel 제제 및 순물질을 활용하여 확립된 일반약리 시험법에 따라 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 수행하였다. 본 연구에서는 1) 중추신경계에 미치는 영향 2) 순환기계에 미치는 영향 3) 비뇨기계에 미치는 영향 4) 소화기계에 미치는 영향 등을 피부에 직접 적용하는 *in vivo* 동물시험으로 관찰하였고 5) 적출장기에 미치는 본 약제의 효능을 *in vitro* 시험으로 관찰하였다.

II. 실험 방법

1. 시험물질 및 시약

AS2-006A는 분자식 $C_{36}H_{56}O_6$, 분자량 584.832, 용점 196.3-199.2인 화합물로서, 물에 녹기 어려우나 CH_2Cl_2 , ethylacetate, dimethylsulfoxide(DMSO) 등 유기용매에는 잘 녹는 백색 또는 미백색의 결정성 분말이다. 시험에 사용한 원료는 서울대학교 신의약품연구센터에서 합성하였으며, *in vivo* 시험에는 약제학적으로 제조한 1% gel ointment를 시험약제로 사용하였다. *In vitro* 시험에서는 AS2-006A를 DMSO에 용해한 후, 증류수에 희석하여 사용하였다. Haloperidol, hexobarbital-Na, chlorpromazine, pentetrazole, carbachol, furosemide, histamine 및 indomethacin은 Sigma시약을 사용하였다. Morphine HCl은 시판용 표준품을 사용하였다.

2. 실험동물

체중 200 g 전후의 웅성 Sprague-Dawley계 랫트를 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입하였고, New Zealand White계 기니피그는 한림동물로부터 공급받아 순화기간을 거친 후 사용하였다. 순화기간과 시험기간 중의 동물 사육 환경은 온도 $23\pm 3^\circ C$, 습도 $55\pm 15\%$ 및 조명시간 12시간의 조건을 유지하였으며, 동물에는 사료와 물을 자유롭게 공급하였다. 장관수송능과 위와 십이지장 점막작용시험에 사용한 랫트는 24시간 절식시켰다.

3. 약물용량설정 및 약물의 처치

랫트(도포면적 $3\times 4\text{ cm}^2$)의 등에 AS2-006A gel ointment를 도포 할 때에는 2000 mg/kg을 시험 최고용량으로 설정하였고, 600 mg/kg을 중등용량, 200 mg/kg을 저용량으로 설정하여 시험하였다. 이때 기체만을 2000 mg/kg 도포한 동물을 대조로 사용하였다. 랫트에 피하주사의 ED_{50} 값인 1 mg/kg을 투여할 때 예측되는 최고 혈중농도치의 약 30배(예측농도, 10^{-5} M)를 *in vitro* 시험의 최고 적용용량으로 설정하였다. 시험전날 랫트의 등털을 전기면도기로 상처가 생기지 않도록 깎은 다음, 시험당일에는 1% gel 제제를 피부일정면적에 비닐장갑을 낀 손가락으로 약 60초간 펴서 발랐으며 약물을 적용한 동물은 케이지당 한마리씩 넣어 시험하였다.

4. 중추신경계에 미치는 영향

1) 일반증상 및 행동에 대한 작용

군당 10 마리의 랫트를 사용하였다. 일반증상의 관찰은 Irwin의 다차원적 관찰법(Irwin, 1968)을 변형하여 행동변화, 신경증상, 자율신경증상 및 중독증상항목으로 실시하였다. AS2-006A gel ointment를 랫트의 피부에 도포한 후 1, 3, 6 및 24시간에 일반증상을 관찰하였다. 비교약물로는 haloperidol 10 mg/kg을 경구투여하였으며, 대조로 사용한 동물은 시험용 약물투여 동물군과 동시에 관찰하였다.

2) Hexobarbital-Na 수면에 대한 작용

랫트를 시험군당 6마리씩 사용하였으며 시험용 gel ointment를 도포하고 6시간 후에 hexobarbital-Na을 100 mg/kg 용량으로 복강주사하고 수면유도시간과 수면지속 시간을 측정하였다. Hexobarbital-Na을 주사한 후에 정향 반사 소실을 수면유도시간으로, 정향반사 소실부터 회복되는 기간까지의 시간을 수면시간으로 측정하였다. 수면시간에 영향을 줄 수 있는 비교약물로 chlorpromazine 50 mg/kg을 랫트에 경구투여하고 1시간 후에 hexobarbital-Na을 투여한 후 수면작용을 관찰하였다.

3) 경련유발 작용

경련유발여부를 시험할 때에는 군당 6마리의 랫트를 사용하였다. 시험약제를 피부에 도포한 6시간 후에 5분 동안 Convuls-1(Columbus Instruments, USA)을 사용하여 경련여부와 강도를 측정하였다. 경련을 유발하는 약물인 pentetrazole 60 mg/kg을 랫트에 복강투여하고 투여직후부터 5분 동안 경련강도를 측정하여 대조로 사용하였다.

4) 정상체온에 대한 작용

정상체온시험에는 군당 6마리의 랫트를 사용하였다. 시험 약물을 도포 전과 도포 한 후 1, 3, 6 및 24시간에 랫

트용 직장체온계를 항문으로부터 약 3 cm 깊이로 삽입하여 체온을 측정하였다. 비교약물로는 aminopyrine 50 mg/kg을 경구투여 하였으며 같은 방법으로 체온을 측정하였다.

5) 자발운동에 대한 작용

자발운동시험에는 군당 6마리의 랫트를 사용하였다. 시험 약제를 도포한 후 30, 120 및 240분 후에 방음실내에서 Opto-Varimax(Columbus Instruments, USA)를 이용하여 5분간씩 자발운동량을 측정하였다. 측정시에는 항상 대조군과 시험물질을 투여한 랫트를 1마리씩 측정 케이지에 넣고 자발운동량을 동시에 측정하였다. 비교약물로는 chlorpromazine 10 mg/kg를 증류수에 녹여 랫트에 경구투여한 후 자발운동량을 측정하였다.

6) Catalepsy 유발작용

시험약물이 catalepsy를 유발하는지의 여부를 시험하기 위해서 군당 6 마리의 랫트를 사용하였다. 시험 약제를 랫트피부에 도포한 후 1, 3, 6 또는 24시간에 catalepsy 여부를 측정하였다. Catalepsy의 단계 및 강도는 Verma 등의 방법(Verma와 Kulkarni, 1992)에 따라 다음 기준으로 측정하였다. 비교동물 군에는 haloperidol 10 mg/kg을 경구 투여한 후 catalepsy 유발을 확인하였다.

(stage 1) 자유롭게 움직임 Score = 0점

(stage 2) 만지거나 누르면 움직임 Score = 0.5점

(stage 3) 앞발을 3 cm 높이의 철봉에 올려 놓았을 때 10 초 이상 정상체위로 돌아가지 못하고 그 상태를 유지함. Score = 각 앞발 당 0.5 점, 총 1점

(stage 4) 앞발을 9 cm 높이의 철봉에 올려 놓았을 때 10 초 이상 정상체위로 돌아가지 못하고 그 상태를 유지함. Score = 각 앞발 당 1점, 총 2점(완전한 catalepsy 반응을 보이면 score는 3.5점으로 정함)

5. 혈압 및 심박수에 미치는 영향

시험 약제가 혈압 및 심박수에 영향을 미치는지의 여부를 관찰하기 위해서 군당 5~6마리의 랫트를 사용하였다. 랫트의 경동맥에 캐놀을 삽입하고, 18~24시간 동안 안정화시킨 다음, 시험 약제를 피부에 도포하였다. 랫트가 자유롭게 움직이는 상태에서 도포 후 30분 간격으로 5시간 동안 Signal Processor(Modular Instruments, USA)를 사용하여 혈압과 심박수를 측정하였다.

6. 뇨량 및 뇨전해질에 미치는 영향

AS2-006A gel ointment가 뇨량 및 뇨전해질에 미치는 영

향을 관찰하기 위해서 군당 6마리의 랫트를 사용하였다. 랫트(도포면적 3×4 cm²)의 등에 시험용 gel ointment를 도포한 후 개별대사 케이지에 넣고 24시간 동안 뇨를 채취하여 뇨량을 측정하고, Na/K/Cl instant ISE analyzer (LYTENING system 30)을 이용하여 뇨중 Na⁺, K⁺ 및 Cl⁻ 농도를 정량하였다. 대조군으로 furosemide 15 mg/kg을 경구투여하여 이뇨작용을 유발시켰으며, 이 경우에는 6시간 동안 뇨를 채취하여 뇨량 및 뇨중 Na⁺, K⁺ 및 Cl⁻ 농도를 정량하였다.

7. 소화기계에 미치는 영향

1) 장관수송능에 대한 작용

군당 6마리의 랫트를 사용하였다. 시험용 gel을 랫트(도포면적 3×4 cm²)의 등에 도포한 후 6시간에 5% charcoal meal(0.5% CMC-Na로 현탁한 것임)을 마리 당 2 ml씩 경구투여 하였다. 랫트에 5% charcoal meal을 투여하고 30 분 후에 치사시켜 위장관을 적출하고, 유문부에서 직장범 위까지 charcoal의 이동거리를 측정하였다. 이동율은 유문부에서 직장까지의 길이에 대한 charcoal 이동거리의 비율로 하였다.

이동율 = (유문부에서부터의 charcoal 이동거리/유문부에서 직장까지의 길이)×100

2) 위, 십이지장 점막 자극 작용

군당 6마리 랫트를 사용하였다. 시험용 gel을 랫트의 피부에 도포하고 4시간 후에 랫트를 치사시켜 위와 십이지장을 적출하고, 적출한 장기를 1% formalin 액 20 ml에 담가서 2시간 동안 방치하고, 위와 십이지장을 절개하여 내벽의 gastric lesion을 관찰하였다.

8. 적출장기에 미치는 영향

1) 기니픽 적출회장에 대한 작용

체중 250 g 전후의 기니픽을 방혈 치사시켜 회장을 적출한 후, Kreb's 용액(NaCl, 118.4 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl₂·2H₂O, 1.9 mM; MgSO₄·7H₂O, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; NaHCO₃, 25 mM; Dextrose, 10.1 mM; CaNa₂·EDTA, 0.01 mM)에 담가 cecum에서 약 10 cm되는 부위는 버리고 그 위 부분을 1.5 cm 취하여 표본을 작성하였다. 37°C의 온도를 유지한 Magnus 장치에 표본을 현수한 뒤 isotonic transducer에 연결하고 500 mg의 정지장력을 걸어주며 1시간 동안 15분 간격으로 씻어주면서 표본의 반응을 안정화시켰다. 시험약물을 10⁻⁹~10⁻⁵ M의 농도범위로 누적하여 가하면서 용량변화에 따른 반응을 관찰하였

다. 비교약물로는 carbachol을 사용하였으며, carbachol의 최대수축력을 100%로 할 때 이에 대한 시험물질의 상대 수축력을 도출하였다.

2) 기니픽 적출기관에 대한 작용

체중 250 g 전후의 기니픽을 방혈 치사시켜 기관을 적출한 후, Krebs's액에 담그고 지방조직을 제거하였다. 기관을 2 mm 폭으로 절개한 후 6~7개의 표본을 실로 고정하고 37°C의 온도를 유지한 Magnus 장치에 현수한 다음 isometric transducer에 연결하였다. 1 g의 정지장력을 준 후, 1시간 동안 15분 간격으로 씻어주면서 표본의 반응을 안정화시켰다. 비교약물로서 carbachol을 10⁻⁹~10⁻⁵ M까지의 용량범위에서 약물을 누적하여 가하면서 반응을 관찰하였다. 시험약물의 수축력은 carbachol의 최대 수축력을 100%로 할 때 이에 대한 상대반응의 비율로 표기하였다.

3) 기니픽 적출심방 및 유두근에 대한 작용

체중 250 g 전후의 기니픽을 방혈치사하고 신속히 심장을 적출하여, Krebs's액에 넣고 폐를 비롯한 주변조직을 제거하였다. 우심방 및 우심실 유두근 표본을 제작하여 37°C의 Magnus 장치에 현수하고 isometric transducer에 연결하였다. 심방표본에 1 g, 유두근 표본에 0.5 g의 정지장력을 가하였으며, 유두근 표본에는 전기자극(1 Hz, 5 ms)을 가하였다. 이후 1시간 동안 15분 간격으로 표본을 씻어주면서 안정화시켰다. 시험약물을 10⁻⁹~10⁻⁵ M 용량범위에서 누적하여 가하면서 반응을 관찰하였다. 약물을 가하기 전의 수축력 또는 박동수를 기준으로 하여 시험약제의 기니픽 적출심방 및 유두근에 대한 작용을 상대적인 변화율로 표시하였다.

9. 통계처리

모든 시험의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었다. 각 군간의 차이는 Newman-Keul's test로 비교하였으며,

Table 1. Effect of AS2-006A gel on general behaviors in SD rats

	Time after Administration																			
	1 h					3 h					6 h					24 h				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1) Behavioral Profile																				
Alertness	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Stereotypy	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Grooming	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritability	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spontaneous activity	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Pain response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Neurological Profile																				
Startle response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub's tail	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abnormal gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Righting reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grip strength	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Pinna reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corneal reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ipsilateral flexor reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3) Autonomic Profile																				
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypothermia	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Writhing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Skin color	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiratory rate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral size	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
Exophthalmos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4) Death																				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A : Base 2000 mg/kg, B : AS2-006A gel 200 mg/kg, C : AS2-006A gel 600 mg/kg, D : AS2-006A gel 2000 mg/kg, E : Haloperidol 10 mg/kg, p.o.
 *indicates significant difference at p<0.001 level, as compared with the control group.
 Values represent the number of rats showing clinical signs among 10 rats used.

Table 2. Effect of AS2-006A gel ointment on hexobarbital-induced sleeping time in SD rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Sleep-inducing time (min)	Sleeping time (min)
Base	2000	2.7±0.6	63.5±16.8
AS2-006A gel	200	2.7±0.7	62.9±16.4
	600	4.1±1.8	89.7±18.7
	2000	3.8±1.1	66.4±19.1
Chlorpromazine	50 ^a	1.3±0.5**	167.7±18.9**

^amg/kg, p.o., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with the control group.

대조군과 비교하여 p<0.05일 때를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 실험 결과

1. 중추신경계에 미치는 영향

1) 일반증상 및 행동에 대한 작용

AS2-006A 1% gel ointment를 200, 600 또는 2000 mg/kg의 용량으로 랫트의 피부에 도포하였을 때 시험동물은 1~24시간에 걸쳐서 이상 증상이나 행동을 보이지 않았다 (Table 1). 반면 대조약물인 haloperidol을 투여한 동물에서는 경계성 저하, 상동증상, 자발운동 저하, 사지긴장도 저하 및 체온 강하 등이 관찰되었다.

2) Hexobarbital-Na 수면에 대한 작용

랫트에 AS2-006A 1% gel ointment를 200, 600 또는

Table 3. Proconvulsive effect of AS2-006A gel in SD rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Impulse Counts/sec
Base	2000	0.008±0.002
AS-2006A gel	200	0.008±0.001
	600	0.007±0.001
	2000	0.008±0.003
Pentetrazole	60 ^a	1.684±0.137**

^amg/kg, i.p., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with control group.

2000 mg/kg의 용량으로 피부에 도포하였을 때 투여한 모든 용량범위에서 hexobarbital에 의한 유도시간 및 수면시간의 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2). 그러나 대조약물인 chlorpromazine은 hexobarbital에 의한 수면유도시간을 유의성있게 감소시켰으며, 수면시간을 유의성있게 증가시켰다.

3) 경련유발 작용

AS2-006A gel을 200, 600 또는 2000 mg/kg 투여한 모든 동물군에서 경련의 지표인 impulse counts/sec가 차이를 보이지 않았으나, pentetrazole 투여군은 현저한 경련을 유발하였다(Table 3).

4) 정상체온에 대한 작용

랫트에 AS2-006A 1% gel을 200, 600 또는 2000 mg/kg의 용량으로 피부에 도포한 후 1, 3, 6 또는 24시간에 체온을 측정된 결과 AS2-006A gel을 도포한 모든 동물군은 기제를 도포한 동물군에 비하여 차이를 보이지 않았다. 반

Table 4. Effect of AS2-006A gel on rectal temperature in SD rats

Time after administration (h)	Body Temperature (°C)				
	Base	AS2-006A (mg/kg)			Aminopyrine
		2000	200	600	
0	36.4±1.42	36.8±0.22	36.5±0.61	37.1±0.22	37.3±0.10
1	37.3±0.55	36.7±0.19	37.3±0.55	37.3±0.18	36.7±0.39*
3	36.8±0.41	36.8±0.17	37.2±0.25	37.4±0.32	37.1±0.61
6	37.2±0.21	36.9±0.35	37.2±0.23	37.4±0.23	37.7±0.29
24	37.3±0.27	36.5±0.21	37.2±0.15	37.3±0.17	37.2±0.33

^amg/kg, p.o., *indicates significant difference at p<0.05 level, as compared with the body temperature at time 0 h.

Table 5. Effect of AS2-006A gel on spontaneous activity in SD rats

Time (min)	Distance Traveled (cm)					
	Base		AS2-006A		Chlorpromazine	
	2000 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg	2000 mg/kg	Vehicle	10 ^a
30	1329±215	1618±361	1657±257	1478±331	1450±239	1326±396
120	436±60	630±304	472±199	421±87	655±543	241±108
240	296±75	405±84	347±146	447±117	314±80	104±49**

^amg/kg, p.o., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with control.

Table 6. Effect of AS2-006A gel on catalepsy in SD rats

Time after administration (h)	Catalepsy Score				
	Base	AS2-006A			Haloperidol 10 ^a
		2000 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg	
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.0±0.5**
3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.1±0.4**
6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.1±0.4**
24	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

^amg/kg, p.o., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with control.

면, 대조약물인 aminopyrine을 투여한 동물은 약물투여 후 1시간에 유의성있게 체온이 하강하였다(Table 4).

5) 자발운동에 대한 작용

랫트에 AS2-006A 1% gel을 200, 600 또는 2000 mg/kg 의 용량으로 피부에 도포한 후 자발운동량을 관찰하였다. AS2-006A 1% gel을 도포한 후 30, 120, 240분에 자발 운동량의 차이는 관찰되지 않았다(Table 5). 대조약물인 chlorpromazine을 투여한 동물군은 약물투여 후 240분 에 대조군에 비하여 유의성있는 자발운동량의 감소를 보 였다.

6) Catalepsy 유발작용

랫트의 피부에 AS2-006A gel을 도포한 후 1~24시간에 catalepsy 유발을 관찰하였다. 시험약제를 투여한 모든 동 물군에서 catalepsy가 관찰되지 않았으나(Table 6), 비교약 물인 haloperidol을 투여한 동물군은 투여 후 1, 3, 6시간에 catalepsy를 유발하였으며, 24시간에 catalepsy는 소실되 었다.

2. 혈압 및 심박수에 미치는 영향

랫트의 등에 기제 또는 AS2-006A gel을 도포하고 5 시간 동안 평균혈압 및 심박수를 관찰하였다. 기제 및 AS2-006A gel 도포군은 각각 기제 적용시 및 약물도포 전과 비교하여 혈압 및 심박수의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1).

3. 뇨량 및 뇨전해질에 미치는 영향

시험약물인 AS2-006A gel을 도포한 모든 동물군은 24 시간 채취 뇨량 및 배설이온량의 변화가 없었다. 비교약물 인 furosemide를 투여한 동물의 뇨를 6시간 동안 채취한 후 뇨량 및 배설이온양(Na⁺, Cl⁻)을 측정하여 대조로 사용 하였다. 대조약물 투여군은 vehicle 처치군에 비하여 뇨량 및 배설이온량이 유의성 있게 증가하였다(Table 7).

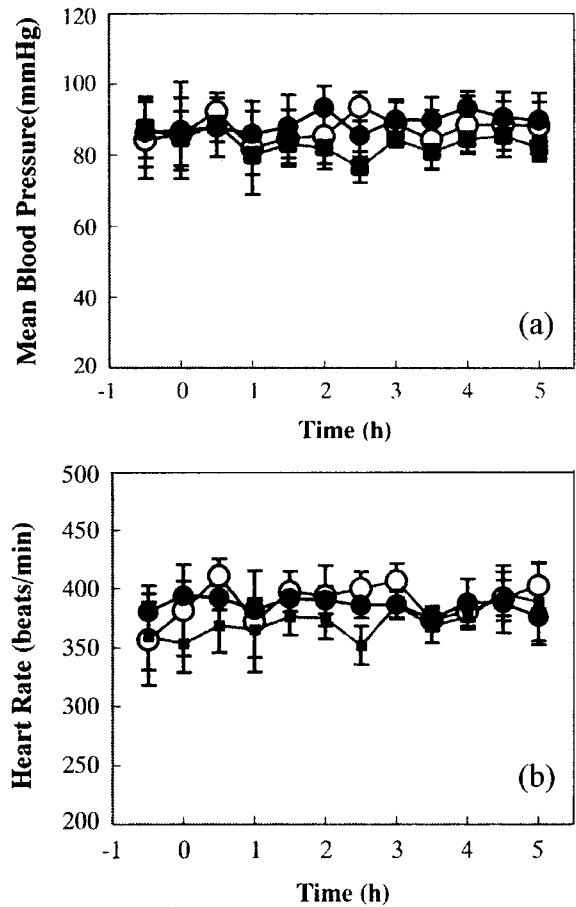


Fig. 1. Effects of AS2-006A (vehicle, ○; 200 mg/kg, ●; 2000 mg/kg, ■) on hemodynamics of conscious SD rats. A) Changes in the mean blood pressure. B) Changes in the heart rate. Bars represent standard errors.

4. 소화기계에 미치는 영향

1) 장관수송능에 대한 작용

AS2-006A gel을 투여한 동물은 대조동물에 비하여 charcoal 이동율에 차이를 나타내지 않았다. 대조약물인 morphine·HCl을 투여한 동물에서는 charcoal 이동율이 유 의성있게 감소되었다(Table 8).

Table 7. Effect of AS2-006A gel on urinary volume and electrolyte in SD rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Urinary volume (ml)	Urinary Electrolyte Excretion (μEq)		
			Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Vehicle ^a	0	5.6±0.8	5.7±1.5	82.2±15.4	51.8±0.9
Furosemide ^a	15	7.6±0.6*	48.2±9.4**	69.3±3.9	110.7±7.1**
Base ^b	2000	13.2±1.0	34.4±4.9	84.1±7.3	76.4±4.1
AS2-006A ^b	200	12.4±2.5	32.5±8.2	100.8±18.3	88.1±9.8
	600	12.6±2.0	25.6±3.6	81.0±9.2	72.1±2.8
	2000	11.7±1.6	45.3±14.6	99.8±13.5	86.7±11.0

^aCollected for 6 h.

^bCollected for 24 h.

*indicates significant difference at p<0.05 level, as compared with vehicle-treated animals.

**indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with vehicle-treated animals.

Table 8. Effect of AS2-006A gel on intestinal propulsion in SD rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Charcoal Movement (%)
Base	2000	70.0±7.2
AS2-006A	60	78.0±4.2
	120	74.9±5.5
	2000	65.6±4.1
Morphine HCl	2 ^a	43.9±9.4**

^ai. v., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with control.

Table 9. Effect of AS2-006A gel on gastric irritation in SD rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Gastric Lesion (cm ²)
Base	2000	0.0±0.0
AS2-006A	60	0.0±0.0
	120	0.0±0.0
	2000	0.0±0.0
Indomethacin	60 ^a	23.1±4.5**

^ap.o., **indicates significant difference at p<0.01 level, as compared with control.

2) 위, 십이지장 점막 자극 작용

시험약물인 AS2-006A gel 또는 기재를 피부에 도포한 동물에서는 위점막에서 gastric lesion이 형성되지 않았으나, 비교약물인 indomethacin을 투여한 동물의 위, 십이지장 점막에는 gastric lesion이 유발되었다(Table 9).

5. 적출장기에 미치는 영향

1) 기니픽 적출회장에 대한 작용

Carbachol을 기니픽 적출회장에 10⁻⁹~10⁻⁵M 농도로 가하였을 때 carbachol은 농도의존적으로 평활근 수축반응을 나타냈다(Fig. 2). 그러나, 시험약물인 AS2-006A를 누적하여 가할 때 10⁻⁹~10⁻⁵M의 농도에서 수축반응이 일어나지 않았다.

2) 기니픽 적출기관에 대한 작용

Carbachol은 10⁻⁹ - 10⁻⁵ M범위에서 농도의존적으로 수

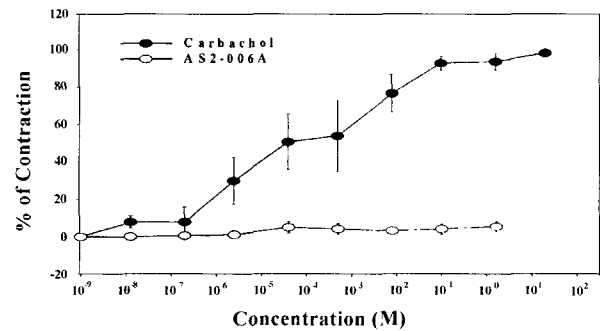


Fig. 2. Effects of AS2-006A (○) or carbachol (●) on the contractility of isolated guinea pig ileum. Each point represents the mean from 4 to 6 preparations. Bars represent standard errors.

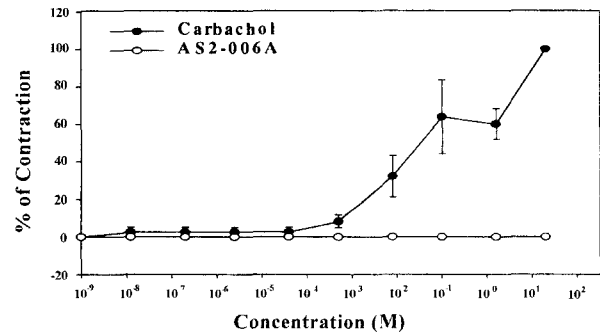


Fig. 3. Effects of AS2-006A (○) or carbachol (●) on the contractility of isolated guinea pig trachea. Each point represents the mean from 4 to 6 preparations. Bars represent standard errors.

축반응을 보였다 (Fig. 3). 시험약물인 AS2-006A를 10⁻⁹~10⁻⁵M까지 누적하여 가하였을 때에는 농도의존적인 수축반응이 일어나지 않았다.

3) 기니픽 적출심방 및 유두근에 대한 작용

시험약물 AS2-006A를 10⁻⁹~10⁻⁵M의 농도로 누적하여 가하였을 때 사용한 용량 범위에서 심실유두근의 수축력 및 우심방의 박동수는 변화하지 않았다(Fig. 4).

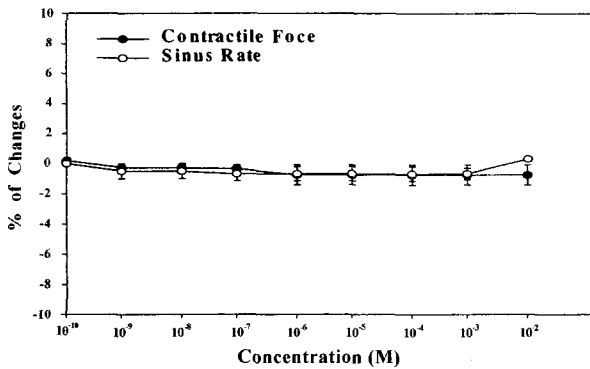


Fig. 4. Effects of AS2-006A on the contractile force of isolated papillary muscle (●) and sinus rates (○) of isolated atrium of the guinea pig. Each point represents the mean from 4 to 6 preparations. Bars represent standard errors.

IV. 고 찰

*Centella asiatica*의 정량추출물은 triterpenoid인 asiaticoside, asiatic acid, madecassic acid로 구성되어 있고 (Sung *et al.*, 1992) 이들 혼합물은 화상 및 창상으로 인한 손상을 보호하거나 치유속도를 향상시킨다. 3종의 triterpene 중 asiatic acid 및 asiaticoside는 생리활성이 강하고 asiaticoside는 저용량에서도 collagen 합성을 현저히 증가시킨다(Maquart *et al.*, 1990, 1999). Asiaticoside의 aglycone인 asiatic acid를 기본모핵으로 유도체를 합성하여 구조활성을 연구하므로써 후보물질인 AS2-006A를 도출하였다. 주성분인 triterpene의 구조활성연구에 의하면 pentacyclic terpene에 glycoside기가 존재하는 경우 유리 aglycone과 효력이 유사하게 나타났고(Bonte *et al.*, 1994), OH기는 keratin과의 결합 또는 피부와의 상호작용에 의해서 흡수를 저해하였다. AS2-006A에서는 OH기 또는 COOH기를 alkoxyalkyl ester형으로 차폐하여 피부의 국소흡수가 용이할 것으로 생각된다.

도출된 AS2-006A는 기존의 추출혼합물인 마데카솔에 비하여 상처치유기간이 짧고 상처부위가 강하게 접합이 되고 특히 상처치유의 상흔이 적게 남아 창상치료제로서 개발가능성이 높다. AS2-006A는 fibroblast human skin cell line(CCD-98sk) 및 mouse skin에서 Collagen I의 생합성을 증가시킨다. 염증세포인 macrophage에서 endotoxin (LPS)에 의하여 발현된 cyclooxygenase-2 및 iNOS의 발현이 AS2-006A를 가한 경우 농도의존적으로 억제되었고 저농도에서 독성없이 염증반응 매개 사이토카인인 IL-1 α , IL-1 β 와 TNF- α 의 생산을 억제하는 것으로 나타나 AS2-006A는 강한 염증 억제작용을 갖는 것으로 보인다(미발표). AS2-006A는 창상치유와 상흔억제작용을 가질 뿐만 아니라 세포보호 또는 사멸효능, 체내 항산화물질의 생성 증가,

β -amyloid로 부터의 뇌세포 보호효능(Mook-Jung *et al.*, 1999) 및 치매치료 효능을 가질 가능성이 있는 것으로 제시되었다(Jew *et al.*, 2000).

AS2-006A를 단위 고용량으로 투여한 후 주요기관의 병리조직학적 소견을 보았을 때 특이한 병소가 관찰되지 않았다. AS2-006A의 유전 독성시험을 한 결과 Salmonella typhimurium TA98 및 TA100을 이용한 복귀돌연변이성 시험에서 돌연변이성을 보이지 않았고, 오히려 유도물질인 7,12-dimethylbenz[a]anthracene에 의한 돌연변이를 억제하는 효과를 보였다. Micronuclei test에서도 유의성 있는 소핵형성을 보이지 않아 유전독성학적으로도 안전하였다(미발표).

본 연구에서는 AS2-006A gel에 의하여 발생할 수 있는 일반약리작용에 관한 시험을 실시하였다. AS2-006A는 일반증상 및 행동, 수면증강, 경련유발, 정상체온 및 자발운동을 일으키지 않아 중추신경계에 미치는 작용은 없으므로 사료된다. 또한 혈압, 심박수의 변화를 본 순환기계 효과, 뇨량, 전해질 배설의 변화를 관찰항목으로 하는 비뇨기계효과 및 장관수송능, 위 십이지장의 점막자극과 같은 소화기계에 미치는 특기할 만한 효과를 보이지 않았다. 따라서 AS2-006A gel을 국소로 도포할 때에는 부작용이 나타나지 않을 것으로 본다. 이러한 결과의 주된 원인은 국소도포에 의해서 혈중으로 이동되는 약물의 양이 극히 적은데 기인하는 것으로 본다(미발표; Rush, 1993).

한편 *in vitro* 시험의 경우, 적출한 회장 및 기관표본에 AS2-006A를 적용하였을 때에 적용한 모든 용량범위(10⁻⁹~10⁻⁵M)에서 평활근 수축반응이 일어나지 않아 회장과 기관지 평활근의 수축효능은 거의 없었다. *In vitro*로 관찰한 기니픽 심장표본의 현수시험에서 AS2-006A는 10⁻⁵M의 고농도에서만 심박수를 약하게 증가시켰으나, *in vivo*의 gel 도포시험에서는 최고용량을 투여한 동물군(2000 mg/kg)은 기체(2000 mg/kg)만을 적용한 동물군에서의 효과와 비교할 때 5시간 동안 심박수에 전혀 변화를 일으키지 않았다. 따라서 본 약물은 랫트나 기니픽에서 종차에 관계없이 전신흡수가 거의 일어나지 않는 것으로 보인다. 이러한 시험결과를 종합할 때, 국소외용제인 AS2-006A gel은 창상효과를 기대하는 임상적용 용량의 범위 내에서 전신적 부작용을 나타내지 않을 것으로 예측한다.

참고문헌

- Bonte, F., Dumas, M., candagne, G. and Meybeck, A. (1994): Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.*, **60**, 133-135.
- Irwin, J.E. (1968): Widen your horizons. *Can Nurse.*, **64**(7), 41-42.

- Lawrence, J.C. (1967): The effect of asiaticoside on guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.*, **49**(1), 95-96.
- Liu, J., Liu, Y., Mao, Q. and Klaassen, C.D. (1994): The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fund. Appl. Toxicol.*, **22**, 34-40.
- Maquart, F.X., Bellon, G., Gillery, P., Wegrowski, Y. and Borel, J.P. (1990): Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect. Tissue Res.*, **24**(2), 107-120.
- Maquart, F.X., Chastang, F., Simeon, A., Birembaut, P., Gillery, P. and Wegrowski, Y. (1999): Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. *Eur. J. Dermatol.*, **9**(4), 289-296.
- Mook-Jung I., Shin, J.E., Yun, S.H., Hur, K., Koh, J.Y., Park, H.K., Jew, S.-S. and Jung, M.W. (1999): Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.*, **58**(3), 417-425.
- Rosen, H., Blumenthal, A. and McCallum, J. (1967): Effect of asiaticoside on wound healing in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**(1), 279-280.
- Rush, W.R., Murray, G.R. and Graham, D.J. (1993): The comparative steady-state bioavailability of the active ingredients of Madecassol. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **18**(4), 323-326.
- Shim, P.-J., Park, J.-H., Chang, M.-S., Lim, M.-J., Kim, D.-H., Jung, Y.H., Jew, S.-S., Park, E.H. and Kim, H.-D. (1996): Asiaticoside mimetics as wound healing agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2937-2940.
- Jew, S.-S., Yoo, C.-H., Lim, D.-Y., Kim, H.M., Mook-Jung, I., Jung, M.H., Choi, H.S., Jung, Y.-H., Kim, H.D. and Park H.-G. (2000): Structure-activity relationship study of Asiatic acid derivatives against beta amyloid (A β)-induced neurotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 199-121.
- Sung, T.V., Lavaud, C., Porzel, A., Steglich, W. and Adam, G. (1992): Triterpenoids and their glycosides from the bark of *Schefflera octophylla*. *Phytochemistry* **31**(1), 227-231.
- Verma, A. and Kulkarni, S.K. (1992): D1/D2 dopamine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor participation in experimental catalepsy in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **109**(4), 477-83.