

Daidzein의 抗炎作用과 그 作用機轉에 관한 研究(II)

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, Chuncheon 200, Korea.

Abstract—The anti-inflammatory mechanism of daidzein was investigated in rats and mice. Daidzein and 4'-methyldaidzein inhibited capillary permeability and lipid peroxidation. Daidzein inhibited growth of granuloma when it was administered into the carrageenin pouch at the low dose, while it acted contrarily at the high dose. Daidzein decreased the antiinflammatory effect in adrenalectomized rat, depleted ascorbic acid and cholesterol contents in adrenals, and increased corticosterone level in plasma, suggesting daidzein acts on the hypophysisadrenal system.

Flavonoids의 抗炎 作用 기전과 관련되어 보
고된 生理 活性을 살펴보면, hyaluronidase, cyclic
AMP phosphodiesterase의 효소 活性 抑制이며¹⁾,
Cu²⁺에 대한 강한 親和性을 갖고 있다.²⁾ 또 一部의
化合物이 mast cell의 탈과립 抑制 活性을 갖고³⁻⁴⁾
lipoxygenase 活性의 抑制⁵⁾, leukocyte function⁶⁾
에의 作用, 혈소판 응집 活性의 抑制⁷⁾ 등이 있다.

이에 비해 isoflavonoids는 구조적으로 flavonoids
와 관련이 되나 재배열된 C₁₅골격을 가지고
flavonoids와는 달리 구별되며, 3-phenylchroman
의 誘導體로서 간주된다.⁸⁾ 研究 등은 前報에서
daidzein 및 그 誘導體의 抗炎作用을 검토한 結
果 daidzein의 抗炎效果을 관찰하였다.

항염 작용의 기전과 관련하여 daidzein의 mic-
rosomal lipid peroxidation 억제 작용이 報告되어
있고⁹⁾, 부신에서의 lipid peroxidation은 ascorbic
acid 및 Fe²⁺의 농도 의존적으로 촉진되며, 이런
작용의 增加가 부신 cytochrome p-450의존성
steroid hydroxylase의 活性을 감소시키는 것으로
보고 되어 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 따라서 lipid peroxidation
은 부신에서 steroidogenic enzymes 活性에 관여
하는 것으로 알려져 있다. 또한 내인성 cyclic-

AMP의 增加가 부신에서 ACTH 作用을 媒介하
는 것으로 시사되고 있다.¹⁴⁾

He 등¹⁵⁾에 의하면 daidzein은 cyclic AMP
phosphodiesterase IC₅₀가 대뇌에서는 50μM이며,
심근에서는 43μM로 強力한 活性을 나타낸 이 報
告되어 있다.

以上과 같은 보고를 基礎로 하여 抗炎作用 기
전을 규명하고 증식형 炎症에 對한 效果를 研究
검토한 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 보고코
자 한다.

實 驗 方 法

器機—UV-Spectrophotometer는 Hitachi model
200-20을 Fluorospectrophotometer는 shimadzu
RF-510을 사용하였으며, Touch Mixer, Potter-
Elvehjem homogenizer 및 Autoclave 등을 사용
하였다.

試藥 및 試料—시약은 一級試藥을 사용하였으
며, methylene chloride는 형광성 물질을 제거하
기 爲해 一級試藥을 silica gel(column 5.0×125
cm)을 통과한 것을 사용하였다.

또한 daidzein, 4'-methyldaidzein 및 dimethyldaidzein은 前報에서 합성한 것을 사용하였다.

Mouse에 經口投與—Daidzein, 4'-methyldaidzein, dimethyldaidzein을 각각 일정량 取하여 尤발에 넣고 tween 80소량 및 蒸溜水를 加해 尤발으로 갈아 完全히 分쇄한後 同量의 1% CMC 용액을 加해 全質이 均等하게 만들어 投與量에 관계없이 5ml/kg으로 하여 투여하였다.

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

Carrageenin pouch 內로 투여—Daidzein을 투여량에 관계없이 0.5% CMC 생리식염수액에 懸탁하여 0.1ml/pouch되게 하여 每 12시간 마다 pouch內로 注入하였다.

實驗動物—실험용 rat(Sprague-Dawley系)를 一定한 實驗室에서 同一한 條件으로 2週以上 飼育시킨 것中 100~200g의 雄性을 한군에 6마리씩 使用하였으며, carrageenin pouch法에 사용한 동물은 체중 100~130g으로 제한하였다. 또한 mouse는 20~30g의 ddy系 雄性을 한군에 6마리씩 使用하였다.

色素漏出 抑制作用—Whittle¹⁶⁾의 方法에 따라 으며 누출된 색소를 spectrophotometer로 파장 590nm에서 吸光度를 測定하여 對照群과 比較하여 抑制率을 算出하였다. 색소량은 mouse의 $\mu\text{g}/20\text{g}$ 으로 표시하였다.

抗酸化 活性에 미치는 影響

實驗方法—Han¹⁷⁾ 등의 方法에 따라 체중 20~25g의 雄性 mouse에 被檢藥物을 1日 1回 2日間 經口投與하고, 2回 投與 前에는 사료와 물을 充分히 공급하였으며, 2回 투여후 사료공급을 중단하고 3時間 後에 20g 체중당 50% ethanol 0.3ml씩을 투여하였다. Ethanol 투여후 12시간 동안 사료공급을 중단한 후 즉시 動物을 脛髓切斷하여 죽인 다음 腹開하여 肝을 摘出하였다.

肝 組織中에서의 過酸化脂質 定量—Nakamura 等¹⁸⁾의 thiobarbituric acid(TBA)法을 利用하였다. 즉 摘出된 肝을 氷冷 生理食鹽液으로 씻어 신속히 평량하고 肝 重量의 5배 용량에 해당하는 M/20 인산염 완충액(pH 7.4)을 가한 후 10

육중 Potter-Elvehjem homogenizer에서 3分間 均質化하였다.

Carrageenin pouch法에 의한 肉芽腫形成抑制作用¹⁹⁾

實驗方法—체중 120~150g의 雄性 rat의 背部 皮下에 공기 5ml를 주입하여 공기낭(air sac)을 만든다. 24시간 후 공기낭 속에 하루 전날 만들어 놓은 2% carrageenin용액 4ml를 주입하였다. 주입후 5日後에 5口 對照群을 경수 절단하여 죽인 다음 肉芽腫을 떼어 wet granuloma의 重量을 測定하였다. 被檢藥物群은 5日부터 8日까지 每12時間마다 투여하고 6日 및 7日에 尿를 採取하여 尿中 L-hydroxyproline을 定量하였으며, 9日째에 경수 절단하여 肉芽腫을 떼내어 wet granuloma의 重量을 測定하였다. 肉芽腫中 collagen은 肉芽腫을 증류수 10ml 및 5ml씩 2回에 걸쳐 autoclaving하여 gelatin으로서 추출하였다.

肉芽腫中 L-hydroxyproline 定量—Woessner²⁰⁾ 등의 方法에 따라 肉芽腫 추출액 1ml를 取해 마개 달린 pyrex test tube에 넣고 C-HCl 1.2ml를 加한 다음 마개를 닫고 130°C에서 3시간 가수분해한 다음 0.05M-chloramine T용액, 3.15M-perchloric acid용액, 20%p-dimethyl aminobenzaldehyde methyl cellosolve용액을 加해 발색후 spectrophotometer 557nm에서 吸光度를 測定하여 檢量線으로부터 L-hydroxyproline量을 산출하였다.

尿中 L-hydroxyproline 定量—Kirivikko 등²¹⁾의 方法에 따라 Urine 1.0ml를 마개달린 pyrex test tubes에 가하고 C-HCl 1.0ml를 加해 완전히 마개를 막은 다음 100°C water bath에서 12시간 가수분해하고 Ehrlich's reagent 1.0ml로 발색한후 spectrophotometer 560nm에서 吸光度를 測定하고 檢量線으로 부터 L-hydroxyproline 量을 산출하였다.

副腎摘出 rat에서의 carrageenin 부종억제작용²²⁾—체중 150~200g의 雄性 rat를 사용하였다. pentobarbital sodium(40mg/kg, I.P.)을 투여하여 마취시킨 다음 中央部正中線을 따라 피부를 切開하고 양쪽 副腎을 적출한지 4日後에 carrageenin誘發浮腫抑制 效果를 觀察하였다. 따라서

sham test도 하여 副腎摘出 rat와 비교하였다. 부신적출 rat는 수술직후 식수로 0.9% 食鹽液을 공급하였다.

副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol에 미치는 影響—150~200g의 雄性 rat에 daidzein 100 mg 및 200mg/kg을 경구투여한 다음 2時間後에 ascorbic acid를 4시간 후에 cholesterol량을 測定하였다. 또 daidzein 200mg/kg을 복강내로 투여한 다음 2 및 4시간후에 후두부를 강타 치사시키고 개복하여 부신을 적출하여 副腎中 ascorbic acid는 2,4-dinitrophenylhydrazin으로, cholesterol은 color reagent(FeCl₃(1→10) C-H₃PO₄용액 1.0ml에 C-H₂SO₄를 가해 100ml로 함)로 발색후 정량하였다.²³⁾

血中 corticosterone에 미치는 영향—150~200

g의 雄性 rat에 복강내로 daidzein 200mg/kg을 투여한 다음 2,4시간 後에 後頭部를 강타하여 치사시킨 후 開腹하고 heparin처리 血液을 取해 血漿中 corticosterone을 精製한 methylene chloride로 추출후 fluorescence reagent(ethanol 25ml에 C-H₂SO₄ 75ml를 가해 만듦)를 가해 발색후 水層(acid lager)을 取해 spectrofluorometer Ex. 475nm, Em 520nm에서 fluorescence를 測定하고²⁴⁾ standard curve에 의해 corticosterone량을 산출하였다.

結果 및 考察

Daidzein 및 그 methyl誘導體의 色素漏出抑制效果—aspirin과 같은 非-steroid性 抗炎症藥의

Table I—Inhibitory activity of daidzein and its methyl derivatives on capillary permeability in mice.

Drug	Dose mg/kg, p.o.	No. of Animals	P.S.B. # (μ g/animal)	Inhibition (%)
Control	—	6	133.7 ± 16.9 ⁺	—
Aspirin	100	6	57.7 ± 14.4**	56.8
Daidzein	100	6	77.3 ± 11.9*	42.2
Daidzein	200	6	75.9 ± 9.6*	43.2
4'-Methyl daidzein	200	6	68.8 ± 21.8*	48.5
Dimethyl daidzein	200	6	98.8 ± 7.8	26.1

⁺ : mean values ± S.E.

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

: Pontamine sky blue

Table II—Antioxidant effect of daidzein and its methyl derivatives on ethanol intoxicated mice.

Drugs	Dose mg/kg/day	No. of Animals	TBA index(A ₅₃₂)	Antioxidant effect value
Normal control	—	6	0.250 ± 0.027 ⁺	—
Control	—	6	0.543 ± 0.066 [#]	—
Tocopherol	50	6	0.327 ± 0.022**	0.26
Daidzein	50	6	0.484 ± 0.071	0.80
Daidzein	100	6	0.403 ± 0.032*	0.52
Daidzein	200	6	0.371 ± 0.034*	0.41
4'-Methyl daidzein	200	6	0.332 ± 0.020**	0.28
Dimethyl daidzein	200	6	0.425 ± 0.043	0.60

⁺ : mean values ± S.E.

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

Significantly deviated from normal control; [#]p < 0.01

$$\text{Antioxidant effect value} = \frac{A_{532S} - A_{532B}}{A_{532E} - A_{532B}}$$

A₅₃₂S : Drug treatment A₅₃₂B : Normal control A₅₃₂E : Ethanol intoxication

대부분은 정도의 差異는 있지만 혈관 투과성을 抑制한다. Daidzein 및 그 methyl유도체의 혈관 투과성 억제에 의한 抗炎作用을 觀察하기 위해 色素漏出 實驗을 한 結果는 Table I과 같다. Daidzein 100mg 및 200mg/kg 經口投與로 色素漏出量이 각각 77.3 및 75.9 μ g/animal로 대조군에 비해 有意性있게 抑制되었으며 대조군에 대한 抑制率로 환산하면 48.5% 및 26.1%였고 이 혈관투과성 억제가 daidzein 및 4'-methyl daidzein의 抗炎效果에 일부 기여할 것으로 사려된다.

Daidzein 및 그 methyl誘導體가 抗酸化活性에 미치는 效果—抗炎效果를 가지고 있는 phenol性的 MK-447의 경우 抗炎作用이 抗酸化 活性, 즉 lipid peroxidation 抑制에 의함을 보고한 바 있다.²⁵⁻²⁶⁾ 抗酸化 活性의 in vitro 실험 방법은 여러가지가 있으며, 이미 daidzein도 검토된 바 있으므로 著者는 in vivo에서 抗酸化 活性을 검토하였다. 그 結果는 Table II와 같다.

Daidzein 50, 100, 200mg/kg 經口投與로 용량의존적으로 lipid peroxidation이 억제되며 抗酸化 效果値는 각각 0.80, 0.52 및 0.41이었고, 이들中 daidzein 100mg 및 200mg/kg에서 有意性을 나타냈다. 또 4'-methyl daidzein 및 dimethyl daidzein 200mg/kg 투여군에서는 각각 0.28 및 0.60으로 4'-methyl daidzein의 경우 daidzein보다 더 큰 抗酸化 效果値를 나타냈다. 그러나

이들의 抗酸化 效果는 d- α -tocopherol에 비하면 훨씬 약한 것으로 나타났다.

Daidzein이 preformed granuloma에 미치는 效果—一局所部位에서 염증반응이 일어나면 염증국소에 血管擴張, 血管壁의 誘過成抗進, 白血球 및 大食細胞의 浸潤 등이 인식된다. 이런 급성 염증을 參出形炎症이라 부르고 염증국소에 의한 毛細血管의 新生세포의 증식과 더불어 결합조직 matrix의 형성 등을 慢性炎症 즉 增殖形炎症이라 한다. 增殖形炎症의 모델은 여러가지가 있으며 cotton pellet法도 이 염증 모델이나 carrageenin pouch法이 여러가지 장점을 가지고 있으며 이미 형성된 granuloma에 대한 實驗이 많이 보고되어 있다.²⁷⁻³⁰⁾ 前報에서 관찰된 daidzein의 cotton pellet 肉芽腫形成 抑制作用이 steroidogenesis에 의한 蛋白質 合成抑制形인지 CaEDTA 및 progesterone과 같은 蛋白質 分解促進形이 관여하는지를 확인하고 前報에서 관찰된 CMC pouch model에서의 단백질 침출 촉진현상을 규명하기 위하여 實驗을 한 結果는 Table III와 같다.

Carrageenin 注入後 5日에 19.76g의 肉芽腫이 형성되었으며, 囊은 형성되지 않아 exudate volume은 측정하지 못했다. 9日 대조군의 경우 16.76g으로 5日 대조군보다 肉芽腫이 작아졌으며, 尿中の hydroxyproline量이 9日 대조군에서

Table III—Effect of daidzein locally injected every 12hr from day 5 to day 8 on a pre-existing carrageenin granuloma.

Drugs	Dose mg/pouch/12hrs	No. of Animals	Granulomatous tissue (g wet wt.)	Total hydroxyproline of entire granuloma (mg)	Hydroxyproline (mg/g wet wt.)	Hydroxyproline (μ g/ml urine)
5-control	—	6	19.76 \pm 1.93 ⁺	4.65 \pm 0.09	0.24	138.42 \pm 7.05
9-control	—	6	16.76 \pm 1.33	3.65 \pm 0.07 ^{**}	0.22	228.62 \pm 17.77 [*]
Hydrocortisone	1	6	8.30 \pm 0.65 ^{**} (50.5) [†]	2.25 \pm 0.18 ^{**} (38.4)	0.27	145.42 \pm 13.46 [*] (36.4)
Daidzein	10	6	14.60 \pm 2.59 (12.9)	3.11 \pm 0.13 ^{**} (14.8)	0.21	196.42 \pm 41.24 (14.1)
Daidzein	50	6	18.03 \pm 1.03 (-7.6)	3.53 \pm 0.08 (3.3)	0.20	175.53 \pm 8.57 [*] (23.2)

[†] : mean values \pm S.E.

^{*} : percent of inhibition

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

Significantly deviated from 5-control : *p<0.05, **p<0.01

增加되는 것으로 보아 5일이후 肉芽腫이 自體分解에 의해 collagen의 배설이 증가되는 것을 알 수 있었다. Hydrocortisone 1mg/pouch를 每 12시간마다 投與한 群에서는 肉芽腫이 8.30g으로 9日 대조군에 비해 有意性있게 억제되었으며, 억제율로 환산하면 50.5%였다. 또한 daidzein 10mg/pouch를 每 12시간 마다 투여한 群에서는 肉芽腫이 14.60g으로 有意性은 없으나 9日 대조군에 비해 12.9% 抑制되었으며 daidzein 50 mg/pouch를 같은 방법으로 투여한 群에서 18.03 g으로 9日 대조군에 비해 有意性은 없었으나 促進되었다. 이 현상은 CMC Pouch에서의 蛋白質浸出과 유사한 結果로 나타났다. 그러나 尿中の hydroxyproline量은 被檢藥物 投與群 모두에서 9日 대조군에 비해 억제되었고, 이 억제는 用量依存性을 나타내며 daidzein 50mg/pouch 投與群에서는 175.53 μ g/ml로 9日 대조군에 비해 23.2% 억제되어 有意性있는 抑制 效果를 나타냈다. Anti-inflammatory steroid는 collagen 및 non-collagen의 合成과 collagen分解를 억제하므로서 resorbed tissue의 wet weight g당 높은 collagen 함량을 나타낸다. 반면 分解 促進形인 Ca EDTA 및 progesterone은 오직 non-collagen protein의 分解를 증가시킨다.³¹⁻³²⁾ 尿中 hydroxyproline量의 結果로 부터 daidzein 및 hydrocortisone이 collagen 分解를 억제시키는 것은 확실하며, daidzein 50mg/pouch 투여시 尿中으로의 分解는 daidzein 10mg/pouch 투여시 보다 적으나 肉芽

腫 腫量은 반대현상을 나타냈다. 이것은 아마도 몇개의 flavonoids에서 이미 보고된³³⁻³⁴⁾ 바 있는 proline의 hydroxylation, 즉 collagen cross linking 을 촉진하는 것으로 추측이 된다. Collagen이 cross linking이 되면 고분자화 되면서 non collagen protein이 되므로 gelatin으로서 추출이 되지 않기 때문에 granuloma tissue gram당 hydroxyproline이 감소되며 또한 尿中으로의 collagen분해도 억제되는 것으로 사려된다.

Daidzein의 副腎摘出 rat에서의 carrageenin 浮腫 抑制效果—Carrageenin과 arachidonic acid 混合起炎에 대한 影響으로 부터 이들에 대한 抗 炎관여로 보기에는 효과가 약하며, 특히 daidzein 의 경우 副腎에의 作用이 豫見되어 副腎摘出 rat에서 부종 억제작용을 검토한 結果는 Table IV와 같다.

위 結果로 부터 sham rat에 daidzein 200mg/kg 을 經口投與한 結果 起炎劑 주사後 1시간 부터 3시간까지 有意性있게 부종 억제효과를 나타냈 으며 4시간 및 5시간 後에도 有意性은 없으나 억제효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 副腎摘出 rat에서는 daidzein 200mg/kg 投與로 기염劑 주 사 1시간 및 2시간에는 有意性있게 억제되었으나 3시간 이후 부터는 sham rat의 daidzein 투여 군보다 덜 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 結果로 부터 daidzein은 carrageenin부종 phase I 에서는 副腎에 관계없이 抑制를 일으키나 phase II에서는 副腎에 의한 作用을 관찰할 수 있었다.

Table IV—Anti-inflammatory activity of daidzein on carrageenin induced edema of the adrenalectomized rat paw at each time.

Treatment	Drug	Dose mg/kg, p.o.	No. of Animal	Time (hours)				
				1	2	3	4	5
Sham-Operation	Control	—	6	38.8 \pm 6.6 ⁺	41.4 \pm 6.9	47.6 \pm 6.0	51.8 \pm 9.7	52.8 \pm 8.8
	Daidzein	200	6	24.7 \pm 2.4* (37.6%) [#]	25.3 \pm 2.5* (38.4%)	29.0 \pm 3.6* (39.1%)	37.3 \pm 5.6 (28.0%)	39.0 \pm 6.4 (26.1%)
Adrenalectomy	Control	—	6	37.3 \pm 3.6	39.6 \pm 6.4	49.9 \pm 10.6	51.7 \pm 7.2	50.9 \pm 7.7
	Daidzein	200	6	15.3 \pm 3.2* (59.0%)	23.0 \pm 4.2* (41.9%)	37.7 \pm 6.1 (24.0%)	50.3 \pm 7.3 (2.7%)	46.8 \pm 5.2 (8.1%)

⁺ : mean values \pm S.E.

[#] : percent of inhibition

Significantly deviated from control; *p<0.05

Table V—Effect of daidzein on ascorbic acid and cholesterol level in rat adrenals.

Drug	Dose mg/kg, p.o.	No. of Animals	Ascorbic acid (mg/100g wet tissue)	Cholesterol (mg/100g wet tissue)
Control	—	6	3.41±0.19 ⁺	21.60±0.50
Daidzein	100	6	3.34±0.44 (2.1) [#]	19.42±1.63 (10.1)
Daidzein	200	6	3.14±0.20 (7.9)	20.04±1.95 (7.2)

+ : mean values ±S.E.

: percent of inhibition

이 경우 carrageenin 誘發浮腫에서 phase I 은 serotonin 및 histamine의 관여가 아니고 bradykinin의 관여로 알려져 있으며³⁵⁾, free radical scavenger인 benzoic acid가 bradykinin 및 kallikrein 誘發浮腫을 현저히 억제시키는 것으로 보아³⁶⁾ daidzein 經口投與에 의한 phase I 부종 억제 작용은 antibradykinin으로 추측이 된다.

Daidzein이 副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol에 미치는 效果

① 經口投與—腦下垂體-副腎系の 기능에 대한 실험으로 副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol量을 측정하여 고갈되면 腦下垂體-副腎系の 작용으로 생각할 수 있다. 즉 正常時 副腎에서는 ascorbic acid가 皮質 steroid의 合成을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 그래서 daidzein 100mg 및 200 mg/kg을 經口投與하고 2시간 후에는 副腎中 ascorbic acid를 4시간 후에는 cholesterol을 각각 측정하였다. 그 결과는 Table V과 같다.

副腎中 ascorbic acid는 Fe⁺ 및 Fe[#]와 함께 副腎에서의 lipid peroxidation을 농도의존적으로 촉진하며, 이것이 또한 steroidogenesis와 관련이 있음이 보고 되었다.¹³⁾ Wilson 등³⁷⁾은 flavonoid인 hesperidin이 다량 함유된 orange peel 추출물이 副腎中 ascorbic acid량을 유의성있게 增加시킴을 보고 하였다. 그러나 daidzein 100mg 및 200mg/kg 투여로 藥物投與 2시간 후에 副腎中 ascorbic acid가 有意性은 없으나 각각 2.1% 및 7.9%의 억제율을 나타냈고 cholesterol도 藥物투여 4시간 후에 有意性은 없으나 각각 10.1% 및 7.2%의 억제율을 나타낸 것으로 보아 副腎에의 作用이 推定되나 有意性이 없었으므로 daidzein 200mg/kg을 腹腔內 投與하여 副腎中 ascorbic

Table VI—Effect on ascorbic acid and cholesterol level in rat adrenals after intraperitoneal administration of daidzein 200mg/kg.

Time (hours)	No. of Animals	Ascorbic acid (mg/100g wet tissue)	Cholesterol (mg/100g wet tissue)
Control	6	3.43±0.23 ⁺	20.5±2.00
2	6	2.61±0.52 (23.9) [#]	26.5±2.62 (-29.3)
4	6	1.99±0.11** (42.0)	13.9±1.18* (32.2)

+ : mean values±S.E.

: percent of inhibition

Significantly deviated from control;

*p<0.05, **p<0.01

acid 및 cholesterol量을 측정하였다.

② 腹腔內 投與—Daidzein 200mg/kg 투여 후 2시간 및 4시간 후에 副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol의 作用을 확인한 결과는 Table VI와 같다.

Ascorbic acid의 경우 藥物 투여 2시간 및 4시간 후에 각각 2.61mg 및 1.99mg/100g wet tissue 이었으며, 대조군에 비해 각각 23.9% 및 42.0%로 유의성있게 억제되었다. 또 cholesterol의 경우는 藥物 투여 2시간 후에는 26.5mg/100g wet tissue으로 대조군에 비해 29.3% 증가되었으나, 4시간 후에는 13.9mg/100g wet tissue으로 대조군에 비해 32.2%로 有意性있게 억제되었다. 이 결과로부터 daidzein의 투여로 副腎 ascorbic acid의 감소가 일어나 daidzein에 의한 腦下垂體-副腎系の 活性化가 推定된다.

Daidzein이 血中 corticosterone에 미치는 效果—腦下垂體-副腎機能에 대한 作用의 間接적인 지표로 副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol을 測

Table VII-Effect on corticosterone level in rat plasma after intraperitoneal administration of daidzein 200mg/kg.

Time (hours)	No. of Animals	Corticosterone ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Change (%)
Control	6	29.4 \pm 3.0 ⁺	—
2 hrs	6	39.2 \pm 4.3*	33.3
4 hrs	6	26.4 \pm 2.1	-10.2

⁺ : mean values \pm S.E.

Significantly deviated from control; * p <0.05

定한 結果 관련성이 推定되었으므로 daidzein 200 mg/kg 腹腔內投與時 血中 corticosterone의 經時 變化를 관찰한 結果는 Table VII과 같다.

위 結果에서 보는 바와 같이 藥物 投與後 2시간에 39.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 대조군 29.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 에 비해 33.3% 촉진되었으며, 4시간 후에는 26.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 대조군에 비해 有意性은 없었으나 10.2% 억제 효과를 나타냈다. Tamura 등³⁸⁾에 의하면 腦下垂體-副腎機能에 영향을 미치는 것으로 알려진 sodium salicylate의 경우 rat에 200mg/kg 腹腔內投與로 副腎中의 ascorbic acid는 48.3% 억제되었으며, 100mg/kg 腹腔內投與로 血中 corticosterone에는 전혀 영향을 미치지 못했다. 이상의 結果로 부터 daidzein의 腦下垂體-副腎系의 活性化를 더욱 확인할 수 있었다.

結 論

1. daidzein의 抗酸化 活性 및 혈관 투과성 억제 효과는 구조중 2개의 hydroxyl기 하나 치환으로는 活性 差異가 없고 두개 치환時는 效果가 減少되었으며, 이 效果가 抗炎 效果에 關여하는 것으로 사려된다.

2. 副腎 摘出 rat炎症 實驗 model에서 daidzein 投與로 phase II에서 抗炎症效果가 示되되며, 副腎中 ascorbic acid 및 cholesterol의 高갈과 血中 corticosterone의 상승으로 부터 腦下垂體-副腎系에 의한 抗炎效果를 알 수 있었다.

3. Steroid性 抗炎劑의 藥效 검정 실험 model인 carrageenin pouch法으로 daidzein의 抗炎作用을 觀察한 結果 낮은 용량에서는 肉芽腫은 억

제되나, 높은 용량에서는 촉진되는 것으로 보아 단백질 分解 抑制의 다른 기전이 추정된다.

文 獻

- Havsteen, B.; Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141(1983).
- Thompson, M., Williams, C.R. and Elliot, G.E.P.; Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.* **85**, 375(1976).
- Fewtrell, C.M.S. and Gomperts, B.D.; Effect of flavone inhibitors of transport ASPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* **265**, 635(1977).
- Bronner, C. and Landry, Y.; Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cell. *Agents and Actions* **16**, 147(1985).
- Sekiya, K. and Okuda, H.; Selective inhibition of platelet lipoxigenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1090(1982).
- 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).
- Landolfi, R., Mower, R.L. and Steiner, M.; Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1525(1984).
- Dewick, D.M.; Isoflavonoids. The Flavonoids, Chapman & Hall, New York, 535(1982).
- Jha, H.C., Recklinghausen, G.V. and Zilliken, F.; Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1367(1985).
- Kitabchi, A.E.; Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature* **215**, 1385(1967).
- Shimizu, K.; Effects of ascorbic acid on the side chain cleavage of cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* **210**, 333(1970).
- Wang, H.P. and Kimura, T.; Ferrous ion-media-

- ted cytochrome p-450 degradation and lipid peroxidation in adrenal cortex mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **423**, 374(1976).
- 13) Brogan, W.C., Miles, P.R. and Colby, H.D.; Factors affecting lipid peroxidation in guinea-pig adrenal microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **663**, 230(1981).
- 14) He, S., Wei, M., Li, R., He, Y. Zhang, R., Chen, Y., Yue, B. and Lu, Y.; Study on the inhibitory effect of flavonoids in some traditional chinese medicines on phosphodiesterase. *Beijing Yixueyuan Xuebao* **14**, 253(1982).
- 15) Dasgupta, A., Chaudhury, K.R., Dasgupta, T. and Roy, P.R.; Effects of PG F_{2α} and stress on the level of ascorbic acid, total lipid and cholesterol in rat adrenal gland. *Indian J. Exp. Biol.* **14**, 479(1976).
- 16) Whittle, B.A.; The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**, 246(1964).
- 17) Han, B.H., Yoo, S.Y., Park, M.W. and Lee, H.J.; Antioxidant activity screening on crude drugs. *Kor. J. Pharmacog.* **10**(3), 108(1979).
- 18) Masugi, F. and Nakamura, T.; Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamin* **51**, 21(1977).
- 19) Fukuhara, M. and Tsurufuji, S.; The effect of locally injected antiinflammatory drugs on the carrageenin granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 475(1969).
- 20) Woessner, J.F.; The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440(1961).
- 21) Kivirikko, K.I., Laitinen, O. and Prockop, D.J.; Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Chem.* **19**, 249(1967).
- 22) Arichi, S., Kubo, M., Tani, T., Nakamura, H., Motoyoshi, S., Ishii, K., Imazu, C., seto, Y., Kadokawa, T., Nagamoto, N., Nanba, K. and Nishimura, H.; Studies on persicae semen II, *Yakugaku Zasshi* **105**, 886(1985).
- 23) Yochim, J.M., McCarthy, J.L. and Sanborn, R.C.; The adrenal corticoids. Experimental Endocrinology, Academic press, New York, 177(1964).
- 24) Nicholson, W.E. and Peytremann, A.; The rat adrenal in situ. Methods in Enzymology **39**, 336 (1975).
- 25) Harada, Y., Tanaka, K. and Katori, M.; Dual effects of a basic anti-inflammatory agent, 2-aminomethyl-4-t-butyl-6-iodophenol hydrochloride, on biosynthesis of prostaglandin endoperoxides. *Japan. J. Pharmacol.* **30**, 544(1980).
- 26) Hirafuji, M. and Ogura, Y.; Lipid peroxidation modifies the effect of phenolic anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmac.* **34**, 933(1985).
- 27) Nakagawa, H., Min, K.R., Nanjo, K. and Tsurufuji, S.; Anti-inflammatory action of progesterone on carrageenin-induced inflammation in rats. *Japan J. Pharmacol.* **29**, 509(1979).
- 28) Nakagawa, H., Shuto, K., Nanjo, K. and Tsurufuji, S.; Influence of Ca EDTA on the metabolism of collagen and noncollagen proteins of carrageenin granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1979(1978).
- 29) Ohno, T., Ishibashi, S. and Tsurufuji, S.; Mode of action of glucocorticoid on the component change and DNA turnover of rat carrageenin granuloma. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 1057(1972).
- 30) Nakagawa, H., Fukuhara, M. and Tsurufuji, S.; Effect of a single injection of betamethasone disodium phosphate on the synthesis of collagen and noncollagen protein of carrageenin granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2253(1971).
- 31) Nakagawa, H.; Regulation of chronic proliferative inflammation by anti-inflammatory drugs. *Yakugaku Zasshi* **102**, 221(1982).
- 32) Nakagawa, H. and Tsurufuji, S.; Action of betamethasone disodium phosphate on the metabolism of collagen and noncollagen protein in rat carrageenin granuloma. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 839 (1972).
- 33) Rao, C.N., Rao, V.H. and Steinmann, B.; Influence of bioflavonoids on the collagen metabolism

- in rats with adjuvant induced arthritis, *Ital. J. Biochem.* **30**, 54(1981).
- 34) Ronziere, M.C., Herbage, D., Garrone, R. and Frey, J.; Influence of some flavonoids on reticulation of collagen fibrils in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1771(1981).
- 35) 津田恭介, 野上壽: 抗炎症薬, 薬效の評価(1), 地人書館, 東京, 239(1971).
- 36) 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).
- 37) Wilson, H.K., Price-Jones, C. and Hughes, R.E.; The influence of an extract of orange peel on the growth and ascorbic acid metabolism of young guinea-pigs. *J. Sci. Fd Agric.* **27**, 661(1976).
- 38) Tamura, S.; Mechanism of anti-inflammatory action of 5-aminoethyl salicylic acid. *Yakgaku Zasshi.* **97**, 295(1977).