

Phenazine dioxide 유도체가 간 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향

강일영·김상렬·김호식*·허근**

효성여자대학교 약학대학

*효성여자대학교 사범대학 화학과, **영남대학교 약학대학

(Received January 12, 1990)

Effect of Phenazine Dioxide Derivatives on the Hepatic Xanthine Oxidase Activity

Il Young Kang, Sang Yul Kim, Ho Sik Kim* and Keun Huh**

Department of Organic Chemistry, College of Pharmacy, Hyosung Women's University

*Department of Chemistry, Teacher's College, Hyosung Women's University, Hayang 713-900, Korea

**Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 713-749, Korea

Abstract—8-Acyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxides and 8-acyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxides bearing n-butanoyl, n-hexanoyl and n-octanoyl groups were synthesized. It was attempted to observe the effect of phenazine dioxide derivatives on the hepatic xanthine oxidase activity in this study. As the activity of xanthine oxidase, the key enzyme in the generation of superoxide anion radical (O_2^-), was measured in the presence of phenazine dioxide derivatives, the action of 8-acyl-2-hydroxyphenazine-5,10-dioxide derivatives inhibited with increase of numbers of carbon atom bearing 8-acyl group. Moreover, when plotted on double reciprocal form, the V_{max} value decrease as increase of numbers of carbon atom bearing acyl groups without affecting the K_m value. However, the hepatic xanthine oxidase activity was not changed by 8-acyl-2-aminophenazine-5,10-dioxide derivatives.

Keywords: Phenazine dioxide derivatives, hepatic xanthine superoxide anion radical, oxidase.

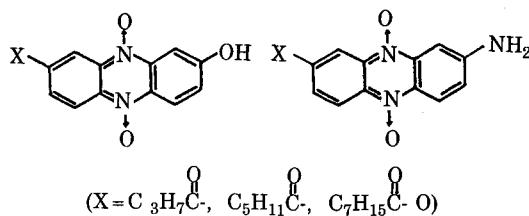
Phenazine 유도체들은 *Pseudomonas* 속 균주의 대사산물로부터 처음 분리된 물질로 항균성을 가진다고 보고¹⁻⁴⁾된 이래 여러 연구자들에 의해 다양한 유도체들이 합성되어 항균작용 뿐만 아니라 고혈압 치료⁵⁾와 제초(Herbicides) 및 제조(algicides)의 목적으로도 사용⁶⁾이 가능하며 항암성도 있다고 보고⁷⁾되고 있어 많은 관심의 대상이 되고 있다.

최근 저자 등도 새로운 phenazine dioxide 유도체를 합성하고 그 항균성을 보고⁸⁾한 바 있다 (Scheme I 참조).

한편 생체내에서의 세균살멸에는 여러 가지 인자가 관여하고 있는 것으로 알려지고 있어 단순한 항균력 실험으로는 그 약효의 판별이 부적당한 결과를

야기시킬 수도 있을 것으로 생각되어진다.

이에 본 연구에서는 체내에서 세균의 살멸에 관여하며, 과잉 생성시 여러 가지 독작용을 유발하는 것으로 알려져 있는 superoxide anion radicals⁹⁾



8-acyl-2-aminophenazine
-5, 10-dioxides

8-acyl-2-hydroxyphenazine
-5, 10-dioxides

Scheme I.—Structure of phenazine dioxide derivatives

에 phenazine dioxide 유도체가 어떠한 영향을 미치는지 검토할 목적으로 superoxide anion radicals 생성효소의 일종인 xanthine oxidase를 정제하고 이의 활성에 미치는 phenazine dioxide 유도체의 영향을 관찰하였다.

실험방법

시약 및 기기—Acetanilide, carbon disulfide, sulfuric acid는 Wako社에서, hydroxyapatite는 Sigma社에서 xanthine sodium salt, uric acid sodium salt는 반정화학社에서 구입하였다.

기기로는 double-beam spectrophotometer (Hitachi model 200-20), ultracentrifuge (Hitachi 70P-72), fraction collector (Korea Manhattan) 등을 사용하였다.

실험동물 및 효소원의 조제—효성여대 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강한 250g 내외의 Sprague-Dawley (SD) 웅성 rat를 사용하였으며 실험동물은 실험전 16시간 동안 절식시켰다. Rat를 ether로 마취시키고 복부 정중선을 따라 개복한 후 0.9% NaCl 용액으로 관류시킨 간장을 적출하였으며, Rowe 등의 방법¹⁰⁾에 준하여 xanthine oxidase를 정제하였다. 즉, 초원심분리, 열처리, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획, acetone분획, 투석 및 hydroxyapatite 유출 등의 과정을 거쳐 정제하였다.

이상의 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 4°C 이하에서 정제하였다.

Xanthine oxidase의 활성측정—Xanthine oxidase의 활성측정은 Stirpe 등의 방법¹¹⁾에 준하여 측정하였다. 즉 0.1M potassium phosphate 완충액 (pH 7.5)에 기질인 xanthine 60 μM 및 효소액을 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰으며 20% trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 반응을 종료시킨 다음 원심분리하여 단백질을 제거하고 반응액 중에 생성된 뇨산을 파장 292nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에 준하여 산출하였다. 효소의 활성도는 1분간에 1mg 단백질이 생성하는 뇨산의 량을 nmole로 표시하였다.

한편 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹²⁾에 의해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

실험결과

Phenazine dioxide 유도체가 간 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향—합성한 phenazine dioxide 유도체를 시험관내에 농도를 달리하면서 첨가하였을 때 xanthine oxidase 활성에 어떤 영향을 미치는가를 검토한 성적이 그림 1 및 2에 나타나 있다.

그림에서 볼 수 있듯이 2번 위치에 hydroxyl기가 치환되어 있는 유도체들인 8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, 8-hexanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide 및 8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide는 첨가농도에 따라서 효소의 활성이 억제되어 시험관내에 8×10^{-7} g/ml 되게 첨가하였을 때는 각각 4.05, 3.51 및 2.97 nmole/mg protein/min으로서 대조치인 5.4 nmole/mg protein/min에 비해 약 25, 35 및 45% 정도 현저히 억제되었으며 이들 물질의 효소활성 억제작용은 acyl기의 탄소원자 수가 많을수록 강하게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 Fig. 2에서 2번 위치에 amino기가 치환되어 있는 유도체들은 시험관내의 첨가농도를 증가시켜도 효소활성에는 별 다른 영향을 미치지 않았다.

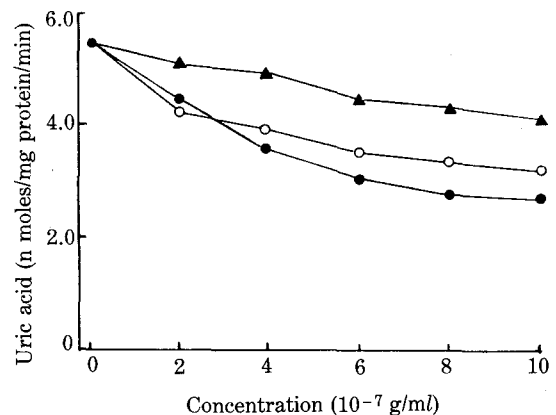


Fig. 1—Effect of phenazine dioxide derivatives on the hepatic cytosolic xanthine oxidase activities *in vitro*.

Each points represent the mean of 3 experiments. ▲; 8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, ○; 8-hexanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, ●; 8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide.

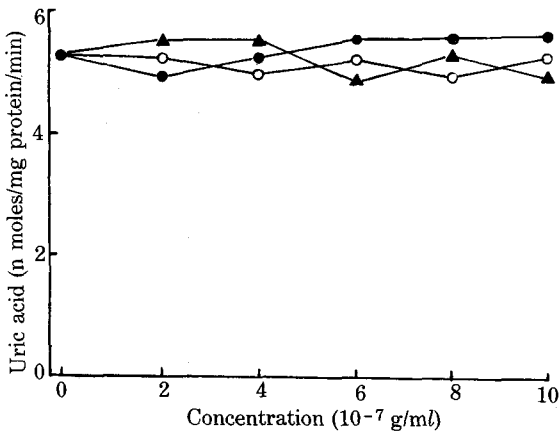


Fig. 2— Effect of phenazine dioxide derivatives on the hepatic cytosolic xanthine oxidase activities *in vitro*.

Each points represent the mean of 3 experiments. ▲ ; 8-butanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide, ○ ; 8-hexanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide, ● ; 8-octanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide.

정제된 xanthine oxidase 활성에 미치는 phenazine dioxide 유도체의 영향—합성 phenazine dioxide 유도체들을 농도별로 시험관내에 첨가하면서 hydroxyapatite column을 통하여 정제된 xanthine oxidase 활성에 어떤 영향을 주는가를 관찰한 성적이 그림 3 및 4에 나타나 있다. 2번 위치에 hydroxyl기가 치환된 유도체인 8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, 8-hexanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide 및 8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide는 시험관내에 첨가농도에 따라 효소활성이 억제되었으며 첨가농도가 8×10^{-7} g/ml 되게 하였을 때는 효소활성이 각각 329.9, 289.4 및 277.8 nmole/mg protein/min으로서 대조치 416.7 nmole/mg protein/min에 비해 약 20, 30 및 35% 정도 억제되었으며 Fig. 1에서처럼 acyl기의 탄소원자 수가 많을수록 효소활성을 현저히 억제시켰다. 한편 Fig. 4에서 2번 위치에 amino기가 치환되어 있는 유도체들은 Fig. 2에서와 유사한 양상을 나타내었다.

Xanthine oxidase 반응속도에 미치는 8-acyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxides 유도체의 영향—시험관내에서 xanthine oxidase 활성을 강력

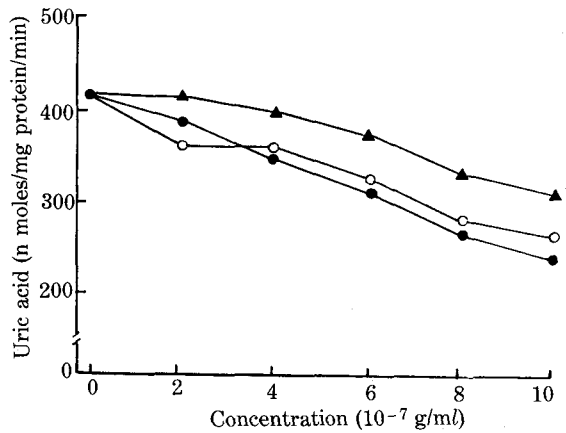


Fig. 3— Effect of phenazine dioxide derivatives on the purified hepatic xanthine oxidase activities *in vitro*.

Each points represent the mean of 3 experiments. ▲ ; 8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, ○ ; 8-hexanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, ● ; 8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide.

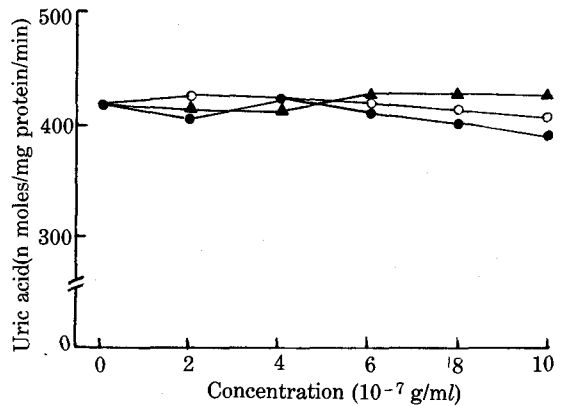


Fig. 4— Effect of phenazine dioxide derivatives on the purified hepatic xanthine oxidase activities *in vitro*.

Each points represent the mean of 3 experiments. ▲ ; 8-butanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide, ○ ; 8-hexanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide, ● ; 8-octanoyl-2-aminophenazine-5, 10-dioxide.

하게 억제시키는 8-acyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxides 유도체들이 xanthine oxidase의 반응속도에 어떠한 영향을 미치는가를 검토할 목적으로 시험관내에 여러 농도의 xanthine과 8-acyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide 유도체들을 $8 \times$

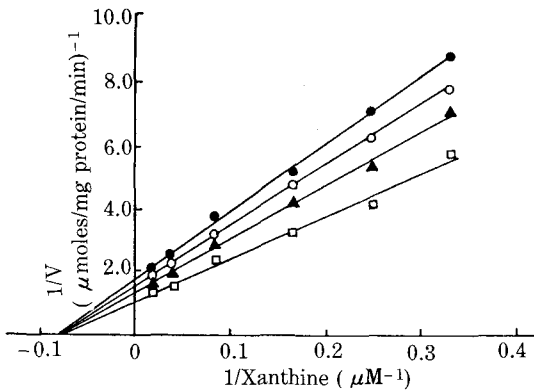


Fig. 5—Lineweaver-Burk plots of the hepatic xanthine oxidase activity.

The reaction mixture contained 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) various concentration of xanthine, phenazine dioxide derivatives (8×10^{-7} g/ml), and enzyme preparation. The assay procedure was described in the experimental methods. The values are the mean of 3 experiments. □; xanthine, ▲; xanthine+8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, ○; xanthine+8-hexanoyl-2-hydroxy-5, 10-dioxide, ●; xanthine+8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide.

10^{-7} g/ml 되게 첨가하여 반응속도론적인 면에서 관찰한 성적이 Fig. 5에 나타내었다.

기질인 xanthine 만을 첨가한 실험에서 xanthine oxidase의 V_{max} 치는 909.1 nmole/mg protein/min 인데 비해 8-butanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide, 8-hexanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide 및 8-octanoyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxide 를 첨가한 실험에서의 V_{max} 치는 714.2, 613.5 및 555.6 nmole/mg protein/min 으로서 약 20, 30 및 40% 정도 감소됨을 알 수 있었다. 그러나 K_m 치는 8-acyl-2-hydroxyphenazine-5, 10-dioxides 유도체들의 첨가에 의해서도 별다른 변화를 관찰할 수가 없었다.

고 찰

새로운 phenazine dioxide 유도체를 합성하고 이들 유도체가 superoxide anion radicals 생성효소인 xanthine oxidase의 활성변동과 관련지어 검토하였다.

근년 생체내의 여러 가지 생리화학적 현상은 superoxide anion radicals의 생성과 분해에 의존하고 있음이 알려지고¹³⁾ 있으므로 활성산소생성효소이며, 핵산 대사의 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 활성변동을 검토하였을 때 phenazine dioxide의 2번 위치에 hydroxyl기가 도입되면 본 효소의 활성이 첨가농도를 증가시킴에 따라 억제되었다. 이러한 작용은 조효소원과 정제된 효소에서 동일한 양상으로 나타났다. 이와 같은 효소활성 억제작용은 8번 위치에 도입된 acyl기의 탄소수가 증가될수록 억제작용이 강력하게 나타났다. phenazine dioxide류의 효소활성 억제작용 기전을 검토할 목적으로 반응속도론적 측면에서 관찰하였을 때 비경쟁적 억제작용을 나타내었다. 한편 2번 위치에 amino기가 도입된 경우는 8번 위치의 acyl기 탄소수에 관계없이 xanthine oxidase 활성변동에는 영향을 미치지 않았다.

이와 같은 유도체들의 작용양상은 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각되어진다.

문 헌

- 1) Chang, P.C. and Blackwood, A.A.: Simultaneous production of three phenazine pigments by pseudomonas aeruginosa Mac 436. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 439 (1969).
- 2) Kiprianova, E.A. and Rabinovich, A.S.: Production of phenazine-1-carboxylic acid by pseudomonas fluorescens. *Mikrobiologiya*, **38**, 224 (1969).
- 3) Levitch, M.E. and Reitz, P.: The isolation and characterization of 2-hydroxyphenazine from pseudomonas aureofaciens. *Biochemistry*, **5**, 689 (1966).
- 4) Olson, E.S. and Richard, J.H.: The structure of the orange pigment from pseudomonas aureofaciens. *J. Org. Chem.*, **32**, 2887 (1967).
- 5) Jonnes, P.H.: Iodinin as an antihypertensive agent. *Ibid.*, **3**, 679 (1973).
- 6) Toohey, J.I., Nelson, C.D. and Krotkov, G.: Toxicity of phenazine carboxylic acid to some bacteria, algae, higher plant and animals. *Can. J. Bot.*, **43**, 1151 (1965).
- 7) Fouch, J.C.L., Reine, B.L. and Alexandre, C.G.: Phenazine derivatives. *U.S. Patent*, **3**, 445, 926

- (1969).
- 8) Kang, I.Y., Kim, S.Y., Kim, H.S., Kim, J.D. and Huh, K., Synthesis and antimicrobial activity of phenazine derivatives (II), *J. Korean Chem. Soc.*, **34**, 189 (1990).
 - 9) Storch, J. and Ferber, E.: Detergent-Amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, **169**, 262 (1988).
 - 10) Rowe, P.B. and Wyngaarden, J.B.: The mechanism of dietary alteration in rat hepatic xanthine oxidase level. *J. Biol. Chem.*, **241**, 5571 (1966).
 - 11) Stirpe, F. and Corte, E.D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855 (1969).
 - 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 - 13) Ross, d., Cotgreave, I. and Moldeus, P.: The interaction of reduced glutathione with active oxygen species generated by xanthine oxidase-catalyzed metabolism with xanthine. *Biochim. Biophys. Acta*, **841**, 278 (1985).