

치매 치료제 염산 디히드로에보디아민의 생식 및 발생 독성

성이숙 · 정성윤 · 서영득 · 진미령 · 최봉웅* · 장병모* · 김대경#

중앙대학교 약학대학, *제일약품(주)

(Received November 17, 2002; Revised November 5, 2002)

Reproduction and Development Toxicity of Anti-Alzheimer's Drug Dehydroevodiamine-HCl

Yi Sook Sung, Sung Yun Jung, Young Deog Seo, Mi Reyoung Chin, Bong Woong Choi*,
Byeung Mo Chang* and Dae Kyong Kim#

Dept. of Environmental and Health Chemistry, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Jeil Pharmaceutical Co. Ltd., Seoul 745-5, Korea

Abstract — Dehydroevodiamine-HCl (DHED), which is a component separated from *Evodia rutaecarpa Benth*, has novel anticholinesterase and anti-amnesic activities in a scopolamine-induced amnesia model. Several studies suggest that DHED might be an effective drug for Alzheimer's disease and a vascular type of dementia. DHED was at dose levels of 0, 50, 100 and 200 mg/kg/day administered intraperitoneally to Sprague-Dawley male rats for 60 days before mating and to females from 14 days before mating to 7 days after mating. Effects of the DHED on general symptom and reproductive performance of parent animals and embryonic development were examined. In male parents, whereas no death was observed, reduction in the increase rate of body weight was found at 200 mg/kg. In female parents, both of the mating performance and the fertility of parent animals were decreased at 200 mg/kg, but not significantly. In 200 mg/kg treated group, the fetal death rate was increased but total fetuses showed no changes compared to the control group. There were no malformed F1 fetuses in all groups.

Keywords □ Dehydroevodiamine, Alzheimer's disease, reproduction and development toxicity

알츠하이머 병은 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 알려져 있는데 이것은 뇌섬유의 신경전달부위에 아세틸콜린 전달과정에 결함이 있을 때 발병하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 따라서 이러한 질병을 치료하기 위해서는 신경전달 부위에 아세틸콜린의 양을 증가시키는 약물의 개발이 필요하다. 그 약물들 가운데서도 특히 아세틸콜린 가수분해효소 저해약물은 임상적으로 가장 높은 치료효율을 나타낸다. 그러나, tacrine, physostigmine과 같이 치료효율이 높은 아세틸콜린 가수분해효소 저해약물조차 임상적인 응용에 많은 제약이 있는 것이 사실이다. 그 이유는 이들 약물이 대부분 생물학적 반감기가 짧고 뇌내침투능력이 낮으며 혈액내에서 불안정할 뿐 아니라 유해한 부작용이 많고 치료범위가 좁다는 한계점이 있었기 때문이다.²⁾

또한, 뇌혈류의 흐름이 원활하지 않을 때 치매가 유발된다는

보고가 있다.³⁾ 허혈성 뇌질환의 모델에서 아세틸콜린 양이 학습과 기억을 수행하는 해마(hippocampus)에서 현저히 낮음을 볼 수 있는데, 이것은 뇌내 혈류방해로 인해 부교감신경이 기능적인 장애를 받고 있기 때문으로 사료된다.^{4,5)}

Dehydroevodiamine-HCl(DHED)는 *Evodia rutaecarpa Benth*에서 추출된 indole alkaloid 성분으로서 혈압강하,⁶⁾ 혈관확장, 뇌혈류 강화 작용,⁷⁾ ion channel depression⁸⁾ 등의 약효를 지니고 있다.

이 약물은 기존의 치매 치료제인 tacrine, donepezil과 같이 아세틸콜린 가수분해효소의 활성을 억제하고 기억력 감퇴 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 현재 새로운 노인성 치매 치료제로 개발되고 있는 화합물이다.

이러한 아세틸콜린 가수분해효소 억제 작용에 의한 기억력 증진효과 뿐만 아니라 기억 증진 및 뇌허혈에 의한 뇌세포사멸을 억제하는 효과가 있으며, 또한 알츠하이머의 주 원인 단백질 중의 하나인 아밀로이드베타 단백질의 독성을 억제하는 효과가 알려져 있어⁹⁾ 효과적인 알츠하이머병 치료제로서의 가능성이 높은

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5610 (팩스) 02-3280-5610
(E-mail) dkkim@cau.ac.kr

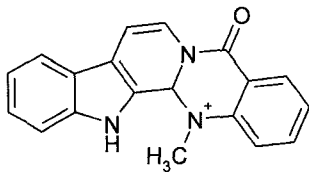


Fig. 1 - Chemical structure of DHED.

신약 후보 물질로 개발 중에 있으며, 몇 가지 일반 독성 및 유전 독성 시험 결과 특이한 독성은 없었다.

본 연구에서는 DHED에 대한 특수독성을 검토할 목적으로 최기형성, 수태능, 생식 및 발생 독성 시험을 실시하였다.

실험방법

시험물질의 조제

시험물질인 DHED은 제일약품(주)에서 치매치료제로 연구중인 화합물로 구조식은 Fig. 1과 같으며, 생리식염수로 현탁하여 실험에 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물은 대한실험동물에서 사육한 특정병원체부재(SPF; specific pathogen free) 암수 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 실험실은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 를 유지하였다. 사료는 실험동물용 고형사료를, 물은 일반 수도물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

최기 형성 시험

임신 흰쥐(체중 275-300 g) 80마리를 각 군당 20마리씩 나누어 다조군, 저용량군, 중간용량군, 고용량군으로 하고 투여용량은 아급성 독성 실험결과를 참조하여 예비실험을 실시하여 설정하였다. 즉, 어미동물에 대하여 30일 이상 투여가 가능한 200 mg/kg을 본 실험에서 고용량으로 하고, 중간용량은 100 mg/kg으로 저용량은 50 mg/kg으로 1.5 cc 생리식염수에 현탁하여 임신 8일째부터 17일째까지 경구 투여하고 임신 말기인 21일째 부검하기 위해 제왕절개하였다.

수태능 시험

DHED를 생리식염수를 가하여 균등히 현탁시켜 사용하였으며, 투여용량은 아급성 독성 실험결과를 참조하여 예비실험을 실시하여 설정하였다. 즉, 어미동물에 대하여 30일 이상투여가 가능한 200 mg/kg을 본 실험에서 고용량으로 하고, 중간용량은 100 mg/kg으로 저용량은 50 mg/kg으로 하여, 수컷은 교배시작 60일 전부터 교배 성립 시까지, 암컷은 교배시작 14일전부터 임신 7일 까지 매일 오전 11시에서 1시 사이 1회 1회 강제 경구 투여하였다. 투여 용량은 kg 당 5 cc로 하였다

시험기간 중 매일 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대하여 관찰하였다.

시험기간 중 교배 전에는 암수 모두 시험 시작부터 주 1회 간격으로, 임신기간에는 임신 0, 7, 14 및 21일째 체중을 측정하였다

교배 전 투여기간이 끝났을 때 같은 군내의 동물끼리 암수 1:1로 동거시켜 3일간 교배의 유무를 확인하였다. 오후에 동거를 시켜서 익일 아침에 질전이 확인되거나 질 도말에서 정자가 관찰되면 교미가 성립되는 것으로 판정하고 이날을 임신 0일로 하였다.

시험에 사용된 수컷은 교배 종료 후, 암컷은 임신 21일째 그리고 교미 미확인 동물들은 최종 동거 일에 부검하여 내부장기에 대하여 육안적인 검사를 실시하였다.

각 군 당 모든 임신동물들을 임신 21일째에 제왕절개하여 착상 수, 생존태자 수, 사망태자 수, 흡수 배아 수, 생존태자의 성별, 체중 및 외표 이상유무를 조사하였다.

주산 수유기 시험

DHED를 생리식염수로 균등히 현탁시켜 사용하였으며, 투여용량은 아급성 독성 실험결과를 참조하여 예비실험을 실시하여 설정하였다. 즉, 어미동물에 대하여 30일 이상투여가 가능한 200 mg/kg을 본 실험에서 고용량으로 하고, 중간용량은 100 mg/kg으로 저용량은 50 mg/kg으로 하여, 임신 15일째부터 분만 후 21일 총 26일 동안 투여하였다.

분만 후 21일 모든 동물을 부검하였고, 분만 태자는 출산 후 70일까지 관찰하였다.

각군의 모든 어미 동물에 대하여 임신 15, 18, 20일과 분만 후 0, 4, 7, 14, 21일에 각각 체중을 측정하였고 분만기간에는 하루 3회씩 관찰하여 분만여부를 확인하고, 분만 완료된 시점을 분만 0일로 하였으며, 임신모체를 분만 후 21일에 에테르 마취 후 개복하여 각 장기의 이상유무를 육안으로 관찰하였고, 간과 신장의 중량을 측정하여 모체에 대한 영향을 관찰하였다.

출산자에 대한 영향 관찰은 다음과 같이 하였다. 출산 당일 출산자수, 생사여부, 성별, 체중 및 외형이상 유무를 관찰하였다.

생후 4일까지의 생존율(%)=(생후 4일의 생존자 수/생존 출산자 수)×100

이유율(%)=(출산후 22일의 생존자 수/생후 4일 조정직후 생존자 수)×100

생후 0, 4, 7, 14, 21일에 각각 체중을 측정하였다.

생존 출산자 전부에 대하여 발육분화 및 반사기능을 검사하였다. 이개개전은 출산자 생후 4일령에 양쪽 귀바퀴가 모두 측두피부로부터 떨어져 있으면 양성으로 하였다. 치아맹출은 생후 13일령에 육안으로 아랫니가 보이면 양성으로 하였다. 안검개열은 생후 18일령에 양쪽 눈을 떴으면 양성으로 하였다. 정향반사는

생후 10일령에 실시하였으며 수평면에 신생자를 뒤집어 5초 이내에 바로 일어나면 양성으로 기록하였다. 감각모를 관찰하여 생성날짜를 기록한다.

모체 당 무작위로 선발된 암수 각 1수를 대상으로 감각 및 운동성 검사를 실시하였다. 로타로드 검사는 생후 28일령에 실시하였고, 로타로드 검사기 장치에서 회전(6회/분)하는 붓에 동물을 적응시킨 후 낙하할 때까지의 시간을 관찰하였다. 최장 관찰 시간은 1분으로 하였고, 3회 시행하여 3회째 성적을 기록하였으며 5초 이상이면 양성으로 하였다.

핫플레이트 검사는 42일령에 평가 하였다. 핫플레이트의 바닥 온도는 55°C가 되도록 유지하였으며 플레이트 바닥에 흰쥐의 발바닥이 모두 닿았을 때를 시점으로 하여, 20 cm 높이의 벽위로 완전히 올라가는데 소요된 시간을 측정하였고, 30초 이내일 경우 양성으로 하였다.

실험결과 및 고찰

최기형성 시험 결과

투여 후 3-4일까지는 대조군과 투여 3군이 별다른 차이점이 관찰되지 않았으며, 투여 5일째부터 고용량군의 체중증가가 관찰되지 않았다. 저용량과 중간용량군의 랫드는 대조군과 비슷한 양상으로 체중이 증가되었다. 임신 15일째인 투여 7일부터는 고용량군의 체중 증가가 다른 군과 비교할 때 현격한 차이를 나타냈고, 4-5마리는 처음보다 체중이 감소되었다. 고용량군의 흰쥐는 계속 눈의 부종과 혼탁이 나타나며 수면시간이 증가하고 운동성이 떨어졌다. 임신 17일째 3군의 흰쥐는 모두 정상적인 하복부 팽창으로 임신이 관찰되지만 고용량군의 흰쥐는 20마리 중 18마리는 하복부 팽창이 관찰되지 않았다.

부검결과 - 출산 직전 부검 결과, 대조군의 경우 20수의 흰쥐에서 각각 배자(embryo) 6-18마리씩 정상적인 발생이 진행되었고 배자의 사지 모두 정상이었다. 저 용량군은 18마리의 흰쥐에서 각각 6-15마리의 배자가 정상적으로 발생하였다. 대부분의 배자가 정상이었으며 전체 흰쥐의 10% 정도의 독성이 관찰되었다. 중간용량의 경우에는 정상적인 크기의 배자와 전혀 자라지 못한 배자가 함께 관찰되었고 40-50% 정도의 독성이 나타났다. 그러나 고용량의 경우, 90% 이상의 독성이 나타났다.

Table I - Absorption rate of fetuses after teratogenicity study

Doses	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
Normal fetuses	9.9 ± 2.1	9.3 ± 2.6	7.0 ± 2.6*	1.7 ± 2.2*
Absorption fetuses	0.3 ± 0.4	0.4 ± 0.6	2.2 ± 2.1*	9.7 ± 2.8*

- Twenty heads of animals per group

- values : means ± S.D.

*Statistically different from control group (P<0.05)

흡수율 - 제왕 절개하여 관찰한 배자의 흡수율은 Table I과 같다. 저 용량의 경우 대조군과 차이가 없었고, 중간 용량군의 경우 저 용량군에 비해 흡수된 배자가 많았으나 정상적인 배자가 더 많았다. 그러나 고용량의 경우 정상적인 배자보다 흡수된 배자가 많았다.

최기형성 시험에서 대조군, 저용량, 중간 용량 및 고용량에서 각각 2.5%, 4.9%, 23.9%, 85.1%의 흡수율이 관찰되었다. DHED 투여 후 고용량군은 투여 7일부터는 다른 군과 현격한 차이로 체중 증가가 관찰되지 않거나 감소하였으며, 눈의 부종과 혼탁이 관찰되고 수면시간이 증가하는 등 운동성이 떨어졌다. DHED는 고용량에서 생식독성 이외에 일반독성도 나타나는 것으로 보인다.

주산 수유기 시험 결과

모체에 대한 영향 - 임신, 이유기의 어미동물의 체중변화는 Table II와 같다. 임신 18일 20일째 경우, 대조군에 비하여 고용량군 어미동물의 체중증가가 관찰되지 않았으며, 분만 후(이유기) 1, 4, 7일경 고용량군의 체중이 급격히 감소됨이 관찰되었다.

분만일의 관찰 - 임신기간은 Table III과 같으며, 중간 용량 투여군과 고용량 투여군에서 임신기간이 23일인 모체의 수가 증가됨이 관찰되었다. 또한 고용량 투여군에서 분만태자의 흡수가 2

Table II - Body weight (g) of dams (F0) administered orally with DHED during pre- and post-natal periods

Gestation (days)	15	18	20
Control	282 ± 3	343 ± 20	376 ± 17
50 mg/kg	273 ± 26	318 ± 21	346 ± 16
100 mg/kg	277 ± 16	322 ± 11	358 ± 10
200 mg/kg	282 ± 17	300 ± 21	301 ± 22*

Lactation (days)	1	4	7	14	21
Control	296 ± 18	309 ± 23	330 ± 21	322 ± 20	283 ± 18
50 mg/kg	288 ± 16	267 ± 19	281 ± 21	275 ± 20	272 ± 17
100 mg/kg	277 ± 15	322 ± 18	358 ± 21	282 ± 22	271 ± 20
200 mg/kg	236 ± 21	226 ± 18*	263 ± 17*	273 ± 17	288 ± 21

- values : means ± S.D.

*Statistically different from control group (P<0.05)

Table III - Effect of DHED on gestation length of dams(F1) administered orally with DHED during pre- and post-natal periods (No. of heads)

Doses	No. of pregnant animals		
	Gestation length (days)	21	22
Control	12	6	0
50 mg/kg	14	2	2
100 mg/kg	13	1	4
200 mg/kg	10	2	6

Table IV - Organ weight (g) of dams (F0) sacrificed after weaning

Doses	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
Liver	12.5	11.5	11.3	12.6
Kidney right	1.1	1.2	1.0	1.1
left	1.1	1.0	1.0	1.11

- Values are means

Table V - Body weight (g) of rats (F1) whose dams were administered orally with DHED during pre- and post-natal periods

Doses	Days				
	0	4	7	14	21
Control	6.2 ± 1.2	9.0 ± 2.2	12.5 ± 2.3	27.6 ± 3.2	42.9 ± 3.7
50 mg/kg	5.7 ± 0.9	9.3 ± 2.7	12.82 ± .9	24.6 ± 4.2	40.8 ± 3.3
100 mg/kg	5.6 ± 0.8	8.9 ± 1.2	12.9 ± 2.3	25.1 ± 2.9	37.8 ± 3.2
200 mg/kg	4.7 ± 1.3	8.2 ± 2.5*	11.2 ± 2.8*	21.7 ± 3.2*	35.4 ± 4.2

Doses	Days		
	28	35	42
Control	78.3 ± 6.5	103.3 ± 9.7	132.6 ± 11.3
50 mg/kg	70.6 ± 5.6	97.7 ± 7.8	115.8 ± 9.0
100 mg/kg	66.3 ± 5.2	88.6 ± 6.7	110.3 ± 9.1
200 mg/kg	58.9 ± 6.1	81.2 ± 7.7	105.3 ± 9.9

- values : means ± S.D.

*Statistically different from control group (P<0.05)

수에서 관찰되었고, 그 중 1수에서는 어미동물의 심한 출혈이 관찰되었다.

장기중량 변화 - 이유 후 모체 부검 시 고용량 투여군 2수에서 위장관 팽대가 관찰되었고, 모체 부검 후 장기 중량을 측정한 결과는 Table IV와 같다. 간장과 신장의 중량을 대조군과 비교할 때 큰 변화는 관찰되지 않았다.

출산자에 대한 영향 - a) 정상 분만한 출산자의 외형이상 관찰 결과 이상이 인정된 개체는 없었다. 고용량 투여군에서 어미동물의 채자잡아먹음으로 머리부분이 없어진 태자와 내부장기가 없어진 태자 시체가 5수 관찰되었다. 출산자의 체중변화율 Table

Table VI - Number of Offspring at birth, post-natal day 4 after culling & weaning

Doses	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
No. of offspring at birth	12.50	13.00	12.60	11.20
at post-natal day 4	12.02	11.88	11.10*	8.20*
survival rate(%)	96.6	91.67	88.09	73.21
after culling	11.91	11.00	10.90	8.00
after weaning	11.30	10.33	10.33	7.75
weaning rate(%)	94.95	93.93	94.77	92.85

- Values are means

*Statistically different from control group (P<0.05)

Table VII - Effect of DHED on physical development of rats (F1) whose dams were administered orally with DHED during pre- and post-natal periods

	Ear opening	Incisor eruption	Eye opening	Hair formation
Control	130/130	130/130	130/130	130/130
50 mg/kg	114/114	104/104	104/104	101/104
100 mg/kg	170/170	164/164	164/164	164/164
200 mg/kg	72/72	64/64	64/64	64/64

- No. of animals showing positive response/No. of animals examined

Table VIII - Surface righting reflex of rats (F1) whose dams were administered orally with DHED during pre- and post-natal periods

Doses	No. of positive animals/ No. of animals examined
Control	130/130
50 mg/kg	104/104
100 mg/kg	160/164
200 mg/kg	58/64

V에 나타내었다. 대조군과 비교시 중간 용량 투여군의 경우 생 후 14일부터 21일 체중감소가, 고용량 투여군의 경우 출산 직후 부터 이유기간에 걸쳐 지속적으로 유의한 체중감소가 관찰되었다.

b) 분만직후의 출산자수, 생후 4일의 생존률, 산자수 조정, 이유 후 출산자수 조정, 이유율은 Table VI과 같다. 분만 후 4일의 생존률은 대조군 96%에 비해 중용량군 88.09%, 고용량군 73.21%로 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 고용량군의 경우 분만직후와 1일째 사망한 태자가 23수 관찰되었고, 이는 약물에 의한 영향으로 생각된다. 이유율은 유의한 변화가 인정되지 않았다.

c) 생존태자에 대해 발육분화검사를 실시하여 얻은 결과는 Table VII과 같다. 약물투여가 이개개전, 치아맹출, 안검개열에 미치는 영향은 관찰되지 않았다. 모생성은 출산후 8-10일에 걸쳐 관찰되었으며, 저용량군의 경우 모생성이 현저히 늦춰진 태자가 3수 발견되었으나 약물에 의한 영향으로 인정되지는 않는다.

d) 정향반사기능의 검사결과는 Table VIII과 같다. 중간용량에

Table IX – Result of rota rod and hot plate test of rats (F1) whose dams were administered orally with DHED during pre- and postnatal period

Doses	Rota rod test	Hot plate test
Control	30/30	32/32
50 mg/kg	26/26	26/26
100 mg/kg	26/26	24/24
200 mg/kg	20/20	20/20

– No. of animals showing positive response/No. of animals tested

서 4수, 고용량에서 6수가 양성반응을 나타내지 않았으며, 이 경우 반사 소요시간은 중간용량에서 8초 2수, 7초 2수, 고용량군에서 8초 2수, 9초 4수로 관찰되었다. 음성반응을 나타낸 고용량군 태자의 경우 중량이 현저히 적게 나타난 개체였으며, 6수 모두 생후 13일령에 사망하였다.

e) 로타로드 측정과 핫 플레이트 검사에 대한 결과는 Table IX와 같다.

로타로드 검사결과 대조군과 투여군 모두에서 5초 이상인 양성판정 결과를 나타내었다. 그러나 고용량의 경우 10초 미만인 개체가 다수 관찰되었다. 핫플레이트시험 결과, 대조군과 투여군 모두에서 30초 이상인 양성판정 결과를 나타내었다. 그러나 고용량군과 중간 용량군의 경우 20초 이상인 개체가 5-7수 관찰되었다.

주산 수유기 시험에서 DHED 고용량, 중간용량 투여군은 임신말기에 독성으로 인해 생존률이 저하되었고, 이유기간 동안 태아사망과 체중 저하가 관찰되었으며, 모체 부검 시 고용량 투여군 2수에서 위장관 팽대가 관찰되었고, 이유 후 발육분화 검사 및 감각운동성검사인 이개개전, 치아맹출, 안검개열, 모생성, 핫플레이트, 로타로드 시험에서 약물이 미치는 영향은 관찰되지 않았다.

Table X – Mean body weight (g) of male rats (F0) administered orally with DHED before mating

Date	Doses Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
1	215 ± 4.1	214 ± 4.3*	216 ± 6.2	216 ± 7.6
7	255 ± 14.8	258 ± 6.6	254 ± 5.4	257 ± 6.9
14	276 ± 11.1	280 ± 11.5*	287 ± 14.1	275 ± 12.2
21	290 ± 11.8	292 ± 9.7	301 ± 10.9	288 ± 16.2
28	310 ± 9.5	318 ± 24.6	321 ± 24.3	296 ± 29.4
35	324 ± 16.5	333 ± 23.0	341 ± 20.0*	313 ± 29.1
42	342 ± 14.9	356 ± 26.8	363 ± 23.4*	323 ± 28.0
49	354 ± 15.0	368 ± 16.4	371 ± 20.6*	337 ± 29.3
56	350 ± 11.6	370 ± 17.3	374 ± 17.0*	336 ± 30.6*
60	360 ± 11.0	379 ± 16.3	388 ± 22.3*	340 ± 31.6
63	356 ± 15.1	377 ± 19.2	385 ± 20.5	332 ± 35.8

– Twenty heads of animals per group

– values : means ± S.D.

*Statistically different from control group (P<0.05)

수태능 시험 결과

수컷동물의 체중 – 수컷 동물의 체중변화는 Table X과 같다. 수컷 동물의 체중은 교배전 기간 동안 고용량 투여군(200 mg/kg)에서 투여 후 21일 제부터 60일째까지의 체중이 대조군에 비하여 감소하였는데 이는 시험물질에 의한 영향으로 생각된다.

암컷동물의 체중 – 암컷동물의 체중변화는 Table XI과 같다. 암컷동물의 체중은 고용량군의 경우 임신 말기로 진행할수록 대

Table XI – Mean body weight (g) of female rats (F0) administered orally with DHED before mating and in gestation period

Doses		Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
No. of animal		20	20	20	20
Before mating					
Days					
1		256 ± 14.8	251 ± 13.9	258 ± 15.3	253 ± 16.0
7		268 ± 13.4	267 ± 13.6	272 ± 17.6	265 ± 27.5
14		274 ± 14.9	281 ± 15.2	273 ± 13.0	270 ± 30.3
No. of animal		12	12	14	10
During pregnancy					
Days					
1		281 ± 14.6	288 ± 13.1	295 ± 17.5	281 ± 30.7
3		292 ± 14.1	293 ± 14.2	283 ± 18.7	285 ± 30.6
5		294 ± 12.6	300 ± 15.9	291 ± 19.3	290 ± 10.0
7		310 ± 11.8	316 ± 11.8	321 ± 17.4	307 ± 33.6
9		328 ± 10.2	333 ± 11.1	339 ± 18.3*	311 ± 33.5
17		340 ± 11.3	342 ± 11.7	345 ± 17.5	320 ± 36.1
21		350 ± 13.7	349 ± 11.2	350 ± 20.1	319 ± 34.3

*Statistically different from control group (P<0.05)

Table XII – Mean food intake (g) of female rats (F0) administered orally with DHED before mating and in gestation period

Doses		Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
No. of animal		20	20	20	20
Days					
Before mating	1	10.7 ± 1.9	11.7 ± 1.9	12.5 ± 2.1	12.2 ± 2.3
	7	12.4 ± 2.8	14.3 ± 4.3	15.1 ± 3.4	11.5 ± 4.4
	14	19.3 ± 4.5	18.7 ± 3.7	19.6 ± 3.8	17.3 ± 3.4
No. of animal		12	12	14	10
Days					
During pregnancy	1	20.2 ± 3.0	20.1 ± 2.6	21.4 ± 2.3	18.9 ± 3.6
	3	21.3 ± 4.1	21.2 ± 3.3	21.5 ± 1.3	19.4 ± 2.4
	5	21.3 ± 3.3	21.2 ± 2.6	21.5 ± 2.8	19.4 ± 1.7
	7	25.5 ± 2.6	24.5 ± 1.9	23.6 ± 3.7	17.8 ± 2.5
	9	28.5 ± 2.5	26.5 ± 2.6	25.4 ± 3.4	20.5 ± 1.7
	17	27.2 ± 2.6	27.3 ± 3.3	27.2 ± 4.3	21.3 ± 2.9
21	28.5 ± 1.7	29.3 ± 4.3	29.6 ± 3.8	23.3 ± 4.1	

– Twenty heads of animals per group
 – values : means ± S.D.

Table XIII – Mean food intake (g) of male rats (F0) administered orally with DHED before mating

Doses	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
7	15.6 ± 4.3	15.8 ± 3.9	13.4 ± 3.6	15.7 ± 4.2
14	17.6 ± 2.7	14.6 ± 3.5	15.7 ± 3.4	15.8 ± 3.3
21	19.1 ± 3.5	16.2 ± 2.8	18.1 ± 3.8	18.1 ± 4.3
28	19.8 ± 2.6	18.3 ± 4.7	21.1 ± 3.6	19.3 ± 4.1
35	21.1 ± 3.0	23.1 ± 2.1	23.3 ± 2.5	24.1 ± 3.7
42	24.2 ± 2.9	22.5 ± 2.6	23.3 ± 2.9	23.4 ± 4.1
49	23.1 ± 4.6	23.4 ± 3.1	21.4 ± 3.0	21.2 ± 2.6*
56	22.3 ± 2.6	27.4 ± 2.5	24.3 ± 4.9	21.7 ± 3.8*
63	24.7 ± 1.9	26.4 ± 1.2	23.5 ± 1.2	23.1 ± 1.7*
73	21.4 ± 1.6	25.2 ± 4.4	22.1 ± 3.8	22.8 ± 3.1*

– Twenty heads of animals per group
 – values : means ± S.D.

*Statistically different from control group (P<0.05)

Table XIV – Reproductive ability of male/female (F0) rats administered orally with DHED before mating and in gestation period

	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
No. of animal male	20	20	20	20
No. of animal female	20	20	20	20
No. of pregnant Animal	12	14	12	8

Table XV – Pregnancy index of female rats (F0) administered orally with DHED before mating and in gestation period

	Control (Vehicle)	Low (50 mg/kg)	Middle (100 mg/kg)	High (200 mg/kg)
No. of pregnant Animal	12	14	12	8
Corpora lutea	12.7 ± 2.5	13.1 ± 1.5	10.4 ± 2.6	9.8 ± 1.4
Implantation	11.3 ± 1.2	11.9 ± 2.2	9.8 ± 1.8	8.9 ± 1.2
Fetal death Rate (resorption+dead/Total fetus)	2/134	1/168	5/118	15/71
Sex ratio(male/female)	0.97	1.04	0.98	1.15
Body weights of live fetuses	5.2 ± 0.7	5.4 ± 0.9	5.1 ± 0.5	4.8 ± 0.7

조금 보다 증가 정도가 작게 나타남을 관찰하였다.

사료섭취량 – 사료섭취량은 Table XII, XIII과 같다. 시험기간 중 사료 섭취량을 측정하여 투여기간 동안의 일일 평균 섭취량을 산출한 결과 수컷 동물에서는 투여군의 섭취량 감소가 대조군에 비하여 통계학적인 유의성이 인정되지 않았으나 암컷동물에서는 고용량군의 섭취량이 대조군에 비하여 감소하였다.

부검소견 – 수컷동물은 교배종료 후에, 암컷동물은 임신 21일째 부검하여 관찰한 결과 고용량 투여군 2수를 제외한 전 시험군에서 육안적인 특이소견은 관찰되지 않았으나, 고용량 투여군 2수에서 위장관 팽대(위와 장이 부어 있음) 현상이 관찰되었다.

생식능력에 대한 영향

a) 교배성적

DHED 고용량 투여군의 경우 수태능이 다소 감소하였으나 수태능 감소의 유의한 변화는 인정되지 않았다.

b) 태자에 대한 영향

약물 투여에 의하여 임신 황체 수나 착상 수의 변화는 관찰되지 않았으나, 고용량 투여군의 경우 생존 태자 수가 감소되었으며, 이는 약물에 의한 영향으로 생각된다.

수태능 시험에서 암컷 고용량의 임신기간 동안 관찰된 체중 증가의 억제와 사료 섭취량의 감소, 부검시 관찰된 위장관 팽대는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다. 또한, DHED를 교배 전 및 임신초기에 각군 20수에 대하여 투여한 후 임신 성립 여부를 관찰한 결과, 대조군에서 12수, 저용량군 14수, 중간용량군 12수 및 고용량 군에서 8수의 임신이 성립되어 고용량군에서 수태능에 약간의 영향이 관찰되었다. 또한, 태자 사망률은 고용량군의 흡수율이 대조군의 흡수율인 2/134에 비해 15/71로 현저히 증가되었음을 확인하였다.

결 론

최기형성시험은 DHED를 흰쥐에 임신 8일째부터 17일째 까지 경구투여하고 임신 말기인 21일째 부검하여 관찰하였다. 모체에 있어서 저용량군과 중간용량군에 비해 고용량군에서 일반적으로 임신 15일째부터 체중증가율이 낮아졌으며 하복부 팽창이 관찰되지 않았고 수면증가와 운동성 결핍이 나타났다. 부검 결과 중간용량의 경우 40-50%의 독성이 나타났으며 고용량의 경우 90%이상의 독성이 나타났다.

주산수유기 시험에서는 DHED를 임신 15일째부터 분만 후 21일까지 경구투여 한 후 부검하고, 분만 태자는 출산 후 70일까지 관찰하였다. 고용량군의 경우 대조군에 비해 체중증가 속도의 감소 또는 체중의 급격한 감소가 관찰되었고, 임신기간이 23일로 증가되는 경우가 있었으며 부검시 장기 중량 등의 변화는 없었다. 태자의 체중은 중간용량과 고용량군에서 유의한 감소가 지속적으로 나타났으며 생존율 또한 고용량으로 갈수록 유의성 있게 감소하였다. 정향반사기능 측정과 로타로드 측정, 핫 플레이트 검사에서도 고용량으로 갈수록 음성반응을 나타내는 태자의 수가 다소 증가 하였으나 약물의 영향으로 판단하기엔 유의성이 없었다.

수태능 시험은 DHED를 수컷은 교배 60일 전부터 교배 성립 시까지, 암컷은 교배시작 14일전부터 임신 7일까지 경구투여 하였다. 수컷은 투여 기간 중 고용량군에서 체중 감소가 나타났으며 이는 DHED의 영향으로 생각된다.

임신동물들은 임신 21일째에 제왕절개하여 착상 수, 생존태자 수, 사망태자 수, 흡수 배아 수, 생존태자의 성별, 체중 및 외표 이상유무를 조사하였다. 임신 동물도 고용량군에서는 체중증가가 감소하는 것을 보였고 사료 섭취량에서도 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 암수 모두 부검시 특이소견은 관찰되지 않았으며 고용량 투여군 2수만이 위장관 팽대 현상을 관찰할 수 있었다. DHED 고용량 투여군의 경우 수태능 감소 경향을 나타내었으며, 태자에 대한 영향으로는 약물 투여에 의하여 임신 황체 수나 착상 수의 변화는 관찰되지 않았으나, 고용량군의 경우 생존 태자 수가 감소됨을 보였다. 임신 성립여부를 관찰한 결

과, 대조군에서 12수, 저용량군 14수, 중용량군 12수 및 고용량군에서 8수의 임신이 성립되어 고용량 군에서 수태능에 약간의 영향이 관찰되었다.

결론적으로 최기형성 시험에서는 DHED투여용량이 증가할수록 높은 흡수율을 나타냈으며 고용량의 경우 90%이상의 독성이 나타났다. 그리고 주산 수유기 시험에서 이유기 동안의 F1에는 독성이 관찰되지 않았으며, 수태능 시험에서 대조군에 비해 DHED 고용량(200 mg/kg) 투여군에서 수태능의 감소가 관찰 되었다. 고용량의 경우에 관찰된 높은 흡수율과 수태능의 감소는 DHED의 치료농도가 5 mg/kg이며, 치매치료제로서 주로 고령의 환자에게 사용된다는 점을 고려할 때, 생식 발생 독성이 크게 위해성을 가진다고 할 수는 없다.

문 헌

- 1) Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, R. W., Coyle, J. T. and DeLong, M. R. : Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. **215**, 1237 (1982).
- 2) Marx, J. L. : Alzheimer's drug trial put on hold. *Science*. **238**, 1041 (1987).
- 3) Rogers, R. L., Meyer, J. S., Mortel, K. F., Mahurin, R.K. and Judd, B. W. : Decreased cerebral blood flow precedes multi-infarct dementia, but follows senile dementia of Alzheimer type. *Neurology*. **36**, 1 (1986).
- 4) Ni, J. W., Ohta, H., Matsumoto, K. and Watanabe, H. : Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res*. **653**, 231 (1994).
- 5) Yonemori, F., Yamada, H., Yamaguchi, T., Uemura, A. and Tamura, A. : Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 973 (1996).
- 6) Yang, H. Y., Li, S. Y. and Chen, C. F. : Hypotensive effects of dehydroevodiamine, a quinazolinocarbolone alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Asia Pac. J. Pharmacol.* **3**, 191 (1998).
- 7) Haji, A., Momose, Y., Takeda, R., Nakanishi, S., Horiuchi, T. and Arisawa, M. : Increased feline cerebral blood flow induced by dehydroevodiamine hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **57**, 387 (1994).
- 8) Loh, S. H., Lee, A. R., Huang, W. H. and Lin, C. I. : Ionic mechanisms responsible for the antiarrhythmic action of dehydroevodiamine in guinea-pig isolated cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 517 (1992).
- 9) Park, C. H., Lee, Y. J., Lee, S. H., Choi, S. H., Kim, H. S., Jeong, S. J., Kim, S. S. and Suh, Y. H. : Dehydroevodiamine-HCl prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in rat models of cognitive disturbance. *J. Neurochem.* **74**, 244(2000).