

천연유래의 항보체 활성물질 선발을 위한 미량탐색법

오세량 · 정근영 · 이형규*

한국과학기술연구원 생명공학연구소

초록 : 천연으로부터 보체 저해활성 물질을 선발할 목적으로 용혈성 보체측정법(hemolytic complement assay, CH₅₀)을 이용한 미량 탐색법을 확립하였다. 보체결합 반응은 microplate에서 수행하였으며, 표준 용혈(50% hemolysis)을 설정하기 위한 최적조건은 classical pathway (CP)의 경우 양 적혈구 농도를 5.0×10^8 cells/ml로 하였을때 hemolysin 희석농도 1/75~1/100 및 보체 희석농도 1/80~1/120이었으며, alternative pathway (AP)의 경우는 토끼 적혈구 농도 4.0×10^8 cells/ml에서 보체 희석농도 1/5, EGTA 4 mM 및 Mg²⁺ 4~8 mM이었다. 비수용성 화합물의 검정에는 dimethyl sulfoxide를 1% 수준이 되도록 시료의 농도를 조절하여 첨가하였다. 본 실험 조건에서 3종의 phenylpropanoid는 모두 농도에 비례하여 항보체 활성을 나타내었는데, 그중 rosmarinic acid의 항보체 활성은 CP의 경우 0.063~0.5 mM에서 $5.4 \pm 3.6\% \sim 95.8 \pm 0.2\%$, AP의 경우 0.063~1 mM에서 $35.1 \pm 0.9\% \sim 95.6 \pm 1.1\%$ 으로 측정되었다(1996년 1월 19일 접수, 1996년 2월 7일 수리).

서 론

보체계(complement system, C)는 면역계중 체액성 면역에 관여하는 주요인자(奏效因子)로서 20종 이상의 단백질로 구성되어 있으며 보체의 활성화는 항원-항체 복합체에 의한 경우(classical pathway, 이하 CP)와 외부 감염원이나 직접적인 세포손상에 의한 경우(alternative pathway, 이하 AP)의 두가지 경로로 일어나고, 이후 동일한 연쇄반응(cascade reaction)으로 생성되는 membrane attack complex (MAC)는 세포 표면에서 삼투용혈을 유발, 세포를 파괴하는 작용을 하여 세균이나 진균, 바이러스 등 외부 감염원에 대한 1차적인 방어기능을 담당하고 있다.^{1,2)} 그러나 활성화 과정중 성분 단백질 C3, C4 및 C5에서 각각 유리되는 저분자의 C3a, C4a 및 C5a는 anaphylatoxin으로서 염증 반응, 과민 반응과 관련된 세포의 활성화 등 다양한 생리적 반응에 직,간접적으로 관여하여 난치성 염증질환 등의 주요 원인³⁻⁷⁾으로, 또한 장기이식 거부반응의 유발인자^{8,9)}로 알려져 있다. 따라서 보체 활성화를 억제하는 물질을 선발하는 것은 과도한 보체 활성화로 인한 질환의 치료제를 개발하는데 중요하게 활용될 수 있다.

보체활성 저해물질 탐색연구와 보체 활성화 물질 탐색연구에 공통으로 사용되는 용혈성 보체 측정법(hemolytic complement assay)은, 보체 결합 (complement fixation) 반응에 사용하는 각 성분의 농도와 실험 scale에 따라 보체역가(CH₅₀, units/ml)가 다르게 나타나므로 임상적으로는 Mayer법, Kent와 Fife법 등을 표준방법으로 하여 측정하고 있다.¹⁰⁾ 그러나 총 반응액의 부피가 크면 각 성분 및 검정 시료의 요구량이 많으므로, 탐색 방

법으로 사용할 경우 경제성 및 신속성을 충족할 수 있는 조건 설정이 필요하였다. 본 연구에서는 천연 유래의 수용성 및 지용성 시료를 신속하게 검정할 수 있는 미량 탐색법의 조건을 확립하였고, 이를 기준으로 보체 저해 활성 물질로 보고된 rosmarinic acid를 비롯한 3가지의 지용성 phenylpropanoid를 대상으로 항보체 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

양 적혈구(SRBC)는 서울대학교 농업생명과학대학 부설 목장에서 전혈을 분양받았으며 토끼 적혈구(RaRBC)는 본 실험실에서 사육되고 있는 토끼로부터 직접 채혈하였다. 정상인 혈청 (normal human serum, NHS)은 대전 혈액원에서, hemolysin (S-1389)는 Sigma Co.에서 각각 구입하여 사용하였다. 그리고 활성검정에 사용한 공시 화합물로서 rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ester 및 caffeic acid methyl ester는 저자들이 배초향 (*Agastache rugosa*)으로부터 분리¹¹⁾한 것을 사용하였다.

완충용액

본 실험에 사용한 GVB (Gelatin Veronal Buffer; 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM barbituric acid, 0.141 M NaCl, 0.1% gelatin and 0.3% sodium azide, pH 7.3)용액은 Mayer¹²⁾의 방법에 따라 제조하였으며, CP상의 검정에는 MgCl₂와 CaCl₂를 각각 0.5 mM 및 0.15 mM로 첨가(GVB²⁺)하였고, AP상의 검정에는 ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) 및

찾는말 : complement, anticomplement activity, rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ester, caffeic acid methyl ester

*연락처

MgCl₂를 첨가(Mg-EGTA-GVB)하여 사용하였다.

후 CP의 경우와 동일한 과정으로 반응을 수행하였다.

보체결합(complement fixation) 반응

보체결합(complement fixation) 반응은 Klerx 등¹³⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. CP상의 보체반응에 사용한 감작적혈구(sensitized erythrocytes, EA)는 양 적혈구 희석 용액에 hemolysin 희석 용액을 동일 부피로 섞은 후 진탕배양(37°C, 30 min)하여 제조하였으며 사용시 원래의 적혈구 농도로 환원하였다. 본 반응은 완충 용액 80 μl와 보체 희석용액 80 μl를 microtiter plate (U type, 96 well)상에서 섞고 1차 진탕배양(37°C, 30 min)한 후 여기에 감작적혈구 40 μl를 가하여 동일 조건으로 2차 진탕배양하고 즉시 원심분리(800×g, 4°C, 30 min)하여 완료하였다. 그후 상등액중 100 μl를 취하여 다른 plate (flat-bottomed type)에 옮긴 후에 microplate reader (Emax precision microplate reader, Molecular devices Co.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. AP상의 보체결합 반응에 사용한 토끼 적혈구 및 혈청은 EGTA 및 Mg²⁺ 농도별로 제조한 완충용액에서 희석한

항보체 활성도(anticomplementary activity, %) 측정

먼저 본 반응과 동일한 농도로 증류수를 가하여 완전히 적혈구를 용혈시키고 이를 0~100%으로 희석하여 각 농도별 흡광도를 측정한다. 각 성분 농도별로 보체결합반응을 3반복으로 진행하여 측정된 용혈 흡광도를 용혈 농도로 환산, 각 실험구의 용혈율(% hemolysis)를 계산하였으며, 이로부터 시료의 항보체 활성도를 측정하였다. 본 반응에는, 증류수로 본 반응과 동일한 농도로 감작적혈구를 용혈시킨 실험구와 불활성화된 보체(56°C 30 min)를 사용한 실험구를 함께 측정하여 각각 최대 및 최저 용혈값으로 하였으며, 시료의 검정시 감작적혈구 대신에 GVB²⁺ 용액을 동일부피로 넣은 실험구의 흡광도를 측정하여 시료자체의 색소에 의한 흡광도 상승을 보정하였다.

본 실험에서 항보체 활성도 측정에 사용한 계산식은 다음과 같다.

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{\text{OD (standard or sample lysis)} - \text{OD (corresponding background lysis)}}{\text{OD (maximum lysis)} - \text{OD (background lysis)}} \times 100$$

$$\text{Anticomplementary activity (\%)} = \left(1 - \frac{\% \text{ hemolysis of sample}}{\% \text{ hemolysis of standard}}\right) \times 100$$

보체결합 반응중 유기용매의 영향

비수용성 화합물이나 이를 포함하는 추출물의 시료의 검정시 수용액상의 본 실험계와 잘 섞이며 광범위한 용해성을 가진 용매를 선발하고자 하였다. 용매로서는 acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol을 선정하여 각각 1~4%로 반응에 첨가한 후 표준용혈 반응에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

보체결합 반응의 성분농도 결정

본 실험에서는 반응액의 총 부피를 200 μl로 축소한 후 microplate상에서 반응을 진행하여 다량의 시료를 신속히 처리할 수 있도록 하였으며, 반응성분의 상태에 따라 변화하는 보체역가는 각 성분의 농도를 조합한 후 동시에 반응을 실시하여 표준용혈(±50% hemolysis)을 나타내는 보체의 농도로서 결정하였다.

먼저, 본 반응과 동일한 농도로 용혈된 적혈구 용액의 희석농도와 흡광도가 1차 비례함을 확인하였다(Fig. 1). 이를 기준으로 각 성분 농도별로 측정된 보체결합 반응의 용혈 흡광도를 용혈 농도로 환산한 후 표준용혈을 위한 각 성분농도를 결정하였다. CP의 경우, Ruddy¹⁰⁾는 적혈구가 최적으로 감작화 되었을 때 용혈은 보체의 양에 비례하여 증가하며 10~90% 용혈에서 직선 상관관계를 나타낸다고 하였는데, 본 조건에서 양 적혈구를

5.0×10⁸ cells/ml의 농도로 희석할 경우 이와 일치하는 hemolysin의 희석농도(1/100)를 감작화에 사용할 농도로서 결정하였고 이때 표준용혈을 나타내는 보체의 희석농도(1/105)를 결정하였다(Fig. 2). 본 반응은 매 실험마다 적혈구를 세척하여 농도를 보정한 후 시료 검정직전에 본 과정을 수행하여 표준용혈을 나타내는 hemolysin 농도 및 보체의 농도를 결정하였다.

AP상의 보체적정 반응에서 Platts-Mills 등¹⁴⁾은 CP에 의한 반응을 억제하고 AP에 의한 용혈반응을 유도하려면 첨가하는 EGTA와 Mg²⁺의 최적 농도 설정이 필요하다고 하였다. 본 실험조건에서 용혈은 EGTA의 농도가 2 mM 이상이면 Ca²⁺에 의한 CP의 활성화는 억제되었고 그후 EGTA 농도의 증가와 관계없이 일정한 수준이었다(Fig. 3). Mg²⁺의 경우, 일정농도 이상으로 첨가하면 오히려 용혈을 억제하였으며 최대 용혈을 유발하는 농도는 보체농도가 높을수록 증가하여 AP상의 보체결합 반응에서 표준용혈을 나타내는 보체-Mg²⁺농도의 조합은 여러가지로 가능하였다. 그러나 보체로서 혈청을 고농도로 사용하면 자체 색소에 의한 최저 흡광도가 증가하였으므로 보체의 적정 희석농도를 1/5로 결정 하였으며, 시료 검정에서는 추출물로부터 Ca²⁺가 도입될 가능성을 감안하여 EGTA의 농도는 4 mM 첨가하였고, 이때 표준용혈을 유발하는 Mg²⁺의 농도를 결정하였다(Fig. 4).

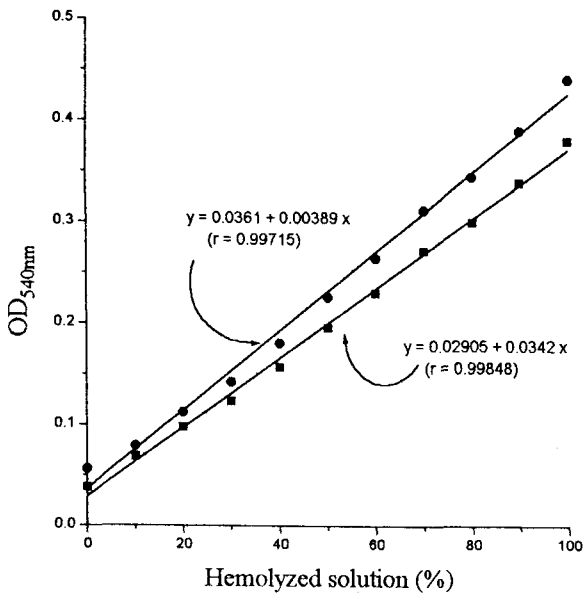


Fig. 1. Optical density of standard hemolyzed solution.

■-■, SRBC 5.0×10^8 cells/ml, ●-●, RaRBC 4.0×10^8 cells/ml.

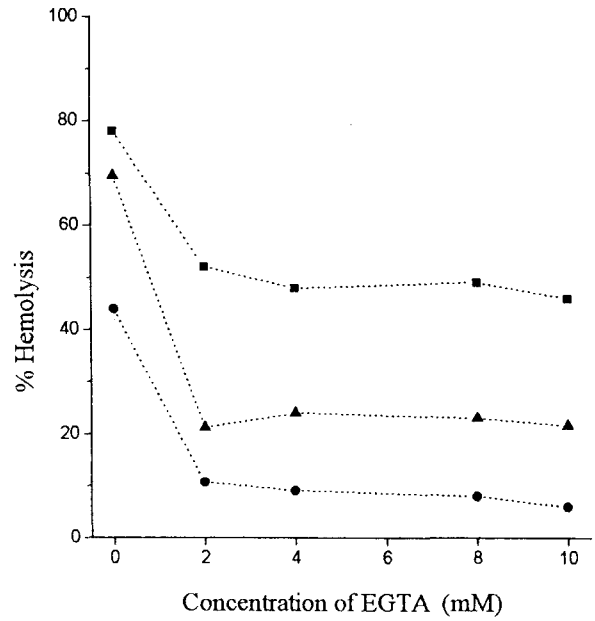


Fig. 3. Effect of EGTA on the hemolysis of alternative pathway. RaRBC concentration was 4.0×10^8 cells/ml and Mg^{2+} was 5 mM.

■-■, serum dilution 1/5, ●-●, serum dilution 1/10, ▲-▲, serum dilution 1/20.

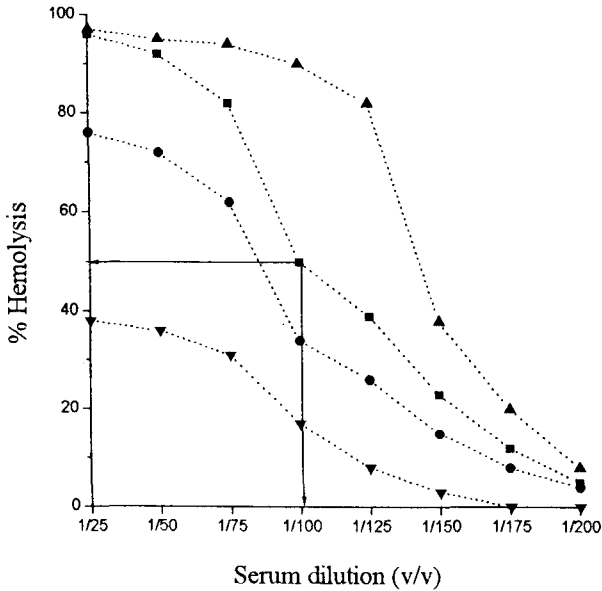


Fig. 2. Example of complement fixation curves on the classical pathway of the complement system. SRBC (5.0×10^8 cells/ml) was sensitized by reaction with corresponding hemolysin solution.

■-■, hemolysin dilution 1/50, ●-●, hemolysin dilution 1/75, ▲-▲, hemolysin dilution 1/25, ▼-▼, hemolysin dilution 1/100.

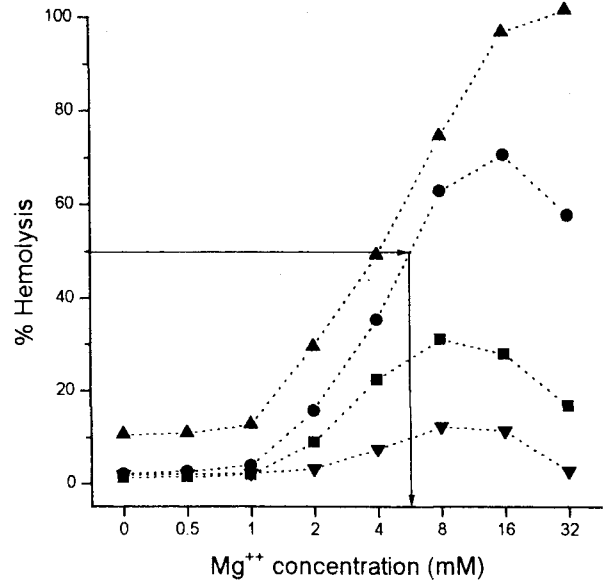


Fig. 4. Effect of Mg^{2+} concentration on hemolysis by the alternative pathway. RaRBC was 4.0×10^8 cells/ml and EGTA was 4 mM.

▲-▲, serum dilution 1/2.5, ■-■, serum dilution 1/10, ●-●, serum dilution 1/5, ▼-▼, serum dilution 1/20.

보체결합 반응중 용매의 영향

수용액상의 본 실험계에 비수용성 화합물이나 이를 포함하는 추출물의 활성을 검정할 경우 균일한 혼합을 위하여 유기용매 첨가가 필요하였다. 선정된 유기용매의 보체결합 반응에 대한 영향을 조사한 결과, CP상에서는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 비하여 acetone과 methanol은 용혈 억제효과가 매우 크게 나타났으며, AP상에서는 acetone과 DMSO에 비하여 methanol의 용혈 억

제효과가 크게 나타났다(Table 1). 본 실험에서는 두 실험계에 공통적으로 영향이 적게 나타난 DMSO를 선정하여 반응중 최종농도를 1%로 하였으며, 이때 표준 용혈의 흡광도 측정은 용매첨가로 인한 변화를 보정한 후 계산하였다.

Phenylpropanoid의 항보체 활성

Table 1. Effect of solvents on the complement fixation reaction.

| solvent ¹⁾ | | effect ²⁾ | |
|-----------------------|----|----------------------|-----------|
| | | CP | AP |
| Acetone | 1% | -26.9±1.5 | -3.9±0.1 |
| | 2% | -40.4±3.0 | -4.6±4.9 |
| | 3% | -54.5±3.7 | +7.8±3.6 |
| | 4% | -61.1±4.9 | +27.7±2.7 |
| DMSO | 1% | -8.4±1.8 | -14.1±4.6 |
| | 2% | -13.4±7.2 | -12.5±3.4 |
| | 3% | -14.3±7.1 | -12.3±0.1 |
| | 4% | -14.4±4.2 | +8.5±1.3 |
| Methanol | 1% | -32.2±2.7 | -26.2±2.7 |
| | 2% | -50.0±3.7 | -35.4±1.7 |
| | 3% | -61.1±0.1 | -38.3±2.9 |
| | 4% | -69.4±0.03 | -32.5±0.1 |

¹⁾ final concentration on complement fixation reaction, ²⁾ denoted suppression(-) or acceleration(+) from standard hemolysis.

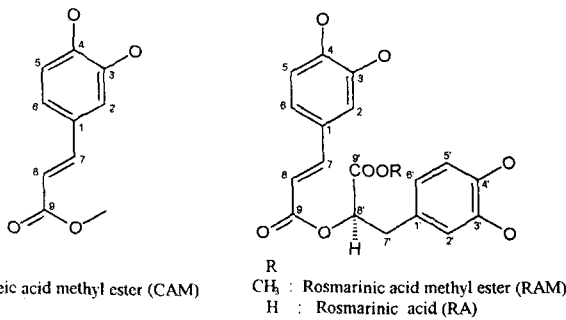


Fig. 5. Structures of compounds isolated from *Agastache rugosa*.

3종의 phenylpropanoids를 농도별로 항보체 활성을 검정한 결과 CP 및 AP상 모두에서 rosmarinic acid가 가장 강한 저해활성을 나타내었다(Fig. 6, Fig. 7). Rosmarinic acid의 저해활성은 CP상에서 0.063 mM일때 5.4±3.6%이었으나 그후 농도 증가에 따라 저해 활성은 급속히 증가하여 0.5 mM에서는 95.8±0.2%로 나타났다. AP상에서는 0.063 mM에서 35.1±0.9%으로 CP의 경우보다 저해 활성이 더 높게 나타났으나 0.5 mM에서는 79.6±1.7%, 1.0 mM에서는 95.6±1.1%로 나타났으며, 0.013 mM~0.1 mM의 농도범위에서 CP상의 저해활성은 AP보다 더 높게 나타났다. Peake 등¹⁵⁾은 CP와 AP상의 활성이 사용하는 적혈구와 표준용혈 조건의 보체농도에 따라 다르게 나타나며 저해활성은 CP상에서 더 크다고 보고하였고, Cimanga 등¹⁶⁾은 rosmarinic acid의 보체 저해활성을 CP상에서 93.3±0.1% (1 mM), AP상에서 67.8±3.8% (1 mM)으로 보고하여 각 보체 반응에서 사용한 성분 농도 및 반응 scale이 다르지만 검정 결과는 본 실험과 유사하였다.

Rosmarinic acid methyl ester와 caffeic acid methyl ester의 항보체 활성 검정은 본 실험에서 처음으로 시도한

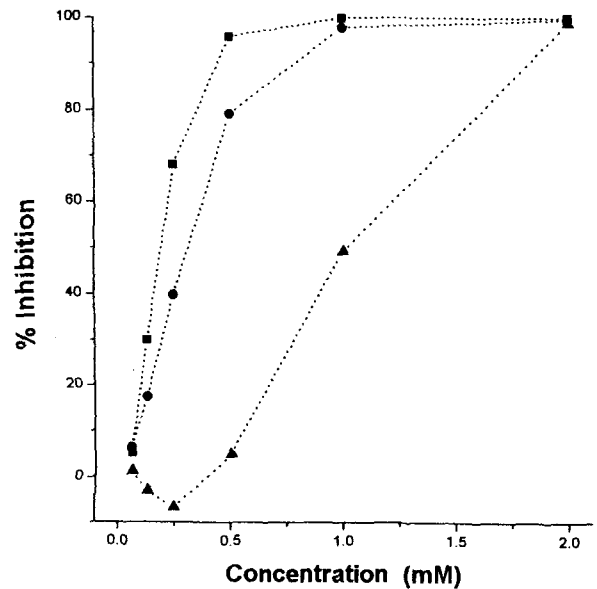


Fig. 6. Anticomplementary activity of three phenylpropanoids isolated from *Agastache rugosa* on the classical pathway. The components for standard hemolysis were SRBC 5.0×10^8 cells/ml, hemolysin dilution 1/100, and serum dilution 1/95, respectively. ■-■, rosmarinic acid, ●-●, rosmarinic acid methyl ester, ▲-▲, caffeic acid methyl ester.

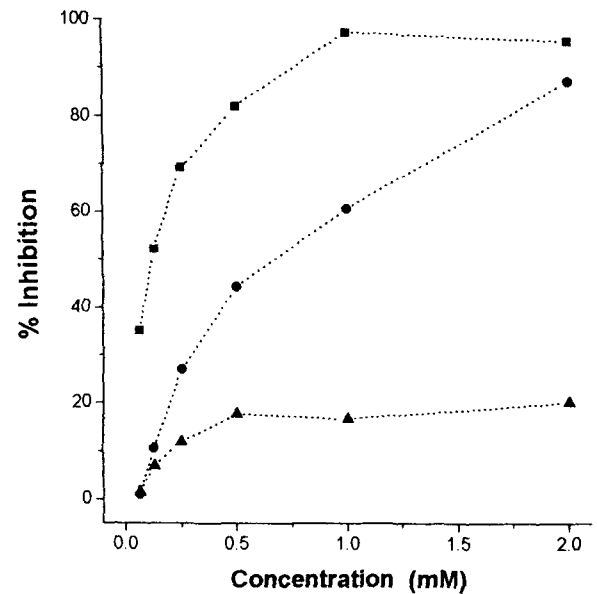


Fig. 7. Anticomplementary activity of three phenylpropanoids isolated from *Agastache rugosa* on the alternative pathway. The components for standard hemolysis were RaRBC 4.0×10^8 cells/ml, serum dilution 1/10, Mg^{2+} 5 mM and EGTA 4 mM. ■-■, rosmarinic acid, ●-●, rosmarinic acid methyl ester, ▲-▲, caffeic acid methyl ester.

것으로, rosmarinic acid methyl ester의 경우 CP 및 AP상의 저해활성은 rosmarinic acid와 유사하였으나 전 농도범위에서 rosmarinic acid보다 낮은 저해활성을 나타내어 구조내 carboxyl group의 노출여부가 활성에 영향을 주는 것으로 판단되었다(Fig. 5). Caffeic acid methyl

ester의 저해활성은 CP의 경우 0.5 mM 이하에서는 거의 저해활성이 나타나지 않았으나 1 mM에서 $49.1 \pm 3.3\%$, 2 mM에서는 $98.8 \pm 0.5\%$ 으로 고농도 범위에서 높은 저해활성이 나타났으며 AP상에서는 전반적으로 저해활성이 낮았고 17.4 ± 1.6 (0.5 mM)~ $35.7 \pm 6.4\%$ (2.0 mM)으로 CP상의 동일 농도에 비하여 농도에 비례한 저해활성 증가도 매우 낮았다.

Rosmarinic acid는 보체 활성화 저해작용,¹⁷⁾ arachidonic acid 대사과정중 leukotriene B₄ (LTB₄) 및 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosetraenoic acid (5-HETE)의 활성 저해작용,¹⁸⁾ lipid peroxidation 저해작용¹⁹⁾ 등 다양한 생리적 반응에 저해활성이 보고된 화합물로서, 항보체 활성 측정의 경우 Peake 등¹⁵⁾은 0~3 mM의 범위에서, Cimanga 등¹⁶⁾은 0.06~1 mM의 범위에서 측정하였는데, 본 방법으로 검정한 결과 CP상에서는 0.06~0.5 mM, AP상에서는 0.016~0.5 mM의 범위에서 농도에 비례한 항보체 활성 측정이 가능하였다.

따라서 본 실험방법은 보체반응의 각 성분과 검정대상 시료를 절감하고 다량의 시료를 신속하게 검정할 수 있는 효과적인 실험계로 판단되었으며, 이를 기준으로 천연자원을 대상으로 보체 저해활성 물질 탐색에 응용이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

양피 (SRBC)를 분양해 주신 서울대학교 농업생명과학 대학 동물자원학과 하 종규 교수님에게 감사드립니다. 본 연구의 일부는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업 (BSE 71590-581-4)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Kuby, J. (1994) In 'Immunology' 2nd ed. Chap. 15, W. H. Freeman Company, U.S.A.
2. Sundsmo, J. S. and D. S. Fair (1983) Relationship among the complement, kinin, coagulation and fibrinolytic systems in the inflammatory reaction. *Clin. Physiol. Biochem.* **1**, 225-284.
3. Rother, K., U. Rother and G. Hänsch (1985) The role of complement in inflammation. *Path. Res. Pract.* **180**, 117-124.
4. Groggel, G. C., S. Adler, H. G. Rennke, W.G. Couser and D. J. Salant (1983) Role of the terminal complement pathway in experimental membranous nephropathy in the rabbit. *J. Clin. Invest.* **72**, 1948-1957.
5. Strunk, R. C., D. M. Eidlen and R. J. Mason (1988) Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete

- proteins of the classical and alternative complement pathways. *J. Clin. Invest.* **81**, 1419-1426.
6. Alexander, E. L., T. T. Provost, M. E. Sanders, M. M. Frank and K. A. Joiner (1988) Serum complement activation in central nervous system disease in Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.* **85**, 513-518.
7. McGeer, D. L. and E. G. McGeer (1995) Alzheimer's disease: arthritis of the brain? *DN&P.* **8**, 80-83.
8. Miyagawa, S., H. Hirose, R. Shirakura, Y. Naka, S. Nakata, Y. Kawashima, T. Seya, M. Matsumoto, A. Uenaka and H. Kitamura (1988) The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* **46**, 825-830.
9. Dimond, P. F. (1995) Complement-inhibiting protein reduces inflammatory events. *Gen. Eng. News* **22**, 1, 22-23.
10. Ruddy, S. (1992) In 'Manual of clinical laboratory Immunology' Rose, N. R., E. C. de Macario, J. L. Fahey, H. Friedman and G. M. Penn 4th ed. Chap. 18, American Society for Microbiology, U.S.A.
11. 이형규 (1994) 순형과 식물로부터 신규성분 연구. 과학기술처보고서 BSE 71590-581-4.
12. Kabat, E. A. and M. M. Mayer (1961) In 'Experimental Immunochimistry' 2nd ed. Charles and Thomas, U.S.A.
13. Klerx, J. P. A. M., C. J. Beukelman, H. V. Dijk and J. M. N. Willers (1983) Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *J. Immunol. Methods* **63**, 215-220.
14. Platts-Mills, T. A. E. and K. Ishizaka (1974) Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* **113**, 348-358.
15. Peake, P. W., B. A. Pussel, P. Martyn, v. Timmermans and J. A. Charlesworth (1991) The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**, 853-857.
16. Cimanga, K., T. D. Bruyne, A. Lasure, B. V. Poel, K. Pieters, D. V. Berghe and A. Vlietinck (1995) *In vitro* anticomplementary activity of constituents from *Morinda Morindoides*. *J. Nat. Prod.* **58**, 372-378.
17. Englberger, W., U. Hadding, E. Etschenberg, E. Graf, S. Leyck, J. Winkelmann and M. J. Parnham. (1988) Rosmarinic acid: a new inhibitor of complement C3-convertase with anti-complementary activity. *Int. J. Immunopharmacol.* **10**, 728-737.
18. Kimura, Y. and H. Okuda (1987) Studies on the activities of tannins and related compounds X. effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Nat. Prod.* **50**, 392-399.
19. Liu, G. -T., T.-M. Zhang, B. -E. Wang and Y. -W. Wang (1992) Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembrane. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 142-152.

Micro-screening Method for the Anticomplement Substances from Natural Resources

Sei Ryang Oh, Keun Young Jung and Hyeong Kyu Lee* (*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon Korea*)

Abstract : To screen inhibitors on complement system from natural resources, micro-screening method was established by using hemolytic complement assay. Complement fixation reaction was carried out in the microplate system. For standard hemolysis (50% hemolysis) of the classical pathway (CP), hemolysin and complement serum were diluted to 1/75~1/100 and 1/80~1/120, respectively, when sheep erythrocytes were 5.0×10^8 cells/ml. In case of the alternative pathway (AP), complement serum was diluted to 1/5 and EGTA and Mg^{2+} were added 4 mM, 4~8 mM, respectively, when rabbit erythrocytes were 4.0×10^8 cells/ml. Dimethyl sulfoxide was used for the assay of non-aqueous soluble compounds or extracts and its final concentration was not more than 1%. Three phenylpropanoids showed anticomplementary activities in proportion to the concentration for both pathways and rosmarinic acid exhibited the highest inhibitory activities: $5.4 \pm 3.6\%$ (0.063 mM)~ $95.8 \pm 0.2\%$ (0.5 mM) and $35.1 \pm 0.9\%$ (0.063 mM)~ $95.6 \pm 1.1\%$ (1 mM) on the CP and the AP, respectively.

*Corresponding author