

흰쥐의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향

III. 뇌세포막의 유동성 및 신경전달관련 효소의 활성화에 미치는 PNE의 투여효과

최진호† · 김정화 · 김동우 · 황찬호 · 김대익 · 이종수

부경대학교 식품생명과학과 생화학연구실

Effect of Pine Needle Extract (PNE) on Physiological Activity of SD Rats III. Feeding Effect of PNE on Fluidity and Neurotransmitter-Related Enzymes in Brain Membranes of SD Rats

Jin-Ho Choi[†], Jung-Hwa Kim, Dong-Woo Kim, Chan-Ho Hwang, Dae-Ik Kim and Jong-Soo Lee

Department of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

To investigate the effect of pine needle extract (PNE) on membrane fluidity and neurotransmitter-related enzymes in brain of Sprague-Dawley(SD), male SD rats were fed basic diets (control group), and experimental diets (PNE group) with 0.5% and 1.0% of PNE for 6 weeks. Pine (*Pinus tabulaeformis* C_{ARR.}) is one of the popular plant drugs which has been used as a medicine in Asia.

Cholesterol levels in brain mitochondria of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly decreased in 15% and 25%, respectively, compared with control group, but cholesterol levels in brain microsomes of these PNE groups showed almost no change compared with control group. Lipofuscin accumulations in brain membranes of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly inhibited in 18% and 21%, respectively, compared with control group. Brain membrane fluidity was also activated in 50% and 100% by the administration of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE. Higher acetylcholinesterase (15% and 25%) and lower monoamine oxidase B (25% and 15%) activities were effectively modulated by the administration of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE. These results suggest that more beneficial effects such as inhibition of cholesterol and lipofuscin, increase of membrane fluidity, higher acetylcholinesterase and lower monoamine oxidase activities in brain membranes of SD rats may be effectively modulated by administration of pine needle extract (PNE).

Key words : Pine(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.), Pine needle extract(PNE), cholesterol, Membrane fluidity, Lipofuscin, Acetylcholinesterase(AChE), Monoamine oxidase-B(MAO-B)

[†] Corresponding author

서 론

솔잎은 《학포헌집(學圃軒集)》의 葉救荒說에 의하면 ‘솔잎은 위장에 위해가 없고 배고픔을 잊게 하며 음식을 절제하고 수명을 연장한다’고 하였고, 《동의보감(東醫寶鑑)》에는 ‘風濕瘡을 主治하고 毛髮을 나게하며 오장을 편히 하여 수명을 연장한다’는 기록이 있다¹⁾. 소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 극동 지방에 널리 자생하고 있는 상록성 침엽수이다. 옛날부터 소나무는 잎(松葉)을 비롯하여 꽃가루(松花), 솔방울(松實), 송진(松脂), 껍질(松皮) 등은 구황식품(救荒食品)으로 널리 이용되어 왔다. 송향(松香)은 《신농본초경(神農本草經)》의 上品에 송지(松脂)로서 수재되어 있고, ‘...풍(風)을 치료하고, 오장을 안정시키며 열을 내리게 한다. 오래 복용하면 몸이 가볍고, 늙지 않으며, 수명(天年)을 연장한다’는 기록이 있다²⁾.

옛날 문헌상에 나타난 한방의 기록이외에 생리 생화학적 연구는 솔잎 첨가식이의 혈청지질대사 연구³⁾, 솔잎 추출물의 혈청 및 간장의 지질과 효소연구⁴⁻⁵⁾ 등이 있을 뿐이다. 그런데 최근 솔잎 추출물의 항암효과⁶⁾가 연구되어 있고, 저자 등⁷⁾이 SD계 흰쥐를 사용하여 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 투여하여 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 미치는 영향을 평가하였다.

본 실험에서는 전보(최 등, 1997)⁷⁻⁸⁾에 이은 연구로서, 송엽을 80% 에탄올로써 water bath(80°C)에서 가열·추출하여 감압·농축한 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가하여 조제한 실험용 사료로서 6주동안 사용한 다음, 뇌를 적출하여 뇌세포획분을 사용하여 콜레스테롤의 변화, 리포푸신의 침착, 세포막 유동성 및 신경전달관련효소로서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE) 및 모노아민 옥시다아제(monoamine oxidase : MAO-B)의 활성에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 조제사료 조성

Sprague Dawley계 흰쥐(male rats : 160±10g)를 한국 화학연구소에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 사육 및

실험조건은 매일 오후 18:00에 체중의 측정과 함께 평량된 사료를 제공하고 다음 날 사료잔량을 평량하여 사료 섭취량을 계산하였다. 그리고 동물사육실은 자동조절(22±2°C ; 65±2% RH)되며 명암은 12시간 사이클(18:00~06:00)로 조절된다. 본 실험에 사용한 사료 조성은 전보(1997)⁷⁻⁸⁾와 마찬가지로 기본사료(control group)의 조성에 송엽 추출물(PNE) 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가하는 대신, 탄수화물중의 corn starch를 각각 0.5% 및 1.0%만큼 줄여서 조제하였다.

2. 뇌세포 획분의 분획

뇌세포의 분획은 저자 등(1996)⁹⁾의 방법에 따라 균질 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용, 균질화한 다음 700×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 9,000×g에서 15분간 원심분리한다. 이 때 생긴 잔사는 균질 완충용액으로써 정용하여 미토콘드리아 획분으로 사용하였고, 상층액은 다시 105,000×g에서 60분간 원심분리하여 얻은 잔사를 같은 완충용액으로 정용하여 마이크로솜 획분으로 사용하였으며, 그 상층액은 시토솜획분으로 사용하였다.

3. 콜레스테롤 함량의 측정

이들 획분의 단백질은 Lowry 등¹⁰⁾의 방법에 따라 정량하여 사용하였다. 뇌세포획분중의 콜레스테롤 함량은 Rudel 등(1973)¹¹⁾의 방법에 따라 o-phthalaldehyde법으로 측정하여 표준 검량선에 의거 뇌세포획분중의 콜레스테롤의 함량을 정량하였다.

4. 세포막 유동성의 측정

뇌세포막의 유동성(membrane fluidity)은 저자 및 Yu 등¹²⁻¹³⁾의 방법에 따라 fluorescence polarization technique에 따라 측정하여 정량하였다.

5. 리포푸신 함량의 측정

생체내의 장기의 생리적 기능저하, 성인병의 발병 및 생체노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 과산화지질(malondialdehyde : MDA)과 단백질의 결합에 의해 리포푸신(lipofuscin)이 생성되는 것으로 알려져 있다. 생체내의 노화세포로 알려진 리포푸신의 측정은 Fletcher 등¹⁴⁾의 방법

에 따라 측정·정량하였다.

6. AChE 및 MAO-B 활성의 측정

뇌조직중의 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE)의 활성은 Hallak 등¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였고, 모노아민 옥시다아제-B(monoamine oxidase-B : MAO-B)의 활성은 Kalaria 등¹⁶⁾의 방법에 따라 H₂O₂의 생성능을 기초로 측정하였다.

7. 분석결과와 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test (Steel 등)¹⁷⁾로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 뇌조직중의 콜레스테롤의 변화

0.5% -PNE 및 1.0% -PNE 투여그룹의 뇌세포막의 미토콘드리아중의 콜레스테롤의 함량은 각각 49.28±3.92mg/g protein 및 42.32±8.72mg/g protein으로서 대조그룹의 콜레스테롤의 함량(58.30±4.15mg/g protein : 100%) 대비 84.5% 및 72.6%로서 각각 15% 및 25%의 뇌세포막 콜레스테롤의 억제효과가 인정되었다. 그렇지만, 뇌세포막의 마이크로솜획분중의 콜레스테롤의 함량은 송엽

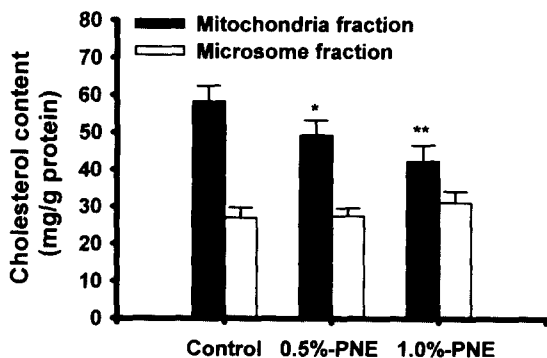


Fig. 1. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on cholesterol levels in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

*p<0.01 ; **p<0.001 compared with control group.

추출물(PNE)의 투여여부에 관계없이 대조그룹 대비 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

사실 혈액이나 조직세포중의 콜레스테롤의 함량은 연령의 증가와 함께 증가하는 것으로 알려져 있다(Schilling 등)¹⁸⁾. 그렇지만, 송엽 추출물의 투여가 뇌조직세포막의 콜레스테롤의 침착을 유의적으로 억제한다는 사실은 매우 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

2. 뇌세포막의 리포푸신의 변화

또한 뇌세포의 기능에 영향을 주는 것으로 알려진 뇌세포막중의 리포푸신(lipofuscin)의 침착에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여영향을 비교하여 보면 Fig. 2와 같다. 뇌세포막중에서 0.5% -PNE 및 1.0% -PNE 투여그룹의 리포푸신의 침착은 각각 1.97±0.15µg/mg protein 및 1.90±0.22µg/mg protein으로서 대조그룹의 리포푸신의 침착(2.41±0.14µg/mg protein : 100%) 대비 각각 81.7% 및 78.8%로서, 각각 18% 및 21%의 리포푸신 침착의 억제효과가 인정되었다(p<0.01).

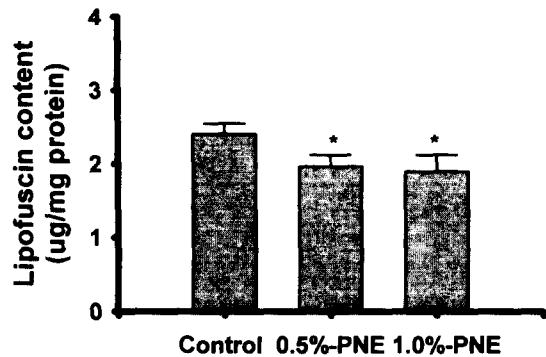


Fig. 2. Feeding effect of pine needle extract (PNE) on lipofuscin levels in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

*p<0.01 compared with control group.

뇌를 비롯한 대부분의 장기에서 생성되는 리포푸신의 함량은 연령과 매우 유의적으로 증가되기 때문에 리포푸신의 함량이 노화의 지표가 되고 있다(Tsuchida 등)¹⁹⁾. 이러한 사실에서 본다면 송엽 추출물(PNE)의 투여에 의하여 리포

푸신의 침착이 효과적으로 억제된다는 사실은 매우 바람직한 사실이라 하지 않을 수 없다.

3. 세포막 유동성의 변화

뇌세포막중의 시냅토솜에서의 도파민 흡수(Maguire 등)²⁰⁾, GABA(γ -aminobutyric acid)의 전달(Strong 등)²¹⁾ 및 시냅토솜에 대한 활성산소의 영향(최 등)¹²⁾ 등 신경의 자극전달에 막유동성은 매우 중요한 역할을 하고 있다.

뇌세포막의 기능에 대단한 영향을 주는 것으로 알려진 뇌세포막의 유동성(brain membrane fluidity)에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여영향을 비교하여 보면 Fig. 3과 같다.

뇌세포막중의 마이크로솜획분에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 막유동성은 각각 1.94 ± 0.11 polarization 및 2.65 ± 0.27 polarization으로서 대조그룹의 막유동성(1.31 ± 0.15 polarization : 100%) 대비 각각 148.1% 및 202.3%로서, 각각 50% 및 100%의 막유동성의 촉진효과가 인정되었다($p < 0.001$). 따라서 송엽 추출물의 투여가 뇌세포막의 유동성을 현저히 촉진함으로써 뇌세포막의 신경전달 등 뇌세포의 활성화에 깊이 관계할 것으로 기대된다.

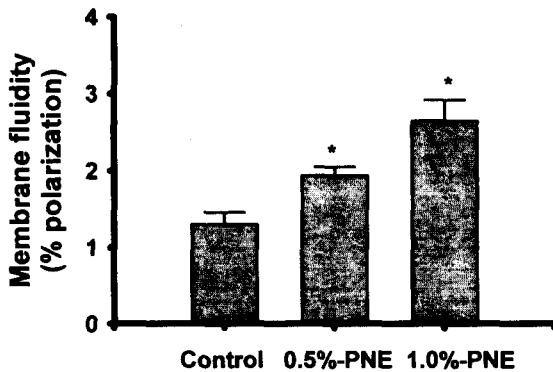


Fig. 3. Feeding effect of pine needle extract (PNE) on membrane fluidity in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

* $p < 0.001$ compared with control group.

4. 아세틸콜린에스테라아제의 활성 비교

뇌의 거의 모든 신경조직에서 발견되는 신경전달물질로서 아세틸콜린(acetylcholine : ACh)은 시냅스(synapse)와

시냅스사이의 신경전달에 관계하는 가장 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. 뇌신경계의 특정부위에서 ACh이 시냅스전 말단에서 분비되면 그것이 시냅스후 수용체와 결합하여 신경세포사이의 자극을 전달한다. 그러나 제2의 자극이 시냅스를 통해 전달하기 전에 제1의 자극시에 분비된 ACh은 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE)에 의하여 가수분해되어야만 한다. 그런데 ACh의 함량은 대부분의 사람 및 설치동물에서 연령과 함께 감소하는 것으로 알려져 있다(McGeer 등, 1975 ; Strong 등, 1980)²²⁻²³⁾. 또한 AChE의 활성도 ACh와 마찬가지로 감소한다는 사실이 밝혀지고 있다(Sastry 등, 1981)²⁴⁾.

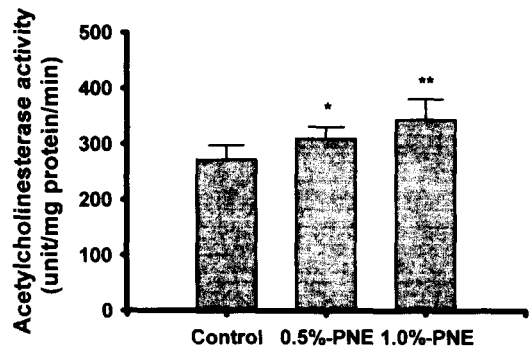


Fig. 4. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on acetylcholinesterase (AChE) activity in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

* $p < 0.01$; * $p < 0.001$ compared with control group.

AChE의 활성화에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여영향을 비교하여 보면 Fig. 4와 같다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 AChE의 활성은 각각 310.20 ± 20.71 unit/min/mg protein 및 344.02 ± 37.21 unit/min/mg protein 으로서 대조그룹의 AChE의 활성(272.29 ± 25.45 unit/min/mg protein : 100%) 대비 113.9% 및 126.3%로서 각각 15% 및 25%의 효소활성의 증가효과가 인정되었다. 따라서 신경전달에 가장 중요한 아세틸콜린에스테라아제의 활성 증가는 대단히 중요한 의미를 갖고 있기 때문에 송엽 추출물(PNE)의 투여는 기억 학습장애의 개선에 효과가 있을 것으로 기대된다.

5. 모노아민 옥시다아제(MAO-B)의 활성 비교

모노아민 옥시다아제(monoamine oxidase : MAO)는 동물에 널리 분포되어 있으면서 사람이나 흰쥐의 뇌나 혈청에서 연령에 따라 증가한다는 사실이 밝혀져 있다(Grote 등, 1974 ; Noda 등, 1982). 이 효소는 도파민(DA)이나 세로토닌(5-HT) 및 그 대사산물로서 노르에피네프린 등의 카테콜아민을 산화하여 파괴하는 효소로 알려져 있다. 특히 모노아민 옥시다아제-B(MAO-B)는 뇌세포내에서 신경전달물질로서 작용하는 카테콜아민을 파괴하기 때문에 MAO-B의 활성증가는 문제가 되는 것으로 알려져 있다.

PNE의 투여가 MAO-B의 활성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Fig. 5와 같다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 MAO-B 활성은 각각 17.33 ± 2.00 n mol/min/g protein 및 19.33 ± 1.67 n mol/min/g protein으로서 대조그룹의 MAO-B 활성(22.67 ± 1.33 n mol/min/g protein : 100%) 대비 76.4% 및 85.3%로서 각각 25% 및 15%의 MAO-B 활성의 억제효과가 인정되었다. 따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여는 뇌조직중의 카테콜아민계 신경물질을 파괴하는 모노아민 옥시다아제-B(MAO-B)의 활성을 효과적으로 억제한다는 사실은 매우 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

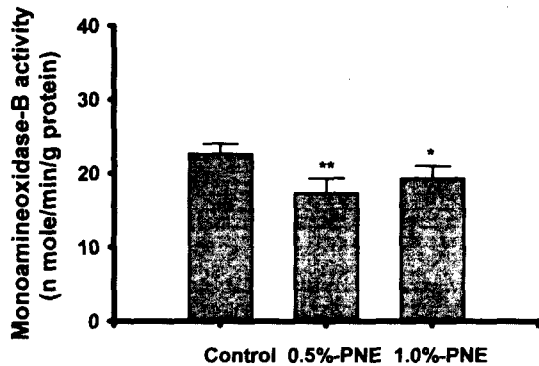


Fig. 5. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on monoamine oxidase-B activity in brain of SD rats after 6 weeks.

*p<0.01 ; **p<0.001 compared with control group.

요 약

송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 0.5% 및 1.0%

%가 되도록 첨가·조제한 실험용 사료로써 6주동안 사육한 다음, 뇌세포핵분을 사용하여 뇌세포막의 콜레스테롤의 변화, 리포푸신(lipofuscin)의 침착, 뇌세포막 유동성 및 신경전달관련효소로서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE) 및 모노아민 옥시다아제(monoamine oxidase : MAO-B)의 활성에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여효과를 평가하였다.

0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 뇌세포막의 미토콘드리아중의 콜레스테롤의 함량은 대조그룹의 콜레스테롤의 함량 대비 각각 15% 및 25%의 뇌세포막 콜레스테롤의 억제효과가 인정되었지만, 마이크로솜핵분중의 콜레스테롤의 함량은 송엽 추출물의 투여에 의한 유의성을 인정할 수 없었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 리포푸신의 침착은 대조그룹 대비 각각 18% 및 21%의 리포푸신 침착의 억제효과가 인정되었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 막유동성은 대조그룹 대비 각각 50% 및 100%의 막유동성의 촉진효과가 인정되었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 AChE의 활성은 대조그룹 대비 각각 15% 및 25%의 효소활성의 증가효과가 인정되었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 MAO-B 활성은 대조그룹 대비 각각 25% 및 15%의 MAO-B 활성의 억제효과가 인정되었다. 따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여는 뇌조직의 콜레스테롤 및 리포푸신의 침착을 효과적으로 억제하고, 세포막의 유동성을 촉진할 뿐만 아니라 뇌조직중의 신경전달물질의 활성을 촉진하며 아울러 카테콜아민계 신경물질을 파괴하는 모노아민 옥시다아제-B(MAO-B)의 활성을 효과적으로 억제한다는 사실은 매우 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

참 고 문 헌

1. 李盛雨 著 : 韓國食經大典. 서울 鄉文社 발행 pp. 414-417(1981).
2. 難波恒雄 著 : 原色和漢藥圖鑑(下) 東京 保育社 발행 pp. 191-194(1980).
3. 김중대·윤태현·최 면·임경자·주진순·이상영 : 솔잎 첨가식이 흰쥐의 혈청 지방질 대사에 미치는 영향. 한국노화학회지 1(1), 47-50(1991).
4. 강운한·박용곤·하태열·문광덕 : 솔잎 추출물이 고지방식을 급여한 흰쥐의 혈청과 간장의 지질 조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 25(3), 367-373

- (1996).
5. 강윤환 · 박용곤 · 하태열 · 문광덕 : 솔잎 추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청, 간장의 효소 및 간조직 구조에 미치는 영향. *한국영양식량학회지* 25(3), 374-378(1996).
 6. Kong, Z., Liu, Z. and Ding, B. : Study on the anti-mutagenic effect of pine needle extract. *Mutat Res Aug.* 347(3-4), 101-104(1995).
 7. 최진호 · 김동우 · 김정화 · 김경석 · 이종수 : 흰쥐(SD rats)의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향 I. 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 미치는 PNE의 투여효과. *한국생명과학회지* 7(4), 371-376(1997).
 8. 최진호 · 김동우 · 김정화 · 김경석 · 이종수 : 흰쥐(SD rats)의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향 II. 뇌세포막의 산소라디칼 및 그 제거효소의 활성에 미치는 PNE의 투여효과. *한국생명과학회지* 8(1), 인쇄중(1998).
 9. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age*, 19, 1-5(1996).
 10. Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275(1951).
 11. Rudel, L. L. and Morris, M. D. : Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J. Lipid. Res.* 14, 364-366(1973).
 12. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Brain synaptosomal aging : free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* 18(2), 133-139(1995).
 13. Yu, B. P., Suescun, E. A., Yang, S. Y. : Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂ : Modulation by dietary restriction. *Mech Age Dev* 65, 17-33(1992).
 14. Fletcher, B. L., Dillard, C. J. and Tappel, S. A. L. : Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52, 1-9(1973).
 15. Hallak, M. and Giacobini, E. A. : Comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase. *Neuropharmacol* 26(6), 521-530(1987).
 16. Kalaria, R. N., Mitchell, M. J. and Harik, S. I. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 3521-3525(1987).
 17. Steel, R.G.D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics. McGrawhill. New York(1960).
 18. Schilling, R. J., Christakis, G., Orbach, A. and Becker, W. H. : Serum cholesterol and triglyceride. An epidemiological and pathogenetic interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.* 22, 133-138(1969).
 19. Tsuchida, M., Miura, T. and Alsara, K. : Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chemistry and Physics of Lipids* 44, 297-325(1987).
 20. Maguire, P. A. and Druse, M. J. : The influence of cholesterol on synaptic fluidity and dopamine uptake. *Brain Res. Bull.* 22, 431-437(1989).
 21. Strong, R. and Wood, W. G. : Membrane properties and aging : *In vivo* and *in vitro* effects of ethanol on synaptosomal β -aminobutyric acid(GABA) release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229, 726-730(1984).
 22. McGeer, E. G. and McGeer, P. L. : Age changes in the human for some enzymes associated with metabolism of catecholamines, GABA, and acetylcholine. In, Ordy JM and Brizzee(eds), *Neurobiology of Aging* pp. 287-305, New York : Plenum Press(1975).
 23. Strong, R., Hsu, L., Bartus, R. T. and Enna, S. J. : Age-related alterations in the rodent brain cholinergic system and behavior. *Neurobiol Aging* 1, 59-64(1980).
 24. Sastry, B. V., Janson, V. E., Jaiswal, N. and Tayeb, O. S. : Deficiencies in the cholinergic nervous system of the rat cerebrum as a function of age. *Age* 4, 142-147(1981).