

생약추출물들의 acetylcholinesterase (AChE) 저해활성검색

김정섭 · 김영섭 · 김성기 · 허정희 · 이봉호¹ · 최병욱¹ · 유건식¹ · 박은경 · 지옥표² · 유시용*

한국화학연구원, ¹한밭대학교 공업화학과, ²성균관대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Some Herbal Extracts on the Acetylcholinesterase (AChE) *In Vitro*

Jeoung Seob Kim, Young Sup Kim, Seong-Kie Kim, Junghee Heor, Bong Ho Lee¹,
Byoung Wook Choi¹, Geonseek Ryu¹, Eun Kyung Park, Ok Pyo Zee², and Shi Yong Ryu*

Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-343,

¹Department of Chemical Technology, Hanbat National University; Taejeon 305-719,

²College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract – The methanol extracts of 340 kinds of Korean medicinal herbs were examined *in vitro* for the inhibitory effect on the acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) from electric eel using acetylthiocholine as a substrate. Among tested, the extracts of Coptidis Rhizoma, Phellodendri Cortex, Evodiae Fructus, Myrrha, Arecae Semen and Piperis nigri Fructus were found to exhibit a significant inhibition upon the acetylcholinesterase in a dose dependent manner, respectively.

Key words – acetylcholine; acetylcholinesterase; inhibition; medicinal herb; Coptidis Rhizoma.

흔히 Alzheimer's disease(AD)라고 일컫고 있는 대부분의 노인성치매(senile dementia)는 그 발병원인에 대해서는 자세히 밝혀진 바 없으나 심한 뇌위축과 뇌세포의 손상으로 말미암아 기억력 및 각종 인지능이 감퇴되고 추상적인 사고판단능력이 현격하게 저하되므로서 궁극적으로는 심각한 성격장애, 불면, 망상, 행동장애등의 증상을 나타내게 되는 대표적인 퇴행성 만성뇌질환이다. 또, 노인성치매를 비롯한 퇴행성 뇌질환은 각종 질병으로 인한 인간의 사망률 분포의 순위도에서도 관상동맥질환, 악성종양에 이어 3위의 순서를 차지하고 있으며 현재 전 세계적으로 2,500만명 정도의 인구가 노인성치매에 시달리고 있다. 실제로 노인성치매의 발병빈도율(유병율)은 환자의 연령에 비례하여 급격히 증가하며 65세 이상 전체인구의 6-8%, 85세 이상 전체인구의 30%가 실제로 이 질병으로 고통을 받고 있다. 이 질병은 환자의 치료과정에 수반되는 직접적인 의료비용 이외에도 환자들을 돌보는데 따르는 추가 간병인력의 손실 및 간병에 따른 생산성저하 등의 부대요인들을 감안하여 볼 때 이 질병으로 인한 사회적, 경제적 손실은 이루 헤아릴 수 없을 정도이다. 따라서 노인인구가 급속하게 증가하고 있는

오늘날의 상황을 직시하여 볼 때 노인성치매는 그 해결책이 하루속히 강구되어야 할 매우 시급한 과제라고 할 수 있다.

그간 현대의학 및 분자생물학의 눈부신 발전에도 불구하고 노인성치매는 아직껏 정확한 질병의 원인조차 제대로 규명되지 못하고 있는 연유로 대부분의 환자들에게 처치되어지고 있는 의료행위는 대부분 항정신성약물(antipsychotics), 항우울제(antidepressant), 항불안제(antianxiety), 항경련제(anticonvulsant), 뇌기능개선편제(nootropics), 신경전달물질의 대사에 관여하는 효소차단제(enzyme blocker), 칼슘차단제(Ca-blocker)등의 약제들을 병의 진행상황에 따라 적절하게 사용함으로써 병의 진전에 따른 일시적인 증상완화만을 도모하고 있는 실정이다. 또, 전술한 약제들중 많은 약물들에 대하여는 치매 치료제로서의 활용가능성이 여러차례 연구 검토되어져 왔으나 대부분의 경우 성격장애, 불면, 망상, 행동장애 등 치매의 진행에 따라 발생하는 각종 병증에 대한 일시적인 완화효과만 일부분 인정이 되고 인지기능개선효과 등 치매에 대한 근본적인 치유효과를 보여주는 약물은 거의 전무한 실정이다. 최근 노인성치매로부터 유발되는 기억력상실, 학습력 저하 등 각종 인지기능장애는 주로 대뇌 기저부의 acetylcholine성 신경세포의 손상으로부터 기인된

*교신저자(E-mail) : syryu@kriect.re.kr

다는 연구가설에 의거하여 무스카린성 acetylcholine 수용체에 대한 효능제, acetylcholine 생성촉진제, acetylcholinesterase 저해제 등 여러가지 작용기전에 따라 acetylcholine 성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 많은 약물들이 개발되어져 왔다.^{1,2)} 이들 약제들은 일차적인 중추 muscarine 성 acetylcholine 수용체의 손상에 따라 중추신경전달계 전반에 걸쳐 포괄적인 신경전달기능저하가 야기되므로써 치매의 발병 및 진행이 이루어진다는 가설에 의거하여 연구 개발된 산물들이다.^{1,2,3)} 대표적인 사례로, 노인성치매로 야기된 muscarine성 acetylcholine 수용체 M₁ subtype(mAChR-M₁)의 기능저하를 향진시켜줄 수 있는 효과적인 muscarine 효능약(mAChR-M₁ agonist)이 치매의 치료 혹은 병의 진행을 지연시켜줄 수 있으리라는 연구 가설 하에 arecoline, oxotremoline 등 여러 가지 muscarine 효능약(mAChR-M₁ agonist)이 연구 개발되었으며,^{4,6)} 현재 mirameline, sabcomeline, xanomeline 등이 시판되고 있다.^{7,8)} 본 연구자들 역시 우수한 muscarine성 acetylcholine 효능약(mAChR-M₁ agonist)을 천연자원 중에서 탐색하여 보고자 다양한 생약의 추출물들을 대상으로 하여 muscarine성 acetylcholine 수용체 M₁ subtype(mAChR-M₁)에 대한 친화력을 검색하여 보고한 바 있다.⁹⁾

전술한 바와 같이 여러 가지 작용기전에 따라 acetylcholine 성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 acetylcholine성 약물들이 속속 개발되고 있으나 현재 전세계적으로 가장 활발하게 연구 개발되어지고 있으며 FDA의 정식허가를 받아 시판되고 있는 tacrine (Cognex), rivastigmine (Exelon), donepezil (Aricept), galantamine (Reminil) 등 치매개선약제들의 약리작용기전을 살펴보면 모두 acetylcholinesterase 저해효과를 약효의 근간으로 삼고 있다. 이와 같이 치매치료제 개발과정에 있어서 전세계적으로 acetylcholinesterase가 가장 많이 약리작용점으로 채택되고 있는 연구추세에 따라 본 연구진은 우리나라등 동북아시아 지방에서 고래로 널리 사용되어 온 여러 생약재들로부터 우수한 치매치료약제를 개발하여 보고자 340여 생약재의 추출물을 대상으로 하여 acetylcholinesterase 의 저해효과를 검색하여 보았다.

재료 및 방법

생약의 추출 및 시료검액조제

실험에 사용된 생약시료들은 경동시장에서 구입하여 전문가의 정확한 감정을 거친후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 한국화학연구원에 보관되어 있다.

건조된 생약시료 100 g을 methanol 2L에 넣고 일주일간 상온에서 침출시킨 후 마포로 추출액을 여과하고 즉시 rotary

evaporator에서 감압농축하였다. 농축액은 냉동보관하고 실험 직전에 0.1 M phosphate buffer (0.1 N NaCl 함유)로 1 mg/ml의 농도로 녹여 시료검액으로 사용하였다.

시약 및 기기

효소저해실험에 사용한 acetylcholinesterase 효소원으로는 전기뱀장어로부터 추출정제된 acetylcholinesterase(AChE, E.C. 3.1.1.7. Sigma C2627)를 사용하였으며 효소반응의 기질로 사용한 acetylthiocholine(ATCh), 효소저해활성의 대조약물로 사용한 THA(tetrahydroaminoacridine; tacrine) 및 coupling agent로 사용한 DTNB(5,5'-dithio bis-2-nitrobenzoic acid)는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 완충용액 0.1 M phosphate buffer(0.1 N NaCl 함유)는 용시 조제하여 사용하였으며 흡광도측정은 HP8452 diode array UV-visible spectrophotometer(Hewlett-Packard)를 이용하였다.

효소활성 및 효소활성저해효과의 측정법

효소활성은 Ellman's coupled enzyme assay 방법을 사용하여 측정하였다.¹⁰⁾ 효소반응은 25.0±0.1°C 항온조내에서 실행하였으며 1 ml cuvette을 반응조로 사용하였다. 즉, 기질, coupling agent 및 검액을 함유한 반응조를 항온조 내에서 4분간 incubation한 후 즉시 효소액(AChE 10 unit/10 µl)을 첨가하고 60초 동안 incubation 한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응액 (1 ml) 중 기질 acetylthiocholine (ATCh)의 농도는 0.1 mM, coupling agent DTNB의 농도는 0.2 mM로 하고 시료검액은 0.1 mg(0.1 ml)으로 하였다. 모든 실험군은 triplicate로 실행하여 흡광도의 평균치를 산출하였다. 시료검액의 효소활성저해 효과는 시료검액 대신 동량의 완충액을 넣은 대조군의 흡광도치(control test, C.T.)와 시료검액을 넣어준 검액군의 흡광도치(sample test, S.T.)를 이용하여 아래 수식에 따라 산출하였다.

$$\text{inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{S.T.}}{\text{C.T.}} \times 100 \right)$$

결과 및 고찰

한방에서 빈용하고 있는 가자(*Terminaria chebula*) 등 생약재 340종의 메탄올 추출물을 대상시료로 하여 전기뱀장어로부터 추출정제된 acetylcholinesterase 에 대한 *in vitro* 저해효과를 acetylthiocholine을 기질로 사용하여 검색하여 보았다. 우선 각각 100 µg/ml의 농도로 희석한 각 생약의 메탄올추출물을 검체로 하여 340종의 생약재 각각의 효소저

Table 1. Inhibition of acetylcholinesterase by extracts of medicinal plants *in vitro*

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Allium tuberosum</i>	가구자	6
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	가시오가피	17
<i>Terminaria chebula</i>	가자	2
<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈근	21
<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈화	2
<i>Chrysanthemum indicum</i>	감국	3
<i>Nardostachys chinensis</i>	감송향	16
<i>Euphorbia kansui</i>	감수	4
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	감초	20
<i>Dalbergia odorifera</i>	강진향	24
<i>Angelica koreana</i>	강활	0
<i>Curcuma longa</i>	강황	17
<i>Kalopanax pictus</i>	개두릅(잎)	0
<i>Brassica juncea</i>	개자	11
<i>Zingiber officinale</i>	건강	28
<i>Castanea crenata</i>	견을	9
<i>Euryale ferox</i>	검인	14
<i>Cassia tora</i>	결명자	31
<i>Gallus domesticus</i>	계내금	13
<i>Cinnamomum cassia</i>	계지	5
<i>Cinnamomum cassia</i>	계피	12
<i>Mucuna birdwoodiana</i>	계혈등	52
<i>Alpinia officinarum</i>	고량강	22
<i>Melia azedarach var. japonica</i>	고련피	2
<i>Picrasma quassioides</i>	고목	0
<i>Angelica tenuissima</i>	고본	19
<i>Sophora flavescens</i>	고삼	32
<i>Capsicum annuum</i>	고추	0
<i>Eriocaulon sieboldianum</i>	곡정초	6
<i>Laminaria japonica</i>	곤포	4
<i>Caragana sinica</i>	골담초근	1
<i>Drynaria fortunei</i>	골쇄보	14
<i>Cucumis melo</i>	과체	11
<i>Agastache rugosa</i>	곽향	0
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	관중	11
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	팔루근	11
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	팔루인	8
<i>Sophora japonica</i>	괴화	0
<i>Lycium chinense</i>	구기자	0
<i>Dianthus chinensis</i>	구맥	17
<i>Cudrania tricuspidata</i>	구절상목	5
<i>Chrysanthemum sibiricum</i>	구절초	4
<i>Cibotium barometz</i>	구척	1
<i>Selaginella tamariscina</i>	권백	1

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Euonymus alatus</i>	귀전우	10
<i>Rosa laevigata</i>	금앵자	6
<i>Lonicera japonica</i>	금은화	0
<i>Platycodon grandiflorum</i>	길경	1
<i>Raphanus sativus</i>	내복자	21
<i>Phragmites communis</i>	노근	1
<i>Aloe ferox</i>	노회	2
<i>Phaseolus radiatus</i>	녹두	0
<i>Omphalia lapidescens</i>	뇌환	12
<i>Echinops setifer</i>	누로	0
<i>Salvia multiorrhiza</i>	단삼	14
<i>Lophatherum gracile</i>	담죽엽	11
<i>Angelica gigas</i>	당귀	29
<i>Codonopsis pilosula</i>	당삼	11
<i>Cirsium japonicum</i>	대계	3
<i>Euphorbia pekinensis</i>	대극	0
<i>Glycine max</i>	대두	4
<i>Areca catechu</i>	대복피	12
<i>Zizyphus jujuba</i>	대추	0
<i>Hydnocarpus anthelmintica</i>	대풍자	12
<i>Rheum palmatum</i>	대황	38
<i>Prunus persica</i>	도인	15
<i>Aralia cordata</i>	독활	27
<i>Benincasa hispida</i>	동과자	5
<i>Malva verticillata</i>	동규자	14
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충	19
<i>Juncus effusus</i>	등심초	7
<i>Aristolochia contorta</i>	마두령	18
<i>Cannabis sativa</i>	마인	0
<i>Portulaca oleracea</i>	마치현	5
<i>Ephedra sinica</i>	마황	14
<i>Lyophyllum ulmarium</i>	만가닥	0
<i>Codonopsis pilosula</i>	만삼	4
<i>Vitex rotundifolia</i>	만형자	12
<i>Rosa rugosa</i>	매괴화	28
<i>Liriope platyphylla</i>	맥문동	4
<i>Hordeum vulgare</i>	맥아	19
<i>Gossypium nanking</i>	면실자	21
<i>Imperata cylindrica</i>	모근	0
<i>Chaenomeles sinensis</i>	목과	9
<i>Paeonia moutan</i>	목단피	31
<i>Cocculus trilobus</i>	목방기	9
<i>Momordica cochinchinensis</i>	목별자	9
<i>Equisetum hiemale</i>	목적	19
<i>Akebia quinata</i>	목통	8

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Saussurea lappa</i>	목향	21
<i>Commiphora molmol</i>	몰약	73
<i>Ulmus macrocarpa</i>	무이	4
<i>Buddleia officinalis</i>	밀몽화	18
<i>Mentha arvensis</i>	박하	0
<i>Pinellia ternata</i>	반하	3
<i>Sinomenium acutum</i>	방기	19
<i>Ledebouriella seseloides</i>	방풍	0
<i>Bombyx mori</i>	백강잠	0
<i>Ginkgo biloba</i>	백과	16
<i>Chelidonium majus</i>	백굴채	29
<i>Bretilla striata</i>	백급	16
<i>Santalum album</i>	백단향	0
<i>Amomum cardamomum</i>	백두구	44
<i>Pulsatilla koreana</i>	백두옹	41
<i>Ampelopsis japonica</i>	백렴	0
<i>Cynanchum atratum</i>	백미	0
<i>Stemona japonica</i>	백부근	4
<i>Aconitum koreanum</i>	백부자	5
<i>Poria cocos</i>	백복령	11
<i>Dictamnus albus</i>	백선피	30
<i>Cynanchum wilfordii</i>	백수오	13
<i>Thuja orientalis</i>	백자인	16
<i>Paeonia albiflora</i>	백작약	28
<i>Angelica dahurica</i>	백지	5
<i>Tribulus terrestris</i>	백질려(질려자)	0
<i>Atractylodes japonica</i>	백출	8
<i>Dolichos lablab</i>	백편두	0
<i>Lilium lancifolium</i>	백합	0
<i>Psoralea corylifolia</i>	보골지	37
<i>Strychnos ignatii</i>	보두	20
<i>Rubus coreanus</i>	복분자	12
<i>Pachyma hoelen</i>	복신	9
<i>Curcuma zedoaria</i>	봉출	37
<i>Triticum aestivum</i>	부소맥	4
<i>Acontium carmichaeli</i>	부자	0
<i>Spirodela polyrhiza</i>	부평	13
<i>Torreya nucifera</i>	비자	3
<i>Eriobotrya japonica</i>	비파엽	6
<i>Dioscorea tokoro</i>	비해	3
<i>Areca catechu</i>	빈랑자	62
<i>Belamcanda chinensis</i>	사간	21
<i>Luffa cylindrica</i>	사과락	15
<i>Adenophora triphylla</i>	사삼	18
<i>Torilis japonica</i>	사상자	8

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Amomum xanthioides</i>	사인	0
<i>Sophora subprostrata</i>	산두근	0
<i>Crataegus pinnatifida</i>	산사자	21
<i>Cornus officinalis</i>	산수유	45
<i>Dioscorea japonica</i>	산약	15
<i>Cremastra variabilis</i>	산자고	0
<i>Zizyphus vulgaris var. spinosus</i>	산조인	8
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	산초	29
<i>Scirpus flaviatilis</i>	삼릉	3
<i>Saururus chinensis</i>	삼백초	1
<i>Panax notoginseng</i>	삼칠근	0
<i>Loranthus parasiticus</i>	상기생	10
<i>Phytolacca esculenta</i>	상륙	9
<i>Morus alba</i>	상백피	53
<i>Morus alba</i>	상심자	12
<i>Morus alba</i>	상엽	9
<i>Paratenodera sinensis</i>	상표초	0
<i>Pleurotus eryngii</i>	새송이	5
<i>Dendrobium nobile</i>	석곡	1
<i>Lycopodium clavatum</i>	석송자	18
<i>Pyrrosia lingua</i>	석위	17
<i>Forsythia viridissima</i>	연교	7
<i>Nelumbo nucifera</i>	연자육	7
<i>Lysimachia foenum-graecum</i>	영릉향	4
<i>Rosa multiflora</i>	영실	17
<i>Ganoderma lucidum</i>	영지	21
<i>Akebia quinata</i>	예지자	1
<i>Acorus gramineus</i>	석창포	15
<i>Curculigo orchioides</i>	선모	3
<i>Inula japonica</i>	선복화	14
<i>Asiasarum sieboldi</i>	세신	20
<i>Cassia angustifolia(C.acutifolia)</i>	센나엽	21
<i>Cephalonoplos segetum</i>	소계	25
<i>Caesalpinia sappan</i>	소목	17
<i>Perilla frutescen var. acuta</i>	소엽	16
<i>Perilla frutescen var. acuta</i>	소자	4
<i>Foeniculum vulgare</i>	소회향	8
<i>Phlomis umbrosa</i>	속단	0
<i>Euphorbia lathyris</i>	속수자	2
<i>Pinus densiflora</i>	솔잎 분말	5
<i>Pinus densiflora</i>	송화분	9
<i>Cynomorium songaricum</i>	쇠양	20
<i>Rehmannia glutinosa var.purpurea</i>	숙지황	2
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	승마	9
<i>Anethum graveolens</i>	시라자	1

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Diospyros kaki</i>	시체	8
<i>Bupleurum falcatum</i>	시호	12
<i>Magnolia denudata</i>	신이	21
<i>Uncaria gambir</i>	아선약	37
<i>Ferula assafoetida</i>	아위	0
<i>Artemisia asiatica</i>	애엽	16
<i>Houttuynia cordata</i>	어성초	7
<i>Ligustrum lucidum</i>	여정실	0
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	오가피	8
<i>Aconitum carmichaeli</i>	오두	0
<i>Prunus mume</i>	오매	14
<i>Schizandra chinensis</i>	오미자	10
<i>Rhus javanica</i>	오배자	49
<i>Evodia officinalis</i>	오수유	64
<i>Lindera strychnifolia</i>	오약	29
<i>Zea mays</i>	옥촉서예	2
<i>Orostachys japonicus</i>	와송	0
<i>Melandrium firmum</i>	왕불류행	4
<i>Solanum nigrum</i>	용규초	10
<i>Dryobalanops aromatica</i>	용뇌	15
<i>Gentiana scabra</i>	용담	14
<i>Agrimonia pilosa</i>	용아초	6
<i>Euphoria longana</i>	용안육	8
<i>Arctium lappa</i>	우방자	17
<i>Acyranthes japonica</i>	우슬	15
<i>Prunus nakaii</i>	육리인	7
<i>Brassica chinensis</i> var. <i>oleifera</i>	운대자	12
<i>Curcuma longa</i>	울금	35
<i>Polygala tenuifolia</i>	원지	14
<i>Daphne genkwa</i>	원화	0
<i>Clematis mandshurica</i>	위령선	20
<i>Polygonatum odoratum</i>	위유	16
<i>Ulmus macrocarpa</i>	유백피	30
<i>Boswellia carterii</i>	유향	5
<i>Cinnamomum cassia</i>	육계	11
<i>Myristica fragrans</i>	육두구	16
<i>Cistanche deserticola</i>	육종용	15
<i>Ginkgo biloba</i>	은행잎	0
<i>Epimedium koreanum</i>	음양곽	16
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	의이인	11
<i>Leonurus sibiricus</i>	익모초	0
<i>Alpinia oxyphylla</i>	익지	8
<i>Lonicera japonica</i>	인동	0
<i>Panax ginseng</i>	인삼	0
<i>Artemisia capillaris</i>	인진호	9

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	자근	15
<i>Pterocarpus santalinus</i>	자단향	0
<i>Aster tataricus</i>	자원	0
<i>Paeonia lactiflora</i>	작약	13
<i>Bombyx mori</i>	잠사	9
<i>Ailanthus altissima</i>	저근백피	11
<i>Polyporus umbellatus</i>	저령	8
<i>Broussonetia kazinoki</i>	저실자	10
<i>Poria cocos</i>	적복령	6
<i>Phaseolus angularis</i>	적소두	3
<i>Paeonia obovata</i>	적작약	29
<i>Anthriscus sylvestris</i>	전호	12
<i>Sambucus williamsii</i> var. <i>coreana</i>	접골목	0
<i>Erucibe obtusifolia</i>	정공동	0
<i>Draba nemorosa</i> var. <i>hebecarpa</i>	정력자	7
<i>Eugenia caryophyllata</i>	정향	12
<i>Eugenia aromatica</i>	정향피	43
<i>Adenophora remotiflorus</i>	제니	10
<i>Gleditsia japonica</i>	조각자	0
<i>Uncaria senensis</i>	조구등	4
<i>Gleditsia japonica</i> var. <i>koraiensis</i>	조협	15
<i>Rheum undulatum</i>	종대황	42
<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i>	죽력	8
<i>Phyllostachys nigra</i>	죽여	10
<i>Houttuynia cordata</i>	즙채	1
<i>Citrus aurantium</i>	지각	16
<i>Lycium chinense</i>	지골피	7
<i>Hovenia dulcis</i> var. <i>koreana</i>	지구자	19
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	지모	5
<i>Kochia scoparia</i>	지부자	25
<i>Poncirus trifoliata</i>	지실	16
<i>Sanguisorba officinalis</i>	지유	19
<i>Gentiana macrophylla</i>	진교	5
<i>Citrus unshiu</i>	진피	19
<i>Tribulus terrestris</i>	질려자	18
<i>Plantago asiatica</i>	차전자	3
<i>Plantago asiatica</i>	차전초	26
<i>Xanthium strumarium</i>	창이자	23
<i>Atractylodes japonica</i>	창출	9
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	6
<i>Arisaema amurense</i>	천남성	9
<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	천련자	15
<i>Gastrodia elata</i>	천마	1
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	천문동	0
<i>Aconium carmichaeli</i>	천오	17

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Rubia akane</i>	천초근	35
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	천축황	16
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	천화분	8
<i>Persicaria tinctoria</i>	청대	3
<i>Aristolochia contorta</i>	청목향	0
<i>Celosia argentea</i>	청상자	18
<i>Citrus unshiu</i>	청피	6
<i>Artemisia apiacea</i>	청호	4
<i>Amomum tsao-ko</i>	초과	21
<i>Alpinia katsumadai</i>	초두구	30
<i>Aconitum ciliare</i>	초오	7
<i>Gentiana scabra</i>	초용담	17
<i>Althaea rosea</i>	촉규화	6
<i>Biota orientalis</i>	촉백엽	15
<i>Gardenia jasminoides</i>	치자	7
<i>Rhus verniciflua</i>	칠피	33
<i>Lycopus coreanus</i>	택란	18
<i>Alisma orientale</i>	택사	18
<i>Smilax china</i>	토복령	8
<i>Cuscuta chinensis</i>	토사자	6
<i>Cnidium officinale</i>	토천궁	14
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	통초	0
<i>Psoralea corylifolia</i>	파고지	31
<i>Morinda officinalis</i>	파극천	24
<i>Croton tiglium</i>	파두	23
<i>Isatis tinctoria</i>	판람근	16
<i>Fritillaria thunbergii</i>	패모	13
<i>Patrinia villosa</i>	패장	5
<i>Flammulina velutipes</i>	팽이버섯	4
<i>Polygonum aviculare</i>	편축	14
<i>Taraxacum platycarpa</i>	포공영	3
<i>Vitis vinifera</i>	포도줄기껍질	55
<i>Typha orientalis</i>	포황	5
<i>Ricinus communis</i>	피마자	23
<i>Piper longum</i>	필발	24
<i>Prunella vulgaris var. lilacina</i>	하고초	0
<i>Polygonum multiflorum</i>	하수오	0
<i>Nelumbo nucifera</i>	하엽	15
<i>Carpesium abrotanoides</i>	학슬	0
<i>Eclipta prostrata</i>	한련초	6
<i>Albizia julibrissin</i>	합환피	4
<i>Lygodium japonica</i>	해금사	7
<i>Kalopanax pictus</i>	해동피	0
<i>Allium macrostemon</i>	해백	10
<i>Pinus koraiensis</i>	해송자	1

Table 1. Continued

Species	생 약*	Inhibition (%)
<i>Sargassum fusiforme</i>	해조	19
<i>Sepia esculenta</i>	해표초	0
<i>Prunus armeniaca var. ansa</i>	행인	22
<i>Cyperus rotundus</i>	향부자	11
<i>Elsholtzia ciliata</i>	향유	15
<i>Scrophularia buergeriana</i>	현삼	4
<i>Geranium thunbergii</i>	현초	14
<i>Corydalis ternata</i>	현호색	49
<i>Nepeta japonica</i>	형개	4
<i>Juglans sinensis</i>	호두	0
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	호로파	0
<i>Embelia parviflora</i>	호미초	5
<i>Pinus densiflora</i>	호박	7
<i>Polygonum cuspidatum</i>	호장근	37
<i>Carthamus tinctorius</i>	홍화씨	1
<i>Betula platyphylla var. japonica</i>	화피	15
<i>Scutellaria baicalensis</i>	황금	0
<i>Astragalus membranaceus</i>	황기	0
<i>Coptis japonica</i>	황련	77
<i>Phellodendron amurense</i>	황백	86
<i>Polygonatum sibiricum</i>	황정	19
<i>Foeniculum vulgare</i>	회향	0
<i>Magnolia officinalis</i>	후박	16
<i>Piper nigrum</i>	후추	62
<i>Sesamum indicum</i>	흑지마	3
<i>Pharbitis nil</i>	흑축	0
<i>Siegesbeckia pubescens</i>	희렴	7

*Each plant sample was prepared by dissolving the MeOH extract of corresponding plant in PBS buffer solution (0.1 mg/ml)

해효과를 검색하고 그 결과를 표 1에 정리하였다. 대부분의 생약재들이 대조약제로 사용한 THA(tetrahydroaminoacridine; tacrine)에 비하여 (THA의 50% 효소저해농도(IC₅₀)는 약 0.3 μM로 나타났다) 미약한 효소저해활성(저해율 50% 미만)을 보여준 반면 황련(Coptidis Rhizoma), 황백(Phellodendri Cortex), 오수유(Evodiae Fructus), 몰약(Myrrha), 빈랑자(Arecae Semen), 후추(Piperis nigri Fructus) 등 6종의 생약추출물이 60% 이상의 강한 효소저해활성을 보여주었으며 이들 시료들은 모두 1.0 μg/ml - 100 μg/ml의 농도영역에서 모두 농도의존적으로 효소활성을 저해하고 있음을 관찰할 수 있었다(data 기재생략). 특히, 황련(Coptidis Rhizoma), 황백(Phellodendri Cortex)의 경우에는 3 μg/ml 이하의 농도에서도 효소활성을 50% 이상 저해하는 강력한 활

성을 보여주었다. 현재 이들 6종의 생약재에 대하여서는 acetylcholinesterase 에 대한 *in vitro* 저해효과를 나타내는 활성성분들을 활성유도분획법(activity-guided fractionation)에 따라 추적분리하는 연구를 수행 중이다.

한편, 본 실험 결과 검체로 사용한 340종의 생약재 중 acetylcholinesterase에 대하여 가장 강력한 *in vitro* 저해효과를 나타낸 바 있는 생약재, 황련(Coptidis Rhizoma)에 대하여서는 별도로 활성유도분획법에 따라 그 활성성분을 추적 단리하여 본 결과 본 생약재에 다량으로 함유된 alkaloid 성분인 berberine 및 coptisine, epi-berberine, groenlandicine, jateorrhizine 등의 protoberberine계 성분들이 acetylcholinesterase 에 대하여 강력한 저해효과를 보여주고 있음을 알 수 있었다.¹¹⁾ 한가지 흥미로운 사실은 전보에 소개한 바와 같이 이들 protoberberine계 alkaloid들이 muscarinic acetylcholine 수용체 M₁ subtype(mAChR-M1)에 대하여 강력한 친화력을 나타내고 있다는 사실과 본 실험에서 관찰된 바와 같이 acetylcholinesterase에 대하여도 강한 저해효과를 보여주고 있는 사실은 acetylcholine 수용체 M₁ subtype (mAChR-M1)와 acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase의 긴밀한 구조적 관련성을 시사하고 있다. 아울러 이미 발표된 각종 문헌을 조사 분석 검토하여 본 결과 berberine 및 관련 protoberberine계 화합물(palmatine, coptisine 등)들이 acetylcholine 수용체 M₁ subtype (mAChR-M₁)에 대하여 유의성있는 친화력을 나타내었으며,¹²⁾ 별도로 시행한 여러 가지 약리학적 연구결과에서도 이들 alkaloid들이 acetylcholinesterase에 대한 저해효과 및 각종 cholinergic receptor에 대하여 효능약으로 작용하고 있음을 알 수 있었다.¹³⁾

또 한편, berberine 및 관련 protoberberine 화합물들이 과연 경구투여나 복강주사에 의한 약물투여 방식으로 치매 및 퇴행성 뇌질환에서 중요한 약물작용점으로 간주하고 있는 대뇌중추에 분포한 cholinergic neuron 특히 cholinergic receptor에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는지는 현재까지의 연구 결과 미지수이지만 이들 성분들을 다량 함유하고 있는 황련(Coptidis Rhizoma) 및 황백(Phellodendri Cortex)등의 약재가 과거로부터 치매등 각종 퇴행성질환의 치료목적으로 단독 혹은 복합제의 형태로 많이 사용되어 왔으며, 수동회피실험(Passive avoidance performance) 등 현대과학적인 실험기법에 의하여 이들 생약재¹⁴⁾ 및 이들 생약재에 함유된 berberine등 protoberberine계 alkaloid의 치매치료제로서의 효능¹⁵⁾이 점차 입증되고 있는 실정이다.

이와 같은 연구결과를 종합하여 볼 때 acetylcholinesterase (AChE) 에 대한 *in vitro* 저해효과를 지표로 하여 새로운 acetylcholine성 약물(cholinergic drug)을 탐색하고 이들 효소저해제들을 치매치료제로 응용, 개발하고자하는 연구는

언급한 바와 같이 현재 전세계적으로 가장 많이 시도되고 있는 방법인 만큼 차후 보다 많은 천연물자원들을 대상으로 하여 광범위하게 지속적으로 수행할 가치가 있다고 사료된다.

결 론

전기뱀장어로부터 추출정제된 acetylcholinesterase(AChE)에 대한 *in vitro* 저해효과를 생약재 340종의 메탄올 추출물을 대상시료로 하여 acetylthiocholine을 기질로 사용하여 Ellman의 방법에 준하여 검색하였다. 검색대상 시료중 황련(Coptidis Rhizoma), 황백(Phellodendri Cortex), 오수유(Evodiae Fructus), 몰약(Myrrha), 빈랑자(Arecae Semen), 후추(Piperis nigri Fructus) 등 6종의 생약추출물이 100 µg/ml의 측정농도에서 60% 이상의 강한 효소저해활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(PF002103-03)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Schroder, H., Giacobini, E., Struble, RG., Luiten, PG., Zilles, K., Strosberg, AD. (1991) Muscarinic cholinergic neurons in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 27(5): 631-636.
- Polinsky, RJ. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther.* 20(4): 634-47.
- Levey, AI. (1996) Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(24): 13541-6.
- Messer, WS Jr., Rajeswaran, WG., Cao, Y., Zhang, HJ., el-Assadi, AA., Dockery, C., Liske, J., O'Brien, J., Williams, FE., Huang, XP., Wroblewski, ME., Nagy, PI., Peseckis, SM. (2000) Design and development of selective muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease: characterization of tetrahydropyrimidine derivatives and development of new approaches for improved affinity and selectivity for M₁ receptors. *Pharm. Acta Helv.* 74(2): 135-140.
- Doody, RS. (1999) Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology* 45 Suppl 1:23-32.

6. Asthana, S., Greig, NH., Holloway, HW., Raffaele, KC., Berardi, A., Schapiro, MB., Rapoport, SI., Soncrant, TT. (1996) Clinical pharmacokinetics of arecoline in subjects with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60(3): 276-282.
7. Harries, MH., Samson, NA., Cilia, J., Hunter, AJ. (1998) The profile of sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M₁ receptor partial agonist, in the marmoset. *Br J Pharmacol.* 124(2): 409-415.
8. Shannon, HE., Rasmussen, K., Bymaster, FP., Hart, JC., Peters, SC., Swedberg, MD., Jeppesen, L., Sheardown, MJ., Sauerberg, P., Fink-Jensen, A. (2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* 42(3): 249-59.
9. Kim, YS., Kim, JS., Kim, SK., Heor, JH., Lee, BE., Ryu, SY. (2001) Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR-M1). *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 219-225.
10. Ellman, GL., Coutney, KD., Andres, V., Featherstone, RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95
11. Kim, JS., Choi, BW., Lee, BH., Kim, SK., Heor, JH., Kim, YS., Zee, OP., Ryu, SY. (2001) Inhibitory effect of protoberberine alkaloids from *Coptidis Rhizoma* upon Acetylcholinesterase (AChE). the proceeding of the 50th convention of Korean Pharmaceutical Society 2001, 04. 20, Kwangju Korea.
12. Schmeller, T., Latz-Bruning, B., Mink, M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257-266.
13. Wang, W., Chen, K., Guan, Y. (1999) Effect of berberine hydrochloride on muscarinic receptors, *Acta Pharmaceutica Sinica* 34: 260-263.
14. Hsieh, MT., Peng, WH., Wu, CR., Wang, WH. (2000) The ameliorating effect of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother. res.* 14: 375-377.
15. Peng WH, Hsieh MT, Wu CR. (1997) Effect of long term administration of berberine on scopolamine-induced Amnesia in rats, *Jpn. J. Pharmacol.* 74: 261-266.

(2002년 5월 18일 접수)