

부신수질 크로마핀(chromaffin) 세포를 이용한 승마 추출물의 카테콜라민 분비 저해작용

우경철 · 서병선*

한동대학교 생명식품과학부 생의학 연구실

The Effects of *Cimicifuga Racemosa* Extracts on the Inhibition of Catecholamine Secretion in Bovine Chromaffin Cells

Kyung-chul Woo and Byung-sun Suh*

School of Life and Food Science, Handong Global University, Pohang, Kyung-Buk 791-708, Korea

Abstract – Extracts of Black cohosh (*Cimicifugae rhizoma*) have been used for the treatment of climacteric complaints for decades. A significant number of woman entering menopause exhibit the following symptoms: getting hot flushes, night sweats, irritability, depression, and anxiety. A reduction of the frequency of hot flushes equivalents and hints on the antidepressant activity of *Cimicifuga* extracts. In the present work, we have screened several 80% ethanol extracts from medicinal plants and found that the extracts from *Cimicifugae Rhizoma*(Black cohosh: 승마) have inhibitory effect on catecholamine secretion in bovine chromaffin cell. Since this extract inhibited 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP)-induced catecholamine secretion, but did not inhibit KCl, bradykinin, and veratridine-evoked case, this inhibitory effect is mediated by nicotinic acetylcholine receptors with noncompetitive manner.

Key words – Black cohosh, *Cimicifugae Rhizoma*, Nicotinic acetylcholin receptor (nAChR), Catecholamine (CA), Bradykinin Receptor (BR), Voltage-sensitive calcium channels (VSCC)

승마 추출물(*Cimicifugae Rhizoma*)은 지난 수십년간 폐경기 증후군의 치료제로 사용되어져 왔다.¹⁻⁴ 폐경기로 말미암아 겪는 에스트로젠이나 프로제스테론 등의 여성 호르몬의 급격한 감소는 폐경기 이후에 나타나는 여성 질환인 발열이나 오한, 우울증, 민감함, 수면장애 등의 원인이 된다. 승마의 성분 중에 식물성 에스트로젠이나 도파민의 성분 등이 폐경기 이후의 여러 불편한 증상을 완화시켜 주며 에스트로젠 치료의 부작용인 유방암과 자궁암의 증가를 억제하는 것으로 알려지고 있다. 이러한 특성으로 인하여 에스트로젠 등의 여성호르몬 대체의약품으로의 가능성을 제공하고 있고 최근 발표에서는 승마의 성분중 에스트로젠으로서의 작용보다는 오히려 도파민 류에 의한 폐경증상 완화효과와의 연관성을 제시하고 있으나⁵ 그 작용기전은 잘 알려지지 않았다. 도파민, 노르에피네프린, 에피네프린과 같은 카테콜라민은 뇌와 부신수질 세포, 교감신경에서 형성되고

분비되며 스트레스등과 같은 감정에 기초한 행동에 중요한 영향을 미친다.⁶ 카테콜라민은 중추신경계에서 분비기전에 이상이 생긴 모델에서 이미 그 중요성과 역할이 연구되어 왔다. 즉, 시냅스에서의 분비량이 불균형을 이룰 경우 조울증(manic depression) 이나 정신분열증 (schizophrenia)과 같은 신경계통의 질병을 유발할 수 있는데, 많은 종류의 정신과 계통의 치료약들이 바로 이 카테콜라민 분비기전에 작용하는 것으로 알려져 있다.^{7,8} 이런 이유로 카테콜라민 분비를 조절할 수 있는 물질은 앞에서 언급한 신경계질환의 치료제로서 개발이 가능한 좋은 후보가 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 승마가 카테콜라민의 분비에 미치는 영향을 고찰하기 위하여 소의 부신수질 세포를 사용했는데 이는 부신이 발달단계에서 신경계로부터 유래한 이유이기도 하며 성체가 된 이후에는 교감신경계의 일부로 내부에 저장공간 없이 체내의 여러 가지 자극에 따라서 피질에서는 코티졸 등의 스트레스성 호르몬을, 수질에서는 카테콜라민과 여러 뉴로펩타이드 등을 혈중으로 분비해 다른 조직과

*교신저자(E-mail) : bssuh@handong.edu
(FAX) : 054-260-1925

기관에 영향을 끼치는 좋은 시스템으로 사용되어 왔기 때문이다. 이중 카테콜라민 분비를 측정하기 위해서는 부신 수질 부분의 세포만을 선택적으로 분리 배양해서 실험에 사용해야 하는데, 수질세포는 다른 교감신경계 세포에 비해서 쉽게 높은 순도의 세포를 분리할 수 있고 배양하는데 있어서도 안정성을 보이기 때문에 신경계 분비기전과 세포의 전기 생리학적인 연구에 많이 사용되어 오고 있다.⁹⁻¹²⁾

본 연구에서는 승마 이외의 몇 가지 종류의 한약재에 대한 에탄올 추출물이 카테콜라민 분비에 어떤 영향을 끼치는지 함께 검색했고, 특이하게 승마의 추출물이 카테콜라민 분비를 유의하게 저해하는 것을 관찰했다. 승마는 과거로부터 통증을 완화시키고, 특히 폐경이후 나타나는 여성질환의 증세를 완화시키는 것으로 그 효능이 많이 알려져 왔는데, 그럼에도 불구하고 그 작용기작은 많이 알려지지 않았다. 본 연구의 결과는 승마 추출물이 선택적으로 니코틴류 아세틸콜린 수용체에 선택적으로 작용하는 것을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 amperometry를 사용해서 보여주고 있다.

재료 및 방법

사용시약

1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP), bradykinin, veratridine, heptane sulfonic acid(Sodium salt), triethylamine, EDTA 등은 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, HPLC용 이동상을 위해서 사용된 phosphoric acid, acetonitrile은 Merck로부터 구입하였다.

추출물 준비

승마 외 다른 한약재의 추출물은 한약 재료상으로부터 구입하여 건재 5 g을 갈아 80% 에탄올로 12시간 동안 추출하고 여과지로 거른 후 80°C로 가열하여 에탄올을 증발시키고 남은 용액을 동결 건조시켜 얻은 분말을 DMSO에 녹여 50 mg/ml로 만들어 사용했고 남은 양은 냉동 보관하였다.

부신수질 크로마핀(chromaffin) 세포 분리와 배양

부신 수질세포는 이전에 보고된 방법에서 약간 변형된 두 단계의 콜라게네이즈(collagenase) 처리를 통해 분리했는데,⁸⁾ 간단히 설명하면 지역 도축장으로부터 부신을 떼어와 주변의 지방조직을 떼어낸 후 칼슘과 마그네슘이 없는 Locke's 용액으로 정맥을 통해 내부의 혈구세포를 씻어낸 후 0.2% 콜라게네이즈를 20분간 처리한 이후 부신수질 부분만 분리해 수술용 칼로 잘게 자른 후 다시 콜라게네이즈 용액

에 1시간 동안 처리하여 가는 망에 걸러 원심분리를 거쳐 수질세포만 얻었다. 얻어진 세포는 DMEM/F12 배지(Life technologies, Inc. Grand Island, NY, USA)에 10% Fetal Bovine Serum(hyclone, Logan, UT, USA), 1% antibiotics (Life Technologies, Inc.)을 첨가한 액체 배지에 부유시키고, 카테콜라민 분비를 측정하기 위해서 24 well plate에 500,000 세포/well 씩 분주해 넣고 95% 공기와 5% CO₂ 배양기에서 2~3일 정도 안정화 시킨 후 실험에 사용했다

HPLC에 의한 카테콜라민 분비 측정

부신수질 세포로부터 분리되는 카테콜라민을 측정하기 위해서 우선 24-well plate에 자란 세포를 칼슘과 마그네슘이 포함되어있는 Locke's 용액 (157.4 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 5.0 mM HEPES, 5.6 mM Glucose, 3.6 mM NaHCO₃, pH 7.4)으로 두 번 씻어준 후 추출물을 15분간 전처리하고 이후 10분간 각각 500 µl 부피로 자극물질 처리 후에 상층액을 0.1 N HCl이 50 µl 담겨있는 각각의 튜브에 담고 측정할 때까지 냉장 보관했다. 만들어진 샘플은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)법을 통해 분리된 카테콜라민의 양을 측정할 수 있는데, 기존에 보고된 조건에서 약간의 변화를 주어 시행하였다.¹³⁻¹⁵⁾ HPLC BAS-480 (BioAnalytical Systems Inc. IN, USA)을 사용했으며, 주입량은 20 µl이었으며, 역상 C18 칼럼(150 mm×1 mm)을 사용해 분리하고 electrochemical detector를 사용해 분리된 카테콜라민을 검출했다. 검출에 사용된 전극은 +770 mV에서 Ag/AgCl reference 전극에 대한 클래식한 3 mm glassy carbon 전극을 사용했다. 전극에 대한 검사 범위를 100 nA와 50nA로 지정하고 유속은 1 ml/min을 적용했다. 이동상의 조성은 고차증류수 2 L 안에 0.55 g heptanesulfonic acid, 0.2 g EDTA, 80 ml acetonitrile, 12 ml 85% phosphoric acid, 16 ml triethylamine을 넣고 pH를 2.5으로 맞추어 필터링한 후 사용하였다. 보통 노르에피네프린은 2분 20초경에 분리되어 나오고, 바로 뒤이어 에피네프린이 2분 35초 정도에, 도파민은 3분 20초 정도에 분리되어 나오게 된다.

Amperometry에 의한 카테콜라민 분비 측정

데이터의 기록은 상온에서 수행되었으며,¹⁶⁾ 크로마핀 세포는 아민(amine)을 제거한 용액에 담겨져 실험에 사용되었고 용액의 조성은 다음과 같다(137.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl, 1 mM MgCl, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.3 titrated by NaOH). 탄소섬유 전극은 10 µm 폴리프로필렌 micropipettor tips과 5~11 µm 탄소 섬유 (PAN T650 or P25: Amoco Performance Products)에 싸서 사용하게 되는데 이 안은 3 M KCl로 채워지고 미세조정기

머리 부분의 끝에 달려서 단일세포의 세포막에 붙이게 된다. 측정은 전극의 전류가 10 pA 아래로 떨어져 안정화 되면 시작한다. 분비된 카테콜라민의 산화에 의해서 생성된 amperometric 전류는 axopatch 200B amplifier (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA)와 +650 mV에 전압을 고정해 놓은 voltage-clamp 모드에서 측정했다. Amperometric 신호는 1 kHz에서 low-pass filtered 되고, 0.5 kHz에서 값을 취하게 되는데 데이터 취득과 분석에는 pCLAMP 8 software (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, U.S.A.)를 사용했고 많은 양의 수적인 결과들을 시각화하는 데는 특별히 IGOR software (WaveMetrics)를 사용했다. 모든 용액은 local perfusion system을 사용해서 2초 안에 bathing 용액을 완전히 교환할 수 있도록 했다.

[³H] 니코틴 binding assay

방사성 동위원소인 [³H] nicotine 을 사용한 건강한 세포에서 니코틴 결합을 방해하는지에 대한 실험은 다른 논문에서 사용한 방법을 사용했다.¹⁷⁾ 24-well plate에 자란 크로마핀 세포를(5×10^5 cells/well) 우선 Locke's 용액으로 두 번 정도 씻어주고 40 nM [³H] 니코틴과 표시된 농도의 승마추출물을 경쟁시킨 후 상온에서 40분 동안 배양시킨다. 그런 후 세포를 100 μ M EGTA가 포함되어 있는 Ca^{2+} -free Locke's 용액 2 ml로 씻어준다. 최종적으로 세포를 5% ice-cold trichloroacetic acid(TCA) 용액 0.5 ml로 갠 다음 긁어 모아서 방출되는 에너지를 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하게 된다. 일반적으로 비특이적 결합은 1 mM 니코틴과 함께 반응시킨 값인데 총 값의 20% 미만이며, 전체값에서 빼준다. Binding data는 총 binding의 퍼센트로 표현한다.

통계분석

모든 정량적인 데이터는 means \pm SEM으로 표현했고 ANOVA test를 통해서 유의성을 검증했다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 카테콜라민 분비 관찰

본 실험에서는 우선 몇 가지 생약제의 80% 에탄올 추출물을 실험에 사용하였다. 우선 스크리닝 단계에서 여러 생약제가 카테콜라민의 생성을 제어하는 효과를 관찰했고, 다음 단계로 카테콜라민을 분비시키는 중요기작 중 하나인 니코틴류 아세틸콜린 수용체에 특이적으로 작용해서 활성을 유도하는 DMPP(1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide)를 처리해서 승마추출물이 DMPP에 의해서 유도된 카테콜

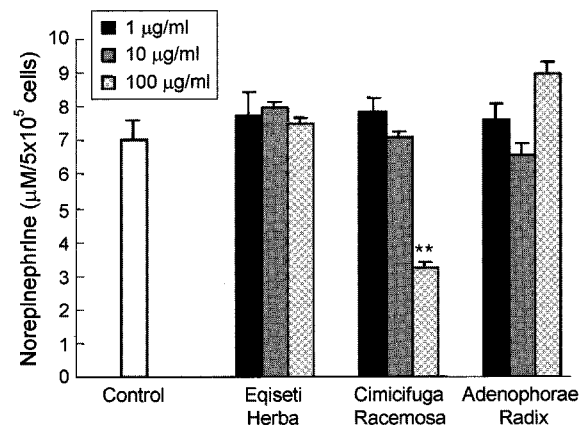


Fig. 1. Effect of various ethanol extracts from medicinal plants on the secretion of catecholamine (norepinephrine).

Various concentrations of ethanol extracts of medicinal plants were pretreated for 15 min and 10 μ M DMPP was added for 10 min to induce catecholamine secretion. Catecholamine concentration was measured by HPLC. Data were obtained by three independent experiments and the values were expressed by means \pm SEM ($p < 0.05$).

라민 분비증가를 얼마나 억제하는가를 보았다(Fig. 1). 결과에서 볼 수 있듯이 다른 추출물에 비해 승마의 경우 농도에 의한 차이를 보이면서 전 처리된 농도가 증가할수록 카테콜라민 분비가 저해되는 것을 보였고 이를 다시 농도를 더 세분화해서 실험했을 때 역시 같은 현상을 관찰할 수가 있었다(Fig. 2A). 카테콜라민의 분비는 세포내 칼슘 농도가 증가할 때 발생하게 되는데 세포내 칼슘증가를 유도하는 경로로는 아세틸콜린 수용체 아래에 위치하는 voltage-sensitive calcium channel, 식물성 알칼로이드(alkaloid)인 veratridine에 의해서 비활성이 낮춰져서 칼슘농도를 올리는 voltage-sensitive sodium channel^{18,19)}이나 G-protein coupled 수용체인 bradykinin 수용체를 통해 phospholipase C(PLC)를 경유해 소포체(Endoplasmic reticulum)로부터 나오는 칼슘에 의한 증가²⁰⁾ 등이 있는데 이들 경로를 각각 활성화 시켰을 때는 그런 저해작용을 관찰 할 수가 없었다(Fig. 2 B-D).

Amperometry에 의한 카테콜라민 분비 관찰

여러 가지 분비세포에서 세포외유출(exocytosis)이 일어날 때는 세포막에 소포(vesicle)가 융합(fusion) 하면서 국소적으로 세포막 면적이 증가하면서 전위차가 변화하게 되는데, 이때 미세 탄소전극을 이용하면 변화량을 관찰 할 수 있게 된다. 부신 수질 크로마핀세포에서 카테콜라민이 세포외유출이 되는 양상을 좀 더 자세히 관찰하기 위해 HPLC 이외에 단일 세포 수준에서 amperometry를 통해 관찰했다. 추출물을 전처리하고 DMPP 10 μ M로 자극했을 때 눈에 띄는

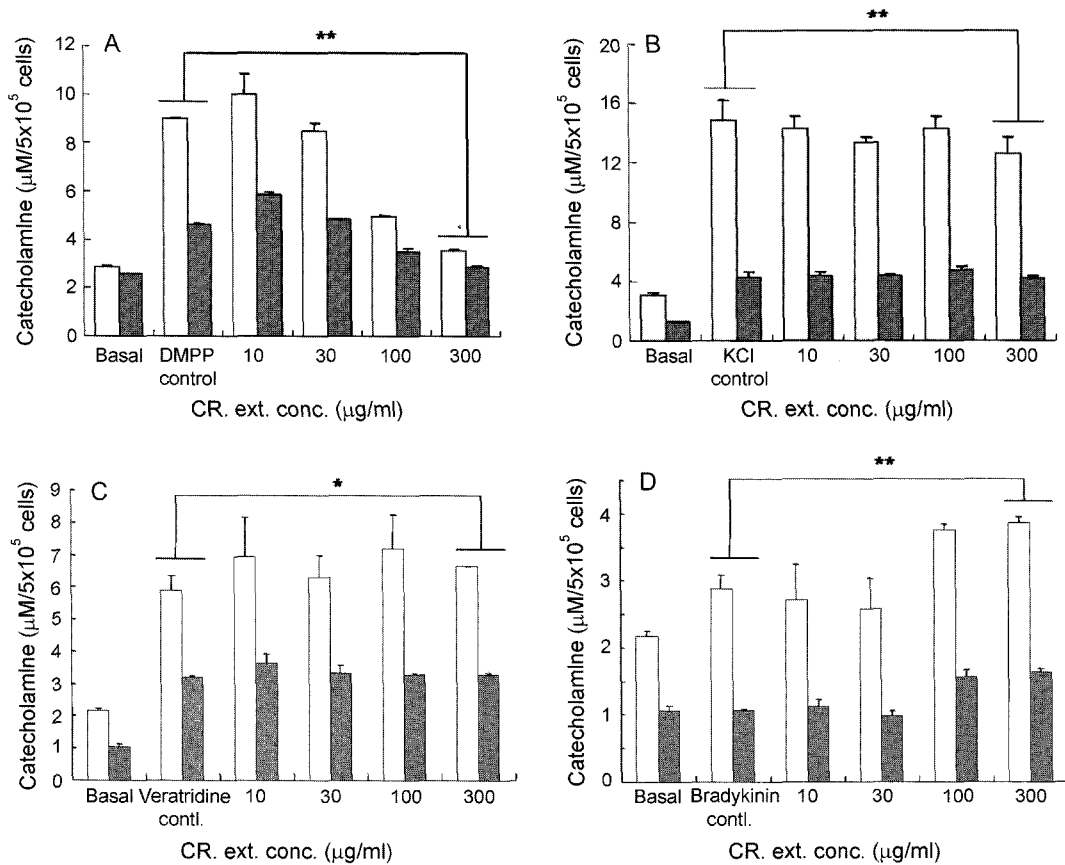


Fig. 2. Inhibitory effect of *Cimicifuga racemosa* extracts (CR ext.) to the secretion of catecholamine induced by DMPP in bovine chromaffin cells.

Cimicifuga racemosa extracts were pretreated for 15 min and various stimulation were conducted (A) 10 µM DMPP, (B) 60 µM KCl, (C) 100 µM veratridine, and (D) 5 µM bradykinin for 10 min to induce catecholamine secretion. Norepinephrine and epinephrine were expressed as open bar and gray bar, respectively. Data were obtained by three independent experiments and the values were expressed by means±SEM (*p<0.05, **p<0.05).

카테콜라민 분비 억제제를 HPLC의 경우와 같이 관찰할 수 있었다(Fig. 3A,C). 하지만 같은 조건에서 자극물질만 KCl (50 mM)로 바꾸었을 때는 DMPP와 같은 눈에 띄는 저해현상을 보이지 않았다(Fig. 3B,D).

[³H] 니코틴 binding assay

니코틴은 니코틴류 아세틸콜린 수용체에 작용하는 물질 (ligand)중 하나로 알려져 있고 다른 여러 연구에서 아세틸콜린 수용체에 니코틴과 경쟁적으로 또는 비경쟁적으로 결합한다는 보고가 있었기 때문에²¹⁾ tritium(³H) 으로 labeling 된 [³H]nicotine이 수용체에 결합하는 것에 승마추출물이 영향을 주는지를 알아보기 위해서 binding assay를 시행했다. 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 추출물의 농도와 관계없이 [³H]nicotine 결합에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으므로 승마추출물은 니코틴과 아세틸콜린의 결합장소와는 다른 곳에 영향을 주는 것으로 보인다.

결론

승마는 과거 아메리칸 인디언들에 의해서 주로 사용되어 왔는데 특히 뱀에 물렸을 때나 분만하는 도중의 자궁경부 (pelvic area)의 진통효과와 혈액공급을 촉진한다고 알려져 있고,²²⁾ 또한 신경통, 두통, 관절염 등의 증상완화에도 사용되어 왔다. 이렇듯 승마는 많은 증상을 치료하는 목적으로 사용되어 왔지만 그것의 실제 어떤 기작을 통하여 작용하는지에 대해서는 그렇게 많은 연구가 이루어지지 못했다.

본 연구에서는 승마의 추출물이 부신 수질 크로마핀 세포에서 카테콜라민 분비를 다른 한약재에 비해 눈에 띄게 저해하는 것을 관찰하고 그 작용기작을 연구하고자 했다. 승마 추출물은 ionotropic receptor인 니코틴류 아세틸콜린 수용체(nAChR)의 작용을 방해함으로써 그 아래에 유발되는 세포내 칼슘 증가를 억제시켜 최종적인 카테콜라민 분비를 억제하는 것으로 보여지는데 이 저해작용은 아세틸콜린 수

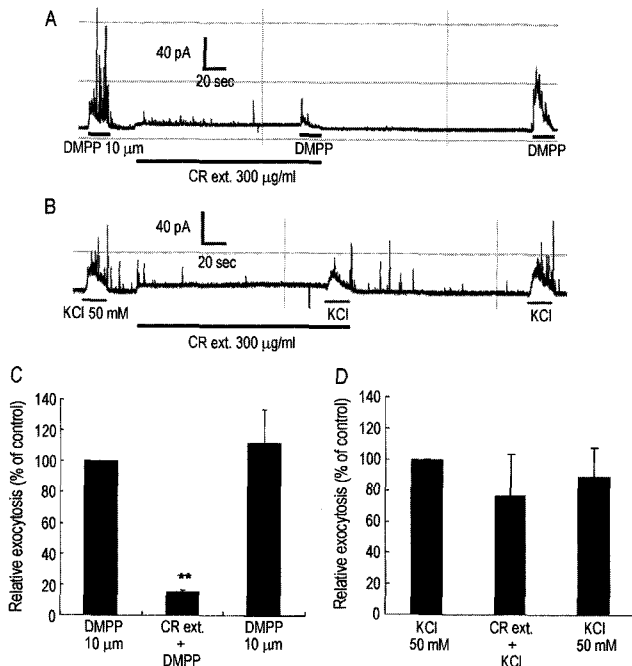


Fig. 3. Inhibitory effects of *Cimicifuga racemosa* extracts on catecholamine secretion in single bovine chromaffin cell. Single bovine chromaffin cell(n=8-9) was stimulated with 10 μM DMPP(A,C) or 50 mM KCl(B, D) for 20 seconds pretreated without (first peak) or with (second peak) 300 μg/ml of *Cimicifuga racemosa* extracts (CR ext.) and washed with bath solution (third peak). Total amperometric currents induced by DMPP or KCl pulse for 20 seconds (A and B, respectively) were integrated and represented as percent of the control value which had no pretreatment. Data were obtained by three independent experiments and the values were expressed by means±SEM (***p*<0.05).

용체에 비교적 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다.¹²⁾ 이는 세포내 칼슘유입을 일으킬 수 있는 다른 수용체를 자극했을 때는 이런 저해작용을 보이지 않았고, 또한 아세틸콜린 수용체 바로 아래 단계인 voltage-sensitive 칼슘 채널을 고농도의 K⁺을 이용해서 활성화(activation) 시켰을 때도 그렇게 눈에 띄는 저해현상을 관찰할 수 없었던 것으로 보아 추출물의 특이적인 표적(target)은 아세틸콜린 수용체이고 그에 따라 수용체 아래단계의 반응들이 저해를 받고 최종 현상인 카테콜라민 분비를 억제하는 것으로 보여졌다. 거기에 더불어 [³H]니코틴결합에는 농도에 따른 증감을 관찰할 수 없었으므로 승마추출물은 아세틸콜린 수용체에 니코틴과 비경쟁적으로 작용하는 물질을 포함하는 것으로 보인다.²¹⁾ 많은 의약품(chemical materials)들이 아세틸콜린 결합장소와는 다른 위치에서 아세틸콜린 수용체와 비경쟁적으로 결합해서 활성을 조절할 수 있는 것으로 보고되고 있다.²³⁾ 이런 비경쟁적 저해성분들은 경쟁성 저해성분과는 달

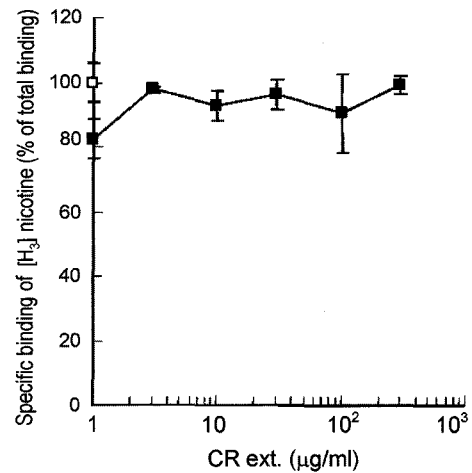


Fig. 4. Effect of *Cimicifuga racemosa* extracts on the specific binding of [³H] nicotine to the bovine chromaffin cell. Chromaffin cells were incubated with various concentration of *Cimicifuga racemosa* extracts and 40 nM [³H] nicotine for 40 min at 25°C. Specific binding of [³H] nicotine was expressed as % of total binding. Nonspecific binding was subtracted with incubation of 1 mM unlabeled nicotine. Data were obtained by three independent experiments and were expressed by means±SEM (*p*<0.05).

리 이온채널(ion channel)의 gating activity를 저해하는 것으로 알려져 있다. 실제로 국부마취제등의 물질들이 이런 비경쟁성 저해작용을 보이는 것으로 여러 논문에서 보여주고 있다.^{24,25)} 본 연구에서 관찰된 카테콜라민 저해효과와 임상적 기능과의 관계는 이미 알려진 구성 성분²⁶⁾ 중 어떤 물질이 실제로 이런 효과를 나타내는지를 동물실험 등을 통하여 밝혀내야 할 것이다. 승마추출물의 특이적인 아세틸콜린 수용체를 경유한 저해효과는 이 한약재가 함유하고 있는 물질이 세포내에서 어떻게 작용하며, 이와 유사한 물질들의 구체적인 신호전달기작을 세포수준에서 규명하는데 유용할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Wuttke W., Jarry H., Westphalen S., Christoffel V., and Seidlova-Wuttke D. (2003) Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *Steroid Biocemistry & Molecular Biology* **83**: 133-147
2. Winterhoff H., Spengler B., Christoffel V., Butterweck V., and Lohning A. (2003) Cimicifuga extract BNO 1055: reduction of hot flushes and hints on antidepressant activity *Maturitas* **44**: Suppl. 1 S51-S58
3. Low Dog T., Powell K.L., and Weisman S.M. (2003) Critical evaluation of the safety of *Cimicifuga racemosa* in

- menopause symptom relief *Menopause* **10**(4): 299-313
4. Jarry H., Metten M., Spengler B., Christoffel V., and Wuttke W. (2003) *In vitro* effects of the Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 *Maturitas* **44**: Suppl. 1 S31-S38
 5. Borrelli F, Izzo AA, Ernst E, (2003) Pharmacological effects of Cimicifuga racemosa. *Life Sci.* Jul **25**:73(10): 1215-1229. Review.
 6. Cooper J.R., Bloom F.E., and Roth R.H. (1991) The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford: Oxford University Press p. 22084.
 7. Seeman P. and Van Tol H.H. (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**: 264-270.
 8. Kilpatrick D.L., Ledbetter F.H., Carson K.A., Kirshner A.G., Slepetic R.J., and Kirshner N. (1980) Stability of bovine adrenal medulla cells in culture. *J. Neurochem.* **35**: 679-692.
 9. Park T.J., Shin S.Y., Suh B.C., Suh E.K., Lee I.S., Kim Y.S., and Kim K.T. (1998) Differential inhibition of catecholamine secretion by amitriptyline through blockage of nicotinic receptors, sodium channels, and calcium channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Synapse* **29**: 248-256.
 10. Kim Y.J., Hur E.M., Park T.J., and Kim K.T. (2000) Nongenomic inhibition of catecholamine secretion by 17 β -estradiol in PC12 cells. *J. Neurochem.* **74**: 2490-2496.
 11. Park T.J., Lee I.S., Ha H., and Kim K.T. (1999) Temperature sensitivity of catecholamine secretion and ion fluxes in bovine adrenal chromaffin cells. *Mol. Cells*, **9**: 67-71.
 12. Park T.J., Park Y.S., Lee T.G., Ha H.J., and Kim K.T. (2003) Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. *Biochem. Pharm.* **65**: 83-90.
 13. Eaton M.J., Frydel B.R., Lopez T.L., Nie X.T., Huang J., McKillop J., and Sagen J. (2000) Generation and initial characterization of conditionally immortalized chromaffin cells. *J. Cell Biochem.* **79**(1): 38-57.
 14. Cheng F., Yang L., Chang F., Chia L., and Kuo J. (1992) Simultaneous measurement of serotonin, catecholamines and their metabolites in cat and human plasma by *in vitro* microdialysis-microbore high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr* **582**: 19-27.
 15. Cheng F, Kuo J, Shih Y, Lai J, Ni D., and Chia L. (1993) Simultaneous measurement of serotonin, catecholamines and their metabolites in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with a microbore column and dual electrochemical detection. *J. Chromatogr* **615**: 225-236.
 16. Kim K.T., Koh D.S., and Hille B. (2000) Loading of oxidizable transmitters into secretory vesicles permits carbonfiber amperometry. *J. Neurosci.* **20**(20): RC101.
 17. Kilpatrick D.L., Slepetic R.J., Corcoran J.J., and Kirshner N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **38**: 427-435.
 18. Catterall W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 1543.
 19. Heldman E., Barg J., Vogel Z., Pollard H.B., and Zimlichman R. (1996) Correlation between secretagogue-induced Ca²⁺ influx, intracellular Ca²⁺ levels and secretion of catecholamines in cultured adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Int.* **28**(3): 325-334.
 20. McMillian M.K., Tuominen R.K., Hudson P.M., Suh H.H., and Hong J.S. (1992) Angiotensin II receptors are coupled to omega-conotoxin-sensitive calcium influx in bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J. Neurochem.* **53**: 1285-1291.
 21. Boyd N.D. and Cohen J.B. (1984) Desensitization of membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: studies of [³H] acetylcholine binding and ²²Na⁺ ion fluxes. *Biochemistry* **23**: 4023-4033.
 22. British Herbal Medicine Association (1983) *British Herbal Pharmacopoeia*, West Yorks, p. 66.
 23. Lena C. and Changeux J.P. (1993) Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci* **16**: 181-186.
 24. Gentry C.L. and Lukas R.J. (2001) Local anesthetics noncompetitively inhibit function of four distinct nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J. Pharmacol Exp Ther.* **299**(3): 1038-1048
 25. Cuevas J. and Adams D.J. (1994) Local anesthetic blockade of neuronal nicotinic ACh receptor-channels in rat parasympathetic ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.* **111**(3): 663-672.
 26. Kusano G. (2001) Studies on the constituents of Cimicifuga species *Yakugaku Zasshi*, Jul; **121**(7): 497-521. Review.

(2003년 10월 16일 접수)