

뇌 조직의 아세틸콜린 및 그 관련효소에 미치는 솔잎 (Pine Needle) 부탄올획분의 영향*

최진호^{1)§} · 김대익¹⁾ · 박시향¹⁾ · 김남주¹⁾ · 백승진¹⁾ · 김군자²⁾ · 김현숙³⁾

부경대학교 생화학교실,¹⁾ 밀양대학교 식품과학과,²⁾ 숙명여자대학교 식품영양학과³⁾

Effects of Pine Needle Butanol Fraction on Acetylcholine (ACh) and Its Related Enzymes in Brain of Rats*

Choi, Jin-Ho^{1)§} · Kim, Dae-Ik¹⁾ · Park, Si-Hyang¹⁾ · Kim, Nam-Ju¹⁾
Baek, Seung-Jin¹⁾ · Kim, Koon-Ja²⁾ · Kim, Hyun-Sook³⁾

Laboratory of Biochemistry,¹⁾ Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Department of Food Science,²⁾ Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

Department of Nutrition and Food Science,³⁾ Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT

This study was designed to investigate the effects of butanol (BuOH) fraction of pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc) needle on cholesterol and lipofuscin (LF) accumulations, acetylcholine (ACh) and its related enzyme activities such as choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE), and monoamine oxidase-B (MAO-B) activity, which destroyed the catecholamine-related neurotransmitters in brain membranes of Sprague-Dawley (SD) rats. Male SD rats were fed basic diets (control group) or experimental diets (BuOH-25, BuOH-50 and BuOH-100) for 45 days. Cholesterol accumulations in mitochondria and microsomes were significantly inhibited (about 14 - 17% and 23 - 34%, respectively) in BuOH-50 and BuOH-100 groups, whereas LF levels were significantly inhibited (about 10 - 14%) in BuOH-50 and BuOH-100 groups compared with control group. ACh levels and ChAT activities were significantly increased (about 11 - 17% and 11 - 23%, respectively) in membranes of BuOH-50 and BuOH-100 groups compared with control group. AChE activities were significantly increased (about 14 - 17%) in membranes of BuOH-50 and BuOH-100 groups. There was no significant difference in MAO-B activities between control and experimental diet groups. The results suggest that butanol fraction of pine needle may play an effective role in an antiaging effect and improving a learning and memory impairments. (*Korean J Nutrition* 37(3): 176~181, 2004)

KEY WORDS : pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc), lipofuscin (LF), acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE), monoamine oxidase-B (MAO-B).

서 론

소나무 (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 극동지방에 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 있다.¹⁾

신경전달물질의 병변을 비롯하여 콜레스테롤의 침착도 뇌의 노화에 따른 기능저하에 깊이 관계하고 있을 뿐만 아니라²⁾ 노화색소로 알려진 리포푸신 (lipofuscin : LF)의 침착,^{3,4)} catecholamine계 신경전달물질의 파괴효소로 알려진 monoamine oxidase-B (MAO-B)의 활성이 뇌조직에서 연령이 증가에 따라 증가하는 등⁵⁻⁷⁾ 노화에 깊이 관계함으로써 기억·학습장애를 유발하여 노인성 치매 등에

접수일 : 2003년 10월 13일

채택일 : 2004년 3월 8일

*This research has supported by a Grant for the Korea Health 21 R&D Project. Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HMP-98-MS-0001)

§To whom correspondence should be addressed.

깊이 관계하는 것으로 알려져 있다. 천연물의 뇌에 대한 생리·생화학적 연구로서는 솔잎 추출물의 혈청 및 간장의 지질함량과 효소활성 연구,^{8,9)} 솔잎 첨가식이의 세포독성 및 지질대사 연구,^{10,11)} 그리고 솔잎 추출물의 항암효과까지 연구되고 있다.¹²⁾

저자 등도 솔잎 추출물의 생리활성연구로서 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 관한 연구,¹³⁾ 뇌세포막의 산소라디칼 및 제거효소에 관한 연구,¹⁴⁾ 뇌세포막의 유동성 및 신경전달관련효소에 관한 연구¹⁵⁾를 수행한 적이 있다. 전보¹⁶⁾의 솔잎성분의 생리활성 관련연구의 일환으로서 솔잎을 80% 메탄올로써 추출하여 감압·농축한 솔잎 추출물을 용매분획법에 따라 분획한 BuOH획분을 농도별로 사료에 첨가·조제한 사료로써 SD계 흰쥐에 45일간 투여하여 적출한 뇌조직획분을 사용하여 콜레스테롤의 억제효과, 리포푸신의 침착 억제효과, 세포막의 유동성의 증가 및 신경전달관련 효소로서 acetylcholinesterase (AChE) 및 MAO-B의 활성에 미치는 솔잎 BuOH획분의 영향을 평가하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 시료의 분획 및 동물실험

실험에 사용할 솔잎 추출물은 봄에 소나무 (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)의 솔잎을 음건(陰乾)하여 파쇄후 후(8.5 kg), 80% 메탄올로써 추출·농축한 솔잎 추출물(2.1 kg)을 용매분획법에 따라 분획하여 동결·건조한 BuOH획분 450 g을 사용하였다. Sprague Dawley (SD)계 흰쥐 (male rats : 160 ± 10 g)를 한국화학연구소에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 사육 및 실험조건은 매일 18 : 00에 사료와 물을 공급하였다. 동물사육실은 자동조절(22 ± 2°C ; 65 ± 2% RH)되고, 명암도 12시간 사이클(18 : 00 ~ 06 : 00)로 조절되었다.

실험에 사용한 기본사료 (control)의 조성은 탄수화물 58.0% (corn starch 45.0% + sucrose 13.0%), 단백질 18.0% (sodium-free casein), 지질 15.0% (lard)로 하였고, 비타민 및 무기질 혼합물 각각 1.0% 및 3.5% 첨가하고, 셀룰로오스 (3.0%), DL-methionine (0.3%), choline chloride (0.2%)를 첨가하고, 여기에 고콜레스테롤 혈증을 유도하기 위하여 cholesterol 0.8% 및 sodium cholate 0.2%를 첨가·혼합하여 조제하였다. 그리고 실험그룹은 솔잎의 BuOH획분을 25, 50, 100 mg/kg BW가 섭취될 수 있도록 기본사료에 첨가·조제하는 대신 그 첨가량

만큼 탄수화물에서 제외하고 실험용 사료를 조제하여 SD계 흰쥐에 45일 동안 투여의 동물실험을 수행하였다.

2. 뇌조직획분의 분획

뇌조직의 분획은 저자 등¹⁷⁾의 방법에 따라 균질 완충용액 (1.15% KCl/10 mM phosphate buffer/5 mM EDTA, pH 7.4)을 사용, 균질화한 다음 700 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 9,000 × g에서 15분간 원심분리하였다. 이 때 생긴 잔사는 균질 완충용액으로써 정용하여 mitochondria획분으로 하였고, 상층액은 다시 105,000 × g에서 60분간 원심분리하여 얻은 잔사를 같은 완충용액으로 정용하여 microsome획분으로 사용하였다.

3. 콜레스테롤 함량의 측정

뇌조직획분중의 콜레스테롤 함량은 Rudel 등의 방법¹⁸⁾에 따라 o-phthalaldehyde법으로 측정하여 표준 검량선에 의거 뇌조직획분중의 콜레스테롤의 함량을 측정하였다. 이들 획분의 단백질은 Lowry 등의 방법¹⁹⁾에 따라 정량하였다.

4. 리포푸신 함량의 측정

생체내의 장기의 생리적 기능저하, 성인병의 발병 및 생체노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 과산화지질 (LPO)과 단백질의 결합에 의해 LP가 생성되는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 생체내의 노화색소 알려진 리포푸신의 측정은 Fletcher 등의 방법²⁰⁾에 따라 측정·정량하였다.

5. AChE 및 MAO-B 활성의 측정

뇌조직중의 acetylcholinesterase (AChE)의 활성은 Hallak와 Giacobini의 방법²¹⁾에 따라 측정하였다. 각 microplate well에 0.1M Tris buffer, pH 8.0 (trizma HCl + trizma base)을 300 μl, 0.01M dithionitrobenzoic acid (DTNB) 20 μl, enzyme suspension (상층액) 10 μl을 연속적으로 첨가한다. 그리고 흡광도 측정직전에 기질시약인 0.1M acetylthiocholine chloride 10 μl을 첨가한다. Microplate reader (ELISA reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도 변화를 5분 동안 관찰하여 AChE의 활성 (unit/min/mg protein)을 측정하였다.

또한 MAO-B의 활성은 Kalaria 등⁶⁾의 방법에 따라 H₂O₂의 생성능을 기초로 정량하였다. 각 시험관에 100 mM Na-Pi buffer (pH 7.4)용액 460 μl, 30 mM sodium azide용액 70 μl, brain homogenates (mitochondria) 100 μl를 넣은 후 기질시약인 10 mM benzylamine을 70 μl을 넣으면서 37°C 항온수조에서 30분간 가온시킨다. 그

리고 항온수조에서 시험관을 꺼내면서 1.8 mM 2, 2'-azino-bis (3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) 500 μ l을 넣는다. 5초 후 저온상태로 보관되어 있는 5units horseradish peroxidase 50 μ l을 넣는 동시에 5초간 잘 혼합시킨다. 10초가 지난 후 0.75 M hydrochloric acid containing 5% NaDodSO₄ (sodium dodecyl sulfate) 250 μ l을 각 시험관에 넣으면서 다시 5초간 잘 혼합시킨다. 기질시약인 10 mM benzylamine을 넣지 않은 blank를 대조로 하여 분광광도계를 이용하여 414 nm에서 흡광도를 측정하여 MAO-B 활성을 측정하였다.

6. 분석결과와 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test²²⁾로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 뇌조직중의 콜레스테롤의 변화

BuOH-25, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹의 뇌조직중의 mitochondria 중의 콜레스테롤의 함량은 각각 56.02 \pm 3.70, 52.08 \pm 3.65 및 50.17 \pm 1.69 mg/g protein으로서 대조그룹의 콜레스테롤의 함량 (60.31 \pm 2.92 mg/g protein : 100%) 대비 7.1%, 13.6% 및 16.8%의 뇌조직중에서 콜레스테롤의 축적 억제효과가 나타났지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 13.6~16.8%로서 통계적으로 유의하였다 (p < 0.01~0.001). 이러한 사실은 고콜레스테롤혈증으로 유도했기 때문에 BuOH-50 이상 투여그룹의 유의적인 콜레스테롤의 억제효과라고 기대된다.

뇌조직중의 microsomes 중의 콜레스테롤의 함량은 각

각 24.95 \pm 1.54, 20.00 \pm 1.62 및 17.20 \pm 1.40 mg/g protein으로서 대조그룹의 콜레스테롤의 함량 (26.15 \pm 2.55 mg/g protein : 100%) 대비 4.6%, 23.5% 및 34.2%의 콜레스테롤의 축적 억제효과가 나타났지만, mitochondria획분에서와 마찬가지로 BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 23.5~34.2%의 통계적으로 매우 유의하였는데 (p < 0.001), 이러한 사실도 mitochondria획분과 같은 경향을 나타내고 있었다. 사실 혈액이나 조직세포중의 콜레스테롤의 함량은 연령의 증가와 함께 증가하는 것으로 알려져 있다.²³⁾

이 실험결과의 솔잎 BuOH획분의 투여가 전보¹⁶⁾에서 평가했던 솔잎 EtOAc획분의 투여보다 뇌조직중의 콜레스테롤의 침착을 훨씬 효과적으로 억제할 수 있다는 사실은 흥미로운 사실이 아닐 수 없다. 솔잎 BuOH획분 중에 어떤 성분이 뇌조직의 콜레스테롤의 침착을 어떻게 효과적으로 억제시키는지의 연구가 필요하다고 기대된다.

2. 뇌조직중의 리포푸신의 변화

뇌를 비롯한 대부분의 장기에서 생성되는 리포푸신 (lipofuscin : LF)의 함량은 연령에 따라 유의적으로 증가되기 때문에 LF의 축적이 노화의 지표가 되고 있다. 뇌세포의 기능에 영향을 주는 것으로 알려진 뇌조직중의 LF의 침착에 미치는 솔잎 BuOH획분의 영향을 비교하여 보면 Table 2와 같다. 뇌조직중에서 BuOH-25, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹의 LF의 침착은 각각 1.33 \pm 0.04, 1.31 \pm 0.09 및 1.25 \pm 0.08 μ g/mg protein으로서 대조그룹의 LF의 침착 (1.45 \pm 0.07 μ g/mg protein : 100%) 대비 각각 91.7%, 90.3% 및 86.2%로서 BuOH획분의 용량존적으로 LF의 침착 억제효과가 나타났지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 10~14%로서 통계적으로 유의하였다 (p < 0.01~0.001)의 유의성을 인정할 수

Table 1. Effects of pine needle butanol fractions on cholesterol levels in brain membranes of SD rats for 45 days

Fractions	Control	BuOH-25	BuOH-50	BuOH-100
Mitochondria (mg/g protein)	60.31 \pm 2.92*	56.02 \pm 3.70	52.08 \pm 3.65 ^o	50.17 \pm 1.69 ^o
	-	92.9%**	86.4%	83.2%
Microsomes (mg/g protein)	26.15 \pm 2.55	24.95 \pm 1.54	20.00 \pm 1.62 ^o	17.20 \pm 1.40 ^o
	-	95.4%	76.5%	65.8%

BuOH-25, BuOH-50 and BuOH-100: Butanol fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; *Mean \pm SD with 7 rats per group; **Percent of control values; ^op < 0.01; ^op < 0.001 compared with control group

Table 2. Effects of pine needle butanol fractions on lipofuscin levels in brain membranes of SD rats for 45 days

Fractions	Control	BuOH-25	BuOH-50	BuOH-100
Homogenates (μ g/mg protein)	1.45 \pm 0.07*	1.33 \pm 0.04 ^o	1.31 \pm 0.09 ^o	1.25 \pm 0.08 ^o
	-	91.7%**	90.3%	86.2%

BuOH-25, BuOH-50, BuOH-100: Butanol fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; *Mean \pm SD with 7 rats per group; **Percent of control values; ^op < 0.05; ^op < 0.01 compared with control group

있었다. 이러한 사실은 전보⁶⁾의 솔잎 EtOAc획분의 투여와는 달리 BuOH획분의 투여에서만 노화색소로 알려진 LF의 침착을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

3. 신경전달물질 ACh 및 그 관련효소의 활성 평가

사실 뇌조직의 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 acetylcholine (ACh)은 시냅스 (synapse)와 시냅스사이의 신경전달에 관계하는 가장 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. 뇌신경계의 특정부위에서 ACh이 시냅스 전 말단에서 분비되면 그것이 시냅스후 수용체와 결합하여 신경세포사이의 자극을 전달한다. 그러나 제 2의 자극이 시냅스를 통해 전달하기 전에 제1의 자극시에 분비된 ACh은 acetylcholinesterase (AChE)에 의하여 가수분해되어야 한다. 그런데 ACh의 합량과 합성효소로서 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성이 대부분의 사람 및 설치동물에서 연령과 함께 감소하는 것으로 알려져 있다.^{24,25)} 또한 AChE의 활성도 ACh와 마찬가지로 감소한다는 사실도 밝혀지고 있다.²³⁾ 뇌조직중의 ACh의 함량, ChAT 및 AChE의 활성에 미치는 솔잎 BuOH획분의 영향을 비교하여 보면 Table 3과 같다. BuOH-25, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹의 뇌조직에서 ACh의 함량은 11.80 ± 0.90, 12.20 ± 0.53 및 12.96 ± 0.31 ng/mg protein으로서 대조그룹 (11.04 ± 0.89 ng/mg protein : 100%) 대비 각각 6.9%, 10.5% 및 17.4%로서 거의 용량의존적으로 증가하였지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 11~17%의 유의성이 인정되었는데 이러한 사실은 LF 및 콜레스테롤의 억제효과가 BuOH획분에서만 나타난다는 사실이다.

또한 이들 세 가지 BuOH획분 투여그룹의 ACh의 합성

에 관여하는 ChAT의 활성도 대조그룹 대비 각각 4.6%, 11.1% 및 22.9%의 거의 용량의존적인 증가효과를 나타내고 있지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 약 11~23%로서 통계적으로 유의하였다 (p < 0.01~0.001). BuOH-25, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹의 뇌조직의 신경전달에 직접 관여하는 AChE의 활성은 193.51 ± 11.09, 207.42 ± 12.27 및 213.39 ± 10.48 unit/mg protein/min으로서 대조그룹의 AChE의 활성 (182.70 ± 12.45 unit/mg protein/min : 100%) 대비 5.9%, 13.5% 및 16.8%로서 BuOH획분의 거의 용량의존적으로 AChE의 활성이 증가되고 있었지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서만 약 14~17%의 통계적으로 유의적인 활성 증가효과가 인정되었다 (p < 0.01~0.001). 따라서 이상의 실험결과를 평가하여 볼 때 솔잎 BuOH획분의 첨가는 ACh 같은 신경전달물질 및 관련효소의 활성증가로 기억·학습의 개선에 크게 기대할 것으로 예상된다.

4. 신경파괴효소 MAO-B의 활성 억제효과

Monoamine oxidase (MAO)는 동물에 널리 분포되어 있으면서 사람이나 흰쥐의 뇌나 혈청에서 연령에 따라 증가한다는 사실이 밝혀져 있다. 이 효소는 도파민 (DA)이나 세로토닌 (5-HT) 및 그 대사산물로서 노르에피네프린 등의 카테콜아민을 산화하여 파괴하는 효소로 알려져 있다. 특히 MAO-B는 뇌세포내에서 신경전달물질로서 작용하는 카테콜아민을 파괴하기 때문에 MAO-B의 활성증가는 문제가 되는 것으로 알려져 있다.^{5,7)} 뇌조직중의 MAO-B 활성에 미치는 솔잎 BuOH획분의 영향을 비교하여 보면 Table 4와 같다. BuOH-25, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹의 뇌조직중의 카테콜아민계 신경전달물질의 파괴

Table 3. Effects of pine needle buthanol fractions on acetylcholine and its related enzymes in brain membranes of SD rats for 45 days

	Control	BuOH-25	BuOH-50	BuOH-100
ACh content (ng/mg protein)	11.04 ± 0.89*	11.80 ± 0.90	12.20 ± 0.53 ^a	12.96 ± 0.31 ^b
	-	106.9%**	110.5%	117.4%
ChAT activity (unit/mg protein/min)	1.53 ± 0.14	1.60 ± 0.08	1.70 ± 0.07 ^a	1.88 ± 0.06 ^c
	-	104.6%	111.1%	122.9%
AChE activity (unit/mg protein/min)	182.70 ± 12.45	193.51 ± 11.09	207.42 ± 12.27 ^b	213.39 ± 10.48 ^b
	-	105.9%	113.5%	116.8%

BuOH-25, BuOH-50 and BuOH-100: Buthanol fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; *Mean ± SD with 7 rats per group; **Percent of control values; ^ap < 0.05; ^bp < 0.01; ^cp < 0.001 compared with control group 0

Table 4. Effects of pine needle butanol fractions on monoamine oxidase-B activities in brain membranes of SD rats for 45 days

	Control	BuOH-25	BuOH-50	BuOH-100
MAO-B activity (nmol/mg protein/min)	2.62 ± 0.22*	2.57 ± 0.14	2.48 ± 0.07	2.45 ± 0.09
	-	98.1%**	94.7%	93.5%

BuOH-25, BuOH-50 and BuOH-100: Butanol fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; *Mean ± SD with 7 rats per group; **Percent of control values

에 관계하는 MAO-B 활성이 2.57 ± 0.14 , 2.48 ± 0.07 및 2.45 ± 0.09 ng/mg protein으로서 대조그룹의 MAO-B 활성 (2.62 ± 0.22 ng/mg protein : 100%) 대비 거의 용량의존적으로 억제하고 있었지만, BuOH획분의 투여그룹에 의한 통계적인 유의효과를 인정할 수 없었다. 이러한 사실은 생리적 효과가 성분에 따라 선택적임을 알 수 있었다.

요 약

술잎 BuOH획분을 하루 25, 50, 100 mg/kg BW로써 SD계 랫트에 45일 동안 투여하여 뇌조직획분의 콜레스테롤 및 LF의 침착, ACh 및 ACh의 합성효소 ChAT, 신경전달에 관여하는 효소 AChE의 활성, 카테콜아민계 신경전달물질의 파괴효소 MAO-B의 활성에 미치는 영향을 평가하였다. 뇌조직의 mitochondria 및 microsome획분 중의 콜레스테롤이 BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서 14~17% 및 23~34%의 통계적인 억제효과가 인정되었고, 뇌조직에 대한 LF도 BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서 10~14%의 유의적인 침착 억제효과가 인정되었다. 뇌조직중의 신경전달물질 ACh의 함량 및 ACh의 합성효소 ChAT의 활성은 BuOH획분의 거의 용량의존적으로 증가현상이 나타났지만, BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서 각각 11~17% 및 11~23%의 통계적인 증가효과가 인정되었을 뿐만 아니라 AChE의 활성도 BuOH-50 및 BuOH-100 투여그룹에서 14~17%의 통계적인 증가효과가 인정되었다. 뇌조직중의 MAO-B의 활성은 BuOH획분의 거의 용량의존적으로 억제하였지만, 그 유의성은 인정할 수 없었다. 따라서 술잎 BuOH획분의 투여는 뇌조직의 유동성을 촉진하고 콜레스테롤의 침착을 억제하며 ACh와 그 관련효소의 활성을 촉진하여 기억·학습의 증진에 매우 효과적으로 작용할 것으로 기대된다.

Literature cited

- Namba T. Colored Illustrations of WAKAN-YAKU, Hoikusa Publishing Co., Vol. II, pp.82-83, 1980
- Joseph JA, Villalobos-Molinas R, Denisova NA, Erat S, Strain J. Cholesterol: A two-edged sword in brain aging. *Free Rad Biol Med* 22(3): 455-462, 1997
- Tappel AL, Fletcher B, Deamer D. Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J Gerontol* 28: 415-424, 1975
- Tsuchida M, Miura T, Alsara, K. Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 297-325, 1987
- Grote SS, Moses SG, Robins E, Hudgens RW, Croniger AB. A study of selected catecholamine metabolizing enzymes: A comparison of depressive suicides and alcoholic suicides with controls. *J Neurochem* 23: 791-802, 1974
- Kalaria RN, Mitchell MJ, Harik SI. 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
- Noda Y, McGeer PL, McGeer EG. Lipid peroxides in brain during aging and vitamin E deficiency: Possible relations to changes in neurotransmitter indices. *Neurol Aging* 3: 173-178, 1982
- Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Nutr* 25(3): 367-373, 1996
- Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver, and liver morphology in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Nutr* 25(3): 374-378, 1996
- Kim EJ, Jung SW, Choi KP, Ham SS, Kang HY. Cytotoxic effect of the pine needle extract. *Korean J Food Sci Technol* 30(1): 213-217, 1998
- Kim JD, Yoon TH, Choi M, Im KJ, Ju JS, Lee SY. Effect of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rats. *Kor J Gerontol* 1(1): 47-50, 1990
- Kong Z, Liu Z, Ding B. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat Res Aug* 347(3-4): 101-104, 1995
- Choi JH, Kim DW, Kim JH, Kim KS, Lee JS. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats I. Feeding effect of PNE on lipid and oxygen radical metabolisms in serum of SD rats. *Kor J Life Sci* 7(4): 371-376, 1997
- Choi JH, Kim JH, Kim DW, Kim KS, Lee JS, Baek YH. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats II. Feeding effect of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain membranes of SD rats. *Kor J Life Sci* 8(1): 91-96, 1998
- Choi JH, Kim JH, Kim DW, Hwang CH, Kim DI, Lee JS. 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. *Kor J Life Sci* 8(2): 167-172, 1998
- Choi JH, Kim DI, Cho WK, Kim KJ, Kim CM. Effects of pine needle ethyl acetate fraction on acetylcholine and its related enzymes in brain membranes of rats. *Kor J Nutr* 37(submitted), 2004
- Choi JH, Kim DW, Yu BP. Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *J Nutr Health & Aging* 2(3): 461-465, 1998
- Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res* 14: 364-366, 1973
- Lowry OH, Roseborough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel SAL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52: 1-9, 1973
- Hallak M., Giacobini EA. Comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase. *Neuropharmacol* 26(6): 521-530,

- 1987
- 22) Steel RGD, Torrie JH. *Principles and procedures of statistics*. McGrawhill. New York, 1960
- 23) Sastry BV, Janson VE, Jaiswal N, Tayeb OS. Deficiencies in the cholinergic nervous system of the rat cerebrum as a function of age. *Age 4*: 142-147, 1981
- 24) McGeer EG, McGeer PL. Age changes in the human for some enzymes associated with metabolism of catecholamines, GABA, and acetylcholine. In, Ordy, J. M. and Brizzee (eds), *Neurobiol Aging*, pp.287-305, 1975. New York: Plenum Press
- 25) Strong R, Hsu L, Bartus RT, Enna SJ. Age-related alterations in the rodent brain cholinergic system and behavior. *Neurobiol Aging* 1: 59-64, 1980