

## 초석잡 메탄올 추출물의 Acetylcholine Esterase 및 Monoamine Oxidase 활성 억제 효과

† 류 병 호 · 김 선 옥  
경성대학교 식품공학과

### Effects of Methanol Extract of *Stachys sieboldii* MIQ on Acetylcholine Esterase and Monoamine Oxidase in Rat Brain

† Beung-Ho Ryu and Seoun-Ok Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Graduate School, Kyungshung University, Daeyeung-dong, Nam-gu, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

This study was undertaken in order to evaluate effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ and its related enzyme activities in brain tissues of rats.

Sprague-Dawley(SD) male rats were fed within a control group, which is a basic diet group. The experimental diet group was given 100 and 200 mg/kg to supervise 100 and 200 mg/kg body weight per day for 20 days.

Lipid peroxide levels and acetylcholine esterase activity in brain tissues were slightly decreased at a dose dependent manner, *in vitro*.

Lipid peroxide levels were also decreased at a dose dependent manner; methanolic extracts of *Stachys sieboldii* MIQ demonstrated significant inhibitory effects, *in vivo*.

Monoamine oxidase and xanthine oxidase activities were significantly inhibited in the brain tissues of experimental group compared to control group and the ratio of type conversion of xanthine oxidase were decreased.

Key words : *Stachys sieboldii* MIQ, acetylcholine esterase, xanthine oxidase.

#### 서 론

사람은 나이가 들어감에 따라 신체적 노화현상이 일어나게 되며, 특히 대뇌(大腦)의 뇌세포수가 점차적으로 줄어들고 기능도 떨어지면서 대뇌가 위축되어 노인성 질환인 치매가 발병할 수 있다<sup>1)</sup>. 치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 일단 후천적 외상이나 질병 등 외인에 의해 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적

으로 기억력, 지남력, 언어, 판단력, 추상적 사고의 판단, 감정의 변화는 물론 인격의 변화를 초래하는 인지 기능과 고등 정신 기능이 감퇴하여 일어나는 복합적인 임상증후군을 일괄하여 지칭된다<sup>2,6)</sup>.

치매는 Alzheimer형 치매와 뇌혈관성 치매, 그리고 이들 증상이 혼재하는 혼합형 치매가 대부분을 차지하고 있다<sup>7)</sup>. 치매환자에서 나타나는 생화학적 변화는 뇌의 측두엽에서 acetylcholine의 함량이 정상적인 상

본 논문은 2004년도 경성대학교 연구비 지원에 의하여 수행하였음.

† Corresponding author : Beung-Ho Ryu, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungshung Univ., Busan 608-736, Korea. Tel : +82-51-620-4712, E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

태보다 매우 감소된 것으로 보고되었다<sup>8)</sup>.

Acetylcholine은 choline acetyltransferase에 의해서 acetyl CoA와 choline으로부터 생합성되거나 acetylcholine esterase에 의하여 acetylcholine의 양이 감소되어 기능이 떨어지게 된다<sup>9,10)</sup>.

이것은 acetylcholine을 생산하는 choline성 신경의 손상이나 세포 사멸로 이어지며 이로 인해 학습력, 기억력 감퇴와 인지력이 저하되는 병리학적 소견이 나타나고 있다<sup>11,12)</sup>. 이와 같이 치매는 인지기능 장애가 주로 대뇌 기저부의 콜린(choline)성 신경세포의 손상으로 발병될 수 있다는 가설과 함께 여러 가지 기능을 갖는 콜린(choline)성 약물들이 개발되었고 일부에서는 다소간의 효과가 입증된 바 있다<sup>13)</sup>.

한편으로는 대다수의 치매 환자는 각종 증상이 수반되는 복합병변으로 인해 심적 부담을 느껴 우울증에 시달리기도 한다. 우울증은 자율 신경계의 교감신경 전달물질인 catecholamine의 체내 함량의 감소와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. Monoamine oxidase는 신경전달물질인 catecholamine을 분해하여 catecholamine의 체내 농도를 조절하는 기능을 한다<sup>15~17)</sup>.

최근에는 치매 치료제로 수용체 특이성이 높고 반감기가 길며 투여방법이 간단한 도네페질(donepezil)이 개발되어 유럽과 미국에서 사용되고 있으며 그 외에도 tacrine, rivastigmine, metrifonate, eptastigmine, physostigmine 등이 acetylcholine esterase의 활성을 저해하는 약물로 사용되고 있다. 그러나 이들 약품은 acetylcholine 분해 효소의 활성을 억제시킴으로써 acetylcholine의 농도를 유지시켜 저하된 인지기능을 개선시키는 효과가 있으나, 간 독성 등 부작용이 있다.

치매는 신경세포의 재생능력이 극히 낮다는 것이 알려지면서 퇴행성 경과를 지연시키는 방법이 임상에서 더 필요하며 이러한 역할을 하는 것 중의 하나가 신경세포 성장요소이다. 이것은 동물실험에서 수술 후 발생하는 콜린(choline)성 신경세포의 변성을 보호하는 효과가 입증되었고 콜린(choline)성 신경세포의 성장, 유지 및 재생에 필수적인 기능성 물질이 요구된다<sup>17,18)</sup>. 그리고 치매를 일으키는 유전자가 21번 염색체에 존재한다는 것이 확인되었고, 중요한 신경계 병변의 하나인 베타-아미로이드( $\beta$ -amyloid) 단백질의 유전자를 규명하려는 연구들이 활발하므로 이 질환에 대한 유전자 치료의 가능성을 제시한 바 있다<sup>19)</sup>.

그러나 치매 예방 및 개선에 대한 가장 합리적인 연구는 뇌세포의 파괴와 노화를 지연시켜 주고, 파괴된 신경세포를 재생시키며 또한 뇌세포를 보호하여 뇌세포의 활동을 촉진하고 인지 기능을 회복시키는 신기

능성 물질이 요구되지만 복잡한 치매질환을 충족시켜 주는 의약품 또는 식품은 현재 없는 실정이다.

초석잠은 다년생 풀로서 여름에는 잎이 무성하고, 겨울에는 뿌리가 누에모양을 하고 있어 식물의 동충하초라고 불리기도 한다. 초석잠은 중국의 중약편에 의하면 뇌경색, 기억력, 기억력 증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채로서 옛날부터 애용되어져 왔다<sup>20)</sup>. 일본에서도 정월 요리에 귀하게 쓰이기도 하고 여러 가지 성인병과 만성병 치료에 유용하게 쓰이기도 하였다. 초석잠의 성분중 탄수화물은 감자와 같은 전분이 아니라 올리고당으로 장속의 유익 세균의 생육을 도와 장의 기능을 촉진하기도 한다.

최근에는 초석잠이 항균효과<sup>21)</sup>, 항암효과<sup>22)</sup> 및 항산화 효과<sup>23)</sup>가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 초석잠이 뇌 기능에 효과가 있다고 예로부터 전해 내려오고 있음에도 불구하고 아직까지 치매에 대한 연구가 진행되지 않았으므로, 초석잠으로부터 치매의 원인과 관련된 acetylcholine 관련효소에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 사용된 초석잠(*Stachys sieboldii* MIQ)은 경남 밀양시장에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 실험동물

한국화학연구소에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강하고 체중이 약  $200 \pm 10$  g 내외의 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐를 사용하였다.

#### 2) 실험동물의 사료의 조성

Sprague Dawley(SD)계 수컷 흰쥐( $200 \pm 10$  g)를 본 대학 동물사육실에서 2주동안 예비사육한 다음, 7마리씩 3군으로 나누어 실험용 기본사료(control group)로써 사육하면서 초석잠 추출물을 각각 체중 kg당 100 mg 과 200 mg이 되도록 조제한 액체사료를 먹인 것을 실험그룹으로 하여 20일간 사육실험을 실시하여 효소의 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 동물사육실은 항온항습( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 2\%$  RH)하에서 12시간 주기(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되도록 하였다.

### 3. 조제사료의 조성

본 실험에 사용한 사료조성은 Table 1에 나타난 바와 같이  $\alpha$ -corn starch 60%, casein 20%, lard 10% 그리고 비타민과 무기질(AIN-76 mixture) 각각 1.2%, 3.5%, 그리고 cellulose powder 5.0%, DL-methionine 0.3%를 첨가하였다. 실험그룹의 사료조성은 초식잠 추출물을 하루에 각각 체중 kg당 100 mg과 200 mg이 되도록 조절한 후 마음대로 먹도록 하였다.

**4. 초식잠 메탄을 추출물의 조제**

환류 냉각관을 부착한 flask내에 초식잠 500g을 넣고 시료 중량의 10배량의 75% 메탄올을 가하여 60°C의 수욕상에서 12시간 동안 2회 반복 추출하여 감압 여과한 후, 여액을 감압 농축하고 이를 동결건조하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**5. 과산화지질 함량 측정**

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 뇌조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색을 n-Butanol : Pyridine(15 : 1) 혼합액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g 당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

**6. 효소원의 조제**

뇌조직 분리는 예리한 수술용 가위를 이용하여 두

개골을 절단하여 적출하였으며 생리식염수에 씻은 다음 여지로 가볍게 압박하여 이물질을 제거하였다. 뇌 조직은 1g 당 4배량의 균질화 완충액(12.5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 0.4 M NaCl 함유)를 가하여 0°C에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 사용하여 과산화 지질의 함량을 측정하였다. 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 취하고 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액과 mitochondria 분획은 monoamine oxidase 활성 측정원액으로, 상정액인 postmitochondria 분획은 acetylcholine esterase 및 xanthine oxidase 활성의 측정에 필요한 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0~4°C에서 행하였다.

**1) 콜린아세틸트랜스퍼라제(ChAT)의 활성**

Ellman 등<sup>25)</sup>의 방법에 의한 DTB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate)에 의한 기질로서 acetyl-CoA을 이용하여 반응을 생성시켜 흡광도를 측정하였다.

뇌 세포 핵분의 콜린 아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase : ChAT)의 측정은 0.2 mM acetyl-CoA, 10 mM choline chloride, 0.2 M KCl, 10 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA를 각각 0.2 mL씩 첨가, 혼합하여 총 0.8 mL의 부피로 만든 다음 choline acetyltransferase을 1  $\mu$ L, cytosol 100  $\mu$ L, 1.0 M Tris buffer 190  $\mu$ L, DTB를 5  $\mu$ L, 20% TCA(trichloroacetic acid) 250  $\mu$ L의 양으로 각각 첨가, 혼합하여 분광광도계를 이용해 파장 412 nm에서 2분 간격으로 ChAT의 활성을 측정하였다.

**2) 아세틸콜린에스테라아제(AChE)의 활성 측정**

뇌 세포에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE) 활성 측정은 Galgani 등<sup>26)</sup>과 Hallak와 Giacobini의 방법<sup>27)</sup>을 병행 측정하였다. 각 microplate well에 0.1 M Tris buffer, pH 8.0(Trizma HCl +Trizma base)을 300  $\mu$ L, enzyme suspension(상정액) 10  $\mu$ L를 연속적으로 첨가한 후 다시 0.1 M acetylthiocholine chloride 10  $\mu$ L를 첨가하였다. Microplate reader (ELISA reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도 변화를 5분 동안 방치한 후 AChE의 활성(unit/min/mg protein)을 측정하였다.

**3) 모노아민옥시다아제(MAO)의 활성 측정**

모노아민옥시다아제(monoamineoxidase : MAO-B)의 활성 측정은 Nagatsu와 Yaki<sup>28)</sup>의 방법에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성능을 측정하였다. 0.1 M 인산칼륨 완충액(potas-

**Table 1. Experimental groups and compositions of basal and *Stachys sieboldii* MIQ supplemented diet**

Ingredient	Basal diet <sup>1)</sup>	Supplemented diet <sup>2)</sup>
Casein	20.0	20.0
DL-methionine	0.3	0.3
Corn starch	60.0	59.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Mineral mixture <sup>3)</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.2	1.2
Lard	10	10
<i>Stachys sieboldii</i> MIQ	-	100 or 200 mg/kg BW

<sup>1)</sup> Basal diet +water.

<sup>2)</sup> Basal diet + *Stachys sieboldii* MIQ + water.

<sup>3)</sup> AIN-76<sup>TM</sup>.

sium phosphate, pH 7.5) 일정량에 기질인 0.9 mM tyramine 0.25 mL와 뇌조직 효소액 0.2 mL를 첨가해 37 °C에서 20분간 반응시킨 다음, 0.767 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 mL와 2% sodium tungstate 용액 1.5 mL를 가하여 반응을 종료시켰다. 반응액을 원심분리하여 상정액을 1.0 mL 취하고 여기에 페놀시액과 alkaline hypochlorite 용액 1.0 mL를 가하여 37°C에서 15분간 가온하여 발색시킨 다음, 파장 625 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1 mg의 단백질이 1분간 생성시킨 NH<sub>3</sub>의 양을 nmole로 나타내었다.

#### 4) Xanthine oxidase의 활성 측정

Xanthine oxidase(type O) 활성 측정은 Stirpe 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 효소원에 0.1M 인산칼륨 완충액(pH 7.5)에 녹힌 후 기질인 xanthine 60 µM을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 단백질을 제거하고 원심분리한 후 이때 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 활성을 환산하였다.

Xanthine dehydrogenase(type D)의 활성 측정은 상기 반응액에 100 mM NAD<sup>+</sup>을 첨가하여 같은 조건에서 반응시킨 후 측정된 효소의 활성(total type O + D type)에서 O type의 활성을 뺀 값으로 환산하였다. 효소의 활성은 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다. 그리고 xanthine oxidase의 type 전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성을 이용하여 oxidase (type O)로의 형전환 비율을 O/O+D의 비율로 계산하였다.

#### 7. 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등<sup>30)</sup>의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 실험하였다.

#### 8. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 실시하였다<sup>31)</sup>.

### 결과 및 고찰

#### 1. *In vitro* 에서 초석잠 추출물의 과산화 지질의 생성에 대한 영향

초석잠 추출물의 농도를 각각 0.02, 0.04, 0.06, 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL 씩 뇌조직 마쇄액에 첨가한 후 각각 37

°C에서 1시간 동안 반응을 시킨 다음 지질의 과산화물의 생성을 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

초석잠 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 반응액의 과산화 지질물의 함량은 21.06±0.23 nmole/g tissue이었다. 그러나 초석잠 추출물을 0.02, 0.04 및 0.06 mg/mL 씩 첨가하였을 때 과산화 지질의 함량은 각각 21.45±0.21, 20.28±3.00 및 18.43±2.20 nmole/g tissue이었다. 반면에 초석잠 추출물의 농도를 각각 10배로 높여 반응액에 첨가하여 과산화물의 생성억제 효과를 조사한 결과 0.2 mg/mL 첨가하였을 때 과산화 지질은 15.42±2.26 nmole/g tissue 이었고, 0.4 mg/mL 첨가시에는 과산화물의 생성량이 11.96±2.21 nmole/g tissue 이었으며, 0.6 mg/mL 첨가시에는 11.58±2.31 nmole/g tissue이었다.

이상의 결과로 보아 초석잠 추출물을 저농도 0.02~0.06 mg/mL로 첨가하였을 때에는 대조군에 비하여 4.7~12.5%의 과산화 생성물의 억제 효과를 나타내었으나, 고농도(0.2~0.6 mg/mL)를 첨가하였을 때는 44.25~45.02%의 과산화물의 생성억제 효과를 나타내었다.

#### 2. *In vitro*에서 초석잠 추출물의 Acetylcholine Esterase 활성 억제 효과

초석잠 추출물의 농도별로 반응액에 첨가한 후 acetylcholine esterase의 활성 억제 효과를 대조군과 비교하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 효소 반응액에 0.02 mg/mL의 초석잠 추출액을 첨가하였을 때 효소의 활성 억제는 1.3%이었으나, 초석잠 추출물의 첨가농도가 약간씩 증가한 0.04 및 0.06 mg/mL일 때 acetylcholine

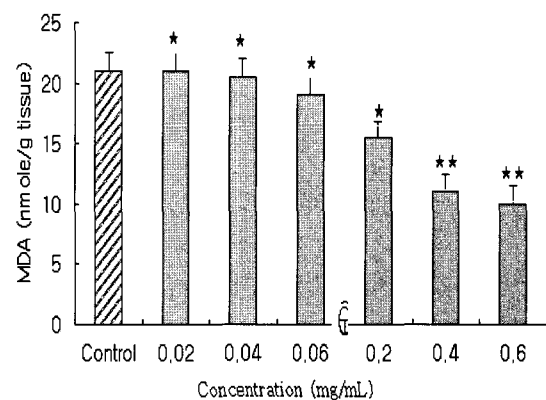


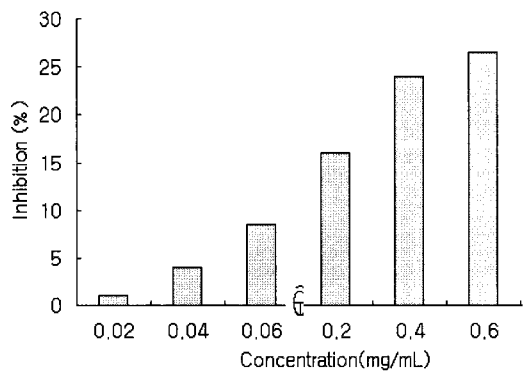
Fig. 1. Effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ on lipid peroxide value of rat brain *in vitro*. Values represent mean±SD for 3 separate experiments. ★ and ★★ : Significantly different from control at  $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively.

esterase의 활성 억제는 각각 4.5% 및 8.8%이었다. 그러나 초석잠 추출물의 농도를 10배 증가시켜 고농도인 0.2, 0.4 및 0.6 mg/mL를 첨가하였을 때는 효소 억제 활성은 각각 16.2%, 24.5% 및 27.6%로 나타내었다.

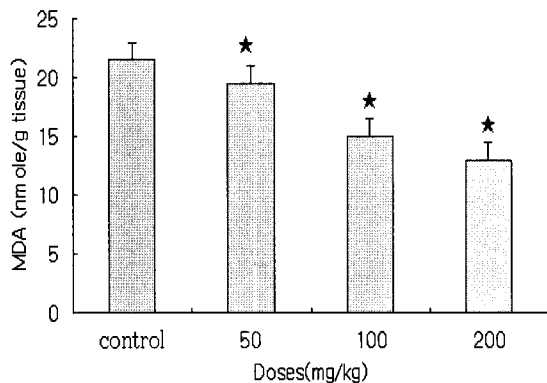
이와 같이 시험관내에서 *in vitro*에서 acetylcholine esterase의 활성억제는 초석잠 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라 억제효과가 높은 용량 의존형으로 나타났으며, 초석잠 추출물의 첨가량이 저농도에서 보다 고농도에서 현저하게 acetylcholine esterase 활성 억제 효과를 나타내고 있다.

**3. 초석잠 추출물의 투여량에 의한 과산화 지질의 함량 변화**

초석잠 추출물을 상기 실험의 결과에 따라 20일간 투여한 후 뇌조직중의 과산화지질의 함량을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 초석잠 추출물을 투여하지 않은 대조군의 뇌조직중의 과산화지질의 함량은



**Fig. 2. Inhibitory effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ on acetylcholine esterase activity of rat brain *in vitro*.** Values represent mean±SD.



**Fig. 3. Lipid peroxide contents of rat brain on the treatment doses of *Stachys sieboldii* MIQ *in vivo*.** Values are mean±SD. ★: Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

22.84±1.25 nmole MDA/g tissue이었고, 100 mg/kg을 투여한 실험군은 14.67±1.48 nmole MDA/g tissue이었으나 200 mg/kg을 투여한 실험군에서는 14.24±1.08 nmole MDA/g tissue로 나타내었다. 이러한 결과로 보아 초석잠 추출물을 100 mg/kg 투여해도 효과적임을 알 수 있었다.

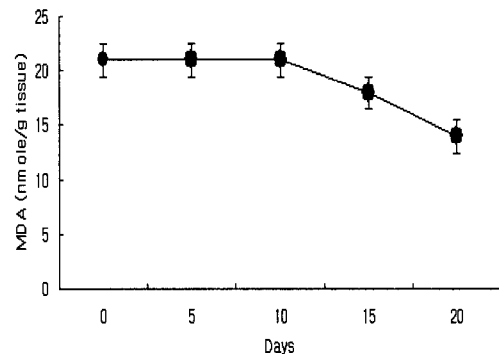
본 실험에서 초석잠 추출물의 용량이 증가할수록 뇌조직 중의 과산화 지질의 함량이 감소하였고, 특히 100 mg/kg의 농도에서는 과산화지질의 함량이 상당히 감소함을 알 수 있었다.

**4. 초석잠 추출물의 투여기간에 따른 과산화지질의 함량 변화**

초석잠 추출물을 실험동물인 쥐에 체중 kg당 100 mg을 경구 투여하면서 5, 10, 15 및 20일의 투여기간에 따른 과산화 지질의 함량을 조사하였다.

Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 초석잠 추출물을 투여하지 않은 대조군의 뇌조직 중의 과산화 지질의 함량은 24.74±2.20 nmole MDA/g tissue 이었으나, 초석잠 추출물을 투여한 후 5일이 경과한 실험군에서는 과산화 지질의 함량은 24.03±2.06 nmole MDA/g tissue 였으며, 10일간 투여한 실험군은 23.21±2.16 nmole MDA /g tissue이었고, 20일간 투여한 실험군에서는 22.60±2.53 nmole MDA/g tissue로 나타내었다. 뇌조직 중의 과산화 지질의 함량은 초석잠 추출물의 투여에 의해 감소하였으나, 유의성은 찾아 볼 수 없었다. 그러나, 20일간 투여한 실험군에서는 14.28±2.24 nmole MDA/g tissue로 대조군에 비하여 약 36% 정도로 과산화 지질의 억제효과를 찾아 볼 수 있었다.

그리고 초석잠 추출물을 실험동물에 체중 100 mg/kg을 20일간 경구 투여한 후 뇌조직중의 과산화 지질의 함량을 대조군과 비교하였다.



**Fig. 4. Effects of feeding days of *Stachys sieboldii* MIQ on lipid peroxide contents of rat brain *in vivo*.** Values represent mean±SD.

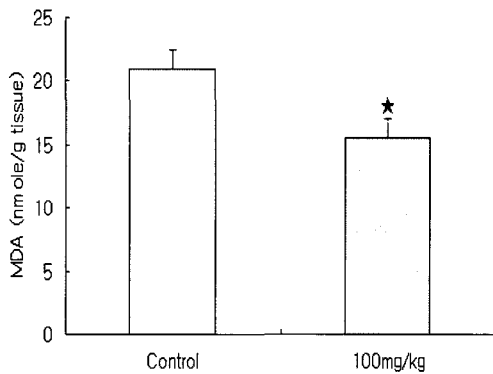
Fig. 5에 나타낸 바와 같이 대조군에서는 뇌조직중의 과산화 지질 함량이  $22.84 \pm 2.16$  nmole MDA/g tissue 이었으나, 초석잠 추출물을 100 mg/kg 투여한 후 20일 경과시에는 뇌조직 중의 과산화 지질의 함량은  $16.25 \pm 2.23$  nmole MDA/g tissue로 대조군에 비하여 29% 정도의 지질 과산화 함량의 감소를 나타내었다.

**5. 초석잠이 acetylcholine esterase(AChE) 및 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성에 미치는 영향**

Acetylcholine을 분해하고 합성하는데 관여하는 효소인 AChE와 ChAT의 활성은 신경전달물질인 acetylcholine의 함량에 크게 관여한다.

초석잠은 kg당 100 및 200 mg/day로 쥐에게 20일간 투여한 후 뇌 조직의 AChE 및 ChAT의 활성을 측정하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 AChE 활성은 초석잠을 kg 당 100 및 200 mg 투여하였을 때 각각  $203.7 \pm 6.04$  및  $209.8 \pm 5.90$  units/mg protein으로 대조군의  $264.5 \pm$



**Fig. 5. Effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ on lipid peroxide of rat brain *in vivo*.** Values represent mean±SD. ★ : Significantly different from control at  $p < 0.05$

**Table 2. Effects of *Stachys sieboldii* MIQ(S.S) on acetylcholine esterase(AChE) and choline acetyltransferase(ChAT) activities in rat brain**

Activities (units/mg protein)	Control	S.S-100	S.S-200
AChE	$264.5 \pm 6.25$	$203.7 \pm 6.04$	$209.8 \pm 5.90$
ChAT	$6.84 \pm 0.53$ <sup>a)</sup>	$7.04 \pm 0.51$ <sup>a)</sup>	$6.09 \pm 0.42$

S.S-100 and S.S-200: *Stachys sieboldii* MIQ of 100 and 200 mg/kg/day added to basic control diet.

<sup>a)</sup> Values represent mean±SD.

6.25에 비하여 23.1%의 활성이 억제되었다.

그리고 ChAT의 활성은 초석잠을 kg당 100 및 200 mg 투여한 후 활성을 측정한 결과 각각  $7.04 \pm 0.51$  및  $6.09 \pm 0.42$  units/mg protein으로 대조군의  $6.84 \pm 0.53$  units/mg protein에 비하여 각각 2.9%씩 증가하였다.

치매 환자의 뇌조직 중에는 acetylcholine 함량이 정상인에 비하여 극히 낮으므로 뇌조직 중의 acetylcholine의 함량은 치매와 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.<sup>19)</sup>

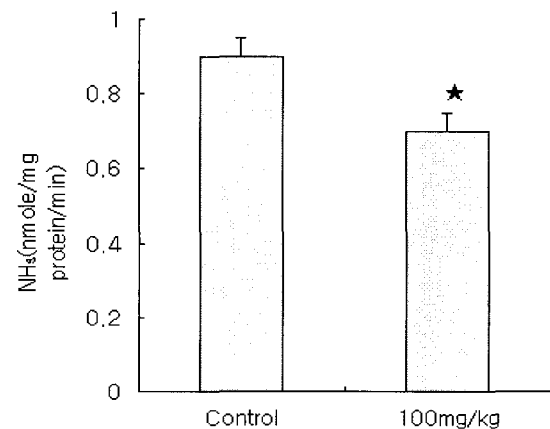
뇌조직에서 acetylcholine esterase의 활성을 억제시키는 약물에 의해 조직 중의 acetylcholine의 농도를 증가시켜 어느 정도 치매 증상을 개선시킬 수 있을 것이다.

본 실험에서 초석잠 추출물을 투여한 후 acetylcholine esterase의 활성을 관찰하였을 때 대조군에 비하여 초석잠을 투여한 실험군에서 효소활성이 감소하는 것으로 나타났으므로 초석잠이 치매에 기여할 것으로 기대된다.

**6. 초석잠 추출물의 Monoamine Oxidase의 활성 억제 효과**

초석잠 추출물을 100 mg/kg을 실험동물에 20일간 투여한 후 뇌조직중의 monoamine oxidase의 활성의 억제 효과를 실험하였다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 대조군의 monoamine oxidase 활성은  $0.926 \pm 0.12$  nmole NH<sub>3</sub>/mg protein/min 이었으나, 실험군의 monoamine oxidase의 활성은  $0.723 \pm 0.11$  nmole NH<sub>3</sub>/mg protein/min으로서 대조군에 비하여 비교적 효소활성이 약간 억제되는 것으로 나타났다.



**Fig. 6. Inhibitory effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ on monoamine oxidase activity in rat brain *in vivo*.** Values are mean. ★: Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

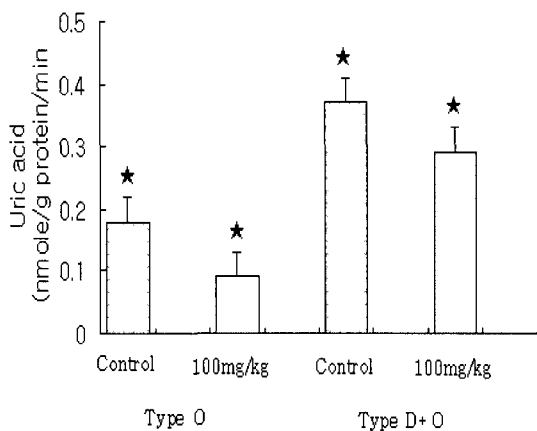
치매는 뇌 조직의 손상이나 퇴화에 의하여 나타날 수 있으므로 이러한 요인을 차단하면 치매의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 판단된다. 뇌의 대뇌 기능의 이상으로 인하여 기억력 소실과 불안, 초조 등 정신적인 기능향진은 치매로 인한 정신적 충격을 경감시킬 수 있다. 교감신경은 정신적 흥분 상태를 원활히 하여 뇌기능을 활발히 하고 정신 기능을 향상시킬 수 있다. 전달물질은 epinephrine이나 norepinephrine 등이 있는데 이러한 호르몬은 monoamine oxidase에 의하여 기능을 소실하게 된다<sup>32)</sup>. 이 monoamine oxidase의 활성을 억제하면 교감신경의 흥분상태를 지속시킬 수 있어 뇌의 정상적인 기능을 할 수 있을 것이다.

**7. 초석잠 추출물의 Xanthine Oxidase 활성 억제효과**

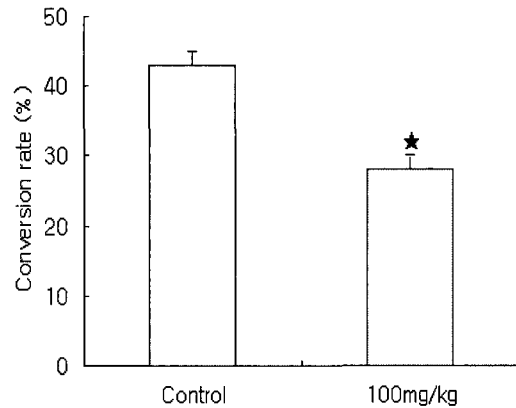
초석잠 추출물을 100 mg/kg을 20일 동안 경구 투여한 후 뇌조직 중의 xanthine oxidase의 type O(oxidase) 활성의 억제효과를 실험하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 초석잠 추출물을 실험 동물인 쥐에 투여한 후 20일 경과 뒤에 xanthine oxidase의 type O 활성은 대조군의 경우 0.19±0.02 nmole/g 이었으나 초석잠 추출물을 투여한 실험군의 xanthine oxidase의 활성은 0.07±0.01 nmole/g로서 초석잠 추출물을 투여함에 따라 xanthine oxidase의 활성이 현저하게 억제 하는 것을 알 수 있었다.

별도로 xanthine oxidase와 xanthine dehydrogenase의 type O 활성을 동일한 조건에서 조사해 본 결과 대조군에 비하여 초석잠 추출물을 첨가한 실험군에서 약간 효소의 활성이 억제됨을 보였으나 큰 차이는 찾아 볼 수 없었다.



**Fig. 7. Inhibitory effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii* MIQ on xanthine oxidase activity in rat brain *in vivo*.** Values represent mean±SD. ★: Significantly different from control at  $p<0.05$ .



**Fig. 8. Effects of methanol extracts of *Stachys sieboldii*. MIQ on type conversion rate from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in rat brain *in vivo*.** Values are mean±SD. ★: Significantly different from control at  $p<0.05$ .

Fig. 8에서 나타낸 바와 같이 xanthine dehydrogenase로부터 xanthine oxidase로 전환율을 조사한 결과 대조군의 전환율은 약 43%이었으나 초석잠 추출물을 투여한 경우 전환율은 약 28%로 현저하게 억제하는 것을 볼 수 있었다.

뇌 기능의 손상의 많은 원인중 큰 비중을 차지하고 있는 것이 활성산소의 세포독성 생성으로 나타나는 현상이다<sup>33)</sup>. 활성산소는 xanthine oxidase의 전환과정 중에 생성되므로, xanthine oxidase의 활성을 억제시키면 활성산소가 생성을 동시에 억제시켜 활성산소에 의한 뇌조직의 손상을 부분적으로 막을 수 있을 것이다. 본 실험에서 초석잠 투여군이 xanthine oxidase 활성과 형 전환비가 대조실험군에 비하여 효소활성뿐만 아니라 전환비도 현저하게 전환됨을 알 수 있었다.

이와 같이 초석잠의 항산화 작용으로 인하여<sup>22)</sup> 뇌조직에서 활성산소의 생성을 억제시켜 뇌조직의 손상을 억제시킬 수 있을 것으로 판단된다.

**요 약**

초석잠 메탄올 추출물이 뇌신경전달물질과 관련이 있는 acetylcholine esterase, monoamine oxidase 및 xanthine oxidase의 활성억제효과에 대하여 실험하였다.

실험관내에서 초석잠 추출물을 각각 100 및 200 mg/kg씩 첨가한 다음 실험한 결과 첨가농도가 증가할 수록 과산화지질의 생성을 억제하여 용량 의존형으로 나타났다.

쥐를 대상으로 20일간 투여한 동물실험에서는 초석

잠 추출물 100 mg/kg을 식이에 혼합하여 투여한 결과 지질 과산화의 생성을 억제하였다.

Acetylcholine esterase의 활성의 경우 초석잠 추출물을 100 mg/kg 투여한 결과 대조군에 비하여 효소활성이 23.11%로 억제되었고, monoamine oxidase 및 xanthine oxidase 활성이 각각 21.93% 및 63.58%로 억제되었다. 그리고 초석잠 추출물을 100 mg/kg을 투여한 경우 xanthine dehydrogenase로부터 xanthine oxidase로의 형 전환비율은 28%로 현저하게 억제되었다.

또한, Xanthine dehydrogenase로부터 oxidase로의 형 전환비율을 실험한 결과 정상상태에 비하여 억제됨을 알 수 있었다.

### 참고문헌

- Roth, ME. Advances in Alzheimer's disease, *Journal of Family Practice* 37(6):593-607. 1993
- Katzman, R. Alzheimer disease. *New Eng. J. Med.*, 3/4, 964-973. 1956
- Jorn, AF, Korten, AE and Henderson, AS. The prevalence of dementia, A quantitative integration of the literature. *Acta. Psychiat. Scand.* 76:465-479. 1986
- Kim, BG, Hyun, KC, Kim, JW and Whang, WW. A clinical study on the effects of oriental medical treatment on Dementia of Alzheimer type. *J. Orient. Neuropsychiat.* 9:25-43. 1995
- Cuello, AC. Progress in brain research(vol. 98) Cholinergic function and dysfunction. Amsterdam, Elsevier, pp. 416-417. 1993
- Jorn, AF, Korten, AE and Henderson, AS. The prevalence of dementia : A quantitative integration of the literature. *Acta Psychiat Scand.* 76:465-479. 1987
- Henderson, AS. The risk factors for Alzheimer's disease ; a review and a hypothesis. *Acta. Psychiat. Scand.* 78:257-275. 1988
- Richter, JA, Perry, EK and Tomlinsom, BE. Acetylcholine and choline levels in postmortem human brain tissue. Preliminary observation in Alzheimer's disease. *Life Sci.* 25:1683-1689. 1980
- Birks, SI and MacIntosh, FC. Acetylcholine metabolism of synapathetic ganglior. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39:787-827. 1961
- Hallak, M and Giacobini, EA. Comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase. *Neuropharmacol.* 26(6):521-530. 1987
- Perry, EK, Perry, RH, Blessed, G and Tomlinson, BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet.* 1:8004:189. 1977
- Bowen, DM, Benton, JS, Spillane, JA, Smith, CC and Allen, SJ. Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J. Neurol. Sci.* 57(2-3): 191-2024. 1982
- Camps, P, Cusack, B, Mallender, WD, Achab, RE, Morral, J, Munoz-Torrero, D and Rosenberry, TL. Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 57(2):409-17. 2000
- Kalaria, RN, Mitchell, MJ and Harik, S. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3521- 3525. 1987
- Kopin, IJ. Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. In, catecholamines. (Blachk, H and Muscholl E. eds.) *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie.* Springer-Verlag., Berlin, 33:271-282. 1972
- Harotani, N, Nomura, J, Kitayama, J. Changes of brain monoamines in the animal model for depression. In. *Psychoneuroendocrine dysfunction*, (Shah, NS and Donald AG Eds) Plenum medical Book Comp. 331-342. 1984
- Bartus, RT, Dean, RL 3rd, Beer, B and Lippa, AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558) : 408-14. 1982
- Muramoto, O, Sugishita, M, Sugita, H and Toyokura, Y. Effect of physostigmine on constructional and memory tasks in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 36(8):501-3. 1979
- Galdzicki, Z, Fukuyama, R, Wadhvani, K, Rapoport, SI and Ehrenstein, G. Beta-amyloid increases choline conductance of PC12 cells : possible mechanism of toxicity in Alzheimer's disease, *Brain Res.* 646: 332-336. 1994
- Yamahara, G. Studies on the *Stachys sieboldii* MIQ. *Med. Mega.* 110:932-935. 1990



21. Ryu, BH and Park, BG. Antimicrobial activity of hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ leaf. *Korea J. Life Sci.* 12(6):803-811. 2002
22. Ryu, BH, Park, BG and Song, SK. Antitumor effects of the hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ. *Korea J. Life Sci.* 17(6):520-523. 2002
23. Baek, HS, Na, YS, Ryu, BH and Song, SK. Antioxidant activities of *Stachys sieboldii* MIQ Stalks. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18(4):266-271. 2003
24. Ohkawa, H, Ohishi, N and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358. 1956
25. Ellman, HL. Tissue Sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77. 1959
26. Galgani, F, Bocquene, G and Cadiou, Y. Evidence of variation of cholinesterase activity in fishes along a pollution gradient in the north sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 19: 1-6. 1992
27. Hallak, M and Giacobini, EA. Comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase. *Neuropharmacol.* 26(6):521-530. 1987
28. Nagatsu, T and Yaki, KA. A simple of monoamine oxidase and D-amino acid oxidase by measuring ammonia. *J. Biochem.* 60:219-221. 1966
29. Stirpe, F and Della Corte, E. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* 244:3855-3863. 1969
30. Lowry, OH, Roseborough, NJ, Farr, LA and Randall, RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1951
31. Steel, RGD and Torrie, JH. Principle and procedures of statistics. New York. 1960
32. Hatotani, N, Nomura, J and Kitayama, J. Changes of brain monoamines in the animal model for depression, In Psychoneuroendocrine dysfunction. ed. by Shah N S and Donald AG 33:1-342, Plenum medical Book Co. 1984
33. Cross, CE, Halsiwell, B, Borish, ET, Pryor, WA, Saul, RL, Maccord, JM and Herman, D. Oxygen radicals and human disease., *Ann. Intern. Med.* 107 (4):526-545. 1987

---

(2004년 9월 13일 접수)