

한약재 물 추출물의 생리활성 검색 및 MPTP-유도 신경독성에 대한 대황의 보호효과

김태은¹ · 윤여민¹ · 박용인¹ · 김윤석² · 전병훈³ · 김명동^{1*}

1: 상지대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 중화한방병원, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Screening of the Biological Activity from Water Extracts of the Medicinal Plants and the Protective Effect of *R. palmatum* on MPTP-induced Neurotoxicity

Tae Eun Kim¹, Yeo Min Yoon¹, Yong In Park¹, Youn Seok Kim², Byung Hun Jeon³, Myung Dong Kim^{1*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University,
 2: Department of Rehabilitation, Joong Hwa Oriental Medical Hospital,
 3: Department of Pathology, College of Oriental medicine, Wonkwang University

This present study was designed to screen medicinal plants for the treatment of brain diseases such as Parkinson's disease or aging. We tested the effects of the water extracts from 38 species medicinal plants on antioxidant capacity, monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitory activity, acetylcholinesterase (AChE) inhibition and antiperoxidation activity in vitro. The water extracts from 38 species were tested on their antioxidant activity using radical scavenging effects against ABTS⁺. The water extract of *C. sappan* was showed the highest antioxidant capacity, the antioxidant activity at 1 μg of herbal extract being 0.38 mM TE. Lipid peroxidation in brain homogenates induced by NADPH and ADP-Fe²⁺ was strong inhibited by *C. sappan* and *R. palmatum* extracts. Among the 38 medicinal plants investigated, *R. palmatum* showed significant biological activity (antioxidant capacity, MAO-B inhibitory activity, and AChE inhibitory activity). The protective efficacy of *R. palmatum* water extract on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism and its possible mechanism were studied in C57BL/6 mice. Treatment of *R. palmatum* water extract protected biomacromolecules such as lipids from oxidative damage induced by MPTP. The content of MDA in brain tissue was decreased significantly by *R. palmatum* extract. These results suggest that *R. palmatum* water extract plays on effective role in attenuating MPTP-induced neurotoxicity in mice. This protective effect of *R. palmatum* might be estimated the result from the inhibitory activity on monoamine oxidase B and the enhancement of antioxidant activity.

Key words : Parkinson's disease, *R. palmatum*, *C. sappan*, Antioxidant Activity, Acetylcholinesterase Inhibitor, Monoamine Oxidase B Inhibitor

서 론

전 세계적으로 사람의 평균 수명이 고령화되는 현상은 과학과 의학의 발전에 힘입어 최근 10년 동안에 급격히 증가되고 있으며, 이로 인해 암과 더불어 퇴행성 뇌 질환 환자의 증가가 최

근 사회적인 문제로 강력히 대두되고 있다. 미국에서는 노인성 치매환자 수가 400만 명 이상으로 제 4위의 사망률을 차지하고 있으며¹⁾, 2040년에는 약 9백만 명에 이를 것으로 추정하고 있다²⁾. 이와 같이 노령인구가 증가됨에 따라 고등정신기능 및 인격의 황폐화를 나타내는 퇴행성 뇌 질환인 치매는 근래에 들어 급격히 증가하는 추세에 있으므로 많은 연구와 더불어 연구비 투자를 하여야 할 것이다. 치매는 환자 자신의 생존능력과 인격뿐만 아니라 보호자의 정신적 고통과 더불어 경제적 피해 및 사회적

* 교신저자 : 김명동, 강원도 원주시 우산동660 상지대학교 한의과대학

· E-mail : drmdkim@hanmail.net, · Tel : 033-730-0670

· 접수 : 2004/08/03 · 수정 : 2004/10/29 · 채택 : 2004/11/23

문제를 발생시키므로 이를 예방하고 치료할 수 있는 의약품의 개발이 시급히 요구되는 분야로 발전하였다. 우리 나라에서도 생활수준의 향상과 보건복지 정책의 발전 등으로 남녀 모두에게 있어서 평균수명이 증가하는 추세를 보이고 있다. 그 결과 치매를 포함한 뇌 질환 환자가 급격히 증가되고 있어 서구사회와 마찬가지로 사회적인 문제로 크게 대두될 것이므로 한약재를 포함하여 천연물을 이용한 퇴행성 뇌질환 치료제의 개발이 이루어져야 하고 또한 천연물 연구를 통해 가능하리라고 판단된다. 퇴행성 뇌질환은 정신 기능의 전반적인 장애 질환으로 발병 원인은 다양하며 대표적으로 치매가 이에 해당된다^{3,4}. 치매에는 여러종류가 있는데, 가장 큰 범주를 차지하고 있는 것은 노인성 치매로 알려진 알츠하이머씨병(Alzheimer's disease)이며, 다음으로 뇌혈관의 이상으로 생기는 혈관성 치매이다. Parkinson씨 질환도 손떨림이나 근육마비 등이 주증상인 신경성 노인질환의 하나이다. 이러한 퇴행성 뇌질환의 주요 발병 원인, 작용기전 및 치료제 개발은 오래 전부터 여러 선진국에서 연구가 활발히 진행되고 있다^{5,6}. 퇴행성 뇌질환을 개선시킬 수 있는 방법으로는 항산화제 및 acetylcholinesterase 억제제의 사용이 공통적으로 활용되고 있으며, Parkinson씨 질환은 MAO-B 억제제를 이용한 치료방법이 활용되고 있어 이에 대한 생리활성물질의 탐색은 화학 합성 물질 및 천연물에서 활발히 연구되고 있다.

생체 내에서 일어나는 에너지 생성을 위한 생화학적 반응인 산화작용은 끊임없이 일어나며 이 과정에서 활성산소 및 free radical을 형성한다. Superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxyl(·OH)과 같은 반응성 산소기(ROS)는 모든 호기성 생물에서 생성되며, 이들은 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 다양한 질환을 일으킨다. 특히 ROS는 세포의 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화 반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되고 노화 및 성인병 등의 질환을 유발시킨다. 생체 내에서 산화반응 중에 생성되는 활성산소 및 free radical은 ROS 제거효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등)에 의해 제거되지만⁷ 조직의 방어능을 초월한 활성산소 및 free radical은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 심장병(heart disease), 당뇨병(diabetes), 각종 암(cancer) 뿐만 아니라 Parkinson씨 질환 및 Alzheimer씨 병과 같은 퇴행성 뇌질환의 원인이 되고 있다⁸⁻¹². 노화, 퇴행성 뇌질환 및 각종 성인병의 원인이 유해 활성산소에 의해 유발된다는 연구결과들이 입증되면서 각종 질병을 예방하기 위해 항산화제의 개발연구가 활발히 진행되고 있다¹³⁻¹⁵. 천연 항산화제로는 tocopherol, 비타민 C, 카로테노이드, catechin, glutathione 등이 밝혀져 있으며, 합성 항산화제로는 항산화 활성이 탁월한 BHA(Butylated hydroxyanisole) 및 BHT(Butylated hydroxytoluene)이 개발되었으나 변이원성 및 독성에 대한 지적도 있는 반면 안전성 및 의약품으로의 활용 가능성도 다양하게 연구되고 있으나 보다 안전하고 강력한 항산화제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다^{16,17}.

치매의 주요 발병 원인이 Alzheimer's disease(AD) 이라는

것이 알려지면서 선진국에서는 그 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다^{5,18}. Alzheimer's disease(AD)는 중추신경계의 퇴행성 질병으로 기억력 감퇴, 인식능력 및 지능 퇴화 등의 증상을 나타내며, 병리적인 소견은 노인반(senile plaque), 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle), amyloid성 혈관이 발견된다¹⁹. 또한 AD는 뇌에서 acetylcholine 생성속도의 감소와 관련이 있다고 밝혀져 있으며²⁰, 그러한 시냅스시스템의 기능을 회복하기 위해서는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 가수분해를 억제시키는 방법이 효과가 있음을 증명하였다^{21,22}. 현재까지 치매를 개선할 수 있는 방법은 탁월한 acetylcholinesterase(AChE)의 기능을 방해하는 저해제의 사용으로 ACh의 분해를 억제시켜 손실된 ACh를 보존시키는 것이다. AChE(EC 3.1.1.7)는 신경조직에 많이 존재하는 효소로서 두 개의 polypeptide 사슬로 구성되어 있고 활성자리는 anionic site와 esteratic site로 이루어진 분자량 약 260,000 dalton의 단백질이다(Fig. 1). AChE는 신경전달물질인 ACh를 acetate와 choline으로 가수분해시키는 역할을 한다. 최근 AD의 치료제로는 Tacrine, Velnacrine, Aricept 등이 사용되고 있으며, 이들은 모두 AChE inhibitor로서 acetylcholine neurotransmitter system에 작용하는 것으로 알려져 있다²³. AChE inhibitor의 사용은 손상된 인식능력을 향상시키며 집중력을 높인데 효과적이지만²⁴ 아직까지 AD를 치료할 수 있는 실질적인 치료제는 없는 상태이고 단지 개선시키는 효과만을 나타낸다. 따라서 AD의 치료제를 개발하기 위해 AChE inhibitor^{25,26}, 항산화제²⁷, 혹은 neuronal NOS inhibitor²⁸ 등에 효과가 탁월한 물질 탐색이 활발히 이루어지고 있는 동시에 AD 발병기전을 밝히는데 많은 연구가 진행되고 있다.

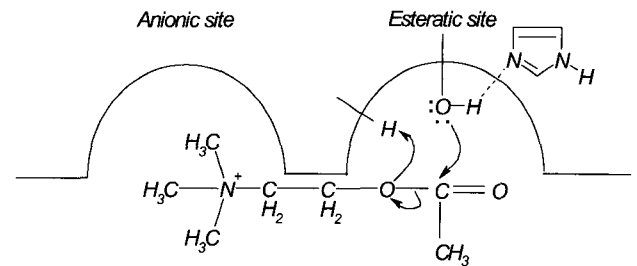


Fig. 1. Structure of acetylcholinesterase

뇌의 MAO-B 활성도는 노화에 따라 증가되며 반응시 활성산소를 생성하기 때문에 Alzheimer's disease나 Parkinson's disease와 같은 퇴행성 신경질환을 촉진한다²⁹. 특히 Parkinson's disease의 주된 신경생리학적 특성은 도파민 신경세포가 파괴되는 것이기 때문에 MAO-B의 억제제들은 신경독성기작에 의해 유발되는 퇴행성 과정을 길항하는 작용을 한다³⁰. Monoamine계 신경전달물질은 신경생물학 및 신경정신적 기능에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이러한 물질들을 분해하는 효소인 monoamine oxidase(EC 1.4.3.4; MAO)는 세포내의 미토콘드리아 외막에 결합되어 있으며, 신경전달물질로 작용하는 활성 monoamine 류인 catecholamine(dopamine, norepinephrine, epinephrine) 및 serotonin 등을 대사시키는 FAD 함유효소로서

O₂를 이용하여 amine 기질을 산화시켜 aldehyde product로 전환시키고 부산물로서 NH₃와 H₂O₂를 생성하게 된다³¹). MAO는 아미노산 서열 및 기질 특이성에 따라 MAO-A와 MAO-B의 두 가지 형태로 대별된다. 즉 MAO-A는 norepinephrine, epinephrine, serotonin (5-HT)을 deamination시키며, clorgyline 및 harmine 등에 의한 저해효과가 탁월하다. 반면 MAO-B는 benzylamine, β-phenethylamine 등을 deamination시키며, L-deprenyl과 같은 drugs에 저해된다³²⁻³⁴).

Parkinson's disease(PD)는 노화가 진행되면서 대부분 발병되나 간혹 40세 이전에도 나타나는 퇴행성 신경질환으로서 1817년 James Parkinson에 의해 발견되어 그의 이름에서 명명되었다. 1980년 대 초 페페리딘(meperidine)을 마약으로 복용한 젊은이들 중에서 PD가 발병하여 사회적인 문제로 대두되었다. 그 이후, 마약에 포함된 MPTP가 PD의 원인물질임이 제기되었다. Gerlach 등³⁵)은 PD와 MPTP-유도 Parkinsonism을 증상학적(symptomatological), 신경병리학적(neuropathological) 및 신경화학적(neurochemical)으로 비교하여 서로 유사함을 보고한 이후, MPTP를 투여하여 PD를 유도시킨 실험동물을 모델로 PD의 연구가 본격화되었다. PD는 흑질에 존재하는 dopamine 생성 신경세포가 파괴되어 선조체의 dopamine 함량이 현저히 감소되어 있는 것이 특징이다. 그러나 그 원인은 아직까지 명확하게 규명되어 있지 않다.

MPTP(M-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 항정신성 의약품인 meperidine (1 - methyl - 4 - phenyl - 4 - propionoxypiperidine)의 합성과정 부산물^{36,37})로서 parkinsonism을 유도하는 신경독성물질이다. Chiba 등³⁸) 및 Markey 등³⁹)은 MPTP가 brain barrier를 통과하면서 monoamine oxidase B(MAO)-B에 의하여 2개의 전자가 산화되어 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium(MPDP)로 대사되고, 다시 2개의 전자가 산화되어 1-methyl-4-phenyl-pyridinium(MPP⁺)로 대사되고 다시 2개의 전자가 산화되어 1-methyl-4-phenyl-pyridinium(MPP⁺)로 대사된다는 작용기전을 밝혔다(Fig. 2).

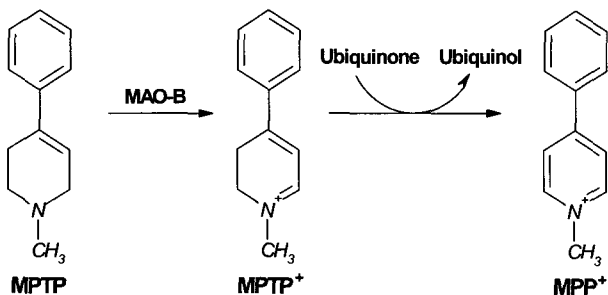


Fig. 2. The proposed metabolism of MPTP.

MPP⁺는 뇌의 nigro- stratal system에 축적되어 dopamine 생성 신경세포에 강력한 신경독성을 일으켜 oxidative stress를 유도하고⁴⁰), catecholamine을 산화시켜 활성산소(reactive oxygen species)를 생성한다⁴¹⁻⁴⁴). 또한 칼슘이온의 항상성과 subsequent neuronal death를 변화시켜 지질과산화물을 유도하고^{41,45-46}), ATP를

상실시켜⁴⁷) 미토콘드리아의 NADH ubiquinone oxidoreductase의 활성을 억제하여⁴⁸) 세포를 손상시킨다^{49,50}). 이와 같은 요인으로 MPP⁺는 dopamine의 생성세포를 파괴하거나 생성기전을 변화시켜 선조체의 dopamine의 함량을 감소시킴으로써 퇴행성 신경질환을 유발한다⁵¹⁻⁵⁴).

MPTP는 MPP⁺로 전환되는 과정 및 MPP⁺가 재산화되는 과정에서 활성산소가 생성되거나 intraneurone에 superoxide가 생성되어 신경독성을 유발한다^{55,56}). 이와 같은 MPTP의 생체내 대사는 MAO의 활성에 가장 큰 영향을 받는 것으로 이미 보고되었다^{38,39}). 그러므로 MAO의 활성증가는 MPTP의 대사를 촉진함으로써 활성산소의 생성을 증가시켜 신경세포를 손상시킨다^{57,8}). MAO-A는 noradrenaline과 5-hydroxytyramine을 대사하며, MAO-B는 dopamine을 대사하는 효소이다. 따라서 MAO-B inhibitor는 MPTP의 독성에 의하여 유발되는 신경의 퇴행과정을 길항하는 작용을 한다³⁰). Heikkila 등⁵⁹)은 MAO-inhibitor가 MPTP의 대사를 억제하여 신경독성을 억제한다고 처음 보고한 이후, 이에 대한 연구가 활발히 진행되었다^{46,60-66}).

Reactive oxygen species(¹O₂, O₂⁻, H₂O₂)는 산소를 이용하는 세포의 대사과정에서 생성되어 세포의 산화적 손상을 일으킨다^{67,8}). 생물들은 활성산소의 손상으로부터 자신을 보호하기 위한 여러 가지 생체 방어기작을 갖고 있다. 그 방어기작에는 항산화 효소, free radical scavenger 및 metal chelating agent 등이 있다⁶⁹). 활성산소를 제거하는 주요 항산화 효소에는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione reductase 등이 있다. Superoxide dismutase는 superoxide anion(O₂⁻)을 H₂O₂로 전환시키는 반면 glutathione peroxidase와 catalase는 H₂O₂를 물로 전환한다. Oxidative stress에 의한 항산화 효소의 결핍과 과도한 활성산소의 생성은 항산화 방어기작을 파괴하기 때문에 PD의 원인이 된다⁴⁶).

이상에서와 같이 PD는 뇌의 흑질에 존재하는 신경세포의 파괴로 선조체의 dopamine 함량이 감소되어 일어나는 퇴행성 신경질환으로서 sporadic PD의 경우 MPTP와 같은 환경신경독성물질이 큰 요인 중의 하나로 지목되고 있다^{60,70-74}). 이 경우 뇌 조직의 monoamine oxidase는 두 가지 생물학적 의미를 갖는다. 첫째는 이 효소의 활성이 증가되면 신경독성물질의 생성이 증가되는 반면 dopamine의 함량이 감소되는 것이고, 둘째는 신경독소인 MPP⁺ 그 자체로 활성산소를 생성시키는 요인이 되지만 dopamine과 같은 catecholamine이 대사될 때 H₂O₂와 같은 활성산소가 생성되어 세포의 산화적 손상이 증가되는 것이다^{43,44,75}). 따라서 MAO-A 또는 MAO-B의 활성억제는 체내의 MPTP에 의한 신경독성을 억제하는 동시에 활성산소의 생성을 억제하며, 나아가서 dopamine이 분해되는 것을 제한한다.

한의학에서 치매는 言語, 感情, 行動面에서 비정상적인 증상이 나타나는 健忘, 呆病, 癡狂, 虛勞 등의 범주에 속하며, 心脾虛, 肝腎不足, 髓海不足 등의 원인으로 발생하므로 益氣健脾, 化痰宣竅, 活血行氣 등의 치료법이 활용된다⁷⁶⁻⁸¹). 대황(Rheum palmatum)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 원줄기는 높이 1 m 정도로 자라며 굵은 황색뿌리가 있다.

대황은 뿌리를 가을에 채취하여 건조시켜 약재로 사용한다. 일반적으로 혈소판 감소증 및 지혈, 구내염 및 모낭염, 화상 등을 치료하는데 사용되며, 사하작용, 항균작용, 항종양작용 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁸²⁾. 대황의 주요성분으로는 수종의 glucoside 화합물이 보고되었다³²⁾.

본 연구에서는 38종의 한약재 물 추출물로부터 생리활성(항산화 활성, MAO-B 활성 억제 및 AChE 억제 활성)이 탁월한 약재를 선별하는 동시에 생리활성이 탁월한 대황이 MPTP로 유도된 신경독성의 완화 효과를 연구함으로써 Parkinson 질환을 개선 및 치료 가능성을 탐색하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 한약재의 물 추출물 제조

본 실험에 사용한 한약재는 서울 경동시장에서 구입하여 감별한 후 사용하였으며, 현재 표준시료는 원광대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되어 있다. 선별된 38 종의 한약재는 각각 100 g 씩을 분쇄한 후 플라스크에 넣고 증류수 1,000 ml로 3시간 동안 가온 추출하였다. 추출물은 3M 여과지를 사용하여 여과하였으며, 이 여과액은 회전농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 시료는 -70℃에 보관하여 결빙시킨 후 동결건조기를 사용하여 건조된 분말을 일정농도(1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml)로 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 생후 6주된 웅성 SD rat(Sprague-Dawley rat)을 샘타고(Sam-TacN)로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 개체간의 차이를 최소화하기 위하여 체중 200 g인 상태가 양호한 개체만을 선별하여 한 cage에 3마리씩 넣어 사육하였다. 또한 MPTP로 신경독성을 유발하여 신경 보호효과를 실험한 동물은 생후 3개월된 웅성 생쥐(C57BL/6 mice)를 사용하였다. 생쥐는 체중 22-25g인 상태가 양호한 개체만을 선별하여 한 cage에 5마리씩 넣어 사육하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도는 22±2℃, 습도 40-60%, 환기는 1시간당 12-15 회로 하였다. 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 먹이는 조희분 8.0%, 조지방 4.5%, 칼슘 0.7%, 인 0.5%, 조섬유 6.0%, 조회분 8.0% 및 비타민과 미네랄이 0.4% 함유되어 있는 신촌사료의 제품을 사용하였다. 깔짚은 삼육실험동물의 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) In vitro 실험방법

(1) 뇌 균질액의 제조

흰쥐로부터 적출한 뇌는 250 mM sucrose가 포함된 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 세척한 다음 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 균질화(W:V=1.5)하여 1,000 g로 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상등액을 뇌 균질액으로 사용하여 항산화 활성 및 지질과산화 억제 활성을 측정하는데 사용하였다.

(2) 항산화 활성 측정

항산화 활성은 kit 시약(Randox Lab., Co LTD)을 이용하여 in vitro에서 ABTS · + (2,2-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphuric acid) radical의 제거효과로 측정하였다⁸³⁾. 즉 20 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 chromogen 0.5 ml와 extract 10 µg/10 µl을 넣고 734 nm에서 흡광도를 측정한 후 기질 100 µl를 넣고 3분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하여 ΔA값을 계산하였다. 표준물질은 Trolox(a water soluble vitamin E analogue)를 사용하였으며 항산화 활성의 단위는 mM TE(mM Trolox equivalent)로 나타내었다.

(3) 지질과산화의 억제활성 측정

Malondialdehyde(MDA)는 TBA(thiobarbituric acid)와 반응하여 532 nm에서 빛을 흡수하는 complex를 형성한다. MDA의 함량은 지질과산화의 지표로서 Suematsu 등⁸⁴⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 5 mM KCl, 5 mM ADP, 0.2 mM FeSO₄ 및 1 mM NADPH 혼합액에 생약 추출물을 첨가한 다음 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 혼합액에 0.38% thiobarbituric acid, 10% acetic acid 및 0.6% SDS 가 혼합된 반응액을 넣고 98℃의 항온수조에서 30분간 끓인 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBA 반응성 물질의 함량 측정은 malondialdehyde (MDA)를 표준물질로 사용하였으며, 생약 추출물의 종류 및 농도별로 지질과산화 억제정도를 비교하였다.

(4) MAO-B 억제 활성의 측정

흰쥐(Sprague-Dawley rat, 체중 200 g) 뇌에서 미토콘드리아를 분리하여 MAO-B의 활성을 측정하였다. 기질은 benzylamine을 사용하였으며, 생성되는 H₂O₂의 양을 비색법으로 측정하여 MAO-B의 활성도를 측정하였다⁸⁵⁾. 또한 MAO-B의 활성 억제 정도를 측정하기 위하여 반응액에 일정량의 시험물질을 넣고 37℃에서 5분간 전처리한 후 MAO-B의 활성도를 측정하였다.

(5) AChE의 활성 억제 측정

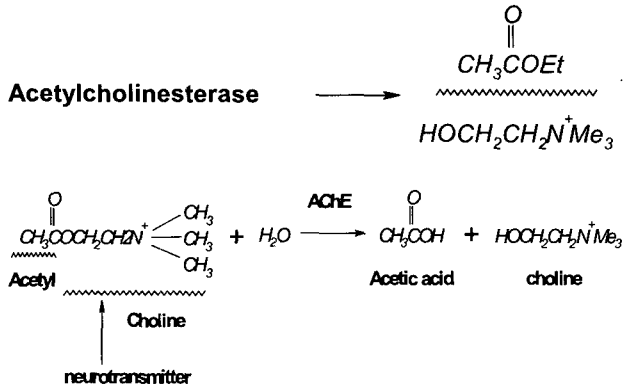
AChE의 효소활성은 Ellman 방법⁸⁶⁾에 따라 수행하였다. Acetylthiocholine(ATCh)를 기질로 사용하였으며 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB(5,5'-dithio-bis- 2-nitrobenzoic acid)와 반응시켜 그 결과 생성되는 5-thio-2-nitrobenzoate를 412 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 정량하였다(Fig. 3). 반응속도는 60초 동안의 초기속도를 측정하였으며, 억제 활성은 inhibition rate (%) = 100 - [(ΔAsamp/ΔAcon)×100] 으로 계산하였다.

2) In vivo 실험방법

(1) 대황으로부터 물 추출물 제조

생체내에서 신경독성에 대한 한약재의 보호효과를 알아보기 위하여 항산화 활성, 지질과산화 억제 및 AChE 활성 억제효과가 가장 탁월한 대황을 선정하여 실험에 사용하였다. 대황은 중국산으로 400 g을 분쇄한 후 플라스크에 넣고 증류수 4,000 ml로 3시간 동안 가온 추출하였다. 추출물은 3M 여과지를 사용하여 여과하였으며, 이 여과액은 회전농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 시료는 -70℃에 보관하여 결빙시킨 후 동결건조기를 사용하여 건조된 분말을 얻었고 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

AChE



ATCh

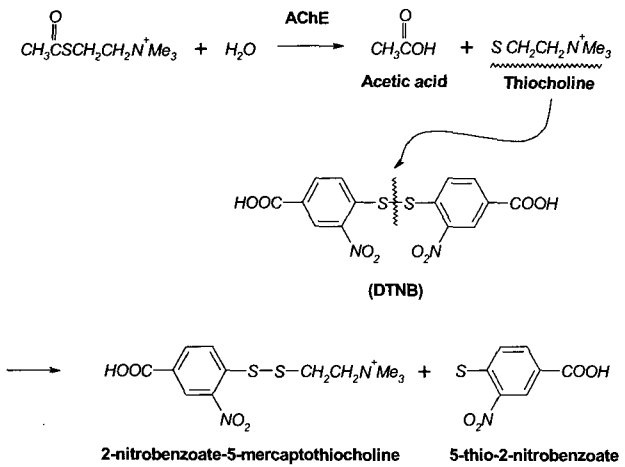


Fig. 3. Colorimetric method of acetylcholinesterase activity

(2) 실험군

실험동물은 대조군(Con; saline 단독 투여군), 대황 100 mg 단독 투여군(RL), 대황 200 mg 단독 투여군(RH), MPTP 단독 투여군(MPTP), RL 및 MPTP 병용 투여군, RH 및 MPTP 병용 투여군의 6 실험군으로 나누었으며, 한 group에 8마리씩 실험하였다. MPTP는 10 mg/kg의 농도로 6일(1회/1일) 동안 피하로 투여하였고, 대황 물 추출물은 각각 100 mg/kg과 200 mg/kg의 저농도와 고농도로 구분하여 15일(1회/1일) 동안 경구 투여하였다. 대황과 MPTP 병용 투여군에서 대황은 MPTP를 투여하기 1시간 전에 6일 동안 병용투여한 다음, 7일째부터는 9일 동안 대황(RL 및 RH)을 단독으로 투여하여 대황 물 추출물의 총 투여기간은 15일이었다. 실험동물은 대황 물 추출물을 마지막으로 투여하고 24시간 절식시킨 다음, CO₂로 마취하여 혈액, 뇌 및 간을 적출하였다.

(3) 체중 및 장기 무게 측정

생쥐의 체중변화는 대황 물 추출물과 MPTP를 투여하면서 2일 간격으로 체중을 측정하였으며, 장기무게는 20% urethane으로 마취한 후 실험동물을 희생시켜 뇌와 간의 무게를 측정하였다.

(4) 혈액학적 분석

대황이 생체내에서 독성을 유발하는지를 알아보기 위하여

혈액내의 간기능 지표, 신기능 지표 및 지질대사를 분석하였다. 즉, 혈청은 생쥐로부터 심장천자를 통해 혈액을 채취하여 원심분리(3,000rpm, 10min)하여 얻었다. 분리한 혈청의 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase(ALP), total cholesterol(TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein-cholesterol(HDL), low density lipoprotein-cholesterol(LDL), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), 그리고 uric acid(UA)는 혈청 자동분석기(Hitachi-7150, Hitach medical Co.)를 이용하여 측정하였다.

(5) 뇌의 부위별 적출

생쥐로부터 적출한 뇌는 혈액과 지방질을 제거한 다음 250 mM sucrose가 포함된 0.9% NaCl로 세척하였다. 뇌의 부위별 적출은 면봉을 이용하여 대뇌피질, 흑질, 소뇌, 선조체 및 해마로 구분하여 적출하였고 모든 과정은 얼음 위에서 수행하였다.

(6) 뇌 조직의 분획조제

생쥐로부터 적출한 뇌는 whole brain, 대뇌피질, 소뇌, 흑질, 선조체, 해마로 구분하여 부위별로 각각 균질액 및 미토콘드리아 분획을 제조하였다. 각 부위별로 적출한 뇌는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 균질화한 다음 원심분리(1,000 g, 10 min)하여 상등액을 균질액으로 사용하였다. 또한 상등액을 원심분리관에 취하여 다시 고속원심분리(12,000 g, 15 min)하여 얻은 pellet을 동일 buffer로 2회 씻어낸 다음 균질화하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 모든 작업은 4℃에서 수행하였고 제조한 분획은 -70℃에 보관하면서 효소활성을 측정하였다.

(7) 단백질 정량

모든 시료의 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등⁸⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다.

(8) 지질과산화 측정

Malondialdehyde(MDA)는 TBA(thiobarbituric acid)와 반응하여 532 nm에서 빛을 흡수하는 complex를 형성한다. MDA의 함량은 지질과산화의 지표로서 Suematsu 등⁸⁴⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 10% acetic acid, 0.6% SDS, 0.38% thiobarbituric acid 혼합액에 뇌 균질액 또는 미토콘드리아를 첨가한 다음 98℃의 항온수조에서 30분간 끓인 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBA 반응성 물질의 함량 측정은 malondialdehyde (MDA)를 표준물질로 사용하여 측정하였다.

(9) MAO-B의 활성측정

생쥐의 뇌의 균질액 및 미토콘드리아를 분리하여 MAO-B의 활성을 Kalaria 등⁸⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 30 mM sodium azide와 기질로 10 mM benzylamine을 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1.8 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 5 unit peroxidase를 넣어 15초간 반응시킨 후 5% sodium dodecyl sulfate가 포함된 0.75 M hydrochloric acid를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(10) Dopamine의 함량측정

Dopamine의 함량은 Zou 등⁷⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 선조

체 및 흑질에서 측정하였다. 생쥐로부터 적출한 선조체(striatum)는 0.1 mM EDTA가 포함된 0.1 M perchloric acid로 균질화(W/V, 1:20)한 다음 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하였다. 그 상등액을 취하여 mobile phase로 희석한(선조체-10배; 흑질-5배) 다음, High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 이용하여 측정하였다. Mobile phase에서는 0.1 M acetic acid-citric acid(pH 3.5) 83%, MeOH 17%, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM sodium octane sulfonic acid가 함유되어 있다. Mobile phase는 0.22 μ m membrane filter를 사용하여 여과하여 사용하였다. 분석 column은 Capcell Pak C18 (4.6 mm id \times 150 mm)를 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min으로 분석하였다.

(11) 통계처리

대조군과 실험군의 생리활성은 평균(mean) \pm 표준편차(SD)로 나타내었으며, 대조군과의 통계학적인 유의성은 Student's t-test를 이용하여 P<0.05 이하의 값을 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 한약재 물 추출물의 생리활성

1) 항산화 활성 및 지질과산화 억제효과

38종의 한약재 물 추출물을 항산화 활성 및 지질과산화 억제 정도를 in vitro 하에서 측정하였다. 한약재의 항산화 측정 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 계혈등(S. suberectus, 2.63 mM TE), 후박(M. obovata, 2.46 mM TE), 소목(C. sappan, 2.43 mM TE), 목근피(H. syriacus, 2.25 mM TE), 대극(E. pekinensis, 2.20 mM TE), 정향(E. caryophyllata, 2.20 mM TE), 복분자(R. coreanus, 2.18 mM TE), 대황(R. palmatum, 2.11 mM TE) 및 조각자(G. japonica, 2.04 mM TE)이 다른 한약재 추출물에 비해 월등히 높은 활성을 나타내었다. 그 외에 조각자, 오수유, 조구등, 쇠양 등도 비교적 높은 항산화 활성을 나타낸 반면 산수유, 갈근, 포공영, 진피, 시호는 다른 한약재 물 추출물에 비해 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 반면 산수유(C. officinalis), 갈근(P. thunbergiana), 포공영(T. platycarpum), 진피(F. rhynchophylla), 시호(B. falcatum)는 상당히 낮은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 높은 계혈등(S. suberectus), 후박(M. obovata), 소목(C. sappan) 및 목근피(H. syriacus)는 10 μ g에서 유사한 수준을 나타내어 농도별로 항산화 활성을 비교 측정한 결과(Fig. 4) 소목 물 추출물 1 μ g 및 5 μ g에서 각각 0.24 및 1.9 mM TE로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. Malondialdehyde (MDA)는 생체막의 불포화지방산에 대한 산화적 손상의 산물로 세포독성 및 유전독성을 알아내는 지표로 쉽게 측정할 수 있다⁹⁶⁾. 지질과산화의 산물의 하나인 MDA의 양은 일반적으로 thiobarbituric acid 반응물질 (TBARS)로 측정되고 있다. 본 연구에서는 뇌 균질액을 사용하여 NADPH⁺-Fe²⁺로 지질과산화를 유도하여 측정하였다. 항지질과산화 정도는 억제제가 없는 상태인 대조군을 100%로 설정하여 MDA 형성율로 나타내었다. NADPH 및 ADP-Fe²⁺로 지질과산화(lipid peroxidation)를 유도하여 측정한 항지질과산화 정도는 계혈등, 후박, 소목 및 목근피 모두 농도 의존적인 변화양

상을 보여주었는데, 소목의 물 추출물은 다른 3종에 비해 MDA 형성율(1 μ g = 68%, 10 μ g = 23%; 100 μ g = 2%)이 가장 낮게 나타내어 가장 높은 항지질과산화 활성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 4종류의 한약재 중에 TBARS 생성(lipid peroxidation)에 대한 억제효능이 가장 높은 소목(C. sappan)은 IC₅₀이 4.6 μ g인 것으로 환산되었다(Fig. 4). 따라서 항산화 활성이 높고 지질과산화의 억제효과가 탁월한 소목은 퇴행성 뇌질환의 위험을 줄일 수 있는 가능성을 갖는 후보 약물로 사료된다. 그 외에도 계혈등, 후박, 목근피, 대극, 정향, 복분자, 대황, 조각자는 비교적 높은 항산화 활성을 나타내므로 AChE 활성 억제 및 MAO-B 활성 억제 효과가 탁월하다면 퇴행성 뇌질환 및 산화적 손상과 관련된 질환에 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

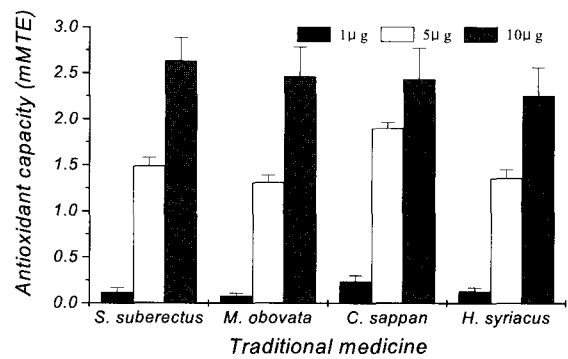


Fig. 4. Comparison of antioxidant capacities in the various concentrations of traditional medicines against ABTS⁺ in vitro. The assay of antioxidant activity against ABTS⁺ was described in Materials and Methods. The values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, each medicinal extract was tested at the various concentrations (1, 5, and 10 μ g).

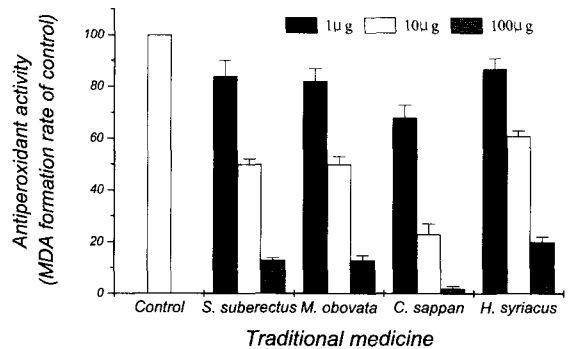


Fig. 5. Antiperoxidant activity of traditional medicines lyophilized water extracts on NADPH and ADP-Fe²⁺ induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. Data are shown as mean \pm SD from three independent experiments, each medicinal extract was tested (10 μ l) at the various concentrations (1, 10, 100 μ g). The antiperoxidant activity was expressed as MDA formation and the value was expressed percentage of control without inhibitor, as 100% activation.

2) MAO-B 활성 억제효과

효소원은 rat brain homogenate를 사용하여 38종의 한약재 물 추출물의 monoamine oxidase B(MAO-B) 활성에 미치는 영향을 측정하였다(Table 2). 반응액중 물 추출물의 농도를 12.5 μ g으로 처리하였을 경우 MAO-B 활성은 속수자(Euphorbia lathyri)

Table 1. Comparison of antioxidant activity of Korean medicinal plants in vitro

Korean herbal name	Herbal common name	Scientific name	Antioxidant activity (mM TE)
계혈등	Mucunae Caulis	<i>Spatholobus suberectus</i>	2.63±0.25
후박	Cortex Magnoliae	<i>Magnolia obovata</i>	2.46±0.32
소목	Lignum Sappan	<i>Caesalpinia sappan</i>	2.43±0.34
목근피	Cortex Hibisci	<i>Hibiscus syriacus</i>	2.25±0.31
대극	Radix Euphorbiae	<i>Euphorbia pekinensis</i>	2.20±0.21
정향	Flos Caryophylli	<i>Eugenia caryophyllata</i>	2.20±0.17
복분자	Fructus Rubi	<i>Rubus coreanus</i>	2.18±0.15
대황	Rhizoma Rhei	<i>Rheum palmatum</i>	2.11±0.24
조각자	Spina Gleditsiae	<i>Gleditsia japonica var. koraiensis</i>	2.04±0.14
오수유	Fructus Euodiae	<i>Euodia officinalis</i>	1.67±0.08
조구등	Ramulus et Uncus Uncariae	<i>Uncaria sinensis</i>	1.65±0.11
쇄양	Herba Cynomorii	<i>Cynomorium songaricum</i>	1.52±0.09
천초	Pericarpium Zanthoxyli	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	1.42±0.07
속수자	Semen Euphorbiae Lathyridis	<i>Euphorbia lathyris</i>	1.35±0.06
백림	Radix Ampelopsitis	<i>Ampelopsis japonica</i>	1.34±0.08
단삼	Radix Salviae Miltiorrhizae	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	1.31±0.13
인진	Herba Artemisiae Capillaris	<i>Artemisia capillaris</i>	1.29±0.12
우방자	Fructus Arctii	<i>Arctium lappa</i>	1.24±0.13
구척	Rhizoma Cibotii	<i>Cibotium barometz</i>	1.11±0.11
애엽	Folium Artemisiae Asiaticae	<i>Artemisia asiatica</i>	1.07±0.07
황금	Radix Scutellariae	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1.02±0.09
속단	Radix Phlomis	<i>Phlomis umbrosa</i>	0.90±0.11
음양곽	Herba Epimedii	<i>Epimedium koreanum</i>	0.71±0.08
박하	Herba Menthae	<i>Mentha arvensis var. piperascens</i>	0.68±0.06
단향	Lignum Santali Album	<i>Santalum album</i>	0.67±0.07
강활	Radix Osterici Koreani	<i>Ostericum koreanum</i>	0.66±0.09
고삼	Radix Sophorae	<i>Sophora flavescens</i>	0.66±0.07
도화	Flos Persicae	<i>Prunus persica</i>	0.65±0.09
황백	Cortex Phellodendris	<i>Phellodendron amurense</i>	0.55±0.07
익모초	Herba Leonuri	<i>Leonurus sibiricus</i>	0.44±0.02
금은화	Flos Lonicerae	<i>Lonicera japonica</i>	0.42±0.03
목통	Caulis Akebiae	<i>Akebia quinata</i>	0.35±0.06
형개	Herba Schizonepetae	<i>Schizonepeta tenuifolia var. japonica</i>	0.34±0.03
산수유	Fructus Corni	<i>Cornus officinalis</i>	0.33±0.03
갈근	Radix Puerariae	<i>Pueraria thunbergiana</i>	0.30±0.04
포공영	Herba Taraxaci	<i>Taraxacum platycarpum</i>	0.27±0.04
진피	Cortex Fraxini	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	0.20±0.03
시호	Radix Bupleuri	<i>Bupleurum falcatum</i>	0.17±0.02

The assay of antioxidant activity against ABTS+ was described in Materials and Methods. Determination of antioxidant activity was expressed in terms of mmol/l Trolox equivalent (mM TE). Data are shown as mean±SD from three independent experiments, each herbal extract was tested (20 µl/assay) at 1mg/ml of the extracts concentration.

가 92%의 억제율을 나타내어 가장 높게 나타내었으며, 대황 (*Rheum palmatum*), 진피(*Fraxinus rhynchophylla*), 정향

Table 2. Monoamine oxidase B inhibitory activity of water extracts from medicinal herbs

Korean herbal name	Herbal name	Scientific name	Inhibitory activity(%)
속수자	Semen Euphorbiae Lathyridis	<i>Euphorbia lathyris</i>	92
대황	Rhizoma Rhei	<i>Rheum palmatum</i>	87
진피	Cortex Fraxini	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	84
정향	Flos Caryophylli	<i>Eugenia caryophyllata</i>	83
대극	Radix Euphorbiae	<i>Euphorbia pekinensis</i>	77
목근피	Cortex Hibisci Syriaci	<i>Hibiscus syriacus</i>	75
조각자	Spina Gleditsiae	<i>Gleditsia japonica var. koraiensis</i>	74
복분자	Fructus Rubi	<i>Rubus coreanus</i>	71
우방자	Fructus Arctii	<i>Arctium lappa</i>	70
계혈등	Mucunae Caulis	<i>Spatholobus suberectus</i>	69
단삼	Radix Salviae Miltiorrhizae	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	68
구척	Rhizoma Cibotii	<i>Cibotium barometz</i>	65
조구등	Ramulus et Uncus Uncariae	<i>Uncaria sinensis</i>	65
인진	Herba Artemisiae Capillaris	<i>Artemisia capillaris</i>	65
익모초	Herba Leonuri	<i>Leonurus sibiricus</i>	64
소목	Lignum Sappan	<i>Caesalpinia sappan</i>	62
오수유	Fructus Euodiae	<i>Euodia rutaecarpa</i>	60
후박	Cortex Magnoliae	<i>Magnolia obovata</i>	59
고삼	Radix Sophorae	<i>Sophora flavescens</i>	59
박하	Herba Menthae	<i>Mentha arvensis var. piperascens</i>	56
포공영	Herba Taraxaci	<i>Taraxacum platycarpum</i>	56
백림	Radix Ampelopsitis	<i>Ampelopsis japonica</i>	54
목통	Caulis Akebiae	<i>Akebia quinata</i>	53
금은화	Flos Lonicerae	<i>Lonicera japonica</i>	53
황백	Cortex Phellodendris	<i>Phellodendron amurense</i>	53
도화	Flos Persicae	<i>Prunus persica</i>	52
천초	Pericarpium Zanthoxyli	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	51
형개	Herba Schizonepetae	<i>Schizonepeta tenuifolia var. japonica</i>	50
애엽	Folium Artemisiae Asiaticae	<i>Artemisia asiatica</i>	50
속단	Radix Phlomis	<i>Phlomis umbrosa</i>	49
쇄양	Herba Cynomorii	<i>Cynomorium songaricum</i>	44
강활	Radix Angelicae Koreanae	<i>Angelica koreana</i>	41
황금	Radix Scutellariae	<i>Scutellaria baicalensis</i>	37
갈근	Radix Puerariae	<i>Pueraria thunbergiana</i>	31
산수유	Fructus Corni	<i>Cornus officinalis</i>	29
단향	Lignum Santali Album	<i>Santalum album</i>	26
시호	Radix Bupleuri	<i>Bupleurum falcatum</i>	25
음양곽	Herba Epimedii	<i>Epimedium koreanum</i>	24

Data are shown as mean from three independent experiments, and each medicinal extract was tested at the 125 µg. The value was expressed as percentage of control without inhibitor, as 100% activation.

(*Eugenia caryophyllata*), 대극(*Euphorbia pekinensis*) 및 목근피 (*Hibiscus syriacus*)도 12.5 µg에서 각각 87, 84, 83, 77, 75%의 활성 억제를 나타내어 다른 한약재에 비해 월등히 높은 활성 억제율이 확인되었다. 또한 조각자, 복분자, 우방자, 계혈등도 비교적 높은 활성 억제를 나타낸 반면 산수유(*Cornus officinalis*), 단향 (*Santalum album*), 시호(*Bupleurum falcatum*) 및 음양곽 (*Epimedium koreanum*)은 가장 낮은 억제 활성을 나타내었다. 따라서 MAO-B 억제 활성이 높은 6종(속수자, 대황, 진피, 정향,

대극, 목근피)의 추출물을 농도별(2.5 μg , 6.25 μg 및 12.5 μg)로 측정된 결과(Fig. 6) 농도 의존적인 변화양상이 확인되었으며, 정황 및 대황이 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 dopamine 대사와 직접적인 연관성이 있는 MAO-B의 억제 활성이 높은 정황과 대황은 parkinson 질환을 치료 및 개선 가능성이 높은 약재로 판단된다. 그 외에도 속수자, 진피, 대극, 목근피도 비교적 높은 MAO-B 활성억제 효과가 확인되어 활성산소의 생성 억제 및 dopamine 분해를 저해하므로 퇴행성 뇌질환의 치료 개선제로 활용도가 높을 것으로 판단된다.

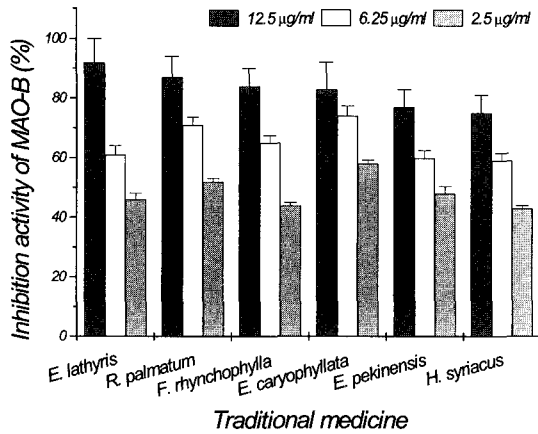


Fig. 6. Monoamine oxidase B inhibitory activity of the selected 6 traditional medicines at various concentration. Each medicinal extract was tested at the various concentrations (2.5, 6.5, and 12.5 $\mu\text{g/ml}$). Data are shown as mean \pm SD from three independent experiments and the values were expressed as percentage of control, as 100% activation.

3. AChE의 활성 억제효과

현재 치매 치료제를 개발하기 위한 연구방향은 AChE 억제제의 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며, 그 외에도 β -amyloid의 침착 억제제, 항산화제, 자유라디칼 제거제 등이 여러 각도로 제시되고 있다. 그러므로 AChE 활성을 억제하는데 효과가 탁월한 한약재의 탐색은 Alzheimer's disease를 포함한 치매의 치료 효과를 높일 수 있는 새로운 한방처방을 개발하는데 필요할 뿐만 아니라 새로운 AChE 억제제를 찾아내는 데 중요한 자료가 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 뇌 질환 환자에 자주 사용되거나 AChE 억제제로서의 효과가 있을 것으로 판단되는 38종의 한약재를 선정하여 본 실험에 사용하였다. AChE 활성 억제효과는 한약재 물 추출물의 최종농도 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Ellman 등⁸⁶⁾의 방법으로 비교 조사하였다. 오수유(*E. rutaecarpa*), 복분자(*R. coreanus*), 단삼(*S. miltiorrhiza*), 대황(*R. palmatum*) 및 고삼(*S. flavescens*)은 AChE에 대해 80% 이상의 활성 억제효과를 나타내었으며, 금은화(*L. japonica*), 목근피(*H. syriacus*), 목통(*A. quinata*), 황백(*P. amurense*) 등의 9종은 79~70% 정도의 활성 억제를 나타내어 AChE 활성 억제작용에 비교적 우수한 한약재로 확인되었다(Table 3). AChE의 활성 억제가 탁월한 4종의 한약재(복분자, 단삼, 대황)를 농도별(2.5 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$)로 제조하여 AChE에 대한 활성 억제율을 비교 측정된 결과, 오수유(*E. rutaecarpa*) 및 복분자(*R. coreanus*)는 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 93%와

Table 3. AChE inhibition activity by the hot water extracts of traditional medicines

Korean herbal name	Herbal name	Scientific name	Inhibition activity (%)
오수유	Fructus Euodiae	<i>Euodia rutaecarpa</i>	93
복분자	Fructus Rubi	<i>Rubus coreanus</i>	88
단삼	Radix Salviae Miltiorrhizae	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	85
대황	Rhizoma Rhei	<i>Rheum palmatum</i>	80
고삼	Radix Sophorae	<i>Sophora flavescens</i>	80
금은화	Flos Lonicerae	<i>Lonicera japonica</i>	79
목근피	Cortex Hibisci	<i>Hibiscus syriacus</i>	79
목통	Caulis Akebiae	<i>Akebia quinata</i>	78
황백	Cortex Phellodendris	<i>Phellodendron amurense</i>	77
우방자	Fructus Arctii	<i>Arctium lappa</i>	76
조각자	Spina Gleditsiae	<i>Gleditsia japonica</i> var. <i>koraiensis</i>	74
단황	Lignum Santali Album	<i>Santalum album</i>	74
조구등	Ramulus et Uncus Uncariae	<i>Uncaria sinensis</i>	73
형개	Herba Schizonepetae	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> var. <i>japonica</i>	72
인진	Herba Artemisiae Capillaris	<i>Artemisia capillaris</i>	69
애엽	Folium Artemisiae Asiaticae	<i>Artemisia asiatica</i>	68
정황	Flos Caryophylli	<i>Eugenia caryophyllata</i>	68
전초	Pericarpium Zanthoxyli	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	67
계혈등	Mucunae Caulis	<i>Spatholobus suberectus</i>	66
박하	Herba Menthae	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	65
대극	Radix Euphorbiae	<i>Euphorbia pekinensis</i>	64
진피	Cortex Fraxini	<i>Fraxinus rhyngchophylla</i>	64
산수유	Fructus Corni	<i>Cornus officinalis</i>	63
후박	Cortex Magnoliae	<i>Magnolia obovata</i>	63
포공영	Herba Taraxaci	<i>Taraxacum platycarpum</i>	62
속수자	Semen Euphorbiae Lathyridis	<i>Euphorbia lathyris</i>	61
소록	Lignum Sappan	<i>Caesalpinia sappan</i>	58
황금	Radix Scutellariae	<i>Scutellaria baicalensis</i>	56
속단	Radix Phlomis	<i>Phlomis umbrosa</i>	55
구적	Rhizoma Cibotii	<i>Cibotium barometz</i>	54
갈근	Radix Puerariae	<i>Pueraria thunbergiana</i>	53
시호	Radix Bupleuri	<i>Bupleurum falcatum</i>	50
쇄양	Herba Cynomorii	<i>Cynomorium songaricum</i>	46
도화	Flos Persicae	<i>Prunus persica</i>	45
음양각	Herba Epimedi	<i>Epimedium koreanum</i>	38
익모초	Herba Leonuri	<i>Leonurus sibiricus</i>	34
백령	Radix Ampelopsitis	<i>Ampelopsis japonica</i>	30
강활	Radix Angelicae Koreae	<i>Angelica koreana</i>	28

Data are shown as mean from three independent experiments, and each medicinal extract was tested at the 25 μg . The value was expressed as percentage of control without inhibitor, as 100% activation.

88%, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 65%와 49%, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 25%와 18%의 활성억제를 나타내어 다른 한약재에 비해 낮은 농도에서도 강한 활성 억제효과를 나타냄이 확인되었다. 또한 단삼 및 대황의 한약재 물 추출물에서는 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 85%와 80%, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 47%와 37%, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 15%와 11%의 활성 억제효과를 나타내었으며, 이들 3종(복분자, 단삼, 대황)의 한약재 추출물 들은 상호간에 유사한 AChE 활성 억제 수준을 나타내었다(Fig. 7). 특히 대황은 AChE 활성 억제가 비교적 높을 뿐만 아니라 항

산화 활성 및 MAO-B 억제율이 높아 Alzheimer's disease 및 Parkinson's disease와 같은 뇌질환의 치료 가능한 후보 약물로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 대황은 Parkinson's disease 및 Alzheimer's disease를 유발한 실험동물모델을 사용하여 약리효능을 입증할 필요가 있으며, 대황으로부터 생리활성을 갖는 물질 분리연구도 수행할 필요가 있는 것으로 사료된다.

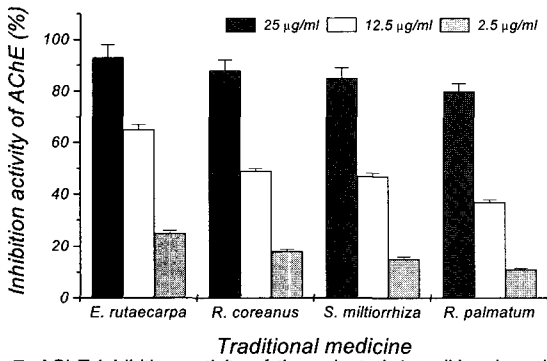


Fig. 7. AChE inhibition activity of the selected 4 traditional medicines at various concentrations. Each medicinal extract was tested at the various concentrations (2.5, 12.5, and 25 µg/ml). Data are shown as mean±SD from three independent experiments and the values were expressed as percentage of control, as 100% activation.

2. 신경독성에 대한 대황의 보호효과

1) 체중 및 장기의 무게변화

대황 물 추출물 및 MPTP가 생쥐의 생리적인 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대황 물추출물을 15일 동안 경구 투여하거나 저농도의 대황 추출물(100 mg/kg, RL) 및 고농도의 대황 추출물(200 mg/kg, RH)을 MPTP와 병용 투여한 다음 실험 시작 일과 대황 추출물 경구 투여 종료일에 체중 변화를 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 생쥐의 체중은 RL 실험군은 대조군에 비해 체중 변화가 관찰되지 않았으며, RH 실험군은 대조군에 비해 다소 증가되는 양상을 보여주었으나 유의성은 관찰되지 않았다. 반면 MPTP 단독 투여군은 대조군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았으나 평균 체중이 대조군에 비해 다소 감소되는 양상을 보여 주어 MPTP가 체중에 다소 영향이 있는 것으로 생각된다. 그러나 대황 추출물 및 MPTP를 병용 투여한 RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군에서는 모두 대조군 및 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이는 없었으나 평균 체중이 증가되는 양상이 관찰되었다. 실험동물을 희생시켜 적출한 간(liver)과 뇌(brain)의 무게를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 간 및 뇌의 무게 변화를 측정된 결과, 대황 단독 투여군 및 병용 투여군 모두에서 대조군에 비해 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, MPTP 단독 투여군에서도 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

2) 혈액의 생화학적 변화

대황 물 추출물 및 MPTP가 생쥐 혈액의 생화학적 지표들 (AST, ALT, ALP, TC, TG, HDL, LDL, Cre, BUN, UA)의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대황 물 추출물을 15일 동안 경구 투여하거나 대황 추출물 및 MPTP를 병용 투여한 다음 혈액을 채취하여 분리한 혈청으로부터 생화학적 변화를 측정된 결

과는 Table 5와 같다. 대황 물 추출물의 단독 투여군인 RL 및 RH 실험군은 대조군에 비해 생화학적 지표들(간기능, 지질대사 및 신기능과 관련된 혈청의 지표)에서 유의한 변화가 관찰되지 않아 200mg/kg까지는 특이한 독성이 없는 것으로 생각된다. MPTP 단독 투여군에서는 triglyceride(TG) 및 high density lipoprotein(HDL) 수준이 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으며, 대황과 MPTP의 병용투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP)에서는 TG와 HDL 수준이 유의적으로 감소되어 대조군의 수준을 나타내었다. 그 외에 MPTP 단독 투여군 및 병용 투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP)의 다른 혈청 지표들에서는 대조군에 비해 유의한 증감이 관찰되지 않았다.

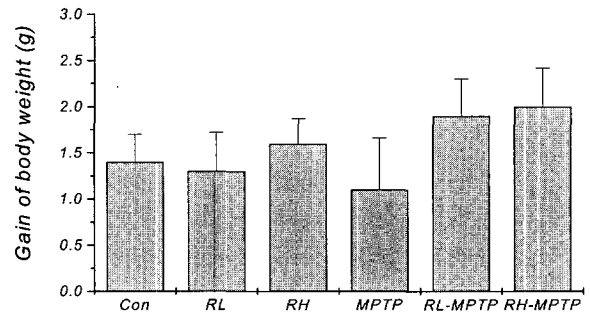


Fig. 8. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on body weight of mice. Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. The medicinal water extracts of each group were oral injection, and MPTP was administered i.p. as indicated in the treatment design. Abbreviations are as follows: Con, treatment of saline alone; RL, low dose treatment of *R. palmatum* extract (100mg/kg); RH, High dose treatment of *R. palmatum* extract (200mg/kg); MPTP, MPTP alone treatment; RL-MPTP, treatments of *R. palmatum* extract (100 mg/kg) and MPTP; RH-MPTP, treatments of *R. palmatum* extract (200 mg/kg) and MPTP.

Table 4. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on brain and liver weights of mice

Experimental group	Weight (g)	
	Brain	Liver
Con	0.45±0.04	1.04±0.09
RL	0.45±0.04	1.02±0.08
RH	0.46±0.02	1.01±0.07
MPTP	0.45±0.03	1.01±0.08
RL-MPTP	0.46±0.03	1.02±0.08
RH-MPTP	0.46±0.04	1.05±0.09

Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

3) 지질과산화물의 변화

뇌의 지질과산화 지표로서 malondialdehyde 함량은 whole brain, 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아와 흑질의 균질액에서 각각 측정하였다. Fig 9는 대황이나 MPTP, 또는 대황 및 MPTP를 실험동물에 투여한 다음 whole brain의 MDA 함량을 미토콘드리아 분획에서 측정된 결과이다. 미토콘드리아 분획의 MDA 함량은 대조군이 0.52 nmol/mg protein이었고 MPTP 단독투여군은 0.45 nmol/mg protein으로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 대황 단독 투여군 및 대황과 MPTP의 병용 투여군들에서도 대조군 및 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이는

Table 5. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP on serum biochemical parameter in mice.

Serum biochemical parameter	Experimental group					
	Con	RL	RH	MPTP	RL-MPTP	RH-MPTP
AST	78±12	95±19	76±13	83±16	74±10	106±18
ALT	24±3.7	26±3.8	23±3.1	22±4.4	22±4.5	28±4.6
ALP	233±35	210±17	239±46	236±18	215±22	241±44
TC	86±9	81±11	80±8	87±11	86±8	92±13
TG	77±6	82±10	81±7	89±6*	77±9**	76±10**
HDL	58±3	58±4	57±5	66±5*	59±3**	58±3**
LDL	9.5±2.7	9.5±3.6	7.3±4.3	7.0±4.4	8.0±3.5	11±3.5
Cre	0.3±0.01	0.3±0.06	0.3±0.01	0.3±0.06	0.3±0.01	0.3±0.01
BUN	31±4	28±2	25±4	28±3	26±3	28±2
UA	3.1±0.5	2.8±0.7	2.4±0.8	2.3±0.9	2.3±0.9	3.2±0.3

Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at P<0.05, respectively. Data were analyzed using by Student's t-test. Notes on group designation are the same as in Fig. 8. Abbreviations are as follows: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; Cre, creatinine; BUN, blood urea nitrogen; UA, uric acid.

관찰되지 않았다. 대뇌피질의 미토콘드리아에서 지질과산화물 측정된 결과는 Fig. 10과 같다. 미토콘드리아 분획의 MDA 함량은 대조군이 0.64 nmol/mg protein이었고 MPTP 단독 투여군에서는 0.75 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황 단독 투여군인 RL 및 RH 실험군의 MDA 함량은 0.63 nmol/mg protein 및 0.6 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 유의한 증감이 관찰되지 않았다. 대황 및 MPTP를 병용 투여한 RL-MPTP 실험군은 0.65 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 감소되는 양상을 보였으나 유의한 차이가 없었다. 반면 고농도의 대황 및 MPTP를 병용 투여한 RH-MPTP 실험군은 0.62 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소 양상을 나타내어 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 소뇌의 미토콘드리아에서 지질과산화물 측정된 결과는 Fig. 11과 같다. 미토콘드리아 분획의 MDA 함량은 대조군이 0.71 nmol/mg protein이었고 MPTP 단독 투여군에서는 0.81 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황 단독 투여군인 RL 및 RH의 MDA 함량은 0.72 nmol/mg protein 및 0.67 nmol/mg protein으로 대조군에 비하여 유의한 증감이 관찰되지 않았다. 반면 저농도의 대황 및 MPTP를 병용 투여한 RL-MPTP 실험군에서는 0.64 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이가 관찰되었으며, 고농도의 대황 및 MPTP를 병용 투여한 RH-MPTP 실험군에서도 0.65 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내어 대황 및 MPTP 병용 투여군들 모두에서 대조군과 유사한 수준을 보여주었다. 따라서 MPTP의 투여는 뇌 영역에 따라 지질과산화 정도 차이가 있음을 알 수 있었는데, whole brain에서는 대황 및 MPTP에 의한 영향은 관찰되지 않았고 대뇌피질 및 소뇌에서는 MPTP에 의해 증가된 MDA 형성물이 대황 추출물의 투여로 인해 완화시켜주는 것으로 확인되었다.

4) Monoamine oxidase B의 활성도 변화

Monoamine계 신경전달물질인 dopamine을 대사하는 monoamine oxidase B(MAO-B)의 활성을 whole brain, 대뇌피

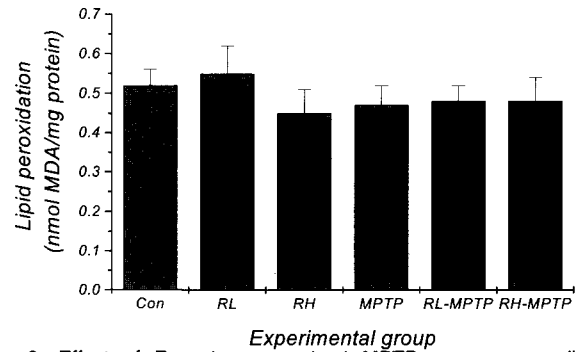


Fig. 9. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on lipid peroxidation in the whole brain mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

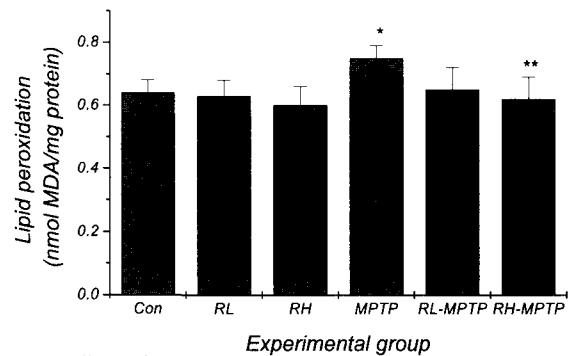


Fig. 10. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on lipid peroxidation in the cerebral cortex mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at P<0.05, respectively. Data were analyzed using by Student's t-test. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

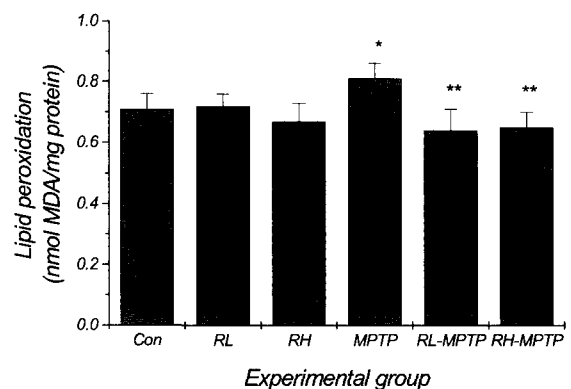


Fig. 11. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on lipid peroxidation in the cerebellum mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 h after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at P<0.05, respectively. Data were analyzed using by Student's t-test. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

질, 소뇌 및 후질에서 각각 측정하였다. 대황이나 MPTP, 또는 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험동물의 whole brain 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 12와 같다. 대

조군의 MAO-B 활성도는 1.35 units이었고 MPTP 단독 투여군은 1.45 units로 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험군들에서도 대조군 및 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 대황이나 MPTP, 또는 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험동물의 대뇌피질 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 13과 같다. 대조군의 MAO-B 활성도는 1.10 units이었고 대황 단독 투여군들(RL 및 RH)에서는 1.05 및 1.09 units로 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 반면 MPTP 단독 투여군은 1.66 units로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으나 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP)에서는 각각 1.20 및 1.23 units로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내었으며 대조군과 유사한 수준으로 회복됨을 보여주었다. 대황이나 MPTP, 또는 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험동물의 소뇌 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 14와 같다. 대조군의 MAO-B 활성도는 1.85 units이었고 대황 단독 투여군들(RL 및 RH)에서는 1.81 및 1.76 units로 대조군에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 반면 MPTP 단독 투여군은 2.57 units로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으나 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP)에서는 각각 1.95 및 1.97 units로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내어 대조군과 유사한 수준을 보여주었다. 지질과산화물을 측정된 결과와 마찬가지로 MAO-B 활성도 측정결과에서도 whole brain에서는 MPTP 단독 투여 및 대황 MPTP 병용 투여시에 영향이 없었으나 대뇌피질 및 소뇌에서는 MAO-B 활성에 영향이 관찰되었다.

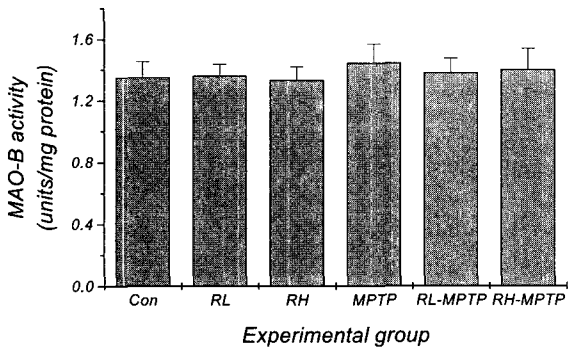


Fig. 12. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the whole brain mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which increased one absorbance/30 minutes. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

5) Dopamine의 함량 변화

MPTP나 대황 물추출물을 실험동물에 투여한 다음, dopamine의 함량을 흑질 및 선조체에서 측정된 결과는 Fig. 15와 같다. 흑질과 선조체에서 모두 MPTP 단독 투여군의 dopamine 함량은 대조군에 비해 현저한 감소 양상을 보였다. 반면 대황 물추출물의 고농도 단독 투여군에서는 대조군에 비해

오히려 감소하였으며 저농도 투여군에서는 흑질만이 증가하는 양상을 나타내었다. MPTP와 대황 물추출물을 병용 투여한 경우에는 모두 증가하는 양상을 나타내었고, 특히 흑질에서 dopamine 수준의 회복정도가 탁월하였다.

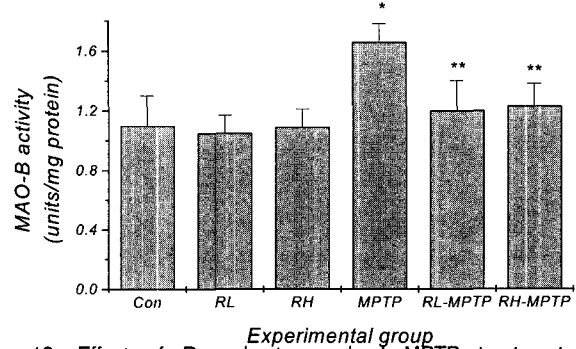


Fig. 13. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the cerebral cortex mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which increased one absorbance/30 minutes. * **Significantly different from the control group and MPTP group at P<0.05, respectively. Data were analyzed using by Student's t-test. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

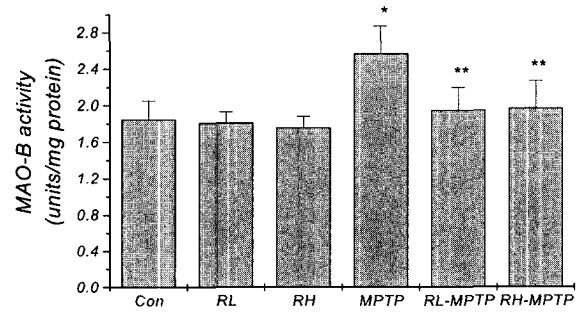


Fig. 14. Effect of *R. palmatum* or/and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the cerebellum mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean±SD of 8 animals per group. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which increased one absorbance/30 minutes. * **Significantly different from the control group and MPTP group at P<0.05, respectively. Data were analyzed using by Student's t-test. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

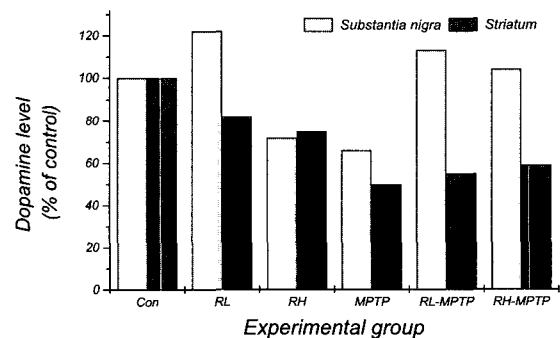


Fig. 15. Effect of *R. palmatum* water extract treatment against depletion of striatal and substantia nigra dopamine levels by MPTP. Striatal and substantia nigra dopamine level was determined by HPLC and expressed as % of control. Data was expressed as mean of 8 animals per group. Notes on group designation are the same as in Fig. 8.

고 찰

효소반응 및 이물질대사 등의 과정에서 형성된 ROS는 지질 과산화, 세포손상 및 독작용을 유발하며⁸⁸⁾, ROS에 의한 산화적 손상은 암(cancer) 뿐만 아니라 Parkinson 질환 및 Alzheimer씨 병 등과 같은 퇴행성 뇌 질환의 주요 발병원인과 연관성이 높다^{10,15,89,90)}. 따라서 항산화제는 산화적인 손상을 감소시켜 암 및 퇴행성 뇌 질환을 낮추어 주는 효과가 있음을 보고된 바 있다^{15,91)}. 최근 질환 예방 및 치료제로 전통약물의 사용이 증가되고 있어 한약재의 생리활성물질의 탐색은 매우 중요하다. 그러므로 본 연구는 퇴행성 뇌질환인 Parkinson씨병을 완화 또는 치료할 수 있는 한약재를 알아내기 위하여 한약재 물 추출물로부터 항산화 효과, acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제효과, monoamine oxidase B(MAO-B) 활성 억제효과, 항지질과산화 효과를 in vitro 하에서 우선 조사하였으며, 생리활성이 탁월한 대황을 선정하여 대황이 신경독성물질의 대사에 미치는 영향을 연구하였다.

항산화 활성은 38종의 한약재로부터 kit 시약(Randox Lab.)을 사용하여 ABTS· + radical에 대한 항산화 효과를 측정하였다. 본 항산화 활성 측정용 kit는 체액 및 혈액을 사용하여 임상 화학적으로 ABTS· + radical에 대한 항산화 효과를 측정하는데 손쉽게 이용되어 왔으며^{92,94)}, 최근에는 생약 및 약물에도 적용되어 사용되고 있다⁹⁵⁾. 한약재의 항산화 활성 측정 결과는 Table 1에 나타내었으며, 계혈등(*S. suberectus*, 2.63 mM TE), 후박(*M. obovata*, 2.46 mM TE), 소목(*C. sappan*, 2.43 mM TE), 목근피(*H. syriacus*, 2.25 mM TE), 대극(*E. pekinensis*, 2.20 mM TE), 정향(*E. caryophyllata*, 2.20 mM TE), 복분자(*R. coreanus*, 2.18 mM TE), 대황(*R. palmatum*, 2.11 mM TE) 및 조각자(*G. japonica*, 2.04 mM TE)가 다른 한약재 추출물에 비해 항산화 활성이 월등히 높다는 것을 확인하였다. 반면 산수유(*C. officinalis*), 갈근(*P. thunbergiana*), 포공영(*T. platycarpum*), 진피(*F. rhynchophylla*) 및 시호(*B. falcatum*)는 상당히 낮은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 높은 계혈등(*S. suberectus*), 후박(*M. obovata*), 소목(*C. sappan*) 및 목근피(*H. syriacus*)는 10 μ g에서 유사한 수준을 나타내어 농도별로 항산화 활성을 비교 측정한 결과(Fig. 4), 소목 물 추출물 1 μ g 및 5 μ g에서 각각 0.24 및 1.9 mM TE로 가장 높은 항산화 활성이 관찰되었다.

Malondialdehyde (MDA)는 생체막의 불포화지방산에 대한 산화적 손상의 산물로 세포독성 및 유전독성을 알아내는 지표로 쉽게 측정할 수 있다⁹⁶⁾. 지질과산화의 산물의 하나인 MDA의 양은 thiobarbituric acid 반응물질 (TBARS)을 일반적으로 측정하고 있으며, 본 연구에서는 뇌 균질액을 사용하여 NADPH⁺-Fe²⁺로 지질과산화를 유도한 후 한약재 물 추출물의 첨가에 따른 지질과산화의 억제 정도를 비교 측정하였다. 항지질과산화 정도는 억제제가 없는 상태인 대조군을 100%로 설정하여 MDA 형성으로 나타내었다. NADPH 및 ADP-Fe²⁺로 지질과산화(lipid peroxidation)를 유도하여 측정된 항지질과산화 정도는 계혈등, 후박, 소목 및 목근피 모두 농도 의존적인 양상을 보여주었는데, 소목의 물 추출물은 다른 3종에 비해 MDA 형성을(1 μ g = 68%,

10 μ g = 23%; 100 μ g = 2%)이 가장 낮게 나타내어 가장 높은 항지질과산화 활성이 있는 것으로 확인되었다. 4종류의 한약재 중 TBARS 생성(lipid peroxidation)에 대한 억제활성이 가장 높은 소목(*C. sappan*)은 IC₅₀ 이 4.6 μ g인 것으로 환산되었다(Fig. 5). 따라서 항산화 활성이 높고 지질과산화의 억제효과가 탁월한 소목은 퇴행성 뇌질환의 위험을 줄일 수 있는 가능성을 갖는 후보 약물로 사료된다.

생체내에서 형성되는 O₂, H₂O₂, OH·와 같은 ROS는 지질, 단백질 및 DNA와 같은 세포 구성물을 산화적 손상을 일으킨다. ROS의 과대적인 형성은 세포 소기관 및 세포막의 산화적 손상을 쉽게 일으켜 lipid peroxide의 생성이 초래된다. ROS나 lipid peroxide는 생체막의 기능 및 세포 구성물의 손상을 초래하여 돌연변이(mutagenicity), 암화작용(carcinogenicity) 및 노화(aging)를 가속화시킨다^{9,12,97)}. 비타민 C와 E 및 β -카로틴과 같은 항산화제는 생체의 산화적 손상을 줄여주어 노화를 억제해주는 동시에 건강을 유지시켜 준다⁹⁸⁾. 항산화제 작용이 입증되면서 최근에는 식물로부터 항산화제 탐색 연구가 활발히 진행되어 곡물, 야채, 생약 등으로부터 항산화 물질이 발견되고 있다⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾.

오늘날 서구 및 우리 나라에서는 노령인구의 비율이 증가함에 따라 암과 같은 고질병과 더불어 신경퇴행성 뇌 질환인 치매 환자의 비율이 급격히 증가하고 있다. 그 중 치매는 노인성 치매(Alzheimer's disease)와 혈관성 치매가 다수를 차지하고 있는 실정이다. 예로부터 치매를 치료하기 위한 한의학적 연구는 三和散¹⁰¹⁾, 七福飲¹⁰²⁾ 및 定志丸¹⁰³⁾의 처방을 활용한 연구가 보고되었을 뿐 체계적인 연구는 아직까지 미흡한 상태이다. 현재 치매 치료제를 개발하기 위한 연구방향은 AChE inhibitor의 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며, 그 외에도 β -amyloid의 침착 억제제, 항산화제, 자유라디칼 제거제 등이 여러 각도로 제시되고 있다. 그러므로 AChE 활성을 억제하는데 효과가 탁월한 한약재의 탐색은 Alzheimer's disease를 포함한 치매의 치료효과를 높일 수 있는 새로운 한방처방을 개발하는데 필요할 뿐만 아니라 새로운 AChE inhibitor를 찾아내는데 중요한 자료가 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 뇌 질환 환자에 자주 사용되거나 AChE inhibitor로서의 효과가 있을 것으로 판단되는 38종의 한약재를 선정하여 본 실험에 사용하였다. AChE 활성 억제효과는 한약재 물 추출물의 최종농도 25 μ g/ml에서 Ellman 등⁸⁶⁾의 방법으로 비교 측정하였다. 오수유(*E. rutaecarpa*), 복분자(*R. coreanus*), 우슬(*A. japonica*), 흑상심(*M. alba*), 단삼(*S. miltiorrhiza*), 맥문동(*L. platyphylla*) 및 대황(*R. palmatum*)은 대조군과 비교하여 AChE에 대해 80% 이상의 활성 억제효과를 나타내었으며, 금은화(*L. japonica*), 목근(*H. syriacus*) 및 오매(*P. mume*) 등의 25종은 79~60% 정도의 활성 억제를 나타내어 AChE 활성 억제작용에 비교적 우수한 한약재로 확인되었다(Table 3).

MAO는 미토콘드리아의 외막에 존재하는 통합단백질로서 MAO-A 및 MAO-B type이 있다. 중추성 MAO의 활성은 우울증 등의 정신질환과 말초에서는 고혈압 등의 질환과 관련이 되어 있다. MAO 저해제는 뇌중 dopamine의 약리작용을 증대시킨다고 보고되었으¹⁰⁴⁾, 우울증(depression), 알코올 중독증

(alcoholism), 정신분열증(schizophrenia) 등의 병인으로 비정상적인 MAO 활성이 작용할 수 있다고 생각되고 있다^{105,106}). 따라서 본 연구에서는 신경성 뇌질환의 개선효과가 있을 것으로 판단되는 38종의 한약재를 선정하여 monoamine oxidase-B (MAO-B)에 대한 억제 활성을 측정하였다. 속수자(*Euphorbia lathyri*)는 추출물의 농도를 12.5 μg 으로 처리하였을 경우 92%의 MAO-B 활성 억제율을 나타내어 다른 한약재에 비해 가장 높게 확인되었으며, 대황(*Rheum palmatum*), 진피(*Fraxinus rhynchophylla*), 정향(*Eugenia caryophyllata*), 대극(*Euphorbia peginensis*) 및 목근피(*Hibiscus syriacus*)도 12.5 μg 에서 각각 87%, 84%, 83%, 77%, 75%의 활성 억제효과를 나타내어 다른 한약재에 비해 월등히 높은 활성 억제율이 확인되었다(Table 2). 또한 조각자, 복분자, 우방자, 계혈등도 비교적 우수한 활성 억제를 나타낸 반면 산수유(*Cornus officinalis*), 단향(*Santalum album*), 시호(*Bupleurum falcatum*) 및 음양곽(*Epimedium koreanum*)은 가장 낮은 억제 활성을 나타내었다. 따라서 MAO-B 억제 활성이 높은 6종(속수자, 대황, 진피, 정향, 대극, 목근피)의 추출물을 농도별(2.5 μg , 6.25 μg , 12.5 μg)로 측정된 결과(Fig. 6) 농도 의존적인 변화양상이 확인되었으며, 정향 및 대황이 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 dopamine 대사와 직접적인 연관성이 있는 MAO-B의 억제 활성이 높은 정향과 대황은 parkinson 질환을 치료 및 개선 가능성이 높은 약재로 판단된다. 그 외에도 속수자, 진피, 대극, 목근피도 비교적 높은 MAO-B 활성 억제효과가 확인되어 활성산소의 생성 억제 및 dopamine 분해를 저해하므로 퇴행성 뇌질환의 치료 개선제로 활용도가 높을 것으로 판단된다.

일반적으로 coumarin과 같은 bicyclic compound는 MAO-A 및 MAO-B 모두에 억제율이 비교적 높고¹⁰⁷). 두충잎으로부터 분리한 3-O- [β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2) β -D-xylopyranosyl] quercetin은 MAO-B 억제활성에 대해 IC_{50} 값이 8.05 $\mu\text{mol/l}$ 이며¹⁰⁸), *Artemisia vulgaris*으로부터 얻어진 flavonoid인 apigenin은 IC_{50} 값이 1.0 μmol 으로 높은 억제 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다¹⁰⁹). 그 외에도 생약재들로부터 MAO 활성 억제율을 비교 측정된 결과에서는 더위지기(*Artemisia iwayomogi*), 쇠물푸레(*Fraxinus sieboldiana*), 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*), 지모(*Anemarrhena asphodeloides*), 백선(*Dictamnus dasycarpus*)에서 비교적 높은 억제율을 보였으며, 가장 활성이 강한 더위지기의 MAO 저해 활성에 대한 IC_{50} 은 108 $\mu\text{g/ml}$ 로 보고하였다¹¹⁰). PD 및 AD 질환의 치료 개발을 MAO-B inhibitor가 많이 연구되고 있으며, 대표적으로 MAO-B 억제제인 L-deprenyl(Selegiline)은 흰쥐 뇌 MAO-B에 대한 IC_{50} 값이 11.25 nmol/l 로 선택성이 높은 비가역적인 억제제이다¹¹¹). L-Deprenyl은 생물학적 작용 및 임상적인 연구결과가 유의한 효과를 보여주고 있어 L-deprenyl을 Parkinson's disease 및 Alzheimer's disease의 효과적인 치료제로 활용 가능성이 높다고 보고하였다⁷⁹). 그러나 L-Deprenyl은 암페타민과 유사한 부작용을 나타내며 고혈압 및 우울증 치료를 위해 pargyline을 복용한 환자가 조병(manic psychosis)에 걸린 사례가 있다¹¹²). 그러므로 MAO-B의 선택적인 억제효과가 탁월하

고 부작용이 없는 MAO-B 억제제를 찾는 연구는 계속되고 있다.

이상의 in vitro에서 실험한 결과를 종합해 볼 때 MAO-B 활성 억제가 가장 높은 속수자 및 정향은 항산화 활성 및 AChE 활성 억제 효과가 비교적 낮았으며, MAO-B 활성 억제가 탁월한 대황 및 복분자는 항산화 활성 및 AChE 활성 억제가 전반적으로 높은 한약재로 나타났다. 따라서 대황의 물 추출물이 신경독성물질에 의한 PD의 치료제로 활용가능성이 있는지를 검토하기 위한 기초연구로서 신경독성물질의 체내대사를 억제하는 지를 조사하고, 이에 대한 작용기전을 규명하였다.

N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)의 독성실험은 주로 mouse^{38,71,73,74})를 실험동물 모델로 연구하였으며, 그 외에도 원숭이^{60,113}) 및 흰쥐^{114,115})등의 다양한 실험동물을 모델로 연구되어 왔다. 그러나 Muthane 등¹¹⁶)이 C57BL/6 mouse가 CD-1 mouse보다 MPTP에 의한 신경독성이 잘 유발된다고 보고함으로써 파킨슨씨병의 발병기전 및 치료제 개발 등을 연구하는데 많은 연구자들이 실험동물의 모델로서 C57BL/6 mouse를 주로 사용하고 있다. 현재 이 실험동물모델에서 MPTP의 신경독성을 완화시킨다고 알려진 것은 L-deprenyl⁶²), sodium salicylate⁷²) 및 pramipexole⁷⁴) 등이 보고되었으며, 추출물 수준에서는 Ginkgo biloba 추출물(EGb 761)이 보고되었다⁷¹). 따라서 본 연구에서는 대황 물 추출물이 생체내에서 생리적, 생화학적으로 어떤 영향을 미치는지를 먼저 확인한 다음, MPTP-유도 신경독성을 완화하는지를 동물실험을 통하여 조사하였다.

실험동물의 체중과 털색 및 움직임 등은 실험동물의 생리적인 변화를 측정하는 일반적인 지표로 이용된다. MPTP와 같은 독성물질은 생체내에서 강력한 독성을 일으켜 실험동물의 체중을 감소시킨다^{117,118}). 본 연구에서 생쥐의 체중은 대황 단독 투여군(RL, RH)은 대조군에 비해 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았으나 고농도(200mg/kg)의 대황 단독 투여군인 RH 실험군이 대조군에 비해 다소 증가하는 양상을 보여주었다. 따라서 대황 물 추출물이 체중 변화에 큰 영향은 없는 것으로 판단된다. 반면 MPTP 단독 투여군은 대조군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았으나 감소하는 양상을 보여주어 MPTP가 체중에 다소 영향이 있는 것으로 생각된다. 그러나 대황과 MPTP를 병용 투여한 RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군에서는 모두 대조군 및 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이는 없었으나 MPTP 단독 투여군에 비해 증가되는 양상이 관찰되었다(Fig. 8). 따라서 대황 및 MPTP 투여에 의해 현저한 체중 변화는 관찰되지 않았으나 대황 물 추출물이 MPTP 투여에 의한 체중감소 정도를 다소 억제해주는 동시에 증가시키는 것으로 생각된다. 또한 실험동물을 희생시켜 적출한 간과 뇌의 무게 변화를 측정된 결과 대황 단독 투여군 및 병용 투여군 모두에서 대조군에 비해 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, MPTP 단독 투여군에서도 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 4).

혈액의 성분들은 생체의 여러 가지 생리적인 변화를 예견할 수 있는 생화학적인 지표로 활용되고 있다. 따라서 대황의 생체내에 미치는 독성 유무를 알아보기 위하여 간기능과 관련된 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 및

alkaline phosphatase를, 신기능과 관련된 지표인 creatinine, blood urea nitrogen 및 uric acid를, 지질대사와 관련성이 높은 total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein 및 low density lipoprotein를 측정된 결과 생화학적 지표들에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 사하작용 등의 독성이 있는 것으로 알려진 대황은 혈액의 생화학적 지표 및 체중 측정결과를 볼 때 200mg/kg의 투여농도까지는 특이한 독성이 없는 것으로 사료된다. 반면 MPTP 단독 투여군에서는 지질대사와 관련된 triglyceride 및 high density lipoprotein 수준이 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으며, 대황과 MPTP의 병용투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서는 TG와 HDL 수준이 유의적으로 감소되어 대조군의 수준을 나타내었다. 따라서 대황은 부분적으로는 지질대사와 관련된 TG 및 HDL을 낮추어 주는 효과가 있는 것으로 사료된다. 그 외에 MPTP 단독 투여군 및 병용 투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)의 다른 혈청 지표들에서는 대조군에 비해 유의한 증감이 관찰되지 않았다.

활성산소에 의한 산화적 손상의 지표로서 지질과산화물인 TBARS는 지질과산화물 뿐만 아니라 단백질의 산화물과도 반응하여 complex를 형성하기 때문에 생체내의 전체적인 산화적 손상에 대한 결과로 볼 수 있다¹¹⁹. MDA의 함량은 MPTP와 같은 신경독성물질을 투여함에 따라 뇌조직에서 증가함을 보고한 바 있으며^{74,75,120}, MPTP는 활성산소를 생성하여 뇌조직의 지질과산화물을 유발한다고 보고하였다⁷⁵. MPTP 투여에 의한 생체내에서의 MDA 함량 증가는 L-deprenyl⁴⁶ 및 pramipexole⁷⁴을 처리하거나 γ -ray⁷⁵를 조사하면 감소된다고 보고한바 있다. 본 연구에서도 MPTP를 투여했을 때 MDA 함량이 whole brain에서는 유의한 차이가 없었으나 대뇌피질 및 소뇌에서는 유의한 증가가 확인되었다(Fig 9, 10, 11). 그러나 대황 및 MPTP를 병용투여함에 따라 대뇌피질 및 소뇌에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였다($P < 0.05$). 이러한 결과는 대황 물 추출물이 MPTP 신경독성에 의한 뇌의 지질과산화를 억제함으로써 신경세포를 보호하는 것으로 생각된다.

MAO는 미토콘드리아의 외막에 존재하는 통합단백질로서 MAO-A와 MAO-B type이 있다. MPTP 자체는 신경독성을 지니고 있지 않으나 monoamine oxidase에 의하여 신경독성을 지닌 MPP⁺로 전환된다. 특히 생체내에서는 MAO-B의 활성 증가가 MPTP의 대사를 촉진하여 nigro-striatal system에 신경독성을 지닌 MPP⁺의 축적을 증가시킨다. 그 중에서도 흑질의 MAO-B 활성도는 MPTP의 대사에 많은 영향을 미친다^{121,122}. Grunblatt 등⁵⁸은 apomorphine을 93 μ M 농도로 처리하였을 때 MAO-A 활성도가 생쥐의 선조체에서 50% 억제된다고 보고하였다. 반면 Mohanakumar 등⁷²은 MPTP(30 mg/kg)를 16시간 간격으로 2회 투여한 다음 1시간, 1일 및 1주일 후에 흑질의 MAO-B 활성도를 각각 측정된 결과 대조군과 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 이는 MPTP의 투여조건, 종(species) 및 조직에 따라 서로 다른 양상을 나타내기 때문인 것으로 판단된다¹²³.

Dopamine의 함량은 MPTP의 신경독성에 대한 보호효과를 조사하는 지표로서 많은 연구에서 측정되었다. 선조체에서

dopamine 함량 감소는 뇌의 MAO-B 활성도가 증가되어 MPTP의 대사가 촉진함으로써 nigro-striatal에 MPP⁺가 축적되어 일어나며, AD(Alzheimer' disease)나 PD(Parkinson's disease)와 같은 퇴행성 신경질환을 유발하는 직접적인 원인이 된다. 그러므로 MAO-B inhibitor는 PD¹²⁴나 우울증¹²⁵을 치료하는데 이미 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서 대황의 물 추출물을 12.5 μ g 농도로 처리하였을 때, in vitro 실험에서 MAO-B의 활성도가 87% 억제됨을 확인되어 다른 한약재 추출물에 비해 MAO-B 활성 억제 효과가 탁월한 동시에 항산화 및 항지질과산화 효과가 탁월한 것으로 판단되어 in vivo 상에서 실험을 수행하였다. Monoamine계 신경전달물질인 dopamine을 대사하는 monoamine oxidase B(MAO-B)의 활성을 whole brain, 대뇌피질, 소뇌 및 흑질에서 각각 측정하였다. 대황이나 MPTP, 또는 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험동물에서 whole brain의 미토콘드리아 분획으로 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 12와 같다. 대조군의 MAO-B 활성도는 1.35 units이었고 MPTP 단독 투여군은 1.45 units로 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험군들에서도 유의한 차이는 보이지 않았다. 대황이나 MPTP, 또는 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험동물의 대뇌피질 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 13과 같다. 대조군의 MAO-B 활성도는 1.10 units이었고 대황 단독 투여군들(RL 및 RH 실험군)에서는 1.05 및 1.09 units로 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 반면 MPTP 단독 투여군은 1.66 units로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으나 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서는 각각 1.20 및 1.23 units로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이를 나타내었으며 대조군과 유사한 수준으로 회복됨을 보여주었다. 대황이나 MPTP, 또는 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험동물의 소뇌 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정된 결과는 Fig. 14와 같다. 대조군의 MAO-B 활성도는 1.85 units이었고 대황 단독 투여군들(RL 및 RH 실험군)에서는 1.81 및 1.76 units로 대조군에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 반면 MPTP 단독 투여군은 2.57 units로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었으나 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서는 각각 1.95 및 1.97 units로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의하게 감소되어 대조군과 유사한 수준을 나타내었다.

MPTP 처리로 PD를 인위적으로 유도시킨 실험동물의 선조체의 dopamine 함량은 대조군에 비해 30~50% 수준으로 감소되거나 EGb 761, L-deprenyl, pramipexole, salicylic acid와 riluzole 등을 처리하면 dopamine의 함량이 대조군의 70% 이상의 수준으로 유지된다고 이미 보고되었다^{63,74}. 본 연구에서 선조체의 dopamine 함량은 MPTP를 투여함에 따라 대조군의 50% 수준으로 감소하였으나 대황과 MPTP를 병용투여함에 따라 대조군의 55% 및 59% 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 또한 흑질의 dopamine 함량은 MPTP를 투여함에 따라 대조군의 66% 수준으로 감소하였으나 대황과 MPTP를 병용투여함에 따라 대조군의

113% 및 104% 수준으로 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 대황이 파킨슨씨병을 가장 두드러진 특징인 dopamine의 함량 감소를 효과적으로 완화시킬 수 있다는 것을 의미하는 중요한 결과이다.

결 론

의약품으로 활용하기 위한 식물자원에 대한 관심은 지난 10년 동안 활기를 갖게 되었다. 본 연구는 노화나 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨병과 같은 뇌질환의 치료가 가능한 후보 한약재를 탐색하였다. 38종의 한약재 물 추출물로부터 *in vitro*에서 항산화 활성, acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제효과 및 monoamine oxidase B(MAO-B) 활성 억제효과를 조사하였다.

ABTS · + radical에 대한 소거효과를 이용하여 38종의 한약재 물 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. 계혈등, 후박, 소목, 목근피, 대극, 정향, 복분자 및 대황은 다른 한약재에 비해 항산화 활성이 가장 높았으며, 항산화 활성이 높은 4종의 한약재 추출물을 다양한 농도(1 µg, 5 µg, 10 µg)에서 항산화 활성을 측정할 결과 농도 의존적인 변화 양상을 나타내었다. 그중 소목은 1 µg에서 0.38 mM TE의 활성을 나타내어 가장 강한 항산화 효과를 보여주었다. 또한 NADPH 및 ADP-Fe²⁺ system에서 유도한 뇌 균질액의 지질과산화를 측정하여 한약재 물 추출물에 대한 항지질과산화 효과를 비교 측정할 결과 소목 및 대황이 가장 높은 항지질과산화 효과가 있음을 확인하였다.

38종의 한약재 물 추출물로부터 monoamine oxidase B에 대한 활성 억제효과를 비교 측정할 결과 속수자, 대황, 진피 및 정향이 가장 강한 활성 억제율을 나타내었다. 다양한 농도에서 MAO-B 활성 억제를 측정할 결과 정향 및 대황이 가장 높은 활성 억제효과를 나타내었다. 또한 뇌 균질액을 이용하여 AChE 활성 억제를 측정할 결과 오수유, 복분자, 단삼, 대황, 고삼이 80% 이상의 억제율을 나타내었다. AChE 활성 억제가 강한 4종의 한약재를 다양한 농도(2.5 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml)에서 AChE 활성 억제율을 비교 측정할 결과, 오수유는 각각 25%, 65%, 그리고 93%의 억제율이 확인되었으며 낮은 농도에서도 비교적 높은 억제율을 나타내었다. 38종의 한약재 물 추출물 중에서 대황은 항산화 활성, MAO-B 활성 억제율, 그리고 AChE 활성 억제율이 다른 한약재에 비해 전반적으로 탁월한 것으로 확인되었다. 따라서 대황은 MAO-B 활성 및 radical 소거효과와 밀접한 관련성이 있는 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨병과 같은 퇴행성 뇌질환을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.

MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)에 의해 유도된 parkinsonism에 대한 대황의 보호효과와 그 보호작용에 대한 기전을 조사하기 위하여 신경생화학적인 지표성분들을 생쥐(C57BL/6 mouse)에서 측정하였다. 생쥐에서 신경독성에 대한 대황 물 추출물의 보호효과를 조사하기 위하여 대황 물 추출물(100 및 200 mg/kg/day)을 MPTP(10 mg/kg/day)를 피하로 투여하기 1시간 전에 15일 동안 경구 투여하였으며, 처음 6일 동안은 대황과 MPTP를 병용 투여하였다. 실험동물은 대황을 마지막

으로 투여한 후 24시간에 희생시키고 혈청 및 뇌의 생화학적 지표들을 측정하였다.

대황을 단독으로 처리한 생쥐는 혈청에서 AST 나 ALT와 같은 constitive enzyme의 활성은 차이를 나타내지 않았다. 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아 분획에서 MPTP에 의해 증가된 MAO-B 활성이 대황 추출물의 투여로 인해 유의하게 감소되었다. 대황을 처리한 생쥐는 MPTP 투여로 선조체의 dopamine 함량이 감소되는 것이 효과적으로 억제되었으며, 지질과산화의 지표인 MDA 함량은 대황처리함에 따라 뇌조직에서 유의하게 감소되어 MPTP에 의한 산화적인 손상으로부터 지질과 같은 macromolecules가 보호되는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 대황 물 추출물은 생쥐의 MPTP-유도 신경독성을 효과적으로 감소시키며, 이러한 신경독성에 대한 대황의 보호효과는 MAO-B의 활성 억제효과와 항산화 활성에 의한 결과로 사료된다.

참고문헌

1. Evans, D.A., Funkenstein, H.H., Alvert, M.S., Scherr, P.A., Cook, N.R., Chown, M.J., Herbert, L.E., Hennekens, C.H., and Taylor, J.O. Prevalence of Alzheimer' disease in community population of older persons. JAMA 262, 2551-2556, 1989.
2. National Institute on Aging. Progress Report on Alzheimer's disease (NIH Publication 95-3994). U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1995.
3. Khachaturian, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch. Neurol. 42, 1097-1105, 1985.
4. Jorm, A., Korten, A., and Henderson, A. The prevalence of dementia: A quantitative integration of the literature. Acta Psychiat. Scand. 76, 564-479, 1987.
5. Rossor, M.N. Neurotransmitters and C.N.S. disease dementia. Lancet, 2, 1200-1204, 1982.
6. Koller, W.C. Neuroprotective therapy for Parkinson's disease. Exp. Neurol. 144, 24-28, 1997.
7. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology 186, 1-85, 1990.
8. Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanisms and biological consequences. Free Radic. Biol. Med. 9, 315-325, 1990.
9. Cerutti, P.A. Oxy-radicals and cancer. Lancet 344, 862-863, 1994.
10. Götz, M.E., Kunig, G., Riederer, P., and Youdim, M.B. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. Pharmacol. Therapeutics 63, 37-122, 1994.
11. Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet 347, 444-445, 1996.

12. Good, P.F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C.W., and Perl, D.P. Evidence fro neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 149, 21-28, 1996.
13. Nizamuddin, A. NADPH-dependent and O₂-dependent lipid-peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 15, 58-62, 1987.
14. Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1780-1783, 1994.
15. Zhang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinsons disease. *Neurobiol. Disease* 7, 240-250, 2000.
16. Branen, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59-63, 1975.
17. Iverson, F. Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Letters* 93, 49-54, 1995.
18. Brodaty, H., Ames, D., Boundy, K.L., Hecker, J., Snowdon, J., Storey, E., and Yates, M.W. Pharmacological treatment of cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Med. J. Aust.*, 175, 324-329, 2001.
19. Duyckaerts, C., Colle, M.A., Delatour, B., and Hauw, J.J. Alzheimer's disease: lesions and their progression. *Rev. Neurol.* 155, 17-27, 1999.
20. Elble, R., Giavobini, E., and Scarsella, G.F. Cholinesterase in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 44, 403-407, 1987.
21. Coyel, J.T., Price, D.L., and Long, M.R. Alzheimer's disease; A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184-1189, 1983.
22. Talesa, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanism Aging Develop.* 122, 1961-1969, 2001.
23. Holscher, C. Possible causes of Alzheimer's disease: Amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol. Disease* 5, 129-141, 1998.
24. Parnetti, L., Senin, U., and Mecocci, P. Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. The way forward. *Drug* 53, 752-768, 1997.
25. Peng, F.C. Acetylcholinesterase inhibition by territrem B derivatives. *J. Nat. Pro.* 58, 857-862, 1995.
26. Hwang, S.Y., Chang, Y.P., Byun, S.J., Jeon, M.H., and Kim, Y.C. An acetylcholinesterase inhibitor isolated from *Corydalis Tuber* and its mode of action. *Kor. J. Pharmacogn.* 27, 91-95, 1996.
27. O'Neill, M., Hicks, C., Ward, M., and Panetta, J.A. Neuroprotective effects of the antioxidant LY231617 and NO synthase inhibitors in global cerebral ischaemia. *Brain Res.* 760, 170-178, 1997.
28. Handy, R.L.C., Harb, H.L., Wallace, P., Gaffen, Z., Whitehead, K.J., and Moore, P.K. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: Antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 119, 423-431, 1996.
29. Jossan, S.S., Gillberg, P.G., Gottfries, C.G., Karlsson, I., and Oreland, L. Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: A biochemical and autoradiographical study. *Neuro. Sci.* 45, 1-12, 1991.
30. Gerlach, M., Richardson, P., and Youdim, M.B.H. The molecular pharmacology of L-deprenyl. *Eur. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 226, 97-108, 1992.
31. Nagatsu, T., Yamamoto, T., and Harada, M. Purification and properties of human brain mitochondrial monoamine oxidase. *Enzymologia* 39, 15-25, 1970.
32. Shah, C.S., Qadry, J.S., and Bhatt, J.G. Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivaties in Indian rhubarb. *Planta Med.* 22, 103-108, 1972.
33. Donnelly, C.H. and Murphy, D.L. Substrate and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 26, 853-858, 1977.
34. Yang, H.Y.T. and Neff, N.H. The monoamine oxidases of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J. Pharm. Exp. Ther.* 189, 733-740, 1974.
35. Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., and Youdim, M.B.H. MPTP mechanism of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. Pharmac. Mol. Pharmacol. Sect.* 208, 273-286, 1991.
36. Langstone, J.W., Ballard, P., and Irwin, R.A. Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 219, 979-980, 1983.
37. Burns, R.S., Markey, S.P., Phillips, J.M., and Chiueh, C.C. The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can. J. Neurol. Sci.* 11, 166-168, 1984.
38. Chiba, K., Trevor, A., and Castagnoli, N.J. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 574-578, 1984.
39. Markey, S.P., Johannesse, J.N., Chiueh, C.S., and Herkenham, M.A. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolic may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311, 464-467, 1984.
40. Adams, J.D., Johannessen, J.H.M., Schuller, J.P., Bacon, S.P., and Markey, S.P. The role of oxidative stress in the systematic toxicity of MPTP and MPP+. Academic Press

- New York. pp. 571-574, 1986.
41. Adams, J.D., Klaidman, L.K., and Leung, A.C. MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 181-186, 1993.
 42. Ali, S.F., David, S.N., Newport, G.D., Cadet, J.L., and Slikker, W.J. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species dopamine levels. *Synapse* 18, 27-34, 1994.
 43. Sriram, K., Pai, K.S., Boyd, M.R., and Ravindranath, V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 749, 44-52, 1997.
 44. Wong, S.S., Li, R.H.Y., and Stadlin, A. Oxidative stress induced by MPTP and MPP⁺: selective vulnerability of cultured astrocytes. *Brain Res.* 836:237-244, 1999.
 45. Poirier, J., Donaldson, J., and Barbeau, A. The specific vulnerability of the substantia nigra to MPTP is related to the presence of transition metals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 25-33, 1985.
 46. Thiffault, C., Aumont, N., Quirion, R., and Poirier, J. Effect of MPTP and L-Deprenyl on antioxidants enzymes and lipid peroxidation level in mouse brain. *J. Neuro. Int. Soc. Neurochem.* 2725-2733, 1995.
 47. Chan, P., Delanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., and Monte, D.D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* 57, 348-351, 1991.
 48. Ramsay, R.R., Salach, J.I., Dadgar, J., and Singer, T.P. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic Parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 267-275, 1986.
 49. Nicklas, W.J., Vyas, I., and Heikkila, R.E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridinium, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503-2508, 1985.
 50. Mizumo, Y., Saitoh, T., and Sone, N. Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase activity by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 294-299, 1987.
 51. Irwin, I. and Langston, J.W. Selective accumulation of MPP⁺ in the substantia nigra: a key to neurotoxicity. *Life Sci.* 36, 207-212, 1985.
 52. Bradbury, A.J., Costall, B., Domeney, A.M., Jenner, P., Kelly, M.E., Marsden, C.D., and Naylor, R.J. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is neurotoxic to the nigro-striatal dopamine pathway. *Nature* 319, 56-57, 1986.
 53. Mitra, M., Mohanakumar, K.P., and Ganguly, D.K. Resistance of golden hamster to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: relationship with low levels of regional monoamine oxidase-B. *J. Neurochem.* 62, 1906-1912, 1994.
 54. Alexi, T., Borlongan, C.V., Faull, R.L.M., Williams, C.E., Clark, R.G., Gluckman, P.D., and Hughes, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology* 60, 409-470, 2000.
 55. Mytilineou, C. and Cohen, G. Deprenyl protects dopamine neurons from the neurotoxic effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium ion. *J. Neurochem.* 45, 1951-1953, 1985.
 56. Kopin, I.J. Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animals. *Adv. Neurol.* 45, 137-144, 1987.
 57. Sabline, S.O., Krueger, M.J., Bachurin, S.O., Solyakov, L.S., Efange, S.M.N., and Singer, T.P. Oxidation products arising from the action of monoamine oxidase B on 1-methyl-4-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, A nonneurotoxic analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* 62, 2012-2016, 1994.
 58. Grunblatt, E., Mandel, S., Berkuzki, T., and Youdim, M.B.H. Apomorphine protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Movement Disorders* 14, 612-618, 1999.
 59. Heikkila R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S., and Duvoisin, R.C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitor. *Nature* 311, 467-469, 1984.
 60. Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C., and Yahr, M.D. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 106, 209-210, 1984.
 61. Koutsilieri, E., Chen, T.S., Rausch, W.D., and Riederer, P. Selegiline is neuroprotective in primary brain cultures treated with 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Eur. J. Pharmacol.* 306, 181-186, 1996.
 62. Le, W., Jankovic, J., Xie, W., Kong, R., and Appel, S.H. (-)-deprenyl of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition. *Neurosci. Letters* 224, 197-200, 1997.
 63. Rothblat, D.S. and Schneier, J.S. The effects of L-deprenyl treatment, alone and combined with GM1 ganglioside, on striatal dopamine content and substantia nigra pars compacta neurons. *Brain Res.* 779, 226-230, 1998.
 64. Royland, J.E., Delfani, K., Langston, J.W., Janson, A.M.,

- and Monte, D.A. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced ATP loss in the mouse striatum. *Brain Res.* 839, 41-48, 1999.
65. Foley, P., Gerlach, M., Youdim M.B.H., and Rieder, P. MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? *Parkinsonism Related Disorders* 6, 25-47, 2000.
66. Boireau, A. Dubedat, P., Bordier, F., Imperato, A., and Moussaou, S. The protective of riluzole in the MPTP model of Parkinson's disease in mice is not due to in MPP+ accumulation. *Neuropharmacol.* 39, 1016-1020, 2000.
67. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 1-15, 1986.
68. Miquel, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine* (Eds. Miquel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H.). CRC Press, Florida, Vol. 1, pp. 3-16, 1989.
69. Reiter, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526-533, 1995.
70. Klivenyi, P., Matthews, R., Wermer, M., Yang, L., MacGarvey, U. Becker, D., Natero, R., and Beal, M.F. Brief communication azulanyl nitron spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* 152, 163-166, 1998.
71. Wu, W.R. and Zhu, X.Z. Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of Ginkgo biloba extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci.* 65, 157-164, 1999.
72. Mohankumar, K.P., Muralikrishnan, D., and Thomas, B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 864, 281-290, 2000.
73. Thomas, T. Monoamine oxidase_B inhibitors in treatment Alzheimers disease. *Neuro. Aging*, 21, 343-348, 2000.
74. Zou, L.L., Xu, J., Jankovic, J., He, Y. Appel, S.H., and Le, W.D. Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. *Neurosci. Lettters* 281, 167-170.
75. Kojima, S., Matsuki, O., Nomura, T., Yamaoka, K., Takahashi, M., and Niki, E. Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low-dose γ -ray irradiation and its effect on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced brain damage. *Free Rad. Biol. Med.* 26:388-395, 1999.
76. 方藥中主編 實用中醫內科學 上海科學技術出版社, pp. 378-380, 1986.
77. 龔廷賢. 增補 萬病回春. 一中社, pp. 229-230, 1994.
78. 謝觀. 東洋醫學大辭典. 高文社, p. 302, 378, 1980.
79. 李旻. 編註 醫學入門(全五卷中二). 大星文化社, pp.180-182, 1984.
80. 孫思邈. 備急千金要方(卷四十). 杏林出版社, pp. 12-13, 1976.
81. 袁立人. 中醫老年病學. 上海中醫學院出版社, p. 142, 308, 1992.
82. 金昌玟, 辛民教, 安德均, 李京淳. 1997. 中藥大辭典. 圖書出版鼎談. 3권, pp. 1014-1022.
83. Rice-Evans, C. and Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 234, 279-293, 1994.
84. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., and Yagi, K. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. *Clin. Chem. Acta.* 79, 267-270, 1977.
85. 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. USA.* 84, 3521-3525, 1987.
86. Ellman, G.L., Coutney, K.D., Andres, V. Jr., and Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95, 1961.
87. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
88. Rush, G.F., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P., and Hewitt, W.R. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 78, 473-483, 1985.
89. Benzi, G. and Moretti, A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 77-101, 1995.
90. Benzi, G., and Moretti, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 16, 661-671, 1995.
91. Huang, T.T., Carlson, E.J., Leadon, S.A., and Epstein, C.J. Relationship of resistance to oxygen free radicals to CuZn-superoxide dismutase activity in trasgenic, transfected, and trisomic cells. *FASEB J.* 6, 903-910.
92. Schofield, D. and Braganza, J.M. Shortcomings of an automated assay for total antioxidant status in biological fluids. *Technical Briefs* 42, 1712-1714, 1996.
93. Rumley, A.G. and Patterson, J.R. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann. Clinical Biochem.* 35, 181-200, 1998.
94. Woodford, F.P. and Whitehead, T.P. Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful? *Annals of Clinical Biochemistry* 35, 48-56, 1998.
95. Mantle, D., Eddeb, F., Areni, K. Snowden, C., and Mendelow, A.D. Comparative antioxidant potential of

- anaesthetics and perioperative drugs in vitro. *Clinica Chimica Acta* 301, 41-53, 2000-a. Mantle, D., Eddeb, F., and Pickering, A.T. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 72, 47-51, 2000-b.
96. Husain, S.R., Cillard, J., and Cillard, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.* 26, 2489-2491, 1987.
 97. Driver, A.S., Kodavanti, P.R.S., and Mundy, W.R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol. Teratology* 22, 175-181, 2000.
 98. Weisburger, J.H. Effective human cancer prevention as goal for the regulation of environmental chemicals. *J. Environ. Health C8*, 339-351, 1991.
 99. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Food Sci. Technol. International* 6, 75-82, 1995.
 100. Peterson, D.M. Oat antioxidants. *Journal of Cereal Science* 33, 115-129, 2001.
 101. 徐榮浚, 申鉉喆, 尹哲浩, 鄭智天, 申億變. 三和散이 腦組織의 acetylcholine esterase 및 monoamine oxidase 活性에 미치는 影響. *韓方成人病學會誌*, 3, 78-92, 1997.
 102. 손정석, 류영수. 七福飲이 노화 백서 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향. *東醫神經精神科學會誌*, 8, 25-37, 1997.
 103. 崔龍垸, 成彊慶, 文炳淳. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究. *大韓韓醫學會誌*, 19, 392-409, 1998.
 104. Riederer, P. and Youdim, M.B.H. Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of Parkinsonian patients treated with L-deprenyl. *J. Neurochem.* 46, 1359-1365, 1986.
 105. Cross, A.J. and Joseph, M.H. The concurrent estimation of the major monoamine metabolites in human and non-human primate brain by HPLC with fluorescence and electrochemical detection. *Life Sci.* 28, 499-505, 1981.
 106. Naoi, M. and Nagatsu, T. Quinoline and quinaldine as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sci.* 40, 1075-1082, 1986.
 107. Thull, U. and Testa, B. Screening of unsubstituted cyclic compounds as inhibitors of monoamine oxidases. *Biochem. Pharmacol.* 47, 2307-2310, 1994.
 108. Baek, N.-I., Ahn, E.-M., Hahn, J.-T., Lee, D.W., Sohn, H.O., and Kwon, B.-M. Isolation of monoamine oxidase B inhibitory compound from the leaves of *Eucommia ulmoides*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 42, 166-169, 1999.
 109. Lee, S.-J., Chung, H.-Y., Lee, I.-K., Oh, S.-U. and Yoo, I.-D. Phenolics with inhibitory activity on mouse brain monoamine oxidase (MAO) from whole parts of *Artemisia vulgaris* L (Mugwort). *Food Sci. Biotechnol.* 9, 179-182, 2000.
 110. Lee, B.H., Choi, B.W., Ryu, G.S., Lee, E.S., Kang, K.J., Hwang, D.Y., and Hong, N.D. Screening of the acetylcholinesterase inhibitors from medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 28, 167-173, 1997.
 111. Borbe, H.O., Niebch, G., and Nickel, B. Kinetic evaluation of MAO-B activity following oral administration of selegiline and desmethyl-selegiline in the rat. *J. Neural. Transm. Suppl.* 32, 131-137, 1990.
 112. Folks, D. and Arnold, E.S. Pargyline-induced mania in primary affective disorder: case report. *J. Clin. Psychiatry* 44, 25-26, 1983.
 113. Taylor, J.R., Elsworth, J.D., Lawrence, M.S., Sladek, J.R., Roth, R.H., and Redmond, D.E. Spontaneous blink rates correlate with dopamine levels in the caudate nucleus of MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurology* 158, 214-220, 1999.
 114. Sayre, L.M., Arora, P.K., Iacofano, L.A., and Harik, S.I. Comparative toxicity of MPTP, MPP+ and 3,3-dimethyl-MPDP+ to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 124, 171-174, 1986.
 115. Sonsalla, P.K., Zeevalk, G.D., Manzino, L., Giovanni, A., and Nicklas, W.J. MK-81 fail to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridium in rats. *J. Neurochem.* 58, 1979-1982, 1992.
 116. Muthane, U., Ramsay, K.A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M., and Przedborski, S. Difference in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/BL and CD-1 mice. *Exp. Neurology* 126, 195-204, 1994.
 117. Widdowson, P.S., Farnworth, M.J., Upton, R., and Simpson, M.G. No changes in behavior, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats. *Human Exp. Toxicol.* 15, 583-591, 1996.
 118. Ferger, B., Spratt, C., Earl, C.D., Teismann, P., Oertel, W.H., and Kuschinsky, K. Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 353, 351-359, 1998.
 119. Yu, B.P., Lee, D.W., Marler, C.G., and Choi, J.H. Mechanism of food restriction: Protection of cellular homeostasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193, 13-15, 1990.
 120. Hung, H.C. and Lee, E.H.Y. MPTP produces differential

- oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 76-84, 1998.
121. Johnson, E.A., Wu, E.Y., Rollema, H., Booth, R.G., Trevor, A.J., and Castagnoli, N. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) analogs: in vivo neurotoxicity and inhibition of striatal synaptosomal dopamine uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 65-74, 1989.
122. Mccrodden, J.M., Tipton, K.F., and Sullivan, J.P. The neurotoxicity and the relevance to Parkinson's disease. *Pharm. Toxicol.* 67, 8-13, 1990.
123. Inoue, H., Castagnoli, K., van der Schyf, C., Mabic, S., Igarashi, K., and Castagnoli, N.Jr. Species-dependent differences in monoamine oxidase A and B-catalyzed oxidation of various C4 substituted 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinyl derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 856-864, 1999.
124. Birkmayer, W., Riederer, P., and Rausch, W.D. In *advances in neurology* (Poirier, L.H., Sourkes, T.L., and Bedard, J.P., eds). pp. 499-510, Raven Press, New York, 1979.
125. Paykel, E.S., Rowan, P.R., Rao, B.M., and Bhat, A. In *Treatment of Depression, Old Controversies and New Approaches* (Cayton, P.J., and Barnett, J.E., eds). pp. 237-252. Raven Press, New York, 1983.