

## 하고초의 Monoamine Oxidase 저해활성

황 금 희\*

건국대학교 바이오식의약연구센터

### Inhibitory Activity on Monoamine Oxidase of *Prunella vulgaris*

Keum Hee Hwang\*

Bio-Food and Drug Research Center, Konkuk University, Chungju-city, Chungbuk 380-701, Korea

**Abstract** – We examined the inhibitory activities against monoamine oxidase (MAO) of *Prunella vulgaris* *in vitro* and *in vivo* methods. Methanolic extract of *P. vulgaris* showed significantly inhibitory activities on MAO-A and MAO-B that were prepared from rat brain and liver *in vitro*. The inhibitory activities were measured by serotonin and benzylamine as substrates, respectively. MAO-A and MAO-B activities were potently inhibited by ethylacetate extracts of *P. vulgaris* *in vitro* tests. It was observed that those activities *in vivo* tests have different tendency each other. MAO-A activity was increased by the oral administration of methanolic extract of *P. vulgaris*, while MAO-B activity was decreased. Consequently, we suggest that *P. vulgaris* may have the effects on the inhibitory activities against MAO both *in vitro* and *in vivo*.

**Key words** – monoamine oxidase (MAO), serotonin (5-HT), *Prunella vulgaris*

하고초 (*Prunella vulgaris*)는 꿀풀과 (Labiatae)에 속한 다년생 초본으로 어린 순은 나물로 식용하고 한방에서는 지상부 말린 것을 하고초라 하여 고혈압에 유효한 약물로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 하고초의 생리활성연구로는 항 HIV 활성,<sup>2,4)</sup> 항염활성,<sup>5,6)</sup> 항알러지 활성,<sup>7,8)</sup> 항산화활성,<sup>6,9)</sup> 항 HSV 활성,<sup>10)</sup> 항돌연변이활성<sup>11)</sup>에 대한 보고가 있으며 ursolic acid 및 그 배당체인 prunellin, fenchone, flavonoid, 유기산류, 탄닌, 칼륨염 등의 성분이 보고되어 있고 국내의 한방에서 이용되고 있는 고혈압 치료의 목적을 설명할 수 있는 혈압조절 기전에 대한 연구보고와 monoamine oxidase 저해 활성 성분 에 대한 연구보고는 아직 없다.

모노아민산화효소 (Monoamine oxidase (amine: oxygen oxidoreductase (deaminating) EC1.4.3.4.)(MAO)는 중추신경계나 말초조직 등 동물조직 중의 미토콘드리아에 널리 존재하면서 신경 전달물질이나 호르몬성 아민 화합물의 대사를 관장하는 효소로서 다음과 같은 반응으로 아민 화합물의 산화적 탈아민 반응을 촉매 하여 신경전달물질과 식사와 장내 박테리아에 의해 유래되는 호르몬성 아민을 분해한다<sup>12)</sup> :  $RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2$

MAO는 내인성 기질로서 카테콜아민과 인돌알칼로이드도

는 그 유도체를 주로 이용하며 기질 특이성에 따라 세로토닌, 노르에피네프린, 에피네프린을 산화적으로 탈아민화시키는 A형과 벤질아민, 페네틸아민의 산화를 촉매 하는 B형의 두 가지 형으로 나눌 수 있다.<sup>13)</sup>

전보<sup>15)</sup>에서 한방의 치료이론인 기미론에 근거하여 분류한 한성약물들이 시험관내 실험에서 MAO 저해활성을 나타내는 것을 확인하여 보고한 바 있으며 본 연구에서는 MAO 저해 활성을 나타내는 자생식물을 이용하여 항우울, 항피로, Parkinson's disease 등의 중추신경계와 관련한 질환의 치료제 개발 및 운동 능력 향상을 위한 건강기능식품 소재를 개발하기 위하여 한성 약물로 분류된 200여종의 식물 중 MAO 저해활성이 우수한 하고초를 선정하여 동물을 이용한 시험관 실험에서 하고초 메탄올추출물의 각 용매분획이 MAO 저해활성을 갖는 것을 확인하였으며 경구투여를 통한 *in vivo* 실험을 통해 체내 MAO 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 하고초를 새로운 기능성 소재로 개발하기 위한 활성 성분연구를 계속하고 있다.

#### 재료 및 방법

**실험재료 및 시약** – 실험에 사용한 하고초는 서울시 소재 경동시장 대덕한의원에서 건조시킨 한약재를 구입하여

\*교신저자(E-mail) : hwang-kh@hanmail.net  
(FAX) : 043-840-3891

사용하였고 시료의 일부는 표준품(NP20-187)으로 보관하였다. 효소활성 측정에 사용한 세로토닌, 벤질아민, 이온교환수지 Amberlite CG-50 등은 Sigma사 제품을 사용하였고 기타 컬럼 크로마토그래피용 용매 및 시료 추출용 용매는 국산 특급 시약을 사용하였다.

**실험동물** - 5주령의 Sprague Dawley계 음성 흰쥐를 (주) 바이오제노믹스에서 공급받아 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm 10\%$ , 12시간 주기로 조명을 조절하는 동물 사육실에서 일반 고형 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 2~4주간 적응시킨 후 실험에 이용하였다.

### 하고초의 시험관내 MAO 저해활성

**시료의 추출 및 검액 조제** - 건조한 약재용 하고초 100 g을 정량하여 가정용 분쇄기로 1분간 마쇄하여 분말로 만들고 여기에 80% 메탄올 1000 ml를 가하여  $95^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 환류 냉각하면서 6시간 가열추출 하였다. 실온으로 식힌 후 여과하고 그 박을 80% 메탄올로 세척하여 여액이 1000 ml 되게 하고  $45^{\circ}\text{C}$  수욕상에서 감압농축 하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물을 상법에 따라 분획하여 클로로포름 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획, 물 분획을 각각 얻었다. 각 분획을 10 mg/ml 용액이 되도록 증류수로 녹이고 이 액을 원액으로 1(10 mg/ml), 1/2(5 mg/ml), 1/4(2.5 mg/ml) 희석액을 검액으로 사용하였다.

### Brain MAO-A의 효소활성 측정

1) **효소원의 조제** - 흰쥐의 뇌 조직을 이용하여 전보에 보고한 방법대로 조제한 단백질을 희석하여 효소원으로 사용하였다.<sup>14)</sup>

2) **효소활성 측정** - 조제한 효소원을 사용하여 문헌의 방법에 준하여 효소활성을 측정하고 각 실험군의 대조군을 기준으로 하여 효소 활성의 변화를 정해진 수식에 따라 계산하였다.<sup>14,15)</sup>

### Liver MAO-B의 효소활성 측정

1) **효소원의 조제** - 흰쥐의 간 미토콘드리아 분획을 상법에 따라 분리하여 효소원으로 사용하였다.

2) **효소활성 측정** - McEwen 등의 방법에 준하여 효소활성을 측정하고 각 실험군의 대조군을 기준으로 하여 효소 활성의 변화를 정해진 수식에 따라 계산하였다.<sup>16)</sup>

### 하고초 경구투여에 의한 rat MAO의 활성 변화 측정

1) **경구투여용 시료의 조제** - 건조한 하고초 100 g을 가정용 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 여기에 약 800 ml의 80% 에탄올 용액을 가하여 환류냉각하면서  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간씩 3회 반복하여 가열추출 하였다. 탈지면으로 여과하고 여액을  $40^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 감압 농축하여 에탄올 추출물 17.67 g을 얻었고 남아 있는 에탄올을 완전히 제거한 후 동결 건조하여 건조된 분말 16.00 g을 얻었다. 동결 건조한 분말을  $-80^{\circ}\text{C}$  deep freezer에 보관하고 실험 시 증류수에 녹여 사용하였다.

2) **시료의 경구투여** - 동결 건조한 하고초 분말 10 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 이 액을 실험 하루 전에 절식시킨 동물에게 전날 오후와 실험 당일 2시간 전에 2회에 걸쳐 4 ml 씩 경구 투여하였다. 대조군에는 같은 조건으로 증류수 4 ml 씩을 경구투여 하였다. 이 양은 시료 건조 중량으로 동물 체중 당 0.3 g/kg되는 양으로 사람 하루 용량에 대한 문헌치<sup>1)</sup> 18-20 g/60 kg에 해당하는 양이다.

3) **MAO의 활성 변화 측정** - 일반 실험실 조건에서 적응시킨 SD계 흰쥐 6마리를 한 군으로 하여 12시간 전에 절식시킨 동물에게 위에서 언급한 방법으로 조제한 하고초 동결건조 분말을 2회 경구투여 하고 2시간이 경과한 후 해부하여 좌심실에서 채혈하여 실험시킨 후 뇌와 간을 적출하여 MAO-A, MAO-B의 활성 변화를 측정하였다. 한편 약물 대신 증류수를 투여한 동물의 효소활성을 따로 측정하여 약물에 의한 효소활성의 변화에 대한 대조군으로 하였으며 MAO-A 및 MAO-B의 효소원 조제 및 효소활성 측정은 앞에서 서술한 방법에 준하였다.

**통계처리** - 실험 결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였으며<sup>17)</sup> Student t-test를 사용하여 유의차 검정을 하였다. 모든 통계는 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

**단백질 정량** - 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's method를 이용하여 측정하였다.<sup>18)</sup>

## 결과 및 고찰

**하고초 추출 및 용매분획** - 건조한 하고초 100 g을 정량하여 mixer로 1분간 마쇄하여 분말로 만들고 여기에 80% 메탄올 1000 ml를 가하여  $95^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 환류 냉각하면서 6시간 가열추출 하였다. 실온으로 식힌 후 여과하고 그 박을 80% 메탄올로 세척하여 여액이 1000 ml되게 하고  $45^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 감압농축 하여 메탄올 추출물 3.64 g을 얻었다. 이 추출물을 상법에 따라 분획하여 클로로포름 분획 1.20 g, 에틸아세테이트 분획 1.13 g, 부탄올 분획 0.86 g 및 물 분획 1.49 g을 각각 얻었으며 이들의 MAO 저해활성을 계산하여 표로 정리하였다(Table I).

**하고초의 각 용매분획이 시험관내 MAO 활성에 미치는 영향**

**용매분획의 시험관내 MAO-A 저해 활성** - 하고초의 용매 분획물 중에서 MAO(Monoamine Oxidase)-A와 MAO-B의 저해활성이 높은 에틸아세테이트 분획에 대해 성분연구를 수행하였다. 하고초 메탄올추출물은 시험관내에서 MAO-A의 효소활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났다. 메탄올 추출물의 MAO-A에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 1.8 mg/ml이었다. 에틸아세테이트 분획에서 가장 강한 MAO-A에 대한 저해활성이 확인되었으며 에틸아세테이트 분획의 MAO-A에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 1.2 mg/ml이었다. 클로로포름 분획의 경우도

**Table I.** MAO Inhibitory Activities of *Prunella vulgaris* (Solvent extraction and fractionation)

Fraction	Amount of extract (g)	MAO A			MAO B		
		IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/g)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/g)
80% MeOH	3.64	1.80	0.20 × 10 <sup>4</sup>	0.55 × 10 <sup>3</sup>	66	0.55 × 10 <sup>5</sup>	0.15 × 10 <sup>5</sup>
CHCl <sub>3</sub>	1.20	2.40	0.50 × 10 <sup>2</sup>	0.42 × 10 <sup>3</sup>	21	0.57 × 10 <sup>2</sup>	0.48 × 10 <sup>2</sup>
EtOAc	1.13	1.20	0.94 × 10 <sup>3</sup>	0.83 × 10 <sup>3</sup>	12	0.94 × 10 <sup>5</sup>	0.83 × 10 <sup>5</sup>
BuOH	0.86	1.90	0.45 × 10 <sup>3</sup>	0.53 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-
H <sub>2</sub> O	1.49	-	-	-	-	--	-

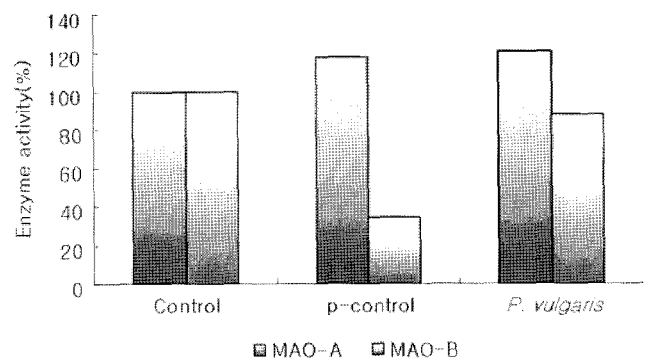
\*One unit is defined as a sample amount to give 50% inhibition against MAO activities.

MAO-A에 대한 저해활성을 나타내 IC<sub>50</sub> 값이 2.40 mg/ml로 나타났으며 부탄올 분획은 MAO-A에 대해 저해활성을 나타내 IC<sub>50</sub> 값은 1.90 mg/ml이었다. 물 분획의 경우는 MAO-A에 대해 저해활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다(Table I).

**용매분획의 시험관내 MAO-B 저해 활성** - 하고초 추출물은 MAO-B에 대한 저해활성이 MAO-A에 대한 저해활성에 비해 강하게 나타나는 특징을 나타냈다. 메탄올 추출물의 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 66 μg/ml이었다. 에틸아세테이트 분획에서 가장 강한 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되었으며 에틸아세테이트 분획의 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 12 μg/ml이었다. 클로로포름 분획의 경우도 MAO-B에 대한 저해활성을 강하게 나타내 IC<sub>50</sub> 값이 21 μg/ml으로 나타났으며 부탄올 분획과 물 분획의 경우는 MAO-B에 대해 저해활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 최근 Parkinson's disease의 치료약물로 널리 이용되고 있는 MAO 저해제들은 대부분 MAO-B 저해제들이다. 하고초의 경우 MAO-A에 대한 저해활성은 비교적 약한 반면 MAO-B에 대한 저해활성이 특징적으로 강하게 나타나는 점과 식품공전에 식용으로 사용이 가능한 식물로 등재되어 있어 독성은 없는 것으로 추정되며 식용으로 이용되어 온 식물들이 특징적으로 아주 강한 생리활성을 나타내지 않는 것을 고려할 때 아주 훌륭한 건강기능식품 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 각 분획의 활성 측정 결과 얻어진 IC<sub>50</sub> 값과 specific activity를 계산하여 Table I에 요약하였다.

**하고초 메탄올 추출물이 체내 MAO 활성에 미치는 영향** - 실험동물에게 대표적인 한성약물인 황련을 경구로 투여했을 때 MAO-A는 그 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며 MAO-B의 경우 역시 농도 의존적으로 활성이 현저히 감소한다는 사실을 보고한 바 있으며<sup>15)</sup> 한성약물인 하고초를 경구로 투여했을 때 운동 중 동물 체내의 MAO 활성에 미치는 효과가 황련과 비슷하게 나타날 것으로 기대하고 하고초 추출물을 경구 투여한 흰쥐의 뇌와 간에서 MAO-A 및 MAO-B의 활성 변화를 측정하였다.

**MAO-A와 MAO-B의 효소활성 변화** - Fig. 1에 나타난



**Fig. 1.** Changes of MAO activities on rat oral administered of *Prunella vulgaris*.

The reaction mixture for MAO-A assay (final volume 1 mL) contained appropriate amount of the crude enzyme, and substrate (serotonin). This incubation mixture was started by adding substrate. The reaction mixture was incubated for 90 min at 37°C in air. The reaction mixture for MAO-B assay (final volume 1 mL) contained appropriate amount of the crude enzyme, and substrate (benzylamine). The enzymatic activity was measured according to the spectrophotometric procedure as described in the experimental method. Deprenyl was used as a positive control.

것처럼 하고초 추출물 대신 증류수를 투여한 대조군의 효소활성을 기준으로 비교해 보면 MAO-A는 하고초 추출물에 의해서 효소활성이 증가되는 것으로 나타났으며 MAO-B는 효소활성이 감소하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 한성 및 열성스트레스 상태에 있는 동물에게 약물을 경구투여하고 효소활성의 변화를 관찰한 실험에서 확인된 결과와 같은 경향을 나타내는 것으로 확인되었다. 즉 한성약물을 경구투여하고 한성 및 열성 스트레스를 유발시킨 경우 열성스트레스에 의해 감소된 MAO-A의 활성을 현저히 증가시키므로써 병증의 개선효과를 기대하게 하는 반면, 한성 스트레스 유발 시에도 MAO-A의 효소활성은 증가되어 기론에 의한 한의학의 약리학적 해석이 MAO 활성 변화로 설명될 수 있음을 확인한 저자 등의 이전 실험 결과와 일치되는 결과임을 알 수 있었다.<sup>19)</sup> 또한 이 결과는 시중에서 Parkinson's

disease의 치료약물로 이용되고 있는 MAO-B 저해제인 deprenyl을 양성대조약물로 이용하여 실험한 결과와도 일치하였다.

## 결 론

실험동물에게 하고초 메탄올 추출물을 경구투여한 후 동물의 체내에서 일어나는 MAO의 활성변화를 관찰하였다. 한편, 하고초 추출물의 용매 분획물들이 시험관 내에서 효소활성에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

위의 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 동물에게 하고초 추출물을 경구 투여했을 때 MAO의 활성을 변화시키며, MAO-A는 활성이 증가되고 MAO-B는 활성이 감소하는 것으로 관찰되었다.
2. 하고초 메탄올추출물은 시험관내에서 MAO-A 및 MAO-B의 효소활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났으며 메탄올 추출물의 MAO-A 및 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.8 mg/ml과 66 µg/ml이었다.
3. 하고초 용매분획을 대상으로 효소활성에 대한 저해효과를 측정하여 에틸아세테이트 분획에서 가장 강력한 MAO-A 및 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되었으며 에틸아세테이트 분획의 MAO-A 및 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.20 mg/ml과 12 µg/ml이었다.
4. 클로로포름 분획의 경우도 MAO-A에 대한 저해활성을 나타내 IC<sub>50</sub> 값이 2.40 mg/ml으로 나타났으며 MAO-B에 대한 저해활성이 강하게 나타나 IC<sub>50</sub> 값이 21 µg/ml으로 나타났다.
5. 부탄올 분획은 MAO-A 대해 비교적 강한 저해활성을 나타내 IC<sub>50</sub> 값은 1.10 mg/ml이었으며 MAO-B에 대한 저해활성은 나타내지 않았다. 물 분획의 경우는 MAO-A와 MAO-B에 대해 저해활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.
6. 이상의 결론으로부터 하고초는 MAO 저해활성을 나타내는 우수한 식물로 운동능력향상, 피로회복, 우울증 개선, Parkinson' disease 등을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(과제번호PF002201-03)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 이창복 (1979) 대한식물도감. 향문사. 서울
2. Liu, S., Jiang, S., Wu, Z., Lv, L., Zhang, J., Zhu, Z., and Wu,

- S. (2002) Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotte*. *Life Sci.*, **71**: 1779-91.
3. Lam, T.L., Lam, M.L., Au, T.K., Ip, D.T., Ng, T.B., Fong, W.P., and Wan, D.C. (2000) A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci.*, **67**: 2889-96.
4. Kageyama, S., Kurokawa, M., and Shiraki, K. (2000) Extract of *Prunella vulgaris* spikes inhibits HIV replication at reverse transcription *in vitro* and can be absorbed from intestine *in vivo*. *Antivir. Chem. Chemother.* **11**: 157-64.
5. Jung, Y.B., Roh, K.J., Jung, J.A., Jung, K., Yoo, H., Cho, Y.B., Kwak, W.J., Kim, D.K., Kim, K.H., and Han, C.K. (2001) Effect of SKI 306X, a new herbal anti-arthritis agent, in patients with osteoarthritis of the knee: a double-blind placebo controlled study. *Am. J. Chin. Med.*, **29**: 485-91.
6. Ryu, S.Y., Oak, M.H., Yoon, S.K., Cho, D.I., Yoo, G.S., Kim, T.S., and Kim, K.M. (2000) Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med.* **66**: 358-60.
7. Au, T.K., Lam, T.L., Ng, T.B., Fong, W.P., and Wan, D.C. (2001) A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci.*, **68**: 1687-94.
8. Liu, F. and Ng, T.B. (2000) Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci.*, **166**: 725-35.
9. Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., and Carnat, A. (1991) Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. Lamaison, J.L., *Phar. Acta. Helv.*, **66**: 185-8.
10. Xu, H.X., Lee, S.H., Lee, S.F., White, R.L., and Blay, J. (1999) Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.*, **44**: 43-54.
11. Lee, H. and Lin, J.Y. (1988) Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat. Res.*, **204**: 229-34.
12. Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H. (1996) The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford university press. NY.
13. Felner, A. E. and Waldmeier, P. C. (1979) Cumulative effects of irreversible MAO inhibitors *in vivo*. *Biochem. Pharmac.* **28**: 995-1002.
14. Hwang, K.H. and Lim, S.H. (2003) Monoamine oxidase inhibitory activities of Korean medicinal plants classified to cold drugs by the theory of KIMI. *Food Science and Biotechnology* **12**: 238-241.
15. Hwang, K.H., Kim, I.R. and Han, Y.N. (1999) Effects of cold and hot drugs on the activity of monoamine oxidase. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 145-150.

16. McEwen, C. M., Cohen, J. R. and Cohen, J. D. (1963) An amine oxidase in normal human serum. *J. Lab. Clin. Med.* **62**: 766-776.
17. SAS: SAS User's Guide, Statistics (1988) SAS Institute Inc., Cary, NC.
18. Daniel, M.B. and Stuart, J.E. (1990) Protein Methods. Wiley-Liss, NY.
19. Hwang, K.H., Ma, J.Y. and Kim, I.R. (1999) The studies on the theory of KIMI by the activity of monoamine oxidase. *Kor. J. Herbology.* **14**: 1-14.

(2006년 7월 11일 접수)