

## 청열약 추출물들의 아세틸콜린에스테라제 저해와 베타아밀로이드 펩티드 응집 억제 효능

권영이\*

우석대학교, 약학대학, 전라북도 완주군 삼례읍 우) 565-701

## Inhibitory potency of Acetylcholinesterase and Amyloid beta(1-42) peptide aggregation to the Extracts of Enthusiasm Reducing herbals

Young-Ee Kwon\*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samnye-eup, Wanju-gun, Jeonbuk 565-701, Republic of Korea

**Abstract** – Inhibition of acetylcholinesterase and amyloid beta(1-42) peptide is good drug targets for Alzheimer's disease therapeutics. Among the twenty enthusiasm reducing herbals, the 70% methanol extracts (1 mg/ml) of *Moutan Radicis Cortex* and *Forsythiae Fructus* showed 91.5% and 85.3% about acetylcholinesterase inhibition, respectively. The extracts (1 mg/ml) of *Coptidis Rhizoma* and *Paeoniae Radix Rubra* showed more than 85% inhibition rate against amyloid beta (1-42) peptide aggregation. The neuroprotective effect of the extracts (1 mg/ml) of *Moutan Radicis Cortex*, *Forsythiae Fructus* and *Paeoniae Radix Rubra* showed 90.0%, 87.4% and 85.1% to compare with amyloid beta (1-42) peptide treated cells (IMR-32), respectively. Three herbs, *Moutan Radicis Cortex*, *Forsythiae Fructus* and *Paeoniae Radix Rubra* are promising candidates from natural products for development of Alzheimer's disease therapeutics.

**Key words** – Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, amyloid beta(1-42), *Moutan Radicis Cortex*, *Gardeniae Fructus*

오늘날 알츠하이머병은 암, 심장질환, 뇌졸중에 이어 노인 사망의 네 번째 원인이 되었으며, 85세 이상 인구의 약 47%가 알츠하이머병 증상을 나타내고 있고, 국내환자 수는 약 28 만 명인 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병은 1910년 독일의 신경병리학자인 Alois Alzheimer에 의해 발견되었고, 원인은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 약 5%만이 유전적이며, 95%는 환경 및 복합적인 원인으로 발병하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 원인으로는 amyloid precursor protein (APP), presenillin 1 (PS1), presenillin 2 (PS2) 유전자등의 변이로 인한 뇌의 기질적인 병변으로 신경세포나 조직이 파괴되어 중추신경계의 이상을 불러일으키는 신경퇴행성 질환으로 알려져 있다.<sup>2-3)</sup> 알츠하이머병의 주요한 원인은 뇌신경전달 물질인 acetylcholine의 뇌중 농도의 감소와 베타아밀로이드 단백질의 응집으로 인한 뇌세포의 퇴행으로 알려져 있다.<sup>4-5)</sup> 중추신경계의 choline system 관련 신경전달물질들과 이들

의 세포내 대사에 관여하는 효소 및 유전자들과 APP와 관련된 유전자 및 효소들의 대사는 상호 상관관계가 있을 것으로 예상되었고, 최근 문헌에 이들의 상호관계에 대한 연구결과가 보고되었다.<sup>6-10)</sup> 현재까지 미국 식품의약품안전청으로부터 알츠하이머병 치료제로 승인받아 임상에서 사용되는 의약품은 모두 아세틸콜린 억제제로 tacrine (Cognex<sup>TM</sup>),<sup>11)</sup> donepezil (Aricept<sup>TM</sup>),<sup>12)</sup> rivastigmine (Exelon<sup>TM</sup>)<sup>13)</sup> 등과 천연물 추출 성분인 galanthamine (Reminyl<sup>TM</sup>)<sup>14)</sup>이 있다.

신경병리학적인 연구에서 베타아밀로이드 펩티드가 알츠하이머병을 유발시키는 신경섬유종을 만드는 가장 주요한 물질임이 밝혀져, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 베타아밀로이드 펩티드는 38개에서 43개정도의 아미노산으로 이루어져있는데 특히 신경세포에 독성을 일으키는 것은 42개의 펩티드로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 특히, 뇌신경세포에서 베타아밀로이드 펩티드 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>)가 과잉 생성되고 이들이 응집을 일으켜 계속 불용성 아밀로이드 덩어리를 형성하여 병변을

\*교신저자 (E-mail): yekwon@ws.ac.kr  
(FAX): 063-290-1812

유발한다는 증거가 발견되면서 베타아밀로이드 펩티드 응집억제는 효과적인 새로운 치매치료제를 개발하는데 있어서 주요한 약물표적이 되었다.<sup>16)</sup>

이에 본 저자는 청열약이 치매치료에 효능을 나타내는지 검토하기 위하여 청열약 중 사용빈도수가 비교적 높은 생약인 목단피, 지모, 치자, 하고초, 금은화, 진피, 죽엽, 결명자, 적작약, 생지황, 연고, 포공영, 어성초, 자근, 황련, 황금, 황백, 모근, 고삼, 노근 등 20종 생약 추출물에 대하여 아세틸콜린에스테라제 저해 효능과 베타아밀로이드 펩티드 응집억제 효능을 시험하였고, 이들 생약 중 비교적 효능이 좋은 목단피, 치자, 적작약, 연고, 황련에 대한 신경세포보호능을 시험하여 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**시약 및 기기** - Acetylcholinesterase의 활성 측정에 사용한 Acetylcholinesterase (Type V-S), acetylcholine iodide, 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), neostigmine bromide는 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였으며, 기기는 UV-VIS Spectrophotometer (SmartSpec3000, BioRad)와 Fusion spectrophotometer (Packard BioScience Company)를 사용하였다. 베타아밀로이드의 응집 정도를 측정하는데 사용한 베타아밀로이드 (A $\beta$ 1-42)는 미국의 아메리칸 펩티드사 (American Peptide Co. USA)의 제품을, thioflavinT, phosphate buffered saline tablet, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]는 미국의 시그마 화학 회사의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급의 시약을 사용하였다. 형광분광분석기는 일본의 시마즈사 (RF-5300PC, Shimadzu Corp.)의 기기를 사용하였다.

**실험재료 및 추출** - 실험에 사용한 청열약에 속하는 생약인 목단피, 지모, 치자, 하고초, 금은화, 진피, 죽엽, 결명자, 적작약, 생지황, 연고, 포공영, 어성초, 자근, 황련, 황금, 황백, 모근, 고삼, 노근 등 20종 생약은 경동시장에서 포장된 제품을 구입하였다. 각각의 생약은 70% 메탄올을 추출용매로 사용하여 Soxhlet 장치로 약 2시간 가열하여 추출 후 용매를 수용액상에서 감압농축 후, 동결 건조하여 사용하였다.

**아세틸콜린에스테라제 저해활성 측정** - Acetylcholinesterase 저해 활성 측정은 Ellman법을 변형하여 행하였다. 효소는 일정량씩 분주하여, -80°C하에서 보관하였으며, 최종 농도는 0.03 unit의 농도로 사용하였으며, 기질은 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 녹인 1000  $\mu$ M의 acetylcholine iodide를 사용하였으며, 발색 시약은 39.6 mg의 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)와 15 mg의 sodium bicarbonate를 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml에 녹여 제조하였다. 효소 반응은 다음과 같이 전개하

였다. 2 ml의 sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 200  $\mu$ l의 DTNB 용액과 100  $\mu$ l의 효소 (0.03 U)를 가한 뒤 37°C에서 10분간 preincubation을 하고, 기질 200  $\mu$ l를 가해 3분간 반응 후 흡광도 (412 nm)를 측정하였다.

**베타아밀로이드(A $\beta$ 1-42) 응집 저해활성 측정** - 베타아밀로이드의 응집 정도 측정은 형광 분석법 (ThioflavinT assay)을 이용하였다. 베타아밀로이드 (A $\beta$ 1-42) 펩티드는 영하 80 °C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종농도는 5  $\mu$ M의 농도로 사용하였다. 합성된 화합물은 실험직전 99.5%의 DMSO에 녹여 완충용액으로 농도별로 희석하여 사용하였으며, 형광물질로 사용하는 5  $\mu$ M의 thioflavinT는 0.01 M 인산소다완충용액에 녹여 제조하였다. A $\beta$ 1-42응집억제 정도를 측정하기 위하여 0.01 M 인산소다완충용액 92.5  $\mu$ l에 일정농도로 만든 생약 추출물 5  $\mu$ l 씩 가하고, 5  $\mu$ M A $\beta$ 1-42 2.5  $\mu$ l를 가한 뒤, 37°C에서 26시간 배양하여 응집시키고, 5  $\mu$ M thioflavinT 2,000  $\mu$ l를 가하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 이때 사용한 형광 분광분석기의 파장 값은 Ex = 446 nm (slit width = 5 nm), Em = 490 nm (slit width = 10 nm)이며, 동일한 실험을 적어도 3회 이상 반복하였다.

**치매세포모델 제작 및 신경세포 손상 억제능 검색** - 사람 신경세포인 IMR-32 cell은 ATCC에서 구입하였고, 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL, Gaithersburg, Md., USA), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 g/ml) 첨가된 EMEM (ATCC, USA) 배지에서 37, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 대수 증식기까지 배양하였다. 배양된 IMR-32 세포를 9 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 농도로 96-well plate에 심고 2시간 동안 안정화 후 beta-amyloid 단독처리군, beta-amyloid (최종 농도 20 uM/0.1% acetic acid) 와 천연물 추출물들을 각각 0.1 mg/ml 농도로 같이 처리한 군으로 나누어 48시간동안 37, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 세포를 배양하였다. MTT 시약 (5 mg/ml)을 50 ul/well 씩 가하여 4시간 반응시킨 후 DMSO 100 ul/well 가한 후 ELISA plate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 공시험으로 보정하고, 같은 시험을 3개 well에서 3회 이상 실시하였다.

## 결과 및 고찰

문헌에 의하면 주로 이열 (裏熱)을 청해 (淸解)하는 약을 청열약 (淸熱藥)이라한다. 청열약은 약성이 한량 (寒涼)하고 청열사화 (淸熱瀉火), 조습 (組濕), 양혈 (涼血), 해독 (解毒) 및 청허열 (淸虛熱)하는 효능이 있으며, 염증을 완화시키고 항근작용이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 치매는 뇌세포의 퇴화로 말미암아 기억력, 인지능력 감퇴, 학습력 저하 등의 증세를 나타내게 되는 질환이다. 뇌세포가 퇴화는 많은 원인

**Table I.** Acetylcholinesterase inhibition and A $\beta$  aggregation inhibition of each extracts of the Enthusiasm Reducing herbals

No.	生藥	Pharmacognogy Latin name	AChE Inhibition (%, 1 mg/ml)	A $\beta_{1-42}$ aggregation Inhibition (%, 1 mg/ml)
1	牡丹皮	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	91.5	29.8
2	知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	9.2	43.1
3	梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	67.8	73.9
4	夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	5.1	0
5	金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	22.2	37.2
6	陳皮	<i>Citri Rericarpium</i>	41.9	48.5
7	竹葉	<i>Lophatheria Herba</i>	5.2	36.7
8	決明子	<i>Cassiae Semen</i>	22.5	10.8
9	赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	65.2	85.2
10	生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	5.4	3.9
11	連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	85.3	56.5
12	蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	10.5	3.5
13	魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	5.8	45.9
14	紫根	<i>Lithospermi Radix</i>	12.1	0
15	黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	35.6	85.9
16	黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	25.6	5.8
17	黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	29.6	6.5
18	茅根	<i>Imperatae Rhizoma</i>	35.8	66.7
19	苦參	<i>Sophorae Radix</i>	45.9	6.2
20	蘆根	<i>Phragmitis Rhizoma</i>	23.1	2.5

Each natural herbals were extracted from 70% methanol. The detection of acetylcholinesterase inhibition was tested by Ellman's method and the calculation was performed the following formular. Inhibition rate(%)=[1-(Test O.D.-Test blank O.D.)/(control O.D.-control blank O.D.)]×100. The each value of A $\beta$  aggregation inhibition was got from Thioflavin T assay using fluorospectrometer.

이 있으나 노화가 주된 원인으로 노화로 인하여 혈액 중 활성산소나 노화물질이 많아지면서 더욱 가속화되는 것으로 알려져 있다. 이에 본 저자는 청열약의 양혈작용에 관심을 가지게 되었고, 치매와의 연관성을 검토하기 위하여 청열약 중 사용빈도수가 비교적 높은 생약 20종의 70% 메탄올 추출물 1 mg/ml 농도에서 치매치료에 효과적인 약물표적인 아세틸콜린에스테라제 저해작용과 A $\beta_{1-42}$  펩티드 응집 저해 효능을 검색하였고, 그 시험결과를 Table I에 나타내었다. 아세틸콜린에스테라제에 대하여 가장 높은 저해율을 나타낸 생약은 목단피로 91.5% (1 mg/ml)을 나타내었고, 그 다음으로 동일 농도에서 연교 85.3%, 치자 67.8%, 적작약 65.2%의 저해능을 보여주었다. 지모, 하고초, 죽엽, 생지황, 어성초는 아세틸콜린에스테라제 저해능이 거의 없는 것으로 나타났다. A $\beta_{1-42}$  응집 저해능은 황련 85.9%, 적작약 85.2%로 비슷한 경향을 보여주었고, 그 다음으로 치자 73.9%, 모근 66.7%, 연교 56.5%의 순으로 활성을 나타내었으며, 하고초, 결명자, 생지황, 자근, 황금, 황백, 고삼, 노근은 거의 활성이 나타나지 않았다. 따라서, 비교적 생리활성을 나타낸 생약인 목단피, 치자, 적작약, 연교, 황련 추출물에 대한

신경세포 보호능을 시험하여, 치매치료에 효능을 가질 수 있는지에 대하여 검토하기로 하였다. 목단피의 주성분은 phenol류, monoterpene glycoside류, tanin류 및 stilbene류이며 알려진 약리작용으로는 항균, 항바이러스, 항염, 통경, 진정, 항산화 및 혈압강화작용이 있으며, 돌연변이 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다. 치자의 주성분은 iridoid류, monoterpeneoid류 및 quinic acid류 등이 있으며, 알려진 약리작용으로는 이담, 간기능강화, 간세포보호, 혈압강하, 항산화작용등이다. 적작약은 작약과 성분이 거의 같아 paeoniflorin 계열 유도체와 tannin류 및 oleanolic acid, hederagenin, betulinic acid 등이 있으며, 알려진 약리작용으로는 진정 및 신경작용, 혈압강하, 항종양작용 및 면역증강 작용이다. 연교의 주성분은 lignan계 화합물과 caffeic acid glycoside, triterpenoid alc flavonoid이며, 약리작용은 항균, 항바이러스, 강심, 이뇨, 진토, 항알러지작용 및 뇌세포 보호 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 황련의 주성분은 isoquinoline alkaloid, phenol성 화합물, lignan계 화합물, coumarinolignane등이 있으며, 약리작용은 항균, 항염, 중추신경억제작용등이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup>

**Table II.** Neuroprotective effect of the extracts of natural products against neuron cell line, IMR-32 by MTT assay

No.	生藥	Pharmacognogy Latin name	Cell viability (0.1 mg/ml)
	Control	Aβ <sub>1-42</sub> (20 μM)	49.1%
1	牡丹皮	Moutan Radicis Cortex	90.0%
3	梔子	Gardeniae Fructus	68.0%
9	赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	85.1%
11	連翹	Forsythiae Fructus	87.4%
15	黃連	Coptidis Rhizoma	76.4%

The neuroprotective effect against neuron cells was determined by MTT assay and the calculation was performed the following formular.

Cell viability (%)=(Test O.D.-Test blank O.D./control O.D.-control blank O.D.)×100

신경세포주인 IMR-32에 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드를 20 μM 농도로 처리하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 세포생존율은 49.1%로 나타나 약 50%의 신경세포손해가 일어난 치매세포모델이 되었음을 확인하였다. 목단피, 치자, 적작약, 연교 및 황련 추출물의 치매세포모델에 대한 신경세포 보호능 시험 결과는 Table II에 나타내었다. 목단피 추출물은 대조군의 세포생존율을 100%로 보았을 때 90%의 세포생존율을 나타내었고, 적작약 85.1%, 연교 87.4%, 황련 76.4%, 치자 68% 순으로 세포생존율을 보여주었다. 이 시험결과는 이들 생약 추출물이 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드로 인하여 세포독성을 일으킨 신경세포에 대하여 세포보호효과를 나타낸 것으로 판단된다. 따라서, 시험대상 청열약 20종 중 치매 효능 약물표적인 아세틸콜린에스테라제 억제에 대하여 비교적 좋은 활성을 나타낸 생약은 목단피와 연교이며, Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드 응집억제에 대하여 비교적 좋은 활성을 보여준 생약은 적작약과 황련으로 나타났으며, 뇌세포신경 보호효능을 나타낸 생약은 목단피, 연교, 적작약으로 나타났다. 본 연구결과 이들 3종 생약은 치매에 효능을 나타낼 수 있는 후보 생약으로 간주될 수 있으며, 이들의 개개 성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 인용문헌

1. Khachaturian Z.S. (1985) Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.* **42**, 1097.
2. Selkoe D.J. (1999) Translating Cell Biology into Therapeutic Advances in Alzheimer's Disease. *Nature*, **399**, A23-A31.
3. Hollander E, Mohs R.C., Davis K.L. (1986) Cholinergic Approaches to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Br.*

- Med. Bull.* **142**, 97.
4. Pietrzik C., Behl C. (2005) Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 173.
5. Silverberg G.D., Mayo M., Saul T., Carvalho J., McGuire D. (2004) Novel ventriculo-peritoneal shunt in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *Expert. Rev. Neurother.* **4**, 97.
6. Cottingham M.G., Voskuil J.L., Vaux D.J. (2003) The intact human acetylcholinesterase C-terminal oligomerization domain is alpha-helical *in situ* and in isolation, but a shorter fragment forms beta-sheet-rich amyloid fibrils and protofibrillar oligomers. *Biochemistry*, **42**, 10863.
7. Prous J., Rabassedá X., Castaner J. (1996) SDZ-ENA-713 Cognition Enhancer Acetylcholinesterase Inhibitor. *Drugs Future*, **19**, 656.
8. Lilienfeld S. (2002) Galantamine-a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* **8**, 159.
9. Cottingham M.G., Hollinshead M.S., Vaux D.J. (2002) Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Biochemistry*, **41**, 13539.
10. De Ferrari G.V., Canales M.A., Shin I., Weiner L.M., Silman I., Inestrosa N.C. (2001) A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*, **40**, 10447.
11. Kurz A. (1998) The therapeutic potential of tacrine. *J. Neural Transm. Suppl.* **54**, 295.
12. Sugimoto H. (2001) Donepezil hydrochloride: a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* **1**, 63.
13. Jann M.W. (2000) Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, **20**, 1.
14. Zarotsky V., Sramek J.J., Cutler N.R. (2003) Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **60**, 446.
15. Barril X., Orozco M., Luque F.J. (2001) Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. *Mini. Rev. Med. Chem.* **1**, 255.
16. Gong Y., Chang L., Viola K.L., Lacor P.N., Lambert M.P., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A-beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 10417.
17. 본초학 (2004) 영림사, 편집부, 777p
18. 생약학 (2006) 동명사, 생약학교재편찬위원회, 523p, 420p

(2007년 11월 5일 접수)