

콜린 에스테라제 저해효과 보유 식물 추출물 탐색

박셋별¹, 이정훈², 김형돈², 서경혜², 정현수¹, 김동휘³, 이승은^{2*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, 공무직, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, 농업연구사,
³농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, 농업연구관

Screening of Plant Extracts with Cholinesterase Inhibition Activity

Saet-Byul Park¹, Jeong-Hoon Lee², Hyung-Don Kim², Kyung-Hae Soe², Hyeon-Soo Jeong¹,
Dong-Hwi Kim³ and Seung-Eun Lee^{2*}

¹Assistant, ²Researcher and ³Senior Researcher, Department of Herbal Crop Research,
National Institute of Horticultural & Herbal Science, Eumseong 27709, Korea

Abstract - This study was conducted to select candidates from plant resources for the purpose of improving or treating Alzheimer's disease, a type of dementia. One hundred and eighty-four plant extracts at a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were screened to determine their capacity to inhibit acetylcholinesterase (AChE) by *in vitro* assay. From this AChE assay, seven plant extracts - including methanol ext. and water ext. of *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark), methanol ext. of *Nelumbo nucifera* Gaertn (stamen/ovary), methanol ext. of *Persicaria tinctoria* H. GROSS (flower), methanol ext. of *Coptis chinensis* (rhizome), ethanol ext. of *Cinnamomum cassia* Blume(bark) and ethanol ext. of *Carthamus tinctorius* L. (fruit) - showed effective inhibition activity ranging from 18.7% to 63.1%. The selected extracts were testified their inhibition activities on AChE and BuChE (butyrylcholinesterase) at concentrations of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the AChE assay, five extracts including methanol ext. of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary), methanol ext. of *Persicaria tinctoria* H. GROSS (flower), methanol ext. of *Coptis chinensis* (rhizome), methanol ext. and water ext. of *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark) showed inhibition activity of 15.0%~73.5%, 19.5%~63.5%, 81.6%~58.5%, 69.9%~80.5%, and 54.8%~78.3%, respectively, at concentrations of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the BuChE assay, the extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary), *Persicaria tinctoria* H. GROSS (flower), and *Coptis chinensis* (rhizome) showed inhibitory capacities of 58.9~81.6%, 45.8%~72.4%, and 33.1%~55.4% at concentrations of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. In conclusion, it is suggested that *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary), *Persicaria tinctoria* H. GROSS, *Coptis chinensis* (rhizome) and *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark) could be selected as candidate materials for improving or treating Alzheimer's disease on the basis of further study.

Key words - Alzheimer's disease, Cholinesterase, Cognition, Dementia

서 언

고령화 현상이 사회문제가 됨에 따라 노인성 질환에 관한 연구의 중요성이 강조되고 있으며, 의학 발달로 높아진 평균수명을 통해 치매는 발병률과 유병률이 점점 높아지고 있는 추세이다(Evans *et al.*, 1989; Nordberg, 1996).

치매는 혈관성치매, 루이소체 질환, 알츠하이머 병 등을 포함하는 신경퇴행성 질환으로서 60세 이상의 치매환자 중 50~

60%가 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)을 앓고 있다. 기본적인 치매 증상으로 기억력 감퇴 및 인지능력 저하가 있고, 그 중 알츠하이머 치매는 인지능력을 점차적으로 저하시키며 기억력 감퇴, 인지력 감소, 우울증 등으로 인해 일상생활 수행에 심각한 영향을 미친다(Alzheimer's Association, 2006).

알츠하이머병은 기억과 관련된 콜린성 신경계에서 신경전달물질 중 하나인 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)이 관여하고 있다고 알려져 있고, 알츠하이머 환자의 뇌 신경절에서 콜린성 신경계의 퇴화는 아세틸콜린 양의 감소에 따른 결핍 현상과 기억과 연관된 해마의 구조적 이상을 만들며, 아세틸콜린 농도 감

*교신저자: E-mail herbin3@korea.kr

Tel. +82-043-871-5782

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

소로 아세틸콜린을 생성하는 신경세포의 손상과 아세틸콜린 분해 효소인 acetylcholinesterase(AChE) 활성의 증가로 인해 기억장애는 더욱 악화된다(Kim *et al.*, 2005; Kasa *et al.*, 2000).

그러므로, 근래에 아세틸콜린의 농도 감소를 늦추기 위해 AChE 저해제에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 알츠하이머 증상을 완화시키고 병의 진행속도를 늦출 수 있는 치매치료제로 타크린(tacrine: Cognex®), 도네페질(donepezil hydrochloride: Aricept®), 리바스티그민(rivastigmine: Exelon®), 갈란타민(galantamine: Reminyl®)이 알려져 있다(Giacobini *et al.*, 2002). 하지만 이들 치매치료제의 사용은 메스꺼움, 식욕 부진, 구토 및 설사와 같은 부작용을 유발하여 일상 생활이 크게 개선되지 않아 보다 부작용이 적고 효과가 우수한 새로운 약물 또는 천연물 발견 등이 요구되고 있다(Lanctôt *et al.*, 2003).

한편, 국내에서 천연식물자원의 항산화 등 활성 탐색 및 선별 자원에 대한 연구(Lee *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2016)는 다수 이루어져 있으나 인지기능개선과 관련하여서는 Cho *et al.* (2014)이 한국산 양하 꽃봉오리가 인지 기능개선 효과를 나타낸다고 보고하고 있을 뿐 식물자원의 인지개선 효과를 탐색하고 유용 자원을 선별한 연구는 미흡하다.

따라서 본 연구팀은 천연식물자원을 대상으로 치매의 일종인 알츠하이머병을 개선 및 치료할 수 있는 소재를 발굴하기 위해 콜린성 에스테라제(AChE) 저해활성을 중심으로 탐색하였으며, 몇 가지 자원을 선별하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 어저귀(*Abutilon theophrasti* Medicus) 열매의 물 추출물 등 184개의 식물 추출물 시료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 약용작물과 소속 식물분류전문가로부터 확보된 식물과 학명을 검토받아 조제된 것을 사용하였으며, 각 추출물은 아래의 방법에 따라 제조되었다(Table 1).

먼저, 상온에서 추출된 추출물로서 추출조건 A, B 및 C는 각각 물, 메탄올 및 에탄올로 추출 및 여과되었다. 또한, 가속용매추출장치(accelerated solvent system, Dionex ASE-350, Themofischer scientific and its subsidiaries, Sunnyvale, USA)를 이용한 추출조건 D와 E는 50°C에서 메탄올 및 에탄올로 각각 추출 및 여과되었고, 추출조건 F는 85°C에서 에탄올로 추출되었다. 그리고, 환류냉각장치를 이용한 추출방법으로 추출조건 G는 100°C에서 물로 추출된 후 여과되었으며, 추출조건 H와 I는 74°C에서 메탄올 및 70% 메탄올로 각각 추출 및 여과되었다. 여과된 각 추출물은 감압농축기(Eyela, N-1200B, Tokyo Rikakikai co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 제거하였으며, 남은 수분 및 물 추출물은 동결건조기(PVTFD 50R, IlshinBioBase Co., Ltd., Donducheon, Korea)를 사용하여 최종 추출물을 확보하였다.

Table 1. Plant part extracts used for the study

Sample No.	Scientific name	Korean name	Used part	Resource ^z	Extract condition ^y
1	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	fruit	1	A
2	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	stem	1	A
3	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	root	1	A
4	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	fruit	1	D
5	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	flower/seed	2	E
6	<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	어저귀	leaf	2	E
7	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	leaf	3	A
8	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	root	3	E
9	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	fruit	3	E
10	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	root	3	A
11	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	fruit	3	A
12	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	leaf	3	E
13	<i>Eleuthero coccus sessiliflorus</i> (Rupr. Maxim.) S. Y. Hu	오갈피나무	fruit	4	A
14	<i>Achillea alpina</i> L.	톱풀	aerial part	1	D
15	<i>Achillea alpina</i> var. <i>discoidea</i> (Regel) Kitam.	산톱풀	root	2	E
16	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	오두	root	14	E

Table 1. Continued

Sample No.	Scientific name	Korean name	Used part	Resource ^z	Extract condition ^y
17	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	오두	root	14	A
18	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	오두	processed root	14	E
19	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	오두	processed root	14	A
20	<i>Aconitum koreanum</i> R. Raymond	백부자	root	5	A
21	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	깊신나물	stem	1	H
22	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	깊신나물	leaf	1	H
23	<i>Akebia quinata</i> (Houtt.) Decne	으름	stem	4	A
24	<i>Akebia quinata</i> (Houtt.) Decne	으름	stem	4	E
25	<i>Alpinia oxyphylla</i> Mique	익지	fruit	15	E
26	<i>Alpinia oxyphylla</i> Mique	익지	fruit	15	A
27	<i>Althaea rosea</i> CAV.	접시꽃	flower(red)	1	D
28	<i>Althaea rosea</i> CAV.	접시꽃	root(red)	1	D
29	<i>Amaranthus</i> SP.	으름덩굴	flower	1	A
30	<i>Amaranthus</i> SP.	으름덩굴	root	1	A
31	<i>Amaranthus</i> SP.	으름덩굴	aerial part	1	A
32	<i>Arisaema amurense</i> Maxim.	둥근잎천남성	processed root	14	A
33	<i>Arisaema amurense</i> Maxim.	둥근잎천남성	processed root	14	E
34	<i>Artemisia annua</i> L.	개똥쑥	leaf/stem/ flower	2	D
35	<i>Artemisia argyi</i> H. Lev. & Vaniot	황해쑥	leaf	14	I
36	<i>Aruncus dioicus</i> var. <i>kamtschaticus</i> Hara	눈개승마	aerial part	1	D
37	<i>Aruncus dioicus</i> var. <i>kamtschaticus</i> Hara	눈개승마	aerial part	1	H
38	<i>Asarum sieboldii</i> Mig.	족도리풀	root	14	E
39	<i>Asarum sieboldii</i> Mig.	족도리풀	root	14	A
40	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	천문동	root	14	A
41	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	천문동	root	14	E
42	<i>Aster scaber</i> THUNB.	참취	aerial part	1	D
43	<i>Aster ageratoides</i> Turcz.	까실쑥부쟁이	aerial part	1	D
44	<i>Aster koraiensis</i> NAKAI	벌개미취	aerial part	1	D
45	<i>Astilbe koreana</i> (Kom.) Nakai	숙은노루오줌	aerial part	2	C
46	<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	황기	root	6	D
47	<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	황기	root	6	A
48	<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	황기	root	6	D
49	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	시호	root	7	E
50	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	시호	root	8	A
51	<i>Calystegia sepium</i> var. <i>japonicum</i> (Choisy) Makino	메꽃	root	1	A
52	<i>Calystegia sepium</i> var. <i>japonicum</i> (Choisy) Makino	메꽃	aerial part	1	A
53	<i>Campanula takesimana</i> Nakai	섬초롱꽃	aerial part	2	C
54	<i>Campsis grandiflora</i> (Thunb.) K.Schum.	능소화	root	1	D
55	<i>Campsis grandiflora</i> (Thunb.) K.Schum.	능소화	aerial part	1	D
56	<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	골담초	stem	1	H
57	<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	골담초	leaf	1	H
58	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	풍선덩굴	seed	1	D
59	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	풍선덩굴	root	1	D
60	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	잇꽃	fruit	9	C
61	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	잇꽃	fruit	9	A
62	<i>Chaenomeles sinensis</i> KOEHNE	모과나무	fruit	1	H

Table 1. Continued

Sample No.	Scientific name	Korean name	Used part	Resource ^z	Extract condition ^y
63	<i>Chaenomeles sinensis</i> KOEHNE	모과나무	leaf	1	H
64	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	양명아주	root	2	E
65	<i>Chionanthus retusus</i> Lindl. & Paxton	이팝나무	branch	2	E
66	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	육계	bark	15	E
67	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	육계	bark	15	A
68	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	육계	stem bark	15	E
69	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	육계	stem bark	15	A
70	<i>Citrus aurantium</i> L.	광굴	unripened fruit	14	D
71	<i>Codonopsis pilosula</i> (FR.) NANNF	만삼	root	1	D
72	<i>Codonopsis pilosula</i> (FR.) NANNF	만삼	aerial part	1	D
73	<i>Coptis chinensis</i>	중국황련	rhizome	-	D
74	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini	산수유	leaf	1	H
75	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	산사나무	leaf	1	H
76	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	산사나무	leaf	1	D
77	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	산사나무	fruit	1	H
78	<i>Cucumis melo</i> L.	메론	fruit stalk	14	E
79	<i>Cucumis melo</i> L.	메론	fruit stalk	14	A
80	<i>Dendranthema boreale</i> (Makino) Ling ex Kitam.	산국	aerial part	1	D
81	<i>Dendranthema zawadskii</i> var. <i>lucidum</i> (Nakai) J.H.Park	울릉국화	aerial part	2	C
82	<i>Dendrobium moniliforme</i> (L.) Sw.	석곡	stem	15	A
83	<i>Dendrobium moniliforme</i> (L.) Sw.	석곡	stem	15	E
84	<i>Aster tartaricus</i> Lf.	개미취	root	1	G
85	<i>Aster tartaricus</i> Lf.	개미취	root	1	H
86	<i>Syringa patula</i> var. <i>Kamibayashii</i> (Nakai) M.Y.Kim	정향나무	flower	14	3
87	<i>Euphorbia lathyris</i> L.	속수자	aerial part	12	A
88	<i>Fagopyrum dibotrys</i> (D.DON) HARA	금교맥	aerial part	1	A
89	<i>Fagopyrum dibotrys</i> (D.DON) HARA	금교맥	root	1	A
90	<i>Forsythia viridissima</i> Lindley	의성 개나리	fruit	9	A
91	<i>Forsythia viridissima</i> Lindley	의성 개나리	fruit	9	E
92	<i>Forsythia viridissima</i> Lindley	의성 개나리	root	1	D
93	<i>Forsythia viridissima</i> Lindley	의성 개나리	aerial part	1	A
94	<i>Gentiana macrophylla</i> Pallas	진교	root	14	A
95	<i>Gentiana macrophylla</i> Pallas	진교	root	14	E
96	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	이질풀	aerial part	1	D
97	<i>Geum aleppicum</i> Jacq.	큰뱀무	aerial part	2	E
98	<i>Geum japonicum</i> Thunb.	뱀무	leaf/stem	1	D
99	<i>Gleditsia japonica</i> Mig.	주엽나무	thorn	1	D
100	<i>Gleditsia japonica</i> Mig.	주엽나무	thorn	1	A
101	<i>Glycine max</i> Merr.	콩	sprouted seed	14	E
102	<i>Glycine max</i> Merr.	콩	sprouted seed	14	A
103	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	감초	root	14	E
104	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	감초	root	14	A
105	<i>Gossyium hirsutum</i> Lam.	목화	root	1	A
106	<i>Gossyium hirsutum</i> Lam.	목화	aerial part	1	A
107	<i>Gossyium hirsutum</i> Lam.	목화	seed	1	A

Table 1. Continued

Sample No.	Scientific name	Korean name	Used part	Resource ^z	Extract condition ^y
108	<i>Hibiscus manihot</i> L.	닥풀	root	1	A
109	<i>Hibiscus manihot</i> L.	닥풀	aerial part	1	A
110	<i>Hibiscus manihot</i> L.	닥풀	flower	1	A
111	<i>Iris germanica</i> L.	독일붓꽃	aerial part	1	A
112	<i>Iris germanica</i> L.	독일붓꽃	root	1	D
113	<i>Iris koreana</i> Nakai	노랑붓꽃	root	1	A
114	<i>Iris koreana</i> Nakai	노랑붓꽃	aerial part	1	A
115	<i>Ledebouriella seseloides</i> (Hoffm.) H.Wolff	방풍	root	1	A
116	<i>Ledebouriella seseloides</i> (Hoffm.) H.Wolff	방풍	root	1	D
117	<i>Ligularia fischeri</i> (Ledeb.) Turcz.	곰취	aerial part	2	C
118	<i>Linum usitatissimum</i> L.	아마	aerial part	1	A
119	<i>Linum usitatissimum</i> L.	아마	fruit	1	A
120	<i>Euphorbia lathyris</i> L.	속수자	fruit	1	A
121	<i>Lycium chinense</i> Mill	구기자나무	fruit	1	D
122	<i>Lycium chinense</i> Mill	구기자나무	fruit	1	A
123	<i>Lythrum salicaria</i> L.	털부처꽃	aerial part	1	A
124	<i>Lythrum salicaria</i> L.	털부처꽃	aerial part	1	D
125	<i>Lythrum salicaria</i> L.	털부처꽃	flower	1	A
126	<i>Magnolia obovata</i> Thumb.	일본목련	bark	4	E
127	<i>Magnolia obovata</i> Thumb.	일본목련	bark	4	A
128	<i>Melissa officinalis</i> L.	레몬밤	aerial part	1	D
129	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	연꽃	stamen/ovary	2	D
130	<i>Oenothera odorata</i>	달맞이꽃	seed	1	D
131	<i>Onoclea sensibilis</i> var. <i>interrupta</i> Maxim.	야산고비	aerial part	1	H
132	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex. Trevir.	마타리	root	1	A
133	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex. Trevir.	마타리	aerial part	1	A
134	<i>Paulownia coreana</i> Uyeki	오동나무	leaf	1	H
135	<i>Paulownia coreana</i> Uyeki	오동나무	fruit	1	H
136	<i>Penthorum chinense</i> Pursh	낙지다리	aerial part	1	A
137	<i>Penthorum chinense</i> Pursh	낙지다리	root	1	A
138	<i>Persicaria orientalis</i> (L.) Spach	털여뀌	leaf	2	E
139	<i>Persicaria orientalis</i> (L.) Spach	털여뀌	stem	1	H
140	<i>Persicaria tinctoria</i> (Aiton) H. Gross	쪽	flower	1	H
141	<i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	갯기름 나물	root	1	D
142	<i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	갯기름 나물	root	1	A
143	<i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	갯기름 나물	aerial part	1	D
144	<i>Phellaodendron amurense</i> Rupr.	황벽나무	bark	13	H
145	<i>Phellaodendron amurense</i> Rupr.	황벽나무	bark	13	G
146	<i>Physalis angulata</i> L.	망파리	aerial part	1	D
147	<i>Physalis angulata</i> L.	망파리	fruit	1	F
148	<i>Physalis angulata</i> L.	망파리	root	1	D
149	<i>Phytolacca americana</i> L.	미국자리공	flower	1	A
150	<i>Phytolacca americana</i> L.	미국자리공	aerial part	1	A
151	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breitenb.	반하	whole plant	1	H
152	<i>Plantago lanceolata</i> L.	창질경이	root	1	D
153	<i>Plantago lanceolata</i> L.	창질경이	aerial part	1	D

Table 1. Continued

Sample No.	Scientific name	Korean name	Used part	Resource ^z	Extract condition ^y
154	<i>Plantago lanceolata</i> L.	창질경이	flower	1	D
155	<i>Plantago lanceolata</i> L.	창질경이	aerial part	1	H
156	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	도라지	root	14	I
157	<i>Polygonatum sibiricum</i> F. Delaroché	층층갈고리 둥글레	root	11	B
158	<i>Potentilla chinensis</i> SER	딱지꽃	aerial part	1	D
159	<i>Potentilla chinensis</i> SER	딱지꽃	root	1	D
160	<i>Potentilla chinensis</i> SER	딱지꽃	stem	1	D
161	<i>Prunus armeniaca</i> Linne	살구나무	seed	14	I
162	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	복사나무	seed	16	E
163	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	복사나무	seed	16	A
164	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	해당화	fruit	1	I
165	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	해당화	seed	1	H
166	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	해당화	leaf	1	H
167	<i>Rumex acetocella</i> L.	애기수영	whole plant	1	A
168	<i>Rumex acetocella</i> L.	애기수영	aerial part	1	D
169	<i>Rumex acetosa</i> L.	수영	root	1	A
170	<i>Rumex acetosa</i> L.	수영	aerial part	1	A
171	<i>Rumex obtusifolius</i> L.	돌소리쟁이	flower	1	A
172	<i>Salvia plebeia</i>	배암차즈기	whole plant	1	D
173	<i>Schisandra chinensis</i> Baill	오미자	fruit	12	E
174	<i>Schisandra chinensis</i> Baill	오미자	fruit	13	A
175	<i>Scrophularia buergeriana</i> Miq.	현삼	aerial part	1	B
176	<i>Scrophularia buergeriana</i> Miq.	현삼	aerial part	1	D
177	<i>Silene armeria</i> L.	끈끈이대나물	flower	1	D
178	<i>Silybum marianum</i>	흰무늬영경귀	aerial part	1	D
179	<i>Synurus deltoides</i> (Aiton) Nakai	수리취	aerial part	1	D
180	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> var. <i>sibiricum</i> Regel & Tiling	평의다리	stem	1	D
181	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	하늘타리	seed	-	D
182	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	하늘타리	seed	-	A
183	<i>Veronicastrum sibiricum</i> (L.) Pennell	냉초	leaf	1	H
184	<i>Veronicastrum sibiricum</i> (L.) Pennell	냉초	stem	1	H

^z1, Suwon (RDA); 2, Eumsung (RDA); 3, Bongwha; 4, Boryeong; 5, Cheongwon; 6, Teabeaksan; 7, Imsil; 8, Bosung; 9, Uiseong; 10, Odaesan; 11, Yeongju; 12, Jecheon; 13, Korea; 14, China; 15, Vietnam; 16, Iran

^ySolvents and conditions for extraction ; A, water at room temperature; B, methanol at room temperature; C, ethanol at room temperature; D, methanol at 50°C by accelerated solvent system; E, ethanol at 50°C by accelerated solvent system; F, ethanol at 85°C by accelerated solvent system, G, water at 100°C; H, methanol at 74°C; I, 70% methanol at 74.

시약

실험에 사용된 sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, acetylcholinesterase, acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), sodium bicarbonate, butyrylcholinesterase, butyrylthiocholine iodide 및 tacrine

hydrochloride 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.에서 구매하였다.

단일농도에서의 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성 측정

확보된 184개의 식물추출물의 아세틸콜린에스테라제 저해능을 100 µg/ml의 단일농도에서 평가하기 위해 Ellman 방법을

변형한 Kim and Chung (2011)의 방법에 따라 실험하였다. 먼저 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)는 sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic을 각각 100 mM로 만들어 pH meter을 이용하여 pH 8.0으로 맞춰 사용하였으며, acetylcholinesterase는 10 unit 농도로 50 μ l씩 나누어 냉동보관하면서 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 950 μ l를 넣어 최종 농도 0.5 U/ml의 농도가 되게 하여 사용하였다. 또한, 기질인 75 mM acetylthiocholine iodide는 buffer (pH 8.0)에 녹여서 사용하였고, 양성대조물질인 tacrine은 0.1 μ g/ml 농도로 녹여 사용하였다. DTNB 시약을 제조하기 위해 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB)와 15 mM sodium bicarbonate는 각각 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 녹여 1:1 비율로 혼합하였다.

최종농도를 100 μ g/ml이 되도록 준비한 추출물 시료와 positive control인 tacrine, control인 buffer을 각각 75 μ l씩 96 well microplate에 분주한 후 buffer 130 μ l, 10 mM DNTB 시약 5 μ l, 75 mM acetylthiocholine iodide 1 μ l를 차례대로 분주하여 상온에서 10분간 반응시키고 AChE 효소 2.5 μ l를 분주하여 1시간 반응시킨 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였고 결과는 control 군 대비 저해율(%)로 표시하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - (\text{Abs}/\text{Abc}) \times 100$$

Abs = Absorbance of tested sample after 60 min of incubation

Abc = Absorbance of control after 60 min of incubation

선발자원의 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성 측정

단일농도 실험결과로부터 선발한 7개의 추출물의 처리농도별 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 선발시료 추출물의 최종농도가 25, 50, 100, 200 μ g/ml가 되도록 조제한 후 앞서 언급한 AChE 저해활성 측정방법에 준해 실험하였다.

선발자원의 부티릴콜린에스테라제(BuChE) 저해활성 측정

선발자원 7종에 대한 농도별 부티릴콜린에스테라제(BuChE)에 대한 저해활성을 확인하기 위해 앞에서 서술한 AChE 저해활성 측정방법에 준해 실험하였다. Butyrylcholinesterase (BuChE)는 10 unit 농도로 50 μ l씩 나누어 냉동보관하면서 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 950 μ l를 넣어 최종 농도 0.5 U/ml로 사용하였고 buffer로 75 mM의 butyrylthiocholine iodide와 0.1

μ g/ml의 tacrine (positive control)을 만들어 사용하였다. 최종농도가 25, 50, 100, 200 μ g/ml이 되게 조제한 각 선발시료와 tacrine를 각각 75 μ l를 96 well microplate에 분주한 후 buffer (control) 130 μ l, DNTB 시약 5 μ l 및 75 mM butyrylthiocholine iodide 1 μ l를 차례대로 분주하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 BuChE 효소 2.5 μ l를 분주하여 1시간 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 410 nm에 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 AChE 저해활성 분석법과 같은 방식으로 control 대비 저해율(%)로 표시하였다.

선발자원의 UPLC-UV-MS 프로파일 분석

선발자원의 성분 프로파일을 확인하기 위해 선발시료를 UPLC (Waters Acquity™ Ultra Performance LC system, Waters Corp., Milford, USA)와 Waters Xevo G2 Q-TOF (Waters Corp., Milford, USA)를 사용하고 컬럼 (ACQUITY UPLC® BEH C18 column (2.1 mm×150 mm, 1.7 μ m, Waters Corp., Milford, USA)을 이용하여 각 식물별로 Table 2와 Table 3에 나타난 조건으로 분석하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차(means±SD, n=3~4)로 나타내었으며, Microsoft excel의 Student's t-test에 의해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

단일농도에서의 AChE 저해활성

콜린 기능의 결손은 인지, 행동 및 일상생활활동에 영향을 미치는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)의 발병에 관련되며, 이러한 결손에 대한 약물적 중재는 아세틸콜린에스테라제 (Acetylcholinesterase, AChE) 저해에 기초하므로 확보된 식물 추출물 184개를 100 μ g/ml의 단일농도에서 AChE 저해활성을 분석하였다(Giacobin, 2003). 실험결과, 52개의 추출물이 0% 이상의 AChE 저해활성을 나타내었으며, 나머지 132개의 시료는 음의 값을 나타내 AChE 효소에 대한 저해효과가 없었다 (Table 4). 0% 이상의 AChE 저해활성을 보였던 52개의 시료 중에서는 시료번호 144 (황벽나무, *Phellaodendron amurense* Rupr., 수피, 메탄올 추출물), 시료번호 145 (황벽나무, *Phellaodendron amurense* Rupr., 수피, 물 추출물), 시료번호 129 (연꽃, *Nelumbo nucifera* Gaertn., 수술/지방, 메탄올 추출물), 시료번호 140 (쪽, *Persicaria tinctoria* H. GROSS, 꽃, 메탄올 추출

Table 2. UPLC analysis conditions of the selected plant extracts of sample no. 60 (*Carthamus tinctorius* L. fruit), sample no. 66 (*Cinnamomum cassia* Blume, bark), sample no. 73 (*Coptis chinensis*, rhizome), sample no. 129 (*Nelumbo nucifera* Gaertn., stamen/ovary), sample no. 140 (*Persicaria tinctoria* H.GROSS, flower), sample no. 144 (*Phellaodendron amurense* Rupr., bark, methanol ext.), and sample no. 145 (*Phellaodendron amurense* Rupr., bark, water ext.)

Sample No.	Solvent for dissolving sample	Injection volume (μl)	Eluent solvent	Eluent condition	Flow (ml/min)	UV wavelength (nm)
60	10 mg/ml in 50% MeOH	2	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-5 min; 10% (B) 5-10 min; 10-15% (B) 10-20 min; 15-25% (B) 20-25 min; 25-100% (B) 25-27 min; 100% (B) 27-27.5 min; 100-10% (B) 27.5-30 min; 10% (B)	0.3	290
66	1 mg/ml in MeOH	4	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-1 min; 15% (B) 1-20 min; 15-40% (B) 20-26 min; 40-100% (B) 26-28 min; 100% (B) 28-28.5 min; 100-15% (B) 28.5-30 min; 15% (B)	0.30	270
73	0.25 mg/ml in MeOH	3	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-5 min; 10% (B) 5-10 min; 10-15% (B) 10-20 min; 15% (B) 20-28 min; 15-100% (B) 28-28.5 min; 100-10% (B) 28.5-30 min; 10% (B)	0.3	320
129	10 mg/ml in MeOH	2	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-20 min; 10% (B) 20-30 min; 10-100% (B) 30-33 min; 100% (B) 33-33.5 min; 100-10% (B) 33.5-35 min; 10% (B)	0.3	340
140	10 mg/ml in MeOH	2	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-1 min; 10% (B) 1-20 min; 10-20% (B) 20-30 min; 20-100% (B) 30-33 min; 100% (B) 33-33.5 min; 100-10% (B) 33.5-35 min; 10% (B)	0.3	340
144	10 mg/ml in MeOH	2	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-5 min; 5% (B) 5-10 min; 5-10% (B) 10-20 min; 10-20% (B) 20-25 min; 20-100% (B) 25-27 min; 100% 27-27.5 min; 100-5% (B) 27.5-30 min; 5% (B)	0.3	280
145	10 mg/ml in MeOH	2	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile	0-5 min; 5% (B) 5-10 min; 5-10% (B) 10-20 min; 10-20% (B) 20-25 min; 20-100% (B) 25-27 min; 100% (B) 27.5-30 min; 5% (B)	0.3	280

Table 3. The method of operation at mass spectrometer

Mode	Voltage		Temperature (°C)		Gas Flow (L/h)		Range (m/z)
	Capillary (kV)	Cone (V)	Source	Desolvation	Cone	Desolvation	
Positive	2.5	15	50	350	30	500	50-1200

Table 4. Inhibition effect of 184 plant extracts (at 100 µg/ml) on the acetylcholinesterase activity

Sample No.	Inhibition (%) at 100 µg/ml			Sample No.	Inhibition (%) at 100 µg/ml				
144	63.1	±	1.3	*** ^y	20	3.4	±	1.7	*
145	61.5	±	1.7	***	38	3.2	±	5.7	
129	59.5	±	3.5	***	103	3.2	±	0.6	***
140	45.6	±	4.3	***	53	3.1	±	1.9	
73	38.3	±	0.7	***	108	3.1	±	1.1	***
66	22.1	±	3.1	***	141	3.0	±	2.6	
60	18.7	±	7.8	*	142	3.0	±	1.4	*
96	9.7	±	1.3	***	65	2.3	±	6.3	
157	9.4	±	3.7	*	91	2.3	±	1.4	***
123	9.3	±	6.9		109	2.3	±	0.8	***
68	8.2	±	1.4	***	98	2.0	±	5.4	
71	7.5	±	1.4	***	45	1.9	±	4.6	
171	6.7	±	1.2	***	72	1.8	±	4.0	***
46	6.6	±	2.2	**	126	1.6	±	0.8	*
67	6.6	±	1.7	**	47	1.5	±	2.9	
162	6.6	±	0.8	***	88	1.4	±	1.2	***
152	6.4	±	2.1	***	124	1.4	±	6.8	
58	6.3	±	1.7	***	25	1.3	±	1.1	
16	6.1	±	1.1	***	18	1.2	±	1.0	***
62	5.7	±	7.4		59	1.2	±	11.9	
153	5.3	±	1.1	**	48	0.6	±	6.3	
101	5.1	±	5.3		113	0.5	±	2.7	
78	4.6	±	1.5	***	69	0.4	±	1.7	***
181	3.6	±	0.9	**	146	0.3	±	6.7	
105	0.1	±	2.3	***	159	-2.8	±	2.4	
7	0.0	±	1.4	***	19	-2.9	±	0.4	***
21	0.0	±	10.1		137	-2.9	±	3.7	***
83	0.0	±	1.0	-	175	-2.9	±	3.9	
180	-0.2	±	2.2		29	-3.1	±	1.8	*
173	-0.4	±	2.0	-	13	-3.2	±	1.0	***
1	-0.4	±	0.4		63	-3.2	±	4.4	
132	-0.6	±	1.6		104	-3.2	±	1.0	***
80	-0.7	±	3.3		166	-3.2	±	5.7	
155	-0.7	±	1.4		147	-3.2	±	4.2	
120	-0.8	±	1.6	***	139	-3.3	±	2.0	
136	-0.8	±	0.3	***	70	-3.4	±	5.3	
164	-0.9	±	2.8		118	-3.4	±	1.3	**
77	-1.2	±	1.5		84	-3.5	±	3.1	
79	-1.3	±	0.6	***	9	-3.7	±	1.4	***
8	-1.4	±	0.6	***	51	-3.7	±	3.9	
27	-1.5	±	0.3	***	174	-3.7	±	1.3	**

Table 4. Continued

Sample No.	Inhibition (%) at 100 $\mu\text{g/ml}$				Sample No.	Inhibition (%) at 100 $\mu\text{g/ml}$			
158	-1.6	±	0.2	***	75	-3.8	±	1.3	***
15	-1.7	±	0.7	*	143	-3.8	±	8.3	
106	-1.9	±	1.0	***	169	-3.8	±	3.0	***
154	-1.9	±	1.3	***	34	-3.9	±	3.3	
127	-2.1	±	1.1	*	165	-3.9	±	2.0	*
167	-2.4	±	5.6		148	-4.0	±	0.4	
110	-2.6	±	2.4		52	-4.0	±	2.8	*
28	-2.7	±	2.8		111	-4.0	±	2.5	
2	-2.8	±	0.9	***	112	-4.2	±	1.5	**
128	-4.4	±	4.5		10	-7.4	±	3.0	***
130	-4.4	±	10.1		90	-7.4	±	0.3	***
32	-4.5	±	1.5	***	100	-7.4	±	3.6	*
56	-4.5	±	1.7	***	119	-7.5	±	3.2	***
17	-4.6	±	1.2	***	87	-8.3	±	1.5	***
89	-4.8	±	1.2	**	55	-8.4	±	2.3	**
156	-4.8	±	6.6		122	-8.6	±	1.6	***
115	-5.0	±	6.2		4	-8.6	±	1.8	*
30	-5.0	±	0.9	***	33	-8.7	±	1.6	***
170	-5.2	±	1.1	**	151	-8.7	±	2.8	**
97	-5.4	±	1.3	**	183	-8.7	±	1.2	***
26	-5.5	±	2.0	*	82	-9.1	±	2.1	**
57	-5.9	±	3.8	***	179	-9.2	±	5.8	
3	-6.1	±	0.9	***	172	-9.3	±	1.7	***
23	-6.4	±	2.7	*	92	-9.5	±	3.9	***
54	-6.5	±	0.7	***	138	-10.6	±	3.3	*
76	-6.6	±	1.4	***	133	-10.8	±	2.1	***
178	-6.6	±	6.8		39	-11.3	±	1.9	***
116	-6.9	±	4.8		149	-11.4	±	0.7	***
81	-6.9	±	7.1		11	-11.5	±	1.4	***
40	-7.1	±	1.2	***	176	-11.6	±	3.6	**
49	-7.1	±	6.1		74	-11.9	±	3.6	**
99	-7.2	±	4.2	*	37	-12.1	±	0.6	***
121	-7.2	±	1.8	**	36	-12.1	±	3.6	**
50	-7.3	±	3.4	*	86	-12.3	±	7.6	*
114	-7.3	±	1.9	**	85	-19.6	±	3.7	***
41	-13.4	±	1.6	***	160	-20.1	±	8.0	*
31	-13.7	±	0.4	***	94	-20.6	±	6.3	**
161	-14.7	±	7.8	*	150	-20.8	±	2.3	***
134	-14.8	±	0.8	***	93	-21.1	±	1.2	***
107	-15.7	±	1.9	***	22	-21.9	±	5.6	**
125	-15.7	±	9.7	*	95	-23.9	±	1.2	***
182	-15.7	±	2.3	***	44	-26.2	±	4.8	**
117	-16.1	±	5.5	**	61	-27.2	±	6.8	**
43	-16.8	±	10.0	*	5	-13.0	±	5.6	*
135	-17.1	±	0.5	***	102	-30.2	±	0.9	***
184	-17.3	±	1.6	***	163	-31.5	±	0.7	***
64	-17.9	±	4.0	*	6	-32.2	±	5.2	**

Table 4. Continued

Sample No.	Inhibition (%) at 100 $\mu\text{g/ml}$				Sample No.	Inhibition (%) at 100 $\mu\text{g/ml}$			
12	-18.0	\pm	1.5	***	24	-33.2	\pm	4.9	***
177	-18.3	\pm	7.3	*	14	-36.5	\pm	5.0	***
131	-18.4	\pm	3.2	***	168	-39.3	\pm	12.0	**
35	-19.1	\pm	9.5	*	42	-44.6	\pm	12.5	**

*Symbol indicates significance of the data, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

³Final concentration of sample for the assay of acetylcholinesterase activity inhibition was 100 $\mu\text{g/ml}$.

물), 시료번호 73 (중국황련, *Coptis chinensis*, 뿌리줄기, 메탄올 추출물), 시료번호 66 (육계, *Cinnamomum cassia* Blume, 수피, 에탄올 추출물) 및 시료번호 60 (잇꽃, *Carthamus tinctorius* L., 열매, 에탄올 추출물) 등 7개의 시료는 $18.7 \pm 7.8\% \sim 63.1 \pm 1.3\%$ 의 비교적 우수한 저해활성을 보인 것을 확인하였다. 이러한 결과에 따라 단일농도에서 AChE 효소에 대해 우수한 저해활성을 보였던 7개의 시료에 대해서는 처리농도별로 추가 실험을 추진하였다.

선발자원의 AChE 저해활성

앞에서 언급한 바와 같이 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 단일농도에서 우수한 AChE 저해활성을 나타내었던 7개 시료를 대상으로 최종처리농도가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하여 AChE 저해활성을 분석하였으며 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험결과를 살펴보면, 잇꽃(*Carthamus tinctorius* L.) 열매의 에탄올 추출물(A), 육계(*Cinnamomum cassia* Blume) 수피의 에탄올 추출물(B)은 처리농도에 따른 AChE 저해효과가 각각 $2.6 \pm 5.2 \sim 12.8 \pm 4.3\%$ 및 $9.1 \pm 1.3\% \sim 15.2 \pm 3.2\%$ 를 보여 전반적으로 낮은 수치를 보였다. 또한 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올 추출물(D)은 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 $15.0 \pm 3.4\% \sim 73.5 \pm 3.6\%$, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올 추출물(E)는 $19.5 \pm 9.1\% \sim 63.5 \pm 5.4\%$ 의 AChE 저해활성을 보여 처리농도가 증가함에 따라 AChE 저해활성이 유의하게 증가하는 결과를 보였다. 그리고, 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올 추출물(C), 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.) 수피의 메탄올 추출물(F) 및 물 추출물(G)은 처리농도에 따라 각각 $81.6 \pm 0.4\% \sim 58.5 \pm 2.4\%$, $69.9 \pm 1.8\% \sim 80.5 \pm 0.9\%$ 및 $54.8 \pm 0.6\% \sim 78.3 \pm 2.6\%$ 의 값을 보여 처리농도에 따라 고르게 매우 높은 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Tabet (2006)에 의하면 AChE 저해제는 약~중 정도의 AD 치료에 유용하게 이용될 수 있으므로 처리농도별 AChE 저해능이

우수하였던 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올 추출물(D), 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올 추출물(E), 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올 추출물(C), 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.) 수피의 메탄올 추출물(F) 및 물 추출물(G)은 경증 내지 중증의 AD 치료용 소재로의 활용 가능성이 높을 것으로 사료되었다.

선발자원의 BuChE 저해활성

아세틸콜린에스테라제(AChE)와 마찬가지로 아세틸콜린의 가수분해에 관여하고 AD에서 중요한 역할을 담당하는 또 다른 콜린에스테라제(ChE)인 부티릴콜린에스테라제(BuChE)에 대한 저해활성을 확인하기 위해 단일농도에서 우수한 AChE 저해활성을 나타내었던 7개의 시료를 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 처리농도로 실험하였다(Giobini *et al.*, 2002). 그 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 7개의 시료 중에서 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올추출물(D), 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올추출물(E) 및 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올추출물(C)이 각각 $58.9 \pm 7.8 \sim 81.6 \pm 1.9\%$ 및 $45.8 \pm 9.8\% \sim 72.4 \pm 2.5\%$ 및 $33.1 \pm 9.9\% \sim 55.4 \pm 5.4\%$ 의 순으로 높은 BuChE 저해활성을 보이는 것을 알 수 있었다. 한편, 잇꽃(*Carthamus tinctorius* L.) 열매의 에탄올 추출물(A), 육계(*Cinnamomum cassia* Blume) 수피의 에탄올 추출물(B), 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.) 수피의 메탄올 추출물(F) 및 물 추출물(G)은 $-19.4 \pm 5.6\% \sim 12.7 \pm 12.7\%$ 범위의 비교적 낮은 수치를 보여 BuChE에 대한 저해활성이 낮은 것으로 확인되었다.

한편, Giacobini (2003)에 의하면 심각한 AD에서는 AChE와 choline acetyltransferase (ChAT)의 90% 정도가 감소되는 반면, 부티릴콜린에스테라제(butyrylcholinesterase, BuChE)의 수준은 증가하므로 본 실험결과, 우수한 BuChE 저해효과가 확인된 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올추출물(D), 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올추출

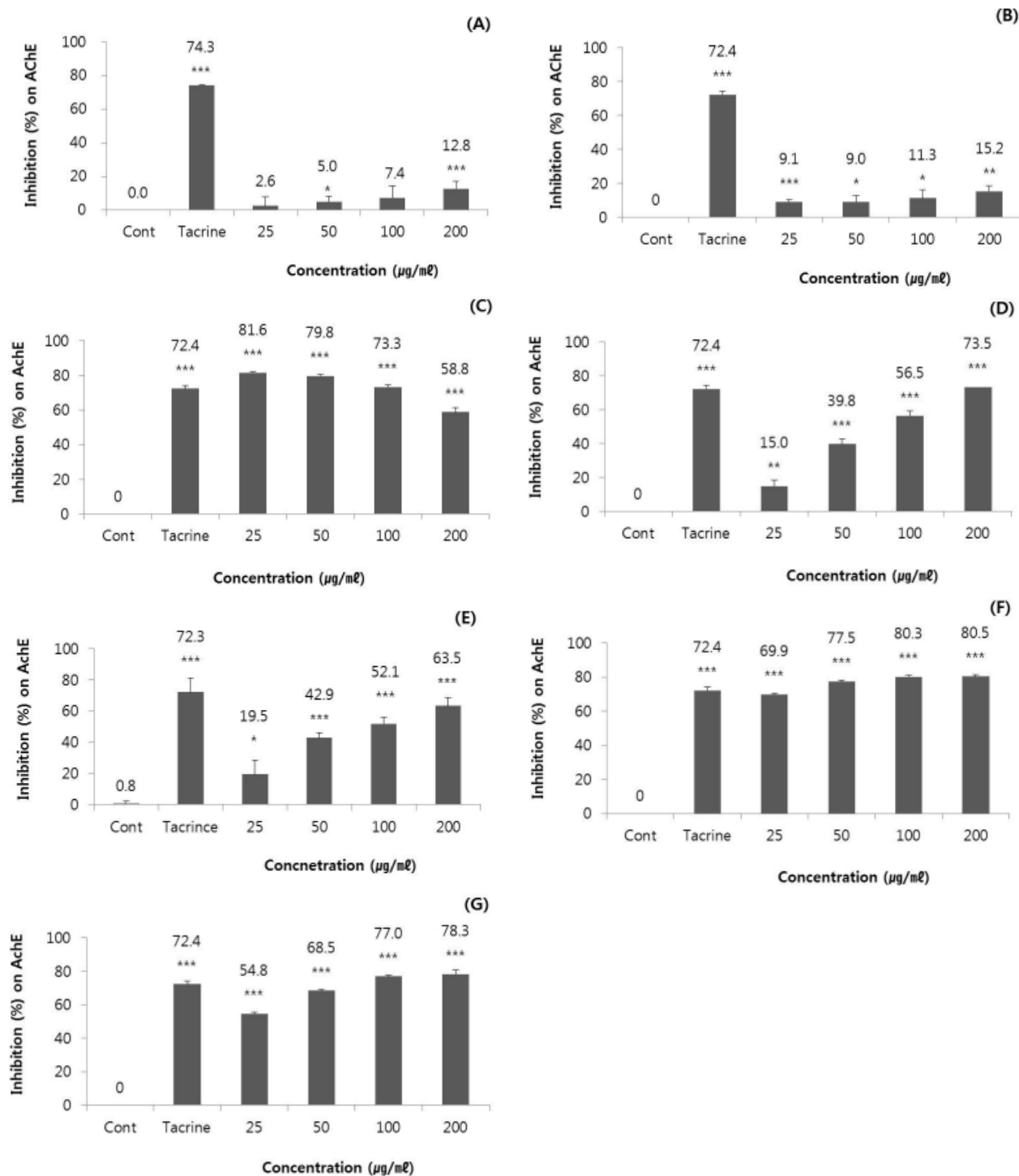


Fig. 1. Inhibition effect of the selected plant extracts of (A) *Carthamus tinctorius* L. (fruit, sample no. 60), (B) *Cinnamomum cassia* Blume (bark, sample no. 66), (C) *Coptis chinensis* (rhizome, sample no. 73), (D) *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary, sample no. 129), (E) *Persicaria tinctoria* H.GROSS (flower, sample no. 140), (F) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 144, methanol ext.), and (G) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 145, water ext.) on acetylcholinesterase (AChE) activity. Each extracts was experimented at the final concentration of 25, 50, 100, and 200 µg/ml. Cont means control which treated with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) and tacrine as positive control was used at the concentration of 0.1 µg/ml.

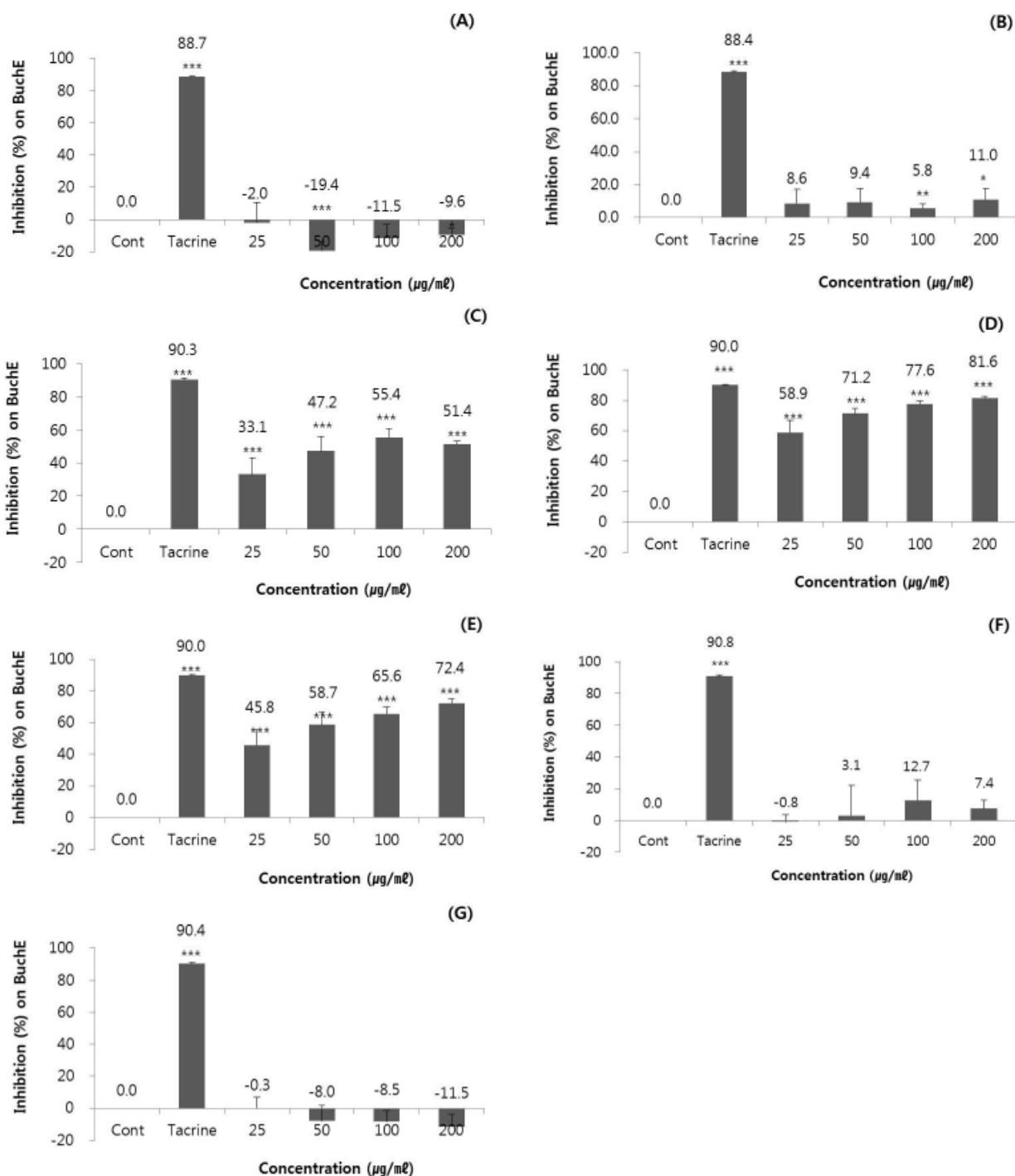


Fig. 2. Inhibition effect of the selected plant extracts of (A) *Carthamus tinctorius* L. (fruit, sample no. 60), (B) *Cinnamomum cassia* Blume (bark, sample no. 66), (C) *Coptis chinensis* (rhizome, sample no. 73), (D) *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary, sample no. 129), (E) *Persicaria tinctoria* H.GROSS (flower, sample no. 140), (F) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 144, methanol ext.), and (G) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 145, water ext.) on butyrylcholinesterase (BuChE) activity. Each extracts was experimented at the final concentration of 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$. Cont means control which treated with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) and tacrine as positive control was used at the concentration of 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

물(E) 및 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올추출물(C)은 심각한 수준의 AD 치료에 이용될 수 있는 후보소재라고 사료되었다.

이상과 같이 본 실험에서는 치매와 관련하여 아세틸콜린에스테라제(AChE) 및 부티릴콜린에스테라제(BuChE) 등 콜린성 에스테라제에 대해 식물 추출물들의 저해활성을 분석하였으므로 이와 관련된 연구 보고를 살펴보고자 한다. 치매의 한 종류인 알츠하이머병(AD)은 전뇌의 콜린성 뉴런 손실과 점진적 아세틸콜린(ACh)의 감소가 특징이며, 아세틸콜린의 활성은 콜린에스테라제의 가수분해작용에 의해 종결된다. 따라서, 이들 효소에 대한 저해물질은 AD를 가진 환자에서 콜린성 뉴런의 활성을 증폭시키며, 뇌의 BuChE를 저해시키면 AD를 치료하여 인지 및 신경병리학적인 마커를 조절할 수 있다(Greig *et al.*, 2005). 콜린계는 신경전달계로서 대뇌 피질을 조절하며 도파민, 노르에피네프린 및 글루타메이트계에 영향을 미치고, 콜린계 기능의 결손은 인지, 행동 및 일상생활 활동에 영향을 미치는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)의 발병에 관련된다. 심각한 AD에서는 AChE와 choline acetyltransferase (ChAT)의 90%가 감소되지만, 부티릴콜린에스테라제(BuChE)의 수준은 증가한다. 그러나 베타-아밀로이드를 함유한 노인성 프라크에는 AChE와 BuChE가 함께 있고 로위체를 가진 치매에서 심각한 콜린계 손상이 발견되므로, 파킨슨성 치매에 대해 AChE 저해요법이 적절할 것으로 보고되고 있다(Giacobini, 2003). 한편, AChE는 콜린성 신경말단에 존재하는 반면, BuChE는 신경교 세포나 신경단위와 관련되는 데, AChE는 정상 뇌의 측두골피질에 있는 total ChE의 90%를 구성하면서 대부분의 시냅스성 아세틸콜린의 불활성화를 매개하고 있으나, BuChE도 아세틸콜린의 가수분해에 관여하고 AD에서 중요한 역할을 담당하므로 AChE와 BuChE에 대한 저해는 AD에서 인지저하를 치료하는 데 유익할 것으로 보고되었다(Giacobini *et al.*, 2002). 또한, AD의 발병에서 중요한 역할을 하는 $A\beta$ 의 독성은 H_2O_2 등의 활성산소(ROS) 증가와 관련되며, 활성산소와 H_2O_2 는 미토콘드리아 기능에 직접 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, 항산화제나 유리기 소거제는 $A\beta$ 에 의해 유도되는 독성에 대해 세포보호를 하며 AD 환자에서 인지결함의 정도는 ChAT 활성의 감소와 콜린성 뉴런의 손실과 유의하게 관련된다. 그러므로 활성산소 생성을 감소시키고 AChE 활성 저해를 통한 ACh의 생성을 증가시키며 ChAT 활성을 증가시키는 것은 AD 치료를 위한 중요한 전략이 될 수 있다(Ruan *et al.*, 2010). AChE 저해제는 경증정도의 AD 치료에 유용하게 이용될 수 있으므로 대부분의 환자에게 잘 통용

되며, 주요 용도는 인지저하의 안정화에 있지만 치매에서의 행동학적 정신적 증상을 개선한다. 또한, 유리기와 아밀로이드 독성에 대한 작용과 뇌와 혈액에서 활성화된 소교세포(microglia)로부터 사이토카인의 분비 감소를 통해서 AChE inhibitor의 항염 작용이 가능하다(Tabet, 2006).

이러한 보고들을 고려할 때, 본 연구에서 확인되었던 AChE에 대한 저해활성이 우수하였던 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올 추출물, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올 추출물, 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올 추출물, 황벽나무(*Phellaodendron amurense* Rupr.) 수피의 메탄올 추출물 및 물 추출물 등의 5가지 추출물시료는 경도부터 중간정도의 AD에서 효과를 발휘할 수 있을 것으로 예상된다. 그리고, BuChE에 대해서도 저해효과가 우수하였던 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올추출물, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올추출물 및 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올추출물 등 3개의 식물 추출물은 심각한 AD에서도 개선효과를 나타낼 수 있는 소재로 확인되었으므로 활용성 검토를 위해 추가 연구가 필요하다고 사료되었다.

선발자원의 UPLC-UV-MS 화학성분프로파일 분석 결과

한편, 선발된 추출물 7개에 대한 UPLC-UV-MS 분석을 통한 화학성분 프로파일 예측을 진행한 결과를 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타내었다. 본 실험은 기존 문헌에 보고된 개별 식물에 함유된 화학성분의 분자량 정보를 활용하여 동일 분자량을 가지는 피크들을 임의적으로 동일 화학성분으로 추정하는 방식으로 진행되었다. 시료번호 60 (잇꽃 열매의 에탄올 추출물)에 대해 분석한 UPLC-UV 크로마토그램(A)을 분석하였을 때 arachidonoylserotonin (MW 462), n-serotonin (MW 322) 및 n-feruoylserotonin (MW 352)로 추정되는 화학성분이 확인되었으며, 시료번호 66 (육계 수피의 에탄올 추출물)의 경우(B)에는 cinnamic acid (MW 148) 및 cinnamaldehyde (MW 132)가 확인되었다. 시료번호 73 (중국황련 뿌리줄기의 메탄올 추출물)의 경우(C)는 thalifendine (MW 322), jateorrhizine (MW 338), columbamine (MW 338), coptisine (MW 320), berberine (MW 336), palmitine (MW 352)로 추정되는 화학성분이 확인되었으며, 시료번호 129 (연꽃 수술/자방의 메탄올 추출물)의 UPLC-UV 크로마토그램(D)에서는 kaempferol-6-methoxy-3-O-glucoside (MW 478), kaempferol-3-O-glucoside (MW 448), kaempferol-3-O-glucuronide (MW 462) 및 kaempferol-3-

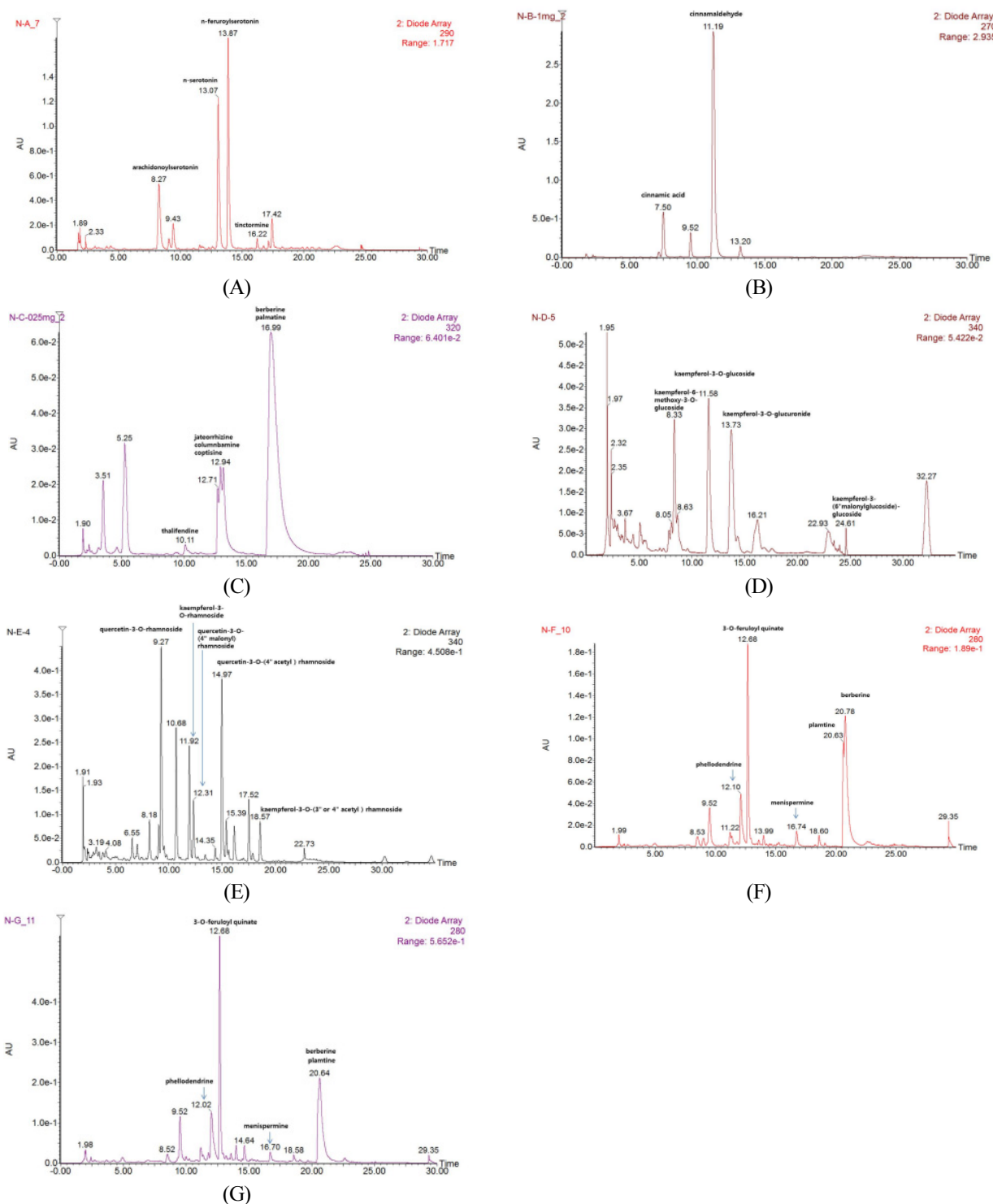


Fig. 3. UPLC-UV chromatograms and tentative identification of metabolites obtained by UPLC-UV-MS analysis. (A) *Carthamus tinctorius* L. (fruit, sample no. 60), (B) *Cinnamomum cassia* Blume (bark, sample no. 66), (C) *Coptis chinensis* (rhizome, sample no. 73), (D) *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary, sample no. 129), (E) *Persicaria tinctoria* H.GROSS (flower, sample no. 140), (F) *Phellodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 144, methanol ext.), and (G) *Phellodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 145, water ext.).

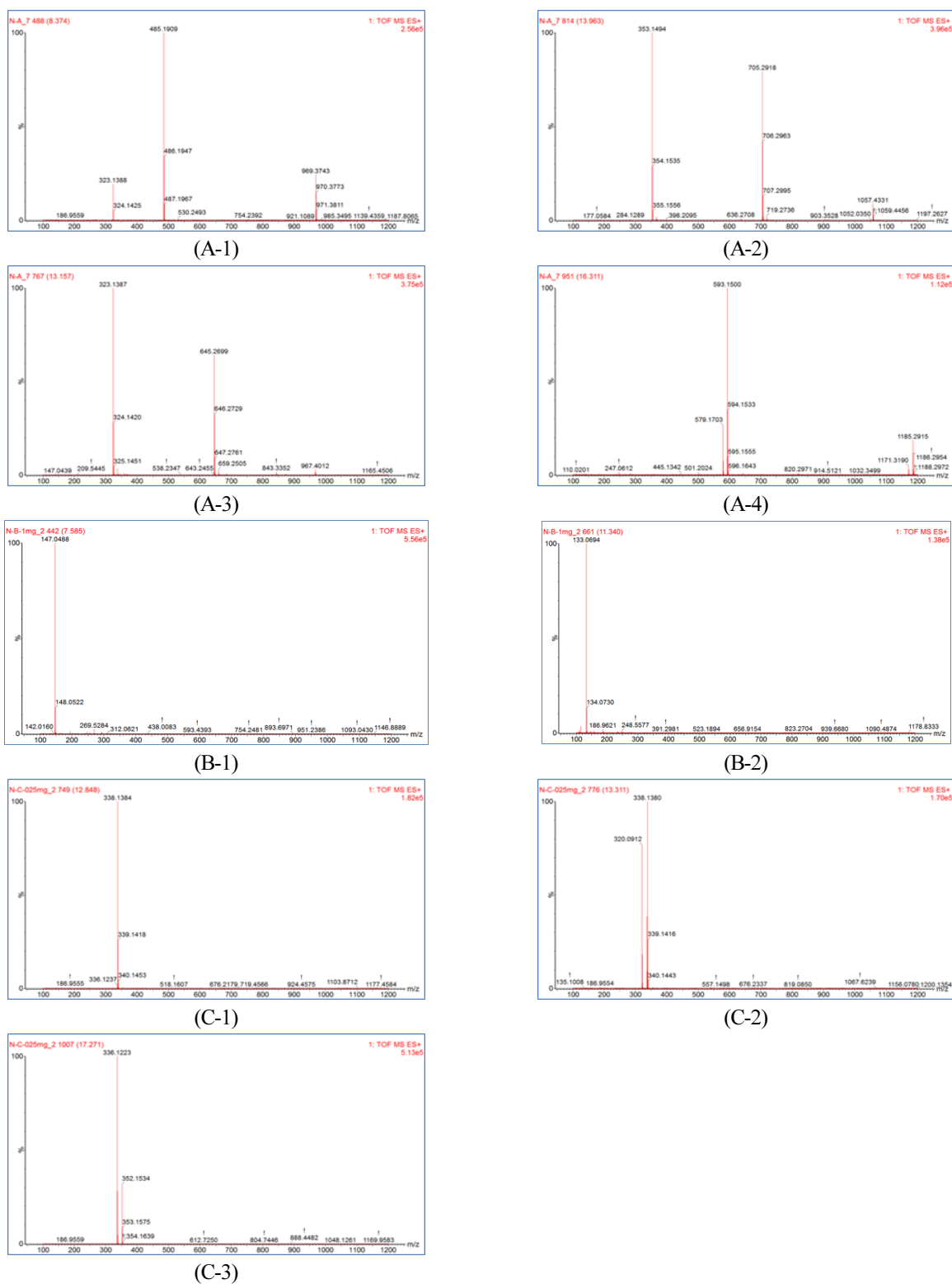
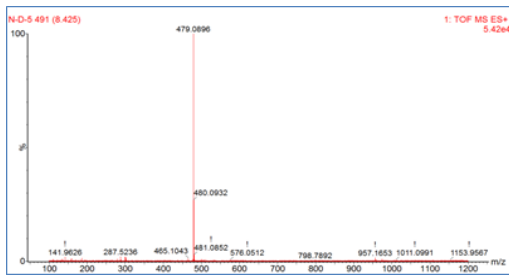
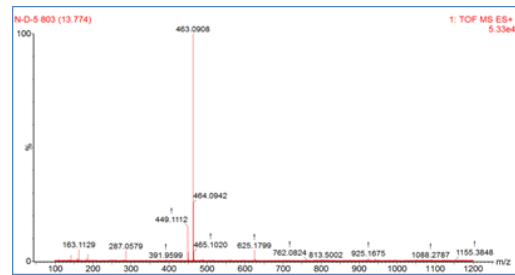


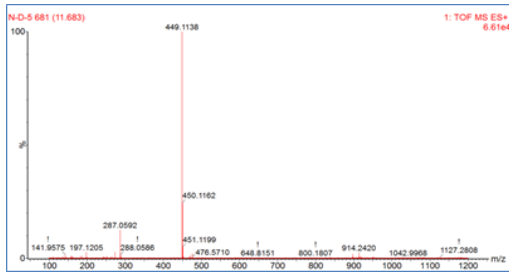
Fig. 4. Mass spectrums of selected plant extracts. (A) *Carthamus tinctorius* L. (fruit, sample no. 60), (B) *Cinnamomum cassia* Blume (bark, sample no. 66), (C) *Coptis chinensis* (rhizome, sample no. 73), (D) *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamen/ovary, sample no. 129), (E) *Persicaria tinctoria* H.GROSS (flower, sample no. 140), (F) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 144, methanol ext.), and (G) *Phellaodendron amurense* Rupr. (bark, sample no. 145, water ext.).



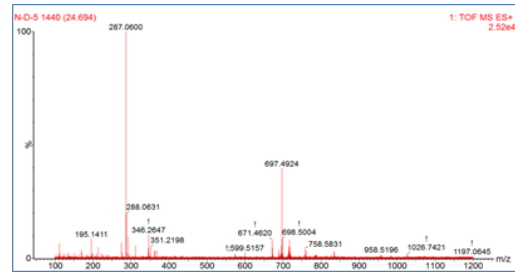
(D-1)



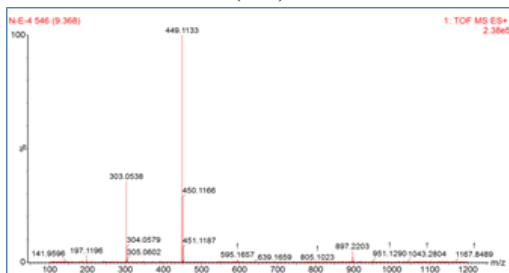
(D-2)



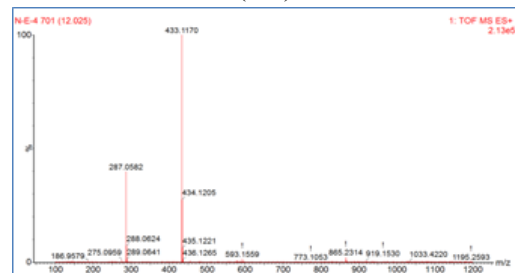
(D-3)



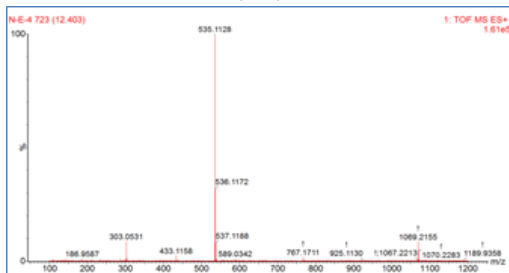
(D-4)



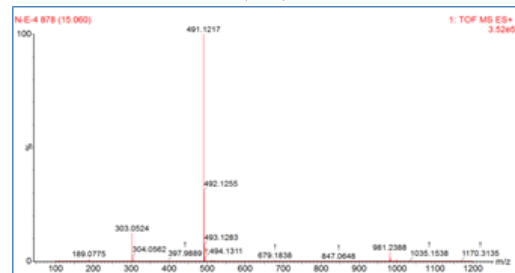
(E-1)



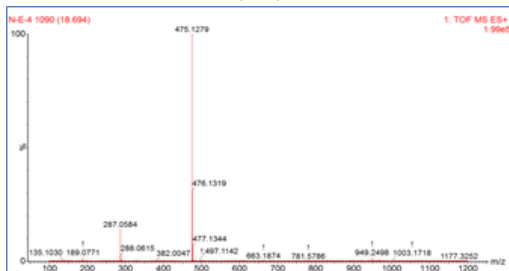
(E-2)



(E-3)

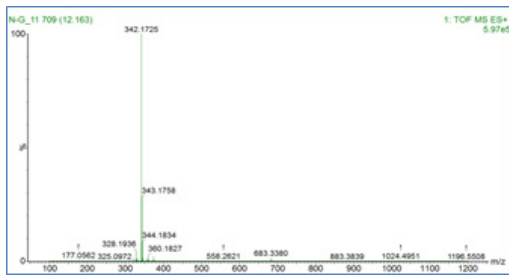


(E-4)

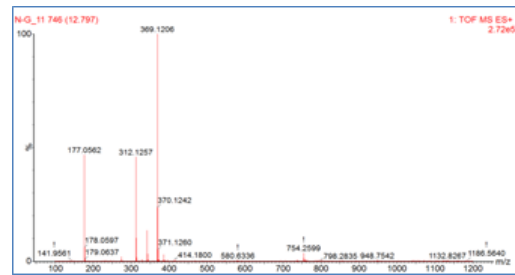


(E-5)

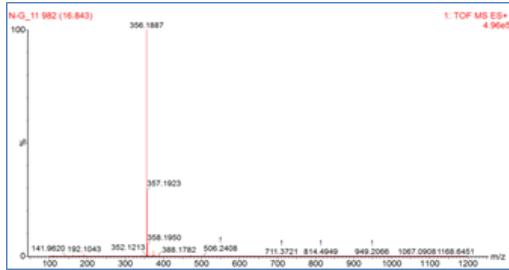
Fig. 4. Continued.



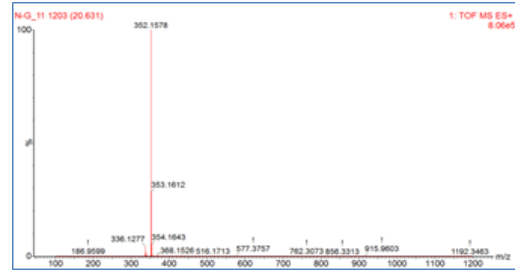
(F-1)



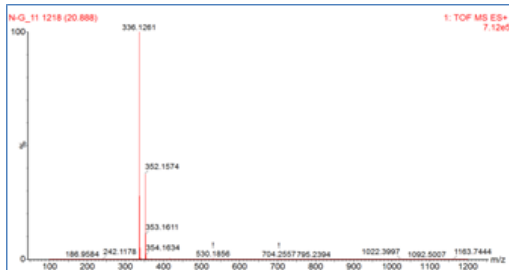
(F-2)



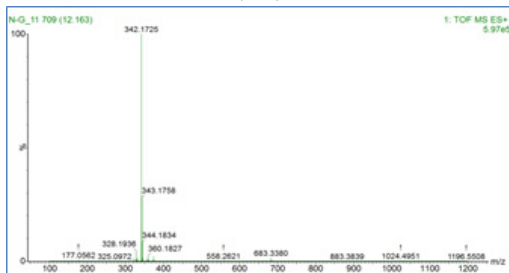
(F-3)



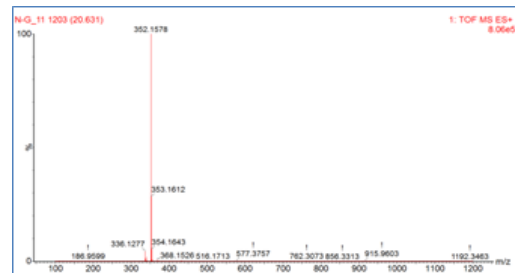
(F-4)



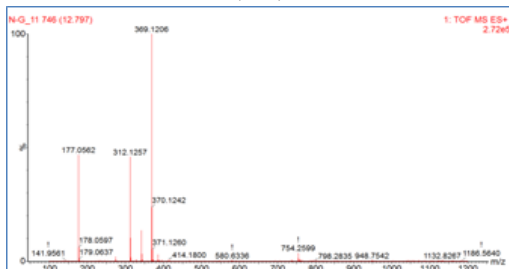
(F-5)



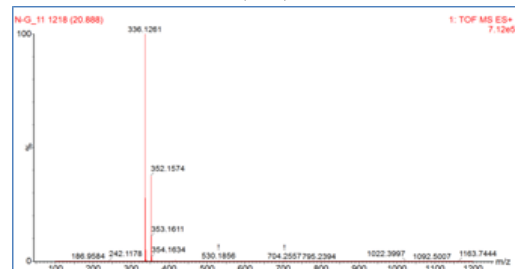
(G-1)



(G-2)

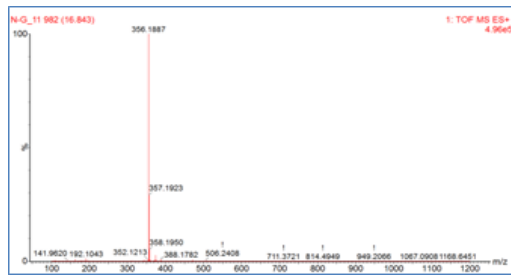


(G-3)



(G-4)

Fig. 4. Continued.



(G-5)

Fig. 4. Continued.

(6" malonylglucoside)-glucoside (MW 696)으로 추정되는 화학성분이 확인되었다. 또한, 시료번호 140 (쪽 꽃의 메탄올 추출물)의 UPLC-UV 크로마토그램(E)에서는 quercetin-3-O-rhamnoside (MW 448), kaempferol-3-O-rhamnoside (MW 432), quercetin-3-O-(4" malonyl) rhamnoside (MW 534), quercetin-3-O-(4" acetyl) rhamnoside (MW 490) 및 kaempferol-3-O-(3" or 4" acetyl) rhamnoside (MW 471)로 추정되는 화학성분 확인되었고, 시료번호 144 및 145 (황벽나무 수피의 메탄올 추출물과 물 추출물의 크로마토그램인(F)와 (G)에서는 phellodendrine (MW 342), 3-O-feruloyl quinate (MW 368), menispermene (MW 356), plamtine (MW 336) 및 berberine (MW 352)이 검출되었다. 따라서, 이러한 UPLC-UV-MS 분석을 통해 각 선발식물별로 기존 문헌에서 보고된 특징적인 화학성분이 존재하는 것으로 추정되었다.

적 요

본 연구는 천연식물자원을 대상으로 치매의 일종인 알츠하이머병을 개선 및 치료할 수 있는 소재를 발굴하기 위해 식물추출물에 대해 콜린성 에스테라제(AChE) 저해활성을 탐색하였다. 184개의 식물추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단일농도에서 아세틸콜린에스테라제(AChE)을 실험한 결과, 10% 이상의 AChE 저해활성을 보였던 추출물은 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr., 수피, 메탄올 추출물), 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr., 수피, 물 추출물), 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn., 수술/자방, 메탄올 추출물), 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS, 꽃, 메탄올 추출물), 중국황련(*Coptis chinensis*, 뿌리줄기, 메탄올 추출물), 육계(*Cinnamomum cassia* Blume, 수피, 에탄올 추출물) 및 잇꽃(*Carthamus tinctorius* L., 열매, 에탄올 추출물) 등 7개가 확인되었다. 선발된 7개의 추출물에 대해서는 25,

20, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종농도에서 AChE 및 BuChE에 대한 저해활성을 검정하였다. 그 결과, AChE 저해활성에서는 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올 추출물이 $15.0 \pm 3.4\% \sim 73.5 \pm 3.6\%$, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올 추출물이 $19.5 \pm 9.1\% \sim 63.5 \pm 5.4\%$, 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올 추출물이 $81.6 \pm 0.4\% \sim 58.5 \pm 2.4\%$, 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.) 수피의 메탄올 추출물이 $69.9 \pm 1.8\% \sim 80.5 \pm 0.9\%$, 그리고 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.) 수피의 물 추출물이 $54.8 \pm 0.6\% \sim 78.3 \pm 2.6\%$ 의 값을 보였다. BuChE 저해활성에서는 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 수술/자방의 메탄올추출물, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS) 꽃의 메탄올추출물 및 중국황련(*Coptis chinensis*) 뿌리줄기의 메탄올추출물이 각각 $58.9 \pm 7.8 \sim 81.6 \pm 1.9\%$ 및 $45.8 \pm 9.8\% \sim 72.4 \pm 2.5\%$ 및 $33.1 \pm 9.9\% \sim 55.4 \pm 5.4\%$ 의 순으로 높은 BuChE 저해활성을 나타내었다. 이러한 실험결과를 종합하여 볼 때, 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)의 수술/자방, 쪽(*Persicaria tinctoria* H. GROSS)의 꽃, 중국황련(*Coptis chinensis*)의 뿌리줄기, 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.)의 수피는 알츠하이머병(AD)의 개선 효과를 나타낼 수 있는 후보 소재로 사료되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(PJ01193201)의 연구비 지원으로 수행된 결과이며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

- Alzheimer's Association. 2006. An Overview of Alzheimer's Disease & Related Dementias. Los Angeles, CA (USA). pp. 4-10 (in Korean).

- Cho, K.H., M.S. Oh, H.G. Kim, S.H. Lee, K.S. Chung and A.J. Kim. 2014. Effects of Korean *Zingiber mioga* R. (flower buds and rhizome) extract on memory. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43:1519-1526.
- Evans, D.A., H.H. Funkenstein, M.S. Albert, P.A. Scherr, N.R. Cook, M.J. Chown, L.E. Hebert, C.H. Hennekens and J.O. Taylor. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in community population of older persons. Higher than previously reported. J. Amer. Med. Assoc. 262:2551-2556.
- Giacobini, E., 2003. Cholinergic function and Alzheimer's disease. Int. J. Geriatr. Psych. 18:S1-S5.
- _____, R. Spiegel, A. Enz, A.E. Veroff and N.R. Cutler. 2002. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. J. Neural. Transm. 109:1053-1065.
- Greig, N.H., T. Utsuki, D.K. Ingram, Y. Wang, G. Pepeu, C. Scali, Q.S. Yu, J. Mamczarz, H.W. Holloway, T. Giordano, D. Chen, K. Furukawa, K. Sambamurti, A. Brossi and D. K. Lahiri. 2005. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. PNASU. 102:17213-17218.
- Jang, T.W., S.H. Nam and J.H. Park. 2016. Antioxidant activity and inhibitory effect on oxidative DNA damage of ethyl acetate fractions extracted from cone of red pine (*Pinus densiflora*). Korean J. Plant Res. 29:163-170.
- Kasa, P., H. Papp and K.P. Torok. 2000. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. Neuroscience 101:89-100.
- Kim, D.I., S.H. Lee, E.Y. Hur, S.M. Cho and H.J. Park. 2005. Screening of natural plant resources with acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34:427-432.
- Kim, S.H. and D.K. Chung. 2011. Nootropic and anti-amnesic effect of PPA on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. J. Orient. Neuropsych. 22:185-199.
- Lancôt, K.L., N. Herrmann, K.K. Yau, L.R. Khan, B.A. Liu, M.M. LouLou and T.R. Einarson. 2003. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta analysis. Can. Med. Assoc. J. 169:557-564.
- Lee, S.E., J. Choi, J.H. Lee, H.J. Noh, G.S. Kim, J. Kim, H.Y. Chung and S.Y. Kim. 2013. Screening of useful plants with anti-inflammatory and antioxidant activity. Korean J. Plant Res. 26:441-449.
- Lyu, H.N., M.H. Park, S.G. Hong, D.Y. Lee, K.M. Han, J.S. Yoo, S.Y. Kim, Y.D. Rho and N.I. Baek. 2007. Development of biologically active compounds from edible plant sources- X X V. Immunostimulating effect of edible plant extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 39:708-714.
- Nordberg, A. 1996. Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. Acta. Neurol. Scand., Suppl. 168:87-92.
- Ruan, C.J., L. Zhang, D.H. Chen, Z. Li, G.H. Du and L. Sun. 2010. Effects of trans-2,4-dimethoxystibene against the neurotoxicity induced by A β ₂₅₋₃₅ both *in vitro* and *in vivo*. Neurosci. Res. 67:209-214.
- Tabet, N. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! Age. Ageing 35:336-338.

(Received 5 May 2018 ; Revised 14 August 2018 ; Accepted 14 September 2018)