

최 종
연구보고서

신경퇴행성 질환 치료를 위한 허브류로부터
tyrosine hydroxylase 유전자, 신경영양인자
발현유도 물질 탐색 및 응용

Development and application of tyrosine
hydroxylase gene and neurotrophic factor inducible
material screening from medicinal herbs for prevent
of Neuronal cell degradation

조 선 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “신경퇴행성 질환 치료를 위한 허브류로부터 tyrosine hydroxylase 유전자, 신경영양인자 발현 유도 물질 탐색 및 응용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 05 월 24 일

주관연구기관명 : 조선대학교

총괄연구책임자 : 김 성 준

세부연구책임자 : 유 진 철

세부연구책임자 : 전 홍 성

연 구 원 : 김 재 성

연 구 원 : 김 승

연 구 원 : 심 명 화

연 구 원 : Sapkota Kumar

연 구 원 : 박 세 은

연 구 원 : 최 봉 석

연 구 원 : 이 효 정

연 구 원 : 김 수 민

연 구 원 : 박 은 정

연 구 원 : 김 지 현

연 구 원 : 주 지 형

연 구 원 : 김 지 은

연 구 원 : 하 정 환

연 구 원 : 장 소 영

연 구 원 : Simkahaka J.R.

연 구 원 : 조 홍 석

요 약 문

I. 제 목

신경퇴행성 질환 치료를 위한 허브류로부터 tyrosine hydroxylase 유전자, 신경영양인자 발현 유도 물질 탐색 및 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

예방의학과 치료의학의 발달로 인류의 인구분포에서 노인이 차지하는 비율이 높아짐에 따라 노인성 신경퇴행성 질환의 치료가 대두되고 있으나, 화학적으로 합성되어 개발된 치료제로는 노인성 퇴행성 질환을 호전시킬 수 있지만 장기간 복용해야하며 위장장애, 어지러움증, 자율신경계 이상, 정신기능 이상 등의 많은 부작용이 나타나므로 다양한 천연물로부터 부작용이 없는 치료제 개발이 요구되어지고 있다. 이러한 노인성 신경퇴행성 질환 중에 대표적으로 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)을 들 수 있으며, 정상인의 뇌에서 흑색질이라는 부위의 신경세포들이 변성되고 이곳에서 만들어지는 도파민이라는 신경전달물질의 결핍이 나타나게 된다. 파킨슨병의 주요 증상으로는 환자가 가만히 있을 때 떨리는 진전(tremor)이 나타나며, 서동(bradykinesia)로 움직임이 느려지게 된다. 이러한 서동은 보폭이 작아지며 발이 지면에서 떨어지지 않고 발을 끌면서 걷는 보행장애, 얼굴의 무표정, 음량이 점점 작아지고 웅얼거리는 증세가 나타나게 된다. 근육이 경직(rigidity)되어지며, 처음에는 경미하나 점차 자세의 불안정으로 인해 자꾸 넘어지는 자세불안정(postural instability) 등의 증세가 나타나게 된다. 파킨슨병은 대부분의 환자에서 서서히 증상이 나타나게 된다. 증상악화 속도는 사람마다 차이가 있지만 일반적으로 매우 느리게 진행되므로 예방이 매우 중요하며 대부분의 환자들은 적절한 치료를 받으면 오랜 기간동안 큰 불

편함이 없이 사회활동이 가능하다. 이러한 파킨슨병의 치료는 약물치료와 수술치료를 병행하게 된다. 수술치료의 경우 대부분 완치를 위해 시행하기보다는 환자의 증상을 호전시키기 위하여 제한된 범위 내에서 시행하게 되나 적응증, 부작용, 실어증, 일시적 기억상실 혹은 영구 기억상실 등의 심각한 부작용을 동반하게 된다. 파킨슨병 치료제의 경우 흑색질의 도파민 양을 증가시키기 위한 이차적 치료제가 다양하게 개발되어졌다. 엘도파(L-dopa)제는 파킨슨병에서 가장 많이 사용되는 약물로 도파민 합성시 도파민의 전구체 물질로 뇌 안에 부족한 도파민을 직접 보충해 주는 약물이며, 도파민 수용체 작용제의 경우 부족한 도파민을 대신하여 도파민과 비슷한 작용을 하고 주로 엘도파 제제와 병행하여 투약하게 된다. 또한 항콜린제 또는 엘데프릴는 주로 초기 파킨슨병환자 치료에 자주 사용되고 있다.

최근 개발되어진 레보도파는 경구투여를 통하여 뇌로 들어갈 수 있는 특별한 구조를 갖고 있어 도파민 투여보다 훨씬 더 잘 흡수되어 뇌 안에서 도파민으로 변환되고 파킨슨병 환자에서 도파민 농도를 높여주어 수년 동안 증상을 호전시킬 수 있다. 또한 도파민의 대사 경로에 관여하는 효소를 억제하여 뇌 안의 도파민 농도를 오래 유지시켜 주는 톨카폰(Tolcapone)이라는 약물이 있는데, 환자에게 매우 효과적이라는 보고가 있지만 부작용으로 간독성이 있어 사용에 제한을 받고 있다. 현재 새로운 도파민 수용체 작용제를 비롯한 많은 약물들이 임상시험 중에 있으나, 이러한 약물들은 증상을 호전시키기 위한 것이므로 약을 아무리 오래 투약하였다고 하더라도 약을 중단한다면 다시 증상이 나타게 된다. 최근에 심각한 사회문제로 대두되어진 노인성 신경퇴행성 질환인 파킨슨병은 신경관련 질병의 치료가 신경분자생물학수준에서 neuron내에 관련된 neurotrophic factor 유전자 및 TH 유전자를 이용한 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 따라서 약용식물에서 추출한 천연물질의 개발로 부작용을 최소화하고 파킨슨병에 관련된 유전자들의 유전자 발현유도를 통하여 증상을 완화 혹은 치료할 수 있는 천연물질 탐색이 필요한 실정이다.

Meyer에 의하면 약용식물인 인삼(*Panax ginseng*)의 뿌리는 흥분과 우울증세, 항경련성 활성화, 항정신성 활성화, 진통억제 활성화, 피로회복 활성화, 촉진 인지수행을 포함한 중추신경계

의 많은 작용을 한다(Saito, 1990). 인삼을 포함한 허브를 이용한 치료제는 파킨슨병에서와 같은 신경계 손상으로 나타나는 다양한 형태를 보호하는 작용을 하는 것으로 보인다. 인삼과 그 구성성분인 ginsenoside는 뇌조직을 포함한(Siddique et al., 2000) 다양한 조직에서 항산화 스트레스를 감소시키고(Kitts et al., 2000), 뇌의 국소빈혈(Lim et al., 1997), 척수손상(Liao et al., 2002)과 근위축성 측삭 경화증(Jiang et al., 2000)에서 신경계 손실을 예방한다. Kampen(2003)등은 이러한 모델에서 인삼 추출액 G115을 이용하여 Substantia nigra에서 Dopaminergic neuron의 신경보호작용은 파킨슨병의 완화시킴을 연구하였다.

허브란 약용식물로 온대지방을 원산으로 하면서 향기가 있으며 인간에게 유용한 모든 식물을 일컫으며, 전 세계에 약 2,500여종 이상이 있으며 생명력이 강해 산이나 물가, 어느 곳에든 뿌리를 내리고 튼실하게 잘 자라는 특징을 가지고 있다. 중국에서는 기원전 5,000년경부터 허브를 사용하였으며 이집트에서는 기원전 2,800년경에, 그리고 바빌로니아에서는 기원전 2,000년경에 허브를 사용하였다는 사실을 역사적 기록을 통해 알 수 있으며, 우리나라도 이미 5,000년 전부터 허브를 이용하기 시작했다. 고대에는 치료목적인 약초, 방부제, 미용법으로 이용하였으며, 그리스에서 허브의 약리 연구가 시작되면서부터 서양에서는 식물성분의 병에 대한 효력의 유무를 연구하면서 분석기술이 발달하여 갖가지 병이나 상처에 듣는 성분들이 분명해지자 그 성분을 합성하려는 연구가 시작되었다. 특히 허브를 이용한 아로마테라피는 1020년대에 프랑스의 화학자 Rene-Maurice Gattefosse에 의해 소개되었으며, 아로마테라피는 우리 몸에 이로운 향기를 의미하는 "Aroma"와 치료법을 의미하는 "therapy"의 합성어로서 허브에서 추출한 휘발성정유(Essential oil)로 심신을 건강하게 하는 향기 요법이 개발되었다. 아로마테라피는 신체의 자체 회복력을 높이고 스트레스나 혹은 스트레스와 연관성을 갖는 증상에 의한 육체적, 정신적인 여러 가지 질병, 스트레스로 인한 정서 불안 등의 신경성 장애 불안, 우울증 등의 노이로제 치료, 각종 노인성 치매에 효과가 있음이 알려졌다.

따라서 본 연구에서는 천연자원인 약용식물인 허브를 이용한 연구가 국내에서도 활발하

게 이루어지고 있으나 파킨슨병에 대한 연구는 미진한 편이다. 본 연구실팀은 다년간 미국 코넬대학교 신경분자생물학실에서 파킨슨병과 이에 관련된 유전자들을 연구한 경험을 토대로 하여 아로마테라피와 연계하여 신경분자생물학적인 노인성 신경퇴행성 질환인 파킨슨병에 대한 예방효과 및 완화시킬 수 있는 치료제 개발에 목적이 있다. 허브류로부터 강력한 신경영양인자 및 도파민생합성에 관련된 유전자들의 발현유도물질을 분리정제 및 특성을 분석하여 치료에 있어 부작용을 최소화할 수 있는 천연물질을 개발하며, 허브재배 농가 및 국내 원예농가에 허브를 이용한 신경퇴행성 질환 예방 및 치료에 대한 과학적 가능성을 제공하며(본 실험실은 허브를 이용한 최근 예비실험에서 쥐의 뇌에 Tyrosine hydroxylase 유전자와 Neurotrophic factor 유전자의 발현유도가 확인되었다. 그림 1,2 참조), 이를 이용한 기능성식품제조에 대한 방향성을 제시하여 국내 허브의 경쟁력 제고 및 고부가가치 농가소득원으로 개발하고자한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 허브 추출물에 의한 도파민 생합성 관련 유전자 및 신경영양인자의 유도발현분석

도파민의 감소는 파킨슨병의 유발원인일 뿐만 아니라 신경세포의 생존에 있어서도 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특히 도파민의 합성은 L-tyrosine을 L-dopa로 전환되어지고 L-dopa는 dopamine으로 전환되어진다. 이들의 각각 전환과정에는 각각의 전환효소가 관련되어져있으며, 특히 L-tyrosine에서 L-dopa로 전환시키는데 관여하는 TH에 관하여 많은 연구가 진행되어졌다. TH는 도파민 생합성관련 신경에 포함되어있는 catechol 합성의 첫 번째 효소로 rate-limiting 효소로 알려져있다. 이러한 TH는 포유동물의 중추신경계에서 hypothalamus, midbrain, brainstem, olfactory bulb 등의 특정부위에서만 제한적으로 발현되어지기 때문에 높은 조직특이성을 나타낸다. 특히 도파민신경세포의 분화가 적절히 일어나지 못하거나, 여러 원인으로 인한 중뇌 도파민신경세포의 사멸 후의 재생과정에서의 적절한 TH 유전자의 발현 조절이 일어나지 않는 것이 파킨슨병의 병리적 원인으로 밝혀지게 됨에 따라 이러한 유전자의 유도발현이 파킨슨병의 예방 또는 치유에 있어서 매우

중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 한편 신경영양인자는 신경세포의 성장과 분화에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다. 특히 파킨슨씨병과 관련하여 BDNF (Brain derived neurotrophic factor), GDNF (Gila cell line derived neurotrophic factor) 등이 도파민 생합성 신경에 관련되어있다. 따라서 본 연구에서는 신경세포 및 실험동물을 이용하여 mRNA level 및 단백질 수준에서의 유도발현을 분석하게 되며, immunohistochemistry를 이용하여 조직 내에서의 발현을 분석하게 된다.

2. 산화적 스트레스로부터 신경세포보호 효능 분석

파킨슨병 발병원인으로 주목받고 있는 것은 체내에서 생성된 라디칼이온 또는 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)에 의하여 dopaminergic neuron의 mitochondria 전자전달계 복합체 I 을 공격함으로써 에너지 대사에 이상이 발생함으로써 도파민 합성에 관련된 신경세포의 위축이 보고되었다. 이러한 라디칼이온 또는 과산화수소의 체내 생성은 지속적인 스트레스에 의하여 생성되어지게 되며, 뿐만 아니라 다양한 살충제, 농약, 등 유기화합물질에 의한 노출에 의하여 치명적인 라디칼 이온 또는 과산화수소가 체내에서 발생되어지게 되며, 이러한 이유로 인하여 후천적인 신경퇴행성이 일어나는 것으로 많은 연구를 통하여 보고되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 약리활성 및 생리활성을 가지고 있는 허브 특히 허브의 항산화효능에 의한 대뇌 라디칼 이온 및 과산화수소에 의한 신경퇴행성 억제 및 신경보호효과를 분석하고자 하였다. 이와 뜻을 같이하여 급속한 공업화 사회로 변모되어짐에 따라 증가되어지는 환경공해는 이러한 파킨슨씨병의 유발에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있을 뿐 만 아니라 스트레스에 의하여 뇌에서 형성되어지는 라디칼이온들에 의하여 뇌 신경세포의 에너지를 생산하는 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I 이 망가짐으로써 에너지 생산에 이상이 발생함으로써 도파민 합성에 관련된 신경세포의 위축이 되어진다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 다양한 허브 추출물 및 이로부터 분리되어진 물질들의 항산화효능을 분석함으로써 체내에 형성된 대뇌 라디칼 이온 및 과산화수소를 제거하는 매카니즘에 따라 신경세포의 미토콘드리아 DNA의 손상을 억제시킴으로써

효능을 분석하고자 하였다. 이러한 라디칼이온 및 과산화수소에 의한 신경세포의 미토콘드리아 DNA 손상은 *in vitro*에서는 Ca^{2+} 을 처리하게 됨으로써 tetrahydrobiopterin (BH4) 가 유도되어지고 *in vivo*에서는 지속적인 스트레스에 의하여 과도한 BH4의 유도는 산화적 스트레스를 유발시키게 된다. 특히 BH4의 경우 도파민 생합성 경로에서 TH의 합성에 있어서 매우 중요한 인자로 작용하게 되지만 이러한 BH4의 과도한 발현은 산화적 스트레스를 유발시킴으로써 미토콘드리아 DNA를 손상시키게 된다. 뿐만 아니라 substantia nigra에 존재하는 면역에 관련된 세포 (macrophage-like immune cell 등) 또한 이들의 생존 수단으로써 BH4를 사용하고 있기 때문에 substantia nigra에 분포되어있는 도파민 생합성에 관련된 신경세포들은 고농도의 BH4에 노출되어져있으며, 이러한 이유로 신경퇴행성이 유발되어지는 것으로 추정하고 있다. 따라서 본 연구에서는 BH4 및 H_2O_2 를 처리함으로써 유발되어지는 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상을 허브 추출물을 처리함으로써 억제되어지는 신경보호효과를 분석하였다.

3. 신경세포 사멸

파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환은 신경세포사멸에 의하여 신경세포 손상과 소실이 이루어지게 된다. 이에 따라 중뇌의 substantia nigra에 분포되어있는 도파민 생합성관련 신경세포들이 선택적으로 소멸되어짐으로써, 운동기능조절에 관여하는 기저핵의 기능이상을 초래하여 운동기능장애가 유발되어지게 되고 이에 따라 파킨슨병 환자들르운 운동기능 장애를 앓게 되는 것이다. 불행하게도 한번 사멸되어진 세포는 재생이 불가능하기 때문에 이러한 신경세포들을 재생시키기 위한 stem cell 연구도 활발하게 진행되어지고 있기는 하지만 아직은 매우 초보적인 단계이며, 아직까지 안전성이 보장되어있지 않기 때문에 사용에는 매우 제한되어져 있다. 따라서 신경세포의 apoptosis 경로를 분석함으로써 파킨슨병의 병변 원인 및 이를 예방하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 신경세포에서의 apoptosis는 caspase라는 단백질들의 순차적인 활성화에 의하여 이루어지게 되며, 이러한 caspase의 활성화는 apoptosome을 활성화시킴으로써 세포사멸을 초래하게 된다. 따라서

국내에 자생 또는 재배되어지고 있는 허브류의 추출물을 신경세포에 처리함으로써 세포사멸기작을 억제시키는 효능을 분석함으로써 신경세포의 apoptosis 측면을 분석함으로써 신경세포의 퇴행을 억제시키는 메카니즘을 분석하게 된다. 따라서 허브추출물에 대한 신경세포의 viability를 분석하게 되며, apoptosis를 유발시키는 rotenone을 처리하여 apoptosis의 중요한 mediator인 caspase-3, caspase-8, 및 caspase-9 등을 발현유무를 비교분석함으로써 결과를 유추하게 된다.

4. 후보 허브류로부터 생리활성 물질분리

후보 허브류로부터 신경퇴행성 예방을 위한 물질을 분리하기 위하여 다양한 유기용매를 이용하여 분획을 분리시킨 후 HPLC를 수행함으로써 생리활성물질을 분리하게 된다. 분리된 생리활성물질은 항산화활성 및 신경영양인자 발현유도, 도파민관련 유전자의 발현유도를 단백질 및 mRNA 수준에서 분석하게 되고, 이에 대한 활성을 분석하게 된다.

특히 본 연구에서는 항산화활성을 나타내는 다양한 물질 carnosol 및 carnosic acid 등과 같은 물질들 및 이외의 기능성물질을 분리함으로써 신경보호효과 등을 분석하게 된다.

5. 신경퇴행성 예방 기능성 시제품 개발 및 이에 대한 효능분석

기능성 시제품을 개발하여 이에 대한 효능을 분석하고 특히 조직 내에서 직접 발현유무를 확인함으로써 효능에 대한 정확한 결과를 유추하고자한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1-1. 도파민 생합성관련 유전자 및 신경영양인자 유도발현을 통한 우수허브의 선정.

본 연구과제를 수행하기 위하여 상수허브랜드로부터 로즈마리, 레몬버베나, 그린타임, 체리세이지, 허니씨클, 애플민트, 레몬밤, 슈퍼민트, 디지털리스, 로즈제라늄, 마리노라벤더,

스테비아, 레몬그라스, 파인애플민트, 오레가노 및 페퍼민트 총 16종의 허브를 수집하여 이들에 대한 항산화, human transformed primary embryonal kidney cell 293 세포, PC12 및 human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서 농도 및 시간에 따른 세포독성, 도파민 생합성과 관련된 TH 및 AADC, 신경영양인자인 BDNF 및 GDNF의 유도발현을 mRNA 및 protein 수준에서의 유도발현을 분석한 결과 로즈마리 추출물이 신경보호효과 및 신경퇴행성에 있어서 가장 적합할 것으로 사료되어진다.

1-2. 산화적 스트레스에 의하여 유발되어지는 신경손상에 대한 보호효과 분석

산화적 스트레스를 지속적으로 받게 되면 미토콘드리아내의 DNA의 변화가 일어나며 apoptosis 발생에 관여하는 유전자들의 발현을 유도한다. 발현된 유전자들은 apoptosis 억제에 관여하는 유전자들의 활성을 억제시키며 apoptosis를 일으킨다. 과산화수소와 로즈마리 추출물을 동시에 처리하였을 때 apoptosis 유발 유전자 발현은 감소하고 apoptosis를 억제하는 유전자의 발현의 증가는 로즈마리 추출물이 가지는 항산화능력에 의해 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 것으로 추정된다.

1-3. 신경보호효과에 관련된 약리활성물질 탐색

로즈마리로부터 분리정제되어진 항산화물질인 Carnosol이 BDNF를 증가시키는 것 외에 신경세포 보호 효과를 가지는데 관여하는 신호전달 경로를 확인하였다. 그 결과 MAP kinase family의 일원으로서 세포사에 관여하는 것으로 알려진 JNK의 활성화를 carnosol이 농도별로 뚜렷하게 저지하는 것을 확인하였다. 신경세포의 사멸 과정에서는 여러 가지 caspase들이 관여하는데, carnosol의 신경세포 보호 작용이 caspase 활성을 억제하는지의 여부를 조사한 결과 신경세포사가 일어날 때 미토콘드리아와 소포체로부터 방출되어 활성화 되는 caspase -9, -12 등이 carnosol에 의해 저해되었고, 세포사의 최종 단계에 작용하는 caspase-3의 작용도 효과적으로 막아주었다. 이러한 결과는 carnosol이 신경세

포 보호 효과를 가지는 경로가 BDNF를 증가시키는 것 외에 JNK와 caspase의 작용을 억제하는 추가적인 기능이 있음을 의미한다.

1-4. 허브추출물로부터 신경보호효과기능성물질분리

로즈마리로부터 신경보호효능을 나타낼 수 있는 생리활성물질을 분리하기 위한 기초자료를 준비하기 위하여 메탄올, 에탄올 및 열수추출을 하여 추출물을 조제하였다. 이들의 세포독성을 분석한 결과 로즈마리 열수추출물이 293, PC12 및 SH-SY5Y 모두에서 세포독성이 없음을 확인하였으며, 메탄올 및 에탄올 추출물의 저농도에서도 특이한 세포독성이 없음을 확인하였다. 그러나 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도로 처리할 경우 세포독성이 나타남을 확인하였다. 또한 이들 추출물에 의한 도파민 생합성 관련 유전자 및 신경영양인자의 유도발현을 분석한 결과 로즈마리 메탄올 추출물이 쥐의 뇌막을 통과하여 BDNF 및 TH의 유도발현이 이루어지고 있음을 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 확인하였다. 또한 다양한 분리정제 방법을 이용하여 본 실험에 사용된 Rosemary 추출물에서 분리된 항산화 물질 CS H-1, CS H-2가 항산화 작용이 강력한 것으로 알려진 Rosemary에서 분리된 기지물질인 carnosic acid와 다른 물질임을 규명하고자 Carnosic acid를 Sigma사에서 구입하여 본 연구에서 분리한 CS H-1, 2와의 차별성을 조사한 결과 분리되어진 물질은 carnosic acid와는 다른 물질임을 확인할 수 있었다. TLC 상의 분석결과 물질의 고유의 값인 Rf값과 육안으로 볼 수 있는 발색 정도, UV 흡수 pattern, 10% 황산 분무에 의한 변화 등을 비교 하였을 때 Table 1.과 같이 Rosemary로부터 나오는 항산화 활성이 강력한 carnosic acid와는 다른 항산화 활성을 지닌 물질 CS H-1, CS H-2를 얻었음을 확인할 수 있었다.

1-5. 시제품의 기능성분석

최근 농촌진흥청 원예연구소가 실험용 쥐를 이용하여 천연 식물 향기가 스트레스를 감소시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 로즈마리 향기성분을 이용하여 신경영양인자 및 도

파민 생합성관련 유전자의 유도발현을 분석하였다. 로즈마리 essential oil 처리후 시간에 따른 발현량을 분석한 결과 시간이 경과할수록 TH 및 AADC의 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다. rat에 처리 후 4 시간이 경과하면서부터 TH 발현량이 크게 증가하였으며 8시간에서 가장 높은 유도 발현을 나타냈다. AADC는 2 시간, 4 시간에서는 발현량이 크게 증가하지는 않았지만 8시간에서는 가장 많은 발현량을 나타냈다. 이는 tyrosine hydroxylase에 의하여 tyrosine이 L-dopa로 전환되어진 후 AADC에 의하여 dopamine으로 전환되기 때문에 TH와 AADC가 발현되는 시간에서 차이를 나타낸 것이다. 이 실험을 통해서 DBH의 발현은 확인되지 않았지만 AADC가 발현되는 것으로 보아 장시간 처리하였을 경우 dopamine이 발현될 것이며 DBH 역시 발현될 것으로 사료 되어진다. essential oil에 의한 AADC와 TH의 발현은 직접 투여하지 않고 로즈마리 향기를 맡는 것만으로도 dopamine의 합성이 가능하며 dopaminergic neuron에 대한 보호효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여주고 있다.

2. 연구결과 활용 건의

방향족 물질 즉 향기성분은 인간의 호흡기를 통하여 뇌의 흑질부위의 도파민합성을 촉진시킴으로써 우울증, 불안감, 피로도를 완화시켜주는 역할을 하는 것으로 사료되어진다. 그러나 허브는 단순한 일차적인 재배에 의하여 관상용으로 상업화되어져 있거나, 허브티, 허브초, 아로마 오일 등과 같은 형태로 산업화되어 판매되어지고 있는 실정이다. 따라서 허브의 다양한 생리활성이 과학적으로 분석되어지고 이로부터 생리활성물질 분리 및 특성을 분석화하여 의료용 치료제 또는 기능성 제제와 같은 고부가가치 상품화가 절실히 필요로 되어지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 허브의 신경퇴행성예방이라는 기능성을 부여한 고부가가치 상품화 개발을 위한 초기 단계로써 허브의 기능성분석 및 기능성을 부여하는 차원으로 신경퇴행성 예방을 위한 허브를 선정하고 이에 대한 분자생물학적 분석을 시도 하였다. 이와 더불어 신경퇴행성예방을 위한 기능성시제품 개발 및 이에 대한 효능분석을 수행함으로써 고부가가치 신경퇴행성예방 기능성을 부여한 시제품의 기술이전을

통한 허브 재배 농가의 새로운 고부가가치 소득원 창출 및 소득 증진에 본 연구의 목표가 있다.

SUMMARY

1-1. Evaluation of the effects of various herbs on the expression for key enzymes in dopamine biosynthesis and neurotrophic factors gene.

The exploration of ethnopharmacologic treatments may be a cost effective alternative, since naturally occurring compounds have been used in the treatment of neurodegenerative diseases such as PD, and AD. Several lines of evidence suggested that a herbal medicine capable of stimulating catecholamine biosynthetic enzymes and neurotrophic factors gene expression have been becoming a prospective agent for PD and AD therapy. In order to evaluate the protective effects of herbs, 16 species of herbs such as rosemary, lemon verbera, green time, cherry sage, honey suckle, applemint, lemon balm, supermint, digitalis, rose geranium, marino lavender, stevia, lemon grass, pineapple mint oregano and peppamint were purchased from Sangsu herb land. First, we investigated the effect of these herbs extract on viability of human embryonal kidney 293 cells, PC12 cells and human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Moreover, to evaluate the dose and time dependent effect of these herbs on catecholamine biosyntheticenzyme and neurotrophic factor genes expression, cells were treated with various concentrations of extract for different times. Related mRNA levels were determined by Reverse transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR), and real time-PCR. Protein levels were measured by western blot and immunohistochemistry.

Our results showed that at the effective concentrations, rosamary was not cytotoxic and the viability of these cells was increased significantly. Treatment

with rosemary extract induced tyrosine hydroxylase (TH), aromatic amino acid decarboxylase (AADC). The induction of these enzymes was found to depend on the dose and duration of administration. Furthermore, rosemary extract significantly increased the mRNA levels of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and remarkably elevated the protein levels of these two neurotrophic factors in a concentration and time-dependent manner. Among the tested herbs, rosemary was found to be effective in this regard.

1-2. Investigation of the potential neuroprotective effects of various herbs on oxidative insults-induced apoptosis in SH-SY5Y cells.

Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are suggested to be associated with the pathogenesis of PD. Accumulating evidence shows that oxidative stress as one of the important pathways leading to neuronal cell death in PD and is caused by neurotoxic agents, such as H_2O_2 , BH_4 which have been shown to induce apoptosis through cellular signaling mechanisms. Excessive neuronal apoptosis may lead to massive neuronal tissue damage, as seen in some human neurodegenerative diseases, like PD. Therefore, the use of anti-apoptotic agents as a way of neuroprotection could be a potential therapy to slow or ameliorate the progression of neurodegenerative diseases. In the present work, we used SH-SY5Y cells to determine the protective effect various herbs against H_2O_2 induced toxicity.

In this study, we observed that the viability of the cells was enhanced by treatment with rosemary extract compared with the cells treated with only H_2O_2 . We found that H_2O_2 caused a significant decrease in cell viability. In contrast, cells

exposed to the same amount of H₂O₂ in the presence of rosemary extract appeared remarkably preserved, indicating that rosemary extracts significantly prevented neuronal death. In addition, in the present work, through phase contrast microscopy, our results conformed that in SH-SY5Y cells by apoptotic mechanisms and that rosemary extract pre-treatment markedly mitigated these distinct morphological changes. We found that treatment of cells with H₂O₂ activated Caspase-3, Caspase-9, Bax and Bad. Pretreatment of cells with rosemary before H₂O₂ treatment significantly abrogated the caspase-3, caspase-9, Bax, and Bad activities induced by H₂O₂. These data indicate that rosemary partially inhibit the neuronal death process in the early stage of the mitochondrial apoptotic pathway. Therefore, the findings of this study suggest that the mechanism of H₂O₂ neurotoxicity may involve oxidative stress, and rosemary may act on reactive oxygen species to inhibit apoptosis by its anti-oxidant properties.

1-5. Exploration of the possible role of aromatic therapy in PD

Approaches to treat Parkinson's disease involve DA replacement in the brain introduction of a direct DA precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) and / or inducing the expression of enzymes involved in dopamine metabolism. Neuroprotective therapy to rescue dopamine neurons, which could alter and prevent the progression of PD has been proposed as an alternative to symptomatic treatment. Several lines of evidence suggested that a herbal medicine capable of stimulating catecholamine biosynthetic enzymes and neurotrophic factors gene expression have been becoming a prospective agent for PD and AD therapy. In this study, expression of the TH and AADC gene were used to evaluate the

activation of dopaminergic pathway by exposed to rosemary odors in the rat. Levels of the TH and AADC mRNA and proteins in the brain were significantly high in rats exposed to rosemary order than the animals placed in a relatively order-free chamber. We propose that the neuronal ensembles expressing increased mRNA and protein levels of the key catecholamine enzymes with odor stimulation represent principle functional units of sensory processing and may be potential approach to regulate dopamine levels. Interestingly, for the first time we have clearly demonstrated that rosemary odors could upregulate the TH and AADC gene expression. Therefore it could be a potential candidate and aromatic approach could be an ideal alternative therapy in PD.

In conclusion, Potential neuroprotective approaches for PD have been focused on agents that can reduce oxidative stress, combat excitotoxicity, provide trophic factors, enhance mitochondria function, counteract inflammation and inhibit apoptosis. Taken together, these observations suggest that among several herbs, rosemary may serve as an ideal adjuvant in this regard in regulation of brain dopaminergic system and may contribute to neuroprotection in neurodegenerative diseases. Ultimately, elucidating the mechanisms by which these extracts exerts their neuroprotective effects could provide novel therapeutic approaches in PD. Further studies of neuroprotective mechanisms of these herb extracts in detail are necessary before definite conclusions can be drawn.

List of Tables

Table 1. Primer sequences of gene related dopamine biosynthesis pathway	48
Table 2. Antibodies used in western blotting	49
Table 3. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against 293 cells according to the concentration in 72 hr.	58
Table 4. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against 293 cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.	59
Table 5. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against PC12 cells according to the concentration in 72 hr.	60
Table 6. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against PC12 cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.	61
Table 7. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against SH-SY5Y cells according to the concentration in 72 hr.	82
Table 8. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against SH-SY5Y cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.	83
Table 9. 기능성식품의 세계 시장현황	183
Table 10. 미국 건강보조식품 시장현황	183
Table 11. 미국의 연도별 20대 허브제품	184
Table 12. 일본 건강식품 시장 추이	185
Table 13. 독일에서의 대표적인 허브와 적용증	185

List of Figurers

Fig. 1. The pathway of Catecholamine biosynthesis.	41
Fig. 2. Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	64
Fig. 3. Compare the Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	65
Fig. 4. Gene induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	67
Fig. 5. Compare the Gene induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	68
Fig. 6. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	69
Fig. 7. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	70
Fig. 8. Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in Rat oral administrated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	72
Fig. 9. Compare the Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in Rat treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	73
Fig. 10. Gene induction of BDNF and GDNF in rat oral administrated by various herbs extracts regard as after 2 hr, (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	74
Fig. 11. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in rat oral administrated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	75
Fig. 12. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in rat oral administrated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino	

	Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	76
Fig. 13.	Compare the protein induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	77
Fig. 14.	Immunohistochemical detection of Tyrosine Hydroxylase treated by Herb extracts in substantia nigra of rat brain.	80
Fig. 15.	Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	84
Fig. 16.	Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	85
Fig. 17.	Gene induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C).	86
Fig. 18.	Compare the protein induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.	87
Fig. 19.	Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C) and Lemon verbena regard as the treated time.	89
Fig. 20.	Compare the protein induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C) and Lemon verbena regard as the treated time.	90
Fig. 21.	Apoptosis pathway of oxidative stress-induced in cells.	94
Fig. 22.	Cell cytotoxicity of Hydrogen Peroxidase (H ₂ O ₂) in SH-SY5Y	100
Fig. 23.	Cell cytotoxicity of co-treated Hydrogen Peroxidase (H ₂ O ₂) with Rosemary in SH-SY5Y. (A: 8hr, B: 12hr)	101
Fig. 24.	western blot assay of gene expression of BDNF and GDNF of co-treated Hydrogen Peroxidase (H ₂ O ₂) with Rosemary in SH-SY5Y.	102
Fig. 25.	western blot assay of gene expression of BDNF and GDNF by co-treated Hydrogen Peroxidase (H ₂ O ₂) with Rosemary in SH-SY5Y.	103

Fig. 26. western blot assay of gene expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic factor of co-treated Hydrogen Peroxidase (H ₂ O ₂) with Rosemary in SH-SY5Y.	104
Fig. 27. Neuroprotection effect of the carnosol against neurotoxicants induced neuronal cell death.	109
Fig. 28. BDNF release in the SH-SY5Y cells by neurotoxicants, growth factors, and carnosol.	111
Fig. 29. Active JNKs are significantly decreased by carnosol.	113
Fig. 30. Carnosol reduced the caspase-9 and -12 activation.	114
Fig. 31. Carnosol reduced the caspase-3 activation.	115
Fig. 32. Cell cytotoxicity of various rosemary extracts as the various dose.	125
Fig. 33. Cell cytotoxicity of various rosemary extracts as the various treatment time.	126
Fig. 34. Antioxident activity of various rosemary extracts.	128
Fig. 35. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.	131
Fig. 36. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain.	132
Fig. 37. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various treatment time in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.	133
Fig. 38. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various treatment time in rat brain.	134
Fig. 39. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.	137
Fig. 40. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain.	138
Fig. 41. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various treatment time in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.	139
Fig. 42. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various treatment time in rat brain.	140
Fig. 43. Protein expression of TH and BDNF treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain.	142
Fig. 44. Protein expression of TH and BDNF treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.	143

Fig. 45. Anti-oxidant activity of different solvent condition	151
Fig. 46. Anti-oxidant aspect of sephadex LH-20 column chromatography fractions	152
Fig. 47. Patterns of TLC analysis	153
Fig. 48. Anti-oxidant activity of rosemary effluent	154
Fig. 49. TLC analysis condition in Hexane : EtAC = 10 : 1	155
Fig. 50. Anti-oxidant activity of rosemary concentration in Hexane : EtAC = 10 : 1	157
Fig. 51. TLC analysis condition in Hexane : EtAC=7 : 2	158
Fig. 52. Anti-oxidant activity of rosemary concentration in Hexane : EtAC = 7 : 2	159
Fig. 53. TLC pattern fraction in Hexane : EtAC = 10 : 1	160
Fig. 54. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	161
Fig. 55. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	162
Fig. 56. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	163
Fig. 57. Anti-oxidant activity after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	164
Fig. 58. TLC analysis of Second fraction after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	165
Fig. 59. Anti-oxidant activity after 2nd Sephadex LH-20 column chromatography	166
Fig. 60. TLC analysis of CS H-1	168
Fig. 61. Analysis of CS H-1 anti-oxidant activity	169
Fig. 62. TLC analysis comparing with Carnosic acid	170
Fig. 63. Anti-neurodegradative protocyte product using Rosemary extracts	174
Fig. 64. Time-dependent expression of tyrosine hydroxylase (TH) treated by Rosemary oil in rat substantia nigra.	175
Fig. 65. Time-dependent expression of aromatic amino acid decarboxylase (AADC) treated by Rosemary oil in rat substantia nigra.	176

목 차

국문 요약문	i
영문 요약문	xii
List of Table	xvi
List of Figures	xvii
국문목차	1
제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 1절 연구개발의 목적	10
제 2절 연구개발의 필요성	13
제 3절 연구개발과제의 범위	18
1. 국내 재배 또는 유통 중인 허브류로부터 신경보호효능을 가지고 있는 허브의 선정	18
2. 신경세포보호효능 분석을 위한 신경영양인자 유도발현 및 도파민 생합성 관련 유전자의 유도발현분석	22
3. 산화적 스트레스로부터 신경세포보호 효능 분석	23
4. 신경세포사멸	24
5. 후보허브류로부터 생리활성 물질분리	25
6. 신경퇴행성 예방 기능성 시제품 개발 및 이에 대한 효능분석	25

제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
-------------------------	----

제 1절 파킨슨병 치료에 관한 국내외 기술개발 현황	26
------------------------------------	----

1. Monoamine oxidase-B inhibitor	26
2. Selegiline (Deprenyl)	26
3. Rasailine	27
4. Dopamine reseptor agonists	28
5. animal studies	28
6. <i>In vitro</i> studies	29
7. Pramipexole 의 임상치료효과	29
8. NMDA receptor antagonists	30
9. Amantadine	30
10. Memantine	31
11. Riluzole	31
12. Iron chelator	32
13. 식품 항산화제	32
가. Tocopherol (vitamin E)	32
나. Flavonids 와 Polyphenols	33
14. 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs): Cyclo-Oxygenase inhibitor	33
15. neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist	34
16. Neurotrophic factor	34

제 2절. 허브로부터 유용추출물 분리 및 이를 이용한 신경보호효능 분석 현황	35
--	----

1. 허브의 항생제 효과	35
2. 허브의 항산화효과	35

3. 서양허브의 화학분석	36
4. 허브의 항암활성	37
5. 허브의 대중적 응용	37
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	39
제 I절. 신경보호효과를 가지는 유용허브의 선정	39
1. 연구의 이론적 배경	39
2. 재료 및 방법	40
가. 재료	42
나. Herb methanol extraction	42
다. 동물세포배양	42
라. 실험동물사육조건	42
마. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석	43
바. PC12 및 SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 신경영양인자 유도발현 분석	43
1) PC12 cell line에 허브 추출물 투여 방법	43
2) Total RNA 분리	44
3) Total RNA 전기영동	44
4) cDNA 합성	45
5) Quantity-Polymerase Chain Reaction (PCR)	45
사. Western blotting	45
1) 단백질 분리 및 정량	46
2) SDS-PAGE	46
3) western blotting	46
아. 면역조직화학법	47

3. 결과	50
가. 수집된 허브에 대한 문헌적 조사결과	50
나. 허브 메탄올 추출물에 의한 정상세포주 293 및 신경세포주 PC12 세포 에 대한 세포독성 분석	56
다. 허브 추출물 처리에 의한 TH, AACD, 신경영양인자의 유도발현분석 (<i>in vitro</i>)	62
라. 허브 추출물 처리에 의한 TH, AADC, 신경영양인자의 유도발현분석 (<i>in vivo</i>)	66
마. 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 이용한 세포보호효과 분석	78
바. Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서 허브추출물의 신경보 호효능 분석	79
4. 결론	91
 제 2 절 산화적 스트레스에 대한 허브 추출물의 신경세포 보호효과 분석	92
 1. 연구배경	92
2. 재료 및 방법	93
가. Herb methanol extraction	93
나. 동물세포배양	95
다. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석	95
라. SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 산화적 스트레스에 의하여 유도되어지는 Apoptosis로부터 보호효과 분석	95
1) SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 투여 방법	96
2) Ripa buffer를 이용한 단백질 분리	96
마. Western blotting	96
1) 단백질 분리 및 정량	96

2) SDS-PAGE	97
3) western blotting	97
3. 결과	97
가. 세포독성분석 (MTT assay)	97
나. 산화적 스트레스에 대한 로즈마리 추출물의 신경보호효과 분석 (BDNF 및 GDNF 유도발현)	98
다. 산화적 스트레스에 대한 로즈마리 추출물의 신경보호효과 분석 (tyrosine hydroxylase 및 AADC 유도발현)	98
라. 산화적 스트레스에 의해 발생한 세포사멸에 대한 로즈마리 추출물의 억제 효과	99
제 3 절 신경보호효과에 관련된 약리활성물질 탐색	105
1. 연구배경	105
2. 재료 및 방법	105
3. 결과	108
가. Carnosol의 human 신경세포 보호효과	108
나. Carnosol의 BDNF 분비 촉진 작용	108
다. Carnosol의 신경세포 보호기작 신호전달체계	110
4. 결론	112
제 4 절 허브추출물로부터 신경보호효과 기능성물질분리를 위한 선행연구 ·	116
1. 연구배경	116
2. 재료 및 방법	116
가. 로즈마리로부터 추출물 조제	116
나. 동물세포배양	117
다. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석	117

라. 전자전달공여능분석	117
마. SH-SY5Y cell line에 로즈마리 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 신경영양인자 유도발현 분석	118
1) SH-SY5Y cell line에 다양한 로즈마리 추출물 투여 방법	118
2) Total RNA 분리	118
3) Total RNA 전기영동	119
4) cDNA 합성	119
5) Quantity-Polymerase Chain Reaction (PCR)	120
바. Western blotting	120
1) 단백질 분리 및 정량	120
2) SDS-PAGE	121
3) western blotting	121
사. 면역조직화학법	121
3. 결과	122
가. 다양한 로즈마리 추출물의 세포독성효과 분석	122
나. 로즈마리 추출물들의 상대적인 항산화효과 분석	127
다. 다양한 로즈마리 추출물에 의한 신경영양인자 유도발현 분석	127
라. 다양한 로즈마리 추출물에 의하여 도파민 생합성과 관련된 유전자의 유도발현 분석	135
마. 단백질 수준에서 TH 및 BDNF의 유도발현 분석	136
4. 결론	141
제 5 절 로즈마리로부터 생리활성물질 분리	144
1. 연구배경	144
가. Rosemary 추출물 제조	144
나. Rosemary 추출액의 용매 분획	144

다. Rosemary 추출액 고형분 제조	144
1) Hexane 분획물 제조	144
2) Methanol 분획물 제조	144
라. 로즈마리 용매분획물의 분리, 정제, 구조분석	145
1) Rosemary 추출물의 size에 의한 활성물질분리 : 1차 Sephadex LH-20 column Chromatography	145
2) Rosemary 추출물의 Sephadex LH-20 column chromatography 활성 분획물의 Silica-gel column chromatography 수행	146
3) Silicagel column chromatography에서 부분 정제된 항산화 물질의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography	147
가) 3번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography	147
나) 2차 Sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석	147
다) 2번째 fraction의 2차 sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석	148
4) Rosemary 용매추출물의 Prep-TLC를 통한 최종 순수 분리	148
가) Hexane: Ethylacetate=10:1 => 3번째 농축물	148
나) Hexane: Ethylacetate=10:1=> 2번째 농축물	148
마. 항산화 물질인 CS H-1, CS H-2의 Carnosic acid와의 TLC 분석 ..	148
2. 실험결과	149
가. 용매 이행성에 따른 항산화 효과	149
나. 각 분획별 항산화 활성 양상	149
다. 활성 분획물의 Silica-gel column chromatography 수행	149
라. 3번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography	156
마. 2번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography	156
바. Rosemary 추출물의 Prep-TLC 최종 순수 분리	156
사. CS H-1, CS H-2의 Carnosic acid와의 TLC 분석	167

제 6 절 허브를 이용한 기능성시제품 제작 및 이에 대한 신경보호 효과 분석	171
1. 연구배경	171
2. 재료 및 방법	172
가. 로즈마리를 이용한 essential oil의 제조	172
나. 실험동물 사육	172
다. 로즈마리 essential oil의 처리	172
라. Immunohistochemistry	173
3. 결과	173
가. 로즈마리 essential oil의한 신경보호효과 분석 (tyrosine hydroxylase aromatic amino acid decarboxylase 유도발현)	173
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	177
제 1 절 1차년도 연구개발 목표 : 도파민 생합성 관련 및 신경영양인자 발현도에 대한 우수허브 선정	177
제 2 절 2차년도 연구개발 목표 : 허브에 의한 산화적 스트레스 및 유용약리활성물질 탐색	178
제 3 절 3차년도 연구개발 목표 : 신경퇴행성 예방 기능성 시제품 제작 및 이에 대한 기능성분석	179
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	180
제 1 절 추가연구의 필요성	180

제 2 절 기업화 추진방안	181
1. 가습기 사용 시 허브 기능성 추출물 투여액의 산업화	181
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	182
제 1 절 허브관련제품의 시장성분석	182
제 7 장 참고문헌	186

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

- 신경퇴행성질환을 치료 및 증상을 완화 할 수 있는 국내 자생 또는 재배되고 있는 유용허브선정 및 이에 대한 신경퇴행성 억제효능 분석
- 신경퇴행성질환 예방질환치료제 기능성 시제품 개발
- 신경퇴행성질환 예방 기능성시제품에 대한 기능분석 및 산업화를 통한 허브재배 농가의 소득증진

신경퇴행성 질환은 최근 들어 노령인구의 증가, 스트레스의 증가 및 환경독소의 증대에 따라 심각한 사회문제로 대두되어지고 있다. 이러한 신경퇴행성질환은 노화, 산화적 스트레스, 미토콘드리아(mitochondria) 대사이상, 신경세포에 관련된 단백질들의 구조적 결함 등에 의하여 유발되어지게 된다. 특히 이러한 신경퇴행성질환은 불과 몇년전만 하여도 노령 인구층에서 발병되어지기 때문에 노화와 관련된 질병으로 치부되어졌으나, 최근에서는 20 ~ 30 대의 청년층에서도 신경퇴행성 질환이 발병되어짐에 따라 이에 대한 관심이 고조되어지고 있다. 그러나 이러한 신경퇴행성 질환은 초기에는 임상적 소견이 나타나지 않음에 따라 발명을 진단하기 어려우며, 일단 병변이 발병한 후에는 뚜렷한 치료방법 및 치료제가 개발되어있지 않음으로써 단순히 병변의 진행을 늦추는데 초점을 둔 외과적 수술 및 약물치료요법이 개발되어졌다. 그러나 이러한 외과적 수술 또는 약물치료요법은 다양한 치료적 제약 및 부작용을 내포하고 있다. 따라서 이러한 신경퇴행성 질병은 예방이 최선이나 현재까지 뚜렷한 예방책 또한 개발지 않은 난점을 가지고 있다. 한편 도파민(dopamine, $C_8H_{11}NO_2$)이라는 뇌신경세포의 흥분전달물질이 있으며, 신경전달물질인 노르에피네프린(Norepinephrine)과 에피네프린(Epinephrine)의 전구물질로 알려져 있다. 이러한

도파민의 합성은 tyrosine hydroxylase (TH)에 의하여 L-tyrosine이 L-dopa 로 전환되어지며, L-dopa는 aromatic amino-acid decarboxylase (AADC)에 의하여 Dopamine으로 합성되어지게 된다. 이러한 도파민은 신경퇴행성 즉 파킨슨병이 발병되었을 때 뇌의 흑질부 (substantia nigra pars compacta)에서 감소되어지게 되고, 신경의 위축이 일어나게 되어진다. 그러나 도파민을 구강투여 또는 정맥주사로 투여하였을 경우 Mao (monoamine oxidase) 또는 COMT (catechol-O-methyl transferase)에 의하여 대사되어지기 때문에 대뇌에서의 작용보다는 체내의 도파민 수용체에 작용함으로써 이뇨작용, 심박증진, 소화촉진 또는 억제, 혈관수축 및 혈압상승 등을 초래하게 된다. 따라서 도파민을 직접 투여하기 보다는 대뇌의 혈관장벽을 쉽게 통과할 수 있는 도파민 전구체인 레보도파 (Levodopa, L-dopa)를 파킨슨병 치료에 사용하게 된다. 그러나 레보도파 역시 dopa decarboxylase에 의하여 대사되어지기 때문에 레보도파를 보호하기 위하여 dopa decarboxylase inhibitor를 동시에 투여하게 되며, 치료에 사용되어지는 약제 역시 복합제제로 구성되어있다. Levodopa를 투여함으로써 파킨슨병환자의 약 30%에서 bradykinesia (서동증) 를 나타내는 파킨슨 증상을 호전시키는 효능을 나타낸다. 그러나 Levodopa의 경우 식욕부진, 오심 구토 등의 소화기계에서 부작용이 나타날 뿐만 아니라 심실성 기외수축 (ventricular extrasystole) 및 심방세동 (atrial fibrillation) 등 다양한 심부정맥 (cardiac arrhythmia) 가 나타날 수 있다. 뿐만 아니라 장기간 levodopa를 투여한 환자의 약 80%는 근경련, 턱현상, 진전 등과 같은 이상운동증과 우울증 불안, 흥분, 불면, 망상, 환각증과 같은 정신이상 또는 행동장애, 성격변화를 나타내기도 한다. 이러한 임상적 반응은 약물 투여기간이 길어질수록 흔히 나타나게 되기 때문에 이러한 약물치료 또한 제한되어 사용된다. 따라서 최근에는 파킨슨병 치료제로써 대뇌에 부족한 도파민을 직접보충해 주는 L-dopa 제제 외에도 부족한 도파민을 대신하여 도파민과 비슷한 작용을 나타내기 위한 도파민 수용체 작용제, L-dopa와 유사한 항콜린 제제, 엘테프릴 (Eldepryl) 등이 개발되어져있지만, 이 또한 다양한 부작용을 내포하고 있음에 따라 그 사용이 매우 제한되어져 있는 실정이다. 외과적인 수술치료의 경우 대부

분 완치를 위한 것보다는 환자의 증상을 호전시키기 위하여 담창구나 시상을 파괴하거나 전기적으로 자극하는 방법 등을 이용하여 매우 제한된 범위 내에서 시행을 하게 된다. 그러나 현재까지 뚜렷한 임상적 발병원인 등이 밝혀져 있지 않기 때문에 적당한 운동과 절제된 생활, 균형 있는 식사 및 휴식을 통하여 파킨슨병을 예방하는 방법 최우선이라고 할 수 있다.

한편 허브는 동서양을 막론하고 고대로부터 다양한 질병을 치료하는데 사용되어진 약용식물로서 다양한 생리활성 및 고유한 향기를 내포하고 있는 식물이다. 특히 우울증, 불안감, 피로감 및 과도한 스트레스 등에 대하여 이들의 고유한 향기가 피곤을 풀어주며, 심신을 안정시켜 스트레스를 풀어주는 역할을 하고 있음은 일반적으로 알려져 있다. 이러한 다양한 향기를 이용하여 예방의학 및 자연치유 등에 응용한 것이 바로 아로마 테라피 또는 향기치료라고 한다. 특히 이러한 방향족 물질 즉 향기성분은 인간의 호흡기를 통하여 뇌의 흑질부위의 도파민합성을 촉진시킴으로써 우울증, 불안감, 피로도를 완화시켜주는 역할을 하는 것으로 사료되어진다. 뿐만 아니라 허브는 매우 높은 항산화효과, 항바이러스, 항박테리아, 항종양, 면역증강, 항암 등 매우 다양한 생리활성효과들이 보고되어짐에 따라 이와 병행하여 많은 연구들이 진행되고 있다. 그럼에도 불구하고 허브는 단순한 일차적인 재배에 의하여 관상용으로 상업화되어져 있거나, 허브티, 허브초, 아로마 오일 등과 같은 형태로 산업화되어 판매되어지고 있는 실정이다. 따라서 허브의 다양한 생리활성이 과학적으로 분석되어지고 이로부터 생리활성물질 분리 및 특성을 분석화하여 의료용 치료제 또는 기능성 제제와 같은 고부가가치 상품화가 절실히 필요로 되어지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 허브의 고부가가치 상품화 개발을 위한 초기 단계로서 허브의 기능성분석 및 기능성을 부여하는 차원으로 신경퇴행성 예방을 위한 허브를 선정하고 이에 대한 분자생물학적 분석을 시도 하였다. 이와 더불어 신경퇴행성예방을 위한 기능성시제품 개발 및 이에 대한 효능분석을 수행함으로써 고부가가치 신경퇴행성예방 기능성을 부여한 시제품의 기술이전을 통한 허브 재배 농가의 새로운 고부가가치 소득원 창출 및 소득 증진에 본 연구의 목표가 있다.

제 2절 연구개발의 필요성

- 급속한 노령인구의 증가 및 스트레스의 증가에 따라 신경퇴행성질환 환자의 급증 및 심각한 사회문제로 대두로 이에 대한 치료제 개발 필요성 대두
- 뚜렷한 치유방안이 개발되어지지 않음에 따라 예방적 차원이 중요함.
- 부작용 및 신경퇴행성 예방을 위한 자연친화적이며 농가소득 증진을 위한 허브의 기능성분석을 통한 기능성부여 고부가가 소득원 창출의 필요성 대두

스트레스의 증가 및 노령인구의 증가 등에 따라 이로부터 유발되어지는 신경퇴행성의 대표적인 질병으로 1817년 James Parkinson에 의하여 보고되어진 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)을 대표적인 예로 들 수 있다. 파킨슨병 (PD)는 임상적으로 신경퇴행성 질환으로 substantia nigra pars compacta (SNpc)에 분포되어있는 dopaminergic (DAergic) cell body의 위축에 의한 결과로 Lewy body가 형성되며, nigrostriatal system에서의 dopamine (DA) 손실에 의해 유발되어진다. 이러한 파킨슨병 발병률은 인구 100,000명 당 약 100 ~ 300명으로 추정되어질 뿐만 아니라 미국에서는 전체 사망자의 사망원인으로 분류되어지는 질병 중에서 15위에 속하는 것으로 발표되었다 (1, 2). 파킨슨병은 노령인구와 밀접한 관련이 있으며, 60세 이상의 노령층에서 가장 높은 발병률을 나타내는 것으로 보고되었다 (3). 임상적 보고서 및 다양한 실험동물 모델을 통하여 파킨슨병의 환경적 요인으로 살충제와 같은 환경적 인자와 직접적인 파킨슨병을 유발시키는 유전적 인자들이 밝혀지고 있다 (4-11). 뿐만 아니라 파킨슨병은 노령인구에서 많이 발병되어지기 때문에 연구자들은 노화와 관련된 질병으로 간주되어지기도 한다 (12-17). 이러한 파킨슨 증후군 (Parkinson's syndrome)이 이와 유사한 증상을 일으키는 질환을 가르켜 넓은 의미에서 사용되어지는 용어이며, 특히 파킨슨병은 만성적으로 아주 천천히 진행성을 나타내는 질병으로 진행속도는 개인마다 다르게 나타난다. 뿐만 아니라 파킨슨병 환자들은 비슷한

임상적 증상을 나타내지만, 진행 도중 개인마다 약간씩 다른 임상적 특성을 나타내기도 한다. 이러한 파킨슨병의 일반적인 특성으로는 진전 수전증, tremor of the hands), 서동증, 경직, 균형장애 등의 운동장애현상이 나타나게 되며, 빠른 속도로 진행되어지는 경우 일상생활이 불가능할 정도의 장애를 일으키기도 한다. 이러한 파킨슨병은 뇌의 substantia nigra (흑색질) 부위에 분포하고 있는 신경세포가 퇴행되어짐에 따라 유발되어지는 신경계 질환이다. 이러한 substantia nigra에는 dopamine (도파민)을 합성하는데 관여하는 dopaminergic neuron이 분포되어있으며, 이들에 의하여 dopamine의 합성이 정상 수준 이하 (80% 이하)로 감소되어졌을 때 파킨슨병의 병변이 나타나게 된다.

이러한 파킨슨병의 초기 증상으로는 파킨슨병환자마다 약간씩 다른 특성을 나타내지만 보편적인 특성은 일상생활에서 평범하게 수행하였던 일에 대한 속도와 정확성 일 떨어지는 것으로 해석되어지는 “**전신 쇠약감**”과 이러한 증상이 몸의 한쪽에 국한되어 있다는 특성을 나타낸다. 이러한 특성에 따라 다리를 끄는 초기 증상 (진전) 또한 동일한 몸의 한쪽에서 나타나게 된다. 이와 더불어 무표정, 음성변화, 걸음걸이의 변화, 글씨체의 변화 등이 수반되어 나타나게 되며, 파킨슨병의 진행이 빠른 경우, 침흘림, 신경과민, 우울증 등과 같은 증상이 나타나기도 한다. 초기 증상의 파킨슨병에 의하여 신체에 균형의 문제와 같이 일상생활에 지장을 초래할 정도의 증상이 나타나는 경우 항파킨슨병 제제를 투약을 하여야 된다. 이후 진행되어지는 파킨슨병의 일차적 증상들로는 신체의 한쪽에서 시작되어진 마비 또는 진전이 시간이 경과함에 따라 반대편 손에서도 동일한 증상이 나타나는 것으로 하체에서도 진전이 나타나게 되며, 구강 또는 하악이 떨리는 경우가 있으며, 심한 경우 머리카락을 때리는 증상이 나타나게 된다. 따라서 이러한 운동 진전은 일상생활에서 기능장애를 유발하게 되며, 더 나아가 환자들 스스로 느끼는 불편감 즉 내적 진전이 진행되기도 한다. 동시에 파킨슨병 환자는 근육의 긴장도가 증가되는 “**경직증**”이 유발되어지게 되고, 얼굴표정의 감소, 미세운동장애, 글씨 쓰는 속도가 느려지거나 글씨의 크기가 작아지는 특성을 나타내는 “**서동증**” (느린 움직임)이 나타나게 된다. “**보행 장애**”의 경우 자

연스러운 팔의 휘저음이 줄어드는 증상이 나타나게 되며, 보행속도가 느려지거나, 보폭이 짧아지는 등의 종종 걸음 형태가 나타나게 되며, 이러한 보행 장애에 의하여 파킨슨병 환자들은 쓰러질 듯한 움직임을 나타내기도 한다. 경우에 따라 보행을 시작하려 할 때 보행이 정지된 듯한 상태를 초래하기도 한다. 따라서 지팡이나 워커 등 균형을 유지하기 위한 보조기구가 필요하게 된다. 특히 이러한 균형 장애와 자세 유지 장애는 진행된 파킨슨병에서 나타나는 증상으로 환자들은 자신의 균형 감각이 소실되었음을 인지하게 된다. 파킨슨병의 이차적인 증상들은 매우 다양하게 나타나게 된다. 특히 파킨슨병 환자들은 언어적 문제 유발되어져 병이 진행되면서 심하게 말을 더듬게 되거나 음성의 톤이 낮아지는 등의 특성을 나타나게 된다. 경우에 따라서는 “**연하장애**”를 유발하여 혀나 목의 근육을 사용함에 있어서 자유스러운 움직임이 제한되어짐에 따라 음식을 목 뒤로 넘겨 상부식도로 넘기는 작용이 지연되어 목에 걸리는 현상이 나타나게 되며, 동시에 입을 꼭 다물지 못하고 자주 침을 흘리는 증상이 나타나게 된다. 이외에도 발목부종, 시각장애 체중감소 및 소화기계 및 비뇨기계 이상, 성적불능, 현기증 등이 나타나게 된다. 뿐만 아니라, 정신 행동 및 기분 장애를 나타나게 되는데, 파킨슨병 환자들의 약 50% 정도는 우울증과 불안감 등의 증상, 또는 수면장애를 유발하게 된다.

위와 같이 파킨슨병은 초기 증상으로부터 병증이 진행되어진 이차증상까지 일반적으로 진전, 경직증, 서동증과 같은 일반적인 증상으로부터 매우 복합적인 증상을 유발시키게 된다.

이러한 파킨슨병은 진단이 매우 어려우며, 완전한 치유방법 또한 개발되어 있지 않기 때문에 약물적 투약, 또는 외과적 수술을 통하여 관련된 증상의 진행속도를 늦추는 것으로 제한되어있다. 한편 이러한 파킨슨병 증상을 완화시키기 위한 다양한 약물치료를 위하여 개발되어진 대표적인 치료제로는 도파민 (dopamine)의 전구물질인 L-dopa 및 이의 유사체 들이 개발되어져있으나 약물내성 및 다양한 부작용을 내포하고 있음에 따라 만족할만한 치유효과를 나타내기에는 부족한 측면이 있다. 이외에도 dopamine 전달에 관련된 의약제제 또는 신경보호효과에 관련된 의약제제들이

개발되어져있지만 앞서 언급한 바와 같이 증상의 진행속도를 늦추게 하는 역할에 제한되어져 있다. 이외에도 외과적인 수술로는 시상절제술, 심부뇌자극술과 같은 요법들이 개발되어졌으나, 이러한 방법들도 단순히 파킨슨병의 진행속도를 늦추게 하거나 일상생활에서의 행동제약을 개선하는데 제한되어있다. 최근에는 다양한 유전자 치료 또는 stem cell에 의한 치유법들이 개발되기는 하였지만, 현재 임상적 사용에 있어서는 다양한 부작용을 내포하고 있는바 그 사용이 매우 엄격히 제한되어져 있는 실정이다. 특히 파킨슨병의 경우 유전적 소양에 의하여 질병이 유발되어지기도 하지만 환경적인 영향에 의하여 유발되어지기도 한다.

한편 HERB (허브)란 식물 중에서도 식용, 미용, 약용, 방향제, 방충제, 방부제, 소취제 등으로 사용되어 인간에게 이로움을 주는 녹색식물을 총칭하는 말로 Health (건강), Edible (식용), Refresh (상쾌함), Beauty (미용)의 복합어로 이르기기도 한다. 그러나 주로 허브는 향초, 약초 등의 약용식물을 가리키는 말로 향신료로 요리에 사용되어지거나 차로 잎을 달여 마시는 향료식물이나 약용식물을 나타내며, 사전적 의미로는 줄기와 잎이 식용, 약용에 쓰이거나 향기나 향미가 이용되기도 하는 식물이라고 정의 되어있다. 오늘날의 허브는 이용범위 및 이용부위가 훨씬 증가되어, 향료, 약용, 채소, 양념, 식품 보존제 혹은 첨가물 등으로 사용되어지기도 한다. 이러한 허브는 예로부터 진통, 진정 등의 치료뿐만 아니라 방부나 살충을 위한 약초로써 사용되어져 왔다. 특히 우리나라에서는 미나리, 쪽갓, 마늘, 파, 생강, 고추 등의 향채소와 창포, 쪽, 익모초, 결명자 등이 예로부터 허브로 사용되어져왔다. 이러한 허브는 혈액순환을 촉진시키거나 기분을 상쾌하게 하는 효과를 가지고 있기 때문에 향을 이용한 aroma therapy (아로마테라피)를 통하여 스트레스 또는 피곤할 때 사용되어지기도 한다. 특히 허브의 경우 고대로부터 아로마테라피 (Aroma therapy)라고 하는 향기요법에 이용되어지고 있으며, 이는 허브에서 즙을 내어 상처에 바르거나 원시적인 훈증법으로 이용하였다. 이러한 역사적 기록으로는 기원전 4000년경 고대 중국 의서에 기록되어있을 뿐만 아니라 기원전 3000년경 이집트에서에서는 시신의 방부처리, 미용 및 의료목적으로 사용되었으며, 인도의 경우 가장 오래된 종교서적 중의 하나인

“리그베다”에도 약 700여종의 약용식물 즉 허브에 대한 약리활성을 기록하였다. 이후 아비제나라는 아랍인 의사에 의하여 라벤더, 캐모마일 등과 같은 약용식물로부터의 증류법을 개발하여 이들의 생리활성을 보고하였고, Fredrich Hoffman에 의하여 현대적인 essential oil로 개발되어져 이에 대한 연구가 시작되었다. “아로마테라피 (Aroma therapy)”라는 용어는 1930년대 가트포세에 의하여 명명되었으며, 화상 후 라벤더 오일에 화상부위를 도포함으로써 통증과 흉터가 현저하게 억제되어짐을 확인하였으며, 이후 다양한 aroma essential oil을 합성하여 이들에 대한 효능을 분석한 결과 항박테리아, 항균, 항바이러스, 등과 같은 살균 및 소독 작용과, 진정, 소염작용 등이 밝혀지게 되었다. 이러한 연구들을 초석으로 하여 향기요법 또는 향기치료라는 아로마테라피가 정립되어지게 되었다. 이후 “모리”에 의하여 피부재생 및 노화방지 등이 밝혀지게 되었으며, 현대에는 이를 이용한 자연친화적 예방의학으로써 자리매김하게 되었다. 특히 파킨슨병의 원인에 대한 다양한 연구가 진행되어짐에 따라 이들의 발병원인에 대하여 수많은 연구결과들이 보고되어졌으며, 이를 이용한 기능성 화장품 및 기능성 식품 첨가제 등의 개발이 가속화 되고 있다. 따라서 국내에서도 이러한 다양한 허브의 기능성을 분석함으로써 일차재배에 의한 상품화를 탈피하여 생명공학과 생명공학적인 분석에 의한 기능성을 부여한 새로운 고부가가치 상품을 개발함으로써 국내 화훼 생산 농가의 새로운 고소득의 창출이 필요하리라 사료되어진다. 특히 최근 미국과의 FTA, 유럽연합과의 FTA에 의하여 전면적인 개방에 대처하기 위하여 다양한 기능성을 포함하고 있는 허브는 새로운 고부가가치 농산물 자원으로써의 개발이 절실히 필요로 되어지고 있다. 허브의 경우는 일차적으로는 식용으로 사용가능한 종이 매우 풍부하며, 이차적으로는 앞서 언급하였듯이 매우 다양한 생리활성기능을 내포하고 있기에 생명공학 기술력을 겸비한 새로운 신상품의 개발이 매우 용이한 장점을 가지고 있기 때문이다. 한편 다양한 허브들의 생리활성 중 두드러지는 특성은 항산화효능을 가지고 있으며, 아로마테라피의 경우 기분을 밝게하거나 안정시키는 등의 기능을 가지고 있는 것으로 보고되어졌다. 특히 항산화효능은 체내 형성되어있는 라디칼이온 또는 과산화수소화합물들을 제거함으로써 신경세포의

DNA를 보호하게 되며, 기분을 밝게하거나 안정시키는 등의 작용은 뇌의 도파민 합성과 매우 밀접한 상관관계가 있음을 추정할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 허브의 생리활성을 신경퇴행성질환에 접목하여 신경퇴행성억제 및 신경보호효능을 분석함으로써 새로운 자연친화적 신경보호기능성 시제품의 개발과 이에 대한 분석을 기초로 하여 허브 재배 농가의 FTA에 대처할 수 있는 고부가가치 생산품 개발에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

제 3절 연구개발 과제 의 범위

- 국내 재배 또는 유통 중인 허브류로부터 신경보호효능을 가지고 있는 허브의 선정 및 이에 대한 분자생물학적 분석
- 신경영양인자 (Neurotrophic factor) 유도발현 및 도파민 생합성을 통한 신경보호효능을 가지는 허브의 선정
- 허브로부터 신경보호효능 물질 분리 및 이에 대한 신경보호효능(신경영양인자 유도발현 및 도파민 생합성) 분석
- 산화적 스트레스에 의한 신경보호효능 분석 및 신경세포 사멸 억제 효능 분석
- 신경퇴행성예방을 위하여 허브 향기 및 이를 이용한 시제품에 의한 신경보호효능 분석

1. 국내 재배 또는 유통 중인 허브류로부터 신경보호효능을 가지고 있는 허브 선정

본 연구를 수행하기 위하여 국내 재배 및 유통 중인 다양한 허브류에 대한 생리활성을 다양한 문헌 조사 및 연구논문을 중심으로 하여 신경퇴행성 억제에 관여할 것으로 추정되어지는 허브류를 조사하게 되고 이로부터 후보 허브를 선정하게 된다. 우리가 주변에서 쉽게 접할 수 있는 대표적인 허브류로는 로즈마리, 레몬밤, 오레가

노, 세이지, 민트 등을 들 수 있으며, 본 연구를 수행하기 위하여 다음과 같은 효능을 확인하였다.

- 로즈마리 (Rosemary, *Rosmarinus officinalis*) : 두통, 여드름 치료, 생리기능강화, 집중력, 기억력증진 및 치매예방 효과 등
- 페퍼민트 (Peppermint, *Mentha piperita*) : 히스테리, 항염, 진통, 발한, 졸음방지 및 구취제거 등
- 타임 (Thyme, *Thymus vulgaris*) : 호흡기질환, **신경성질환**(우울증), 빈혈, 피로 회복, 강장효과 등
- 세이지(Sage, *Salvia officinalis*) : 두뇌, 근육발달 강화, 통증제거, 구취제거, 강장 작용, 혈당 강하(당뇨병에 효과) 등
- 레몬버베나 (Lemon verbena, *Aloysia triphylla*) : 신장 기능 강화, 다이어트 효과, 소화촉진, 진정, 이뇨효과 등
- 레몬그라스 (Lemongrass, *Cymbopogon citratus*) : 피로회복, 빈혈개선, 소화기능 강화 등
- 레몬밤 (Lemon Balm, *Melissa officinalis*) : 소화, 식욕을 촉진시켜 식전 식후의 음료로도 적격, 신경안정 효과 등
- 월계수 (Laurel, *Laurus nobilis*) : 신경통, 류마티스, 진통효과, 불면증 감소 등
- 오레가노 (Oregano, *Origanum vulgare*) : 살균, 진정, 거담(가래 제거), 최음, 소화 촉진, 강장효과 등
- 로즈제라늄 (Rose geranium, *Pelargonium rosium*) : 동상, 스트레스 해소, 피부염 등
- 보리지(Borage, *Borago officinalis*) : 강장제, 소화촉진, 살균, 항균, 감기, 혈액정화, 만성신장염, 류머티스, 조급증, 습진 등
- 라벤더 (lavender, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula officinalis*) : 우울증해소, 불면증, 두통, 방부효과, 항염증, 여드름, 피부염, 습진, 피부감염 등

- 스피어민트 (spearmint, *Mentha spicata*) : 진통, 소화불량, 멀미 등
- 애플민트 (Apple mint, *Mentha* sp.) : 살균, 소독 등
- 스테비아 (Stevia, *Stevia rebaudiana*) : 최면작용, 발한작용, 해열작용 등
- 히썩 (Hyssop, *Hyssopus officinalis*) : 식욕증진, 소화촉진, 강장작용, 산화방지와 살균작용 등
- 헬리오트로프 (Heliotrope, *Heliotropium* sp.) : 긴장완화, 불면증 등
- 바질 (Basil, *Ocimum basilicum*) : 방광염, 안정, 이완 효과, 살균, 소독, 집중력 증가, 호흡기계의 증상 완화 등

이에 대한 학술적인 생리활성은 다음과 같이 검증되었다. 가장 일반적으로 주변에서 구입하거나 볼 수 있는 로즈마리 (*Rosmarinus officinalis*)의 약리활성은 매우 다양하게 보고되어졌다. González-Trujano 등 (2007)에 의하면 설치류에 로즈마리 추출물을 처리한 결과 무통증효과 (antinociceptive effect)가 나타남을 보고 하였으며 (1), 또한 Tahraoui 등 (2007)은 모로코에서 당뇨병증과 고혈압증에 전통적인 민방요법으로 사용되어져왔음을 보고하였다 (2). 한편 로즈마리의 가장 두드러진 생리활성은 항산화효과로 Tawaha 등 (2007) (3), Mata 등 (2007)(6), Mónica 등 (2007)(7), Yesil 등 (2007)(8) 에 의하여 보고되어졌을 뿐만 아니라, Okamura 등 (1994)(13)에 의하여 로즈마리로부터 carnosol을 분리하였으며, Wei 등 (2006)(9) carnosol의 항산화활성을 보고하였다. 또한 분리된 carnosol은 Huang 등 (2005)(11)에 의하여 c-Jun 및 NF- κ B를 통하여 metalloprotease-9 발현을 억제함으로써 B16/F10 mouse melanoma의 전이 억제효과 뿐만 아니라 Amin 등 (2005)(10)은 로즈마리 추출물이 간보호효과가 있음을 보고 하였다. 이외에도 Yesil 등 (2007)(14)은 로즈마리 메탄올 (methanol) 추출물 및 오일에 강력한 항박테리아효능이 있음을 보고하였으며, Weckesser 등 (2007)(4)은 박테리아 및 이스트 (yeast)에 강력한 성장억제효능을 나타냄을 보고하였다. 레몬밤 (*Melissa officinalis*)의 약리활성 중에서 가장 주목받고 있는 활성은 로즈마리와 같이 항산화활성이 보고되어져있다. Dastmalchi 등

(2007)(14)은 레몬밤의 화학적 조성과 더불어 in vitro에서의 항산화활성을 보고하였으며, Herodez 등 (2003)(20) 또한 유기용매를 이용하여 레몬밤의 잎으로부터 추출한 추출물의 항산화활성에 대하여 보고하였다. 특히 레몬밤의 경우는 Herpes simplex virus에 대한 항바이러스효과 (Allahverdiyev 등, 2004)(18), 간보호 효과 (Bolkent 등, 2005)(16), 소화기 개선효과 (Sadraei 등, 2003)(19) 등이 보고되어졌다. 또한 Milos 등 (2000)(23)과 Chun 등 (2005)(22)은 오레가노 (*Origanum vulgare*)의 항산화활성을 보고하였으며, 특히 Chun 등 (2005)(22)은 이러한 오레가노의 항산화활성에 의하여 헬리코박터 (*Helicobacter pylori*)에 대한 항박테리아 활성을 보고하였다. Goun 등 (2002)는 오레가노 추출물로부터 antithrombin활성을 보고하였으며, 이러한 antithrombin활성은 체내 형성되어질 수 있는 혈전형성을 억제시킴으로써 혈액순환을 촉진하는 역할을 하게 된다. 로즈제라늄 (*Pelargonium rosium*)은 가장 두드러진 생리활성 또한 항산화활성으로 Tepe 등 (2006)(27)에 의하여 보고되어졌으며, Mativandlela 등 (2006)(26)은 로즈제라늄추출물에 의한 항박테리아, 항진균효과 등을 보고하였다. 또한 Schulz (2007)(25)는 로즈제라늄 추출물이 급성기관지염 환자에게 효과가 있음을 보고하였을뿐만 아니라, Wittschier 등 (2007)(23)는 로즈제라늄 추출물이 인간의 위내에 서식하는 헬리코박터 (*Helicobacter pylori*)의 위내 부착을 억제함을 보고하였다. 세이지(*Salvia officinalis*)는 로즈마리와 더불어 가장 널리 잘 알려진 허브 중의 하나로 매우 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 그러나 세이지 또한 다양한 생리활성 중 가장 두드러진 생리활성은 항산화활성을 알려져 있다. Grzegorzcyk 등 (2007)(29), Paula 등 (2003, 2002)(36, 37), Lu 등 (2001)(38, 39) 모두 세이지로부터 항산화활성에 관하여 보고하였으며, 특히 Lima 등 (2007)은 세이지물추출물 및 메탄올 추출물이 산화적 손상으로 부터 간암세포주를 보호한다고 보고하였으며, Amin 등 (2005) 또한 azathioprine-induced toxicity에 대하여 간세포를 보호한다고 보고하였다. 뿐만 아니라 세이지 추출물은 UV에 의하여 유발되어지는 돌연변이를 억제시키며 (Filipic 등 1997; Vuković-Gačić 등 2006), Tada 등 (1994)(44) 항바이러스 효능을 보고하였다. 한편 세이지로부터 Okamura 등 (1994) 및 Lu 등

(1999)은 carnosol 및 carnosic acid, Sagecoumarin 등과 같은 유용 항산화물질을 분리하여 보고하였으며, Bailly 등 (2005)(32)은 HIV-1 integrase를 세이지로부터 분리하여 보고하였다. 한편 Carnat 등 (1999)(48)은 레몬버베나 (*Aloysia triphylla*)의 항산화활성 및 향기치료에 대하여 보고하였으며, Duarte 등 (2005)(47)은 여성의 자궁 질염을 일으키는 *Candida*에 대한 항생효과를 보고하였다. Zamorano-Ponce 등 (2004, 2006)(45,46)은 유해물질로부터 DNA손상을 억제시킨다고 보고하였다. 이와 같이 다양한 허브들은 매우 다양한 생리활성효과를 나타내고 있으며, 이들의 대표적인 특성은 항산화효과임을 언급하였다. 따라서 본 연구에는 다양한 생리활성을 가진 허브류 중에서도 항산화활성이 강력하고 이로부터 신경보호효능을 나타내는 허브를 선정하여 본 연구의 신경퇴행성예방 시제품을 제조하는데 사용하게 되었다.

2. 신경세포보호효능 분석을 위한 신경영양인자 유도발현 및 도파민 생합성관련 유전자의 유도발현분석

앞서 언급한 바와 같이 도파민의 감소는 파킨슨병의 유발원인일 뿐만 아니라 신경세포의 생존에 있어서도 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특히 도파민의 합성은 L-tyrosine을 L-dopa로 전환되어지고 L-dopa는 dopamine으로 전환되어진다. 이들의 각각 전환과정에는 각각의 전환효소가 관련되어져있으며, 특히 L-tyrosine에서 L-dopa로 전환시키는데 관여하는 tyrosine hydroxylase에 관하여 많은 연구가 진행되어졌다. tyrosine hydroxylase는 도파민 생합성관련 신경에 포함되어있는 catechol 합성의 첫 번째 효소로 rate-limiting 효소로 알려져 있다. 이러한 tyrosine hydroxylase는 포유동물의 중추신경계에서 hypothalamus, midbrain, brainstem, olfactory bulb 등의 특정부위에서만 제한적으로 발현되어지기 때문에 높은 조직특이성을 나타낸다. 특히 도파민신경세포의 분화가 적절히 일어나지 못하거나, 여러 원인으로 인한 중뇌 도파민신경세포의 사멸 후의 재생과정에서의 적절한 tyrosine hydroxylase 유전자의 발현 조절이 일어나지 않는 것이 파킨슨병의 병리적 원인으로 밝혀지게 됨에 따라 이러한 유전자의 유도발현이 파킨슨병의 예방 또는 치유에 있어

서 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

한편 신경영양인자는 신경세포의 성장과 분화에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다. 특히 파킨슨병과 관련하여 BDNF (Brain derived neurotrophic factor), GDNF (Gila cell line derived neurotrophic factor) 등이 도파민 생합성 신경에 관련되어있다.

따라서 본 연구에서는 신경세포 및 실험동물을 이용하여 mRNA level 및 단백질 수준에서의 유도발현을 분석하게 되며, immunohistochemistry를 이용하여 조직 내에서의 발현을 분석하게 된다.

3. 산화적 스트레스로부터 신경세포보호 효능 분석

파킨슨병 발병원인으로 주목받고 있는 것은 체내에서 생성된 라디칼이온 또는 과산화수소(hydrogen peroxide)에 의하여 dopaminergic neuron의 mitochondria 전자전달계의 complex I 을 공격함으로써 에너지 대사에 이상이 발생함으로써 도파민 합성에 관련된 신경세포의 위축이 보고되었다. 이러한 라디칼이온 또는 과산화수소의 체내 생성은 지속적인 스트레스에 의하여 생성되어지게 되며, 뿐만 아니라 다양한 살충제, 농약, 등 유기화학물질에 의한 노출에 의하여 치명적인 라디칼 이온 또는 과산화수소가 체내에서 발생되어지게 되며, 이러한 이유로 인하여 후천적인 신경퇴행성이 일어나는 것으로 많은 연구를 통하여 보고되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 약리활성 및 생리활성을 가지고 있는 허브 특히 허브의 항산화효능에 의한 대뇌 라디칼 이온 및 과산화수소에 의한 신경퇴행성 억제 및 신경보호효과를 분석하고자 하였다. 이와 뜻을 같이하여 급속한 공업화 사회로 변모되어짐에 따라 증가되어지는 환경공해는 이러한 파킨슨병의 유발에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있을뿐만 아니라 스트레스에 의하여 뇌에서 형성되어지는 라디칼이온들에 의하여 뇌 신경세포의 에너지원을 생산하는 미토콘드리아 (mitochondria) 전자전달계 복합체 I 이 망가짐으로써 에너지 생산에 이상이 발생함으로써 도파민 합성에 관련된 신경세포의 위축이 되어진다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 다양한 허브 추출물 및 이로

부터 분리되어진 물질들의 항산화효능을 분석함으로써 체내에 형성된 대뇌 라디칼 이온 및 과산화수소를 제거하는 매카니즘에 따라 신경세포의 미토콘드리아 DNA의 손상을 억제시킴으로써 효능을 분석하고자 하였다. 이러한 라디칼이온 및 과산화수소에 의한 신경세포의 미토콘드리아 DNA 손상은 in vitro에서는 Ca^{2+} 을 처리하게 됨으로써 tetrahydrobiopterin (BH4)가 유도되어지고 in vivo에서는 지속적인 스트레스에 의하여 과도한 BH4의 유도는 산화적 스트레스를 유발시키게 된다. 특히 BH4의 경우 도파민 생합성 경로에서 tyrosine hydroxylase의 합성에 있어서 매우 중요한 인자로 작용하게 되지만 이러한 BH4의 과도한 발현은 산화적 스트레스를 유발시킴으로써 미토콘드리아 DNA를 손상시키게 된다. 뿐만 아니라 substantia nigra에 존재하는 면역에 관련된 세포 (macrophage-like immune cell 등) 또한 이들의 생존 수단으로써 BH4를 사용하고 있기 때문에 substantia nigra에 분포되어있는 도파민 생합성에 관련된 신경세포들은 고농도의 BH4에 노출되어져있으며, 이러한 이유로 신경퇴행성이 유발되어지는 것으로 추정하고 있다. 따라서 본 연구에서는 BH4 및 hydroperoxide를 처리함으로써 유발되어지는 미토콘드리아 DNA 손상을 허브 추출물을 처리함으로써 억제되어지는 신경보호효과를 분석하였다.

4. 신경세포 사멸

파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환은 신경세포사멸에 의하여 신경세포 손상과 소실이 이루어지게 된다. 이에 따라 중뇌의 substantia nigra에 분포되어있는 도파민 생합성관련 신경세포들이 선택적으로 소멸되어짐으로써, 운동기능조절에 관여하는 기저핵의 기능이상을 초래하여 운동기능장애가 유발되어지게 되고 이에 따라 파킨슨병 환자들르 운동기능 장애를 앓게 되는 것이다. 불행하게도 한번 사멸되어진 세포는 재생이 불가능하기 때문에 이러한 신경세포들을 재생시키기 위한 stem cell 연구도 활발하게 진행되어지고 있기는 하지만 아직은 매우 초보적인 단계이며, 아직까지 안전성이 보장되어있지 않기 때문에 사용에는 매우 제한되어져 있다. 따라서 신경세포의 apoptosis 경로를 분석함으로써 파킨슨병의 병변 원인 및 이를 예방하기 위한 많

은 연구가 진행되고 있다. 이러한 신경세포에서의 apoptosis는 caspase라는 단백질들의 순차적인 활성화에 의하여 이루어지게 되며, 이러한 caspase의 활성화는 apoptosome을 활성화시킴으로써 세포사멸을 초래하게 된다. 따라서 국내에 자생 또는 재배되어지고 있는 허브류의 추출물을 신경세포에 처리함으로써 세포사멸기작을 억제시키는 효능을 분석함으로써 신경세포의 apoptosis 측면을 분석함으로써 신경세포의 퇴행을 억제시키는 메커니즘을 분석하게 된다. 따라서 허브추출물에 대한 신경세포의 viability를 분석하게 되며, apoptosis를 유발시키는 rotenone을 처리하여 apoptosis의 중요한 mediator인 caspase-3, caspase-8, caspase-9 등을 발현유무를 비교분석함으로써 결과를 유추하게 된다.

5. 후보 허브류로부터 생리활성 물질분리

후보 허브류로부터 신경퇴행성 예방을 위한 물질을 분리하기 위하여 다양한 유기용매를 이용하여 분획을 분리시킨 후 HPLC를 수행함으로써 생리활성물질을 분리하게 된다. 분리된 생리활성물질은 항산화활성 및 신경영양인자 발현유도, 도파민관련 유전자의 발현유도를 단백질 및 mRNA 수준에서 분석하게 되고, 이에 대한 활성을 분석하게 된다.

특히 본 연구에서는 항산화활성을 나타내는 다양한 물질 carnosol 및 carnosic acid 등과 같은 물질들 및 이외의 기능성물질을 분리함으로써 신경보호효과 등을 분석하게 된다.

6. 신경퇴행성 예방 기능성 시제품 개발 및 이에 대한 효능분석

기능성 시제품을 개발하여 이에 대한 효능을 분석하고 특히 조직 내에서 직접 발현유무를 확인함으로써 효능에 대한 정확한 결과를 유추하고자한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 파킨슨병 치료에 관한 국내외 기술개발 현황

1. Monoamine oxidase-B inhibitor

Monoamine oxidase는 dopamine, norepinephrine, serotonin, β -phenylethylamine 등과 같은 monoamine 신경전달물질을 deamination 시키는 작용을 하며 MAO-A와 MAO-B 두가지 타입이 존재한다. MAO-A는 serotonin을 우선적으로 deamination 시키며 clorgiline과 같은 억제제에 반응을 한다. MAO-B는 β -phenylethylamine 을 주로 deamination 시키고 selegiline과 rasagiline 같은 억제제에 반응 한다. MAO-A inhibitor는 우울증과 파킨슨병에 효과가 있는 반면 MAO-B inhibitor는 파킨슨병에만 선택적으로 효과를 나타낸다. MAO-B는 뇌에서 MAO 활성의 약 80%를 차지하고 있으며 Striatum에 존재하는 주된 효소이다.

2. Selegiline (Deprenyl)

Selegiline (phenyl-isopropyl-methyl-propargylamine) 은 비가역적으로 MAO-B를 억제하며 MAO-B의 (-) isomer 가 (+) isomer보다 효과가 더 우수하다. 약한 정도의 항파킨슨 효과를 나타내며 levodopa투여량을 약 30% 줄여주는 효과를 가지고 있다. 운동 불능 현상을 나타내는 환자와 wearing off 현상을 나타내는 환자에게 가장 효과가 좋다. 7년 동안 임상 실험한 결과를 토대로 selegiline의 치료효과가 처음으로 보고되었다. Selegiline의 신경계퇴행성질환에 대해 적용되는 것은 5가지 기작들 때문에 인정받고 있다. 첫째로 selegiline은 중추신경계에서 MAO-B를 억제하여 dopamine과 같은 biogenic amine의 정상적인 대사과정에서 일어나는 free radical의 형성을 감소시킨다는 것이다. 둘째로 striatum 와 뇌의 다른 부위에서 catalase와 SOD 활성을 증가시켜 free radical을 제거하는 능력을 증진시킬 수 있다는 것이다.

셋째로 MAO-B를 억제하며 environmental pretoxin의 활성화를 억제할 수 있다는 것이다. 넷째로 신경말단에서의 재흡수를 억제함으로써 selegiline과 그 대사물은 내인성 신경독소의 흡수를 막아줄 수 있다는 것이다. 다섯째로 rasailine과 유사하게 MAO-B 활성억제와는 관계없는 antiapoptotic 분자, neurotropic 요소의 발현과 미토콘드리아 막전위유지등과 관련된 기전에 의해 뇌신경보호와 뇌세포가소성을 유도한다는 것이다.

apoptosis를 억제하며 Bcl-2와 Bcl-xL등과 같은 antiapoptotic 단백질 합성을 증가시키고 apoptotic 단백질인 Bax의 합성을 감소시킨다. 또한 NGF, BDNF, GDNF 등과 같은 내인성 neurotrophic factor들을 증진시키는 효과를 나타냈다.

Selegiline 을 투여한 환자에서 levodopa 를 이용한 치료단계가 늦게 나타나거나 병의 악화가 투여하지 않은 환자에 비하여 병의 악화가 약하게 되었지만 아직은 Selegiline의 치료효과에 대해서는 아직 신뢰할만한 수준은 아니다.

3. Rasailine

Rasagiline은 selgiline과 구조가 유사하며 MAO-B에 선택적인 비가역억제제이다. *in vitro* studies에서는 Selegiline 보다 MAO-B 억제 효과와 치료효과가 10배 더 크게 나타났다.

Rasailine 은 미토콘드리아 막전위를 안정화시키며 Caspase-3 와 DNA fragmentaion 을 완전히 억제하고 핵 내로 proapoptotic glyceraldehydes-3-phosphatae degydrgenase (GADPH)의 이동을 막아주어 세포의 apoptosis를 억제한다. Rasagiline의 S-isomer 역시 유사한 효과를 나타낸다. 이들은 Bcl-2와 Cu/Zn SOD1의 감소를 막아주고 장기간 투여하면 SOD와 Catalase 활성을 증가시켜 free radical에 의한 oxidative stress를 감소시킨다. Rasailine은 Selegiline과는 다르게 amphetamine moiety로부터 유도되거나 amphetamine으로 대사되지 않기 때문에 anti-apoptotic effect를 방해 받지 않는다.

4. Dopamine reseptor agonists

Dopamine reseptor agonists는 striatum의 도파민 수용체들에 직접 작용을 한다. Levodopa와는 다르게 Dopamine reseptor agonists는 산화성 대사과정이 필요 없어 세포에 독성을 나타내는 free radical 대사산물들을 생성하지 않는다. Substantia nigra의 도파민 신경세포에서 일어나는 철에 의한 oxidative stress가 파킨슨병의 발병에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 동물과 인체를 이용한 실험에서 Substantia nigra의 신경보호효과는 free radical 제거작용, Fe^{2+} chelator 작용, dopamine 이화작용, 그리고 anti-apoptotic gene와 neurotrophic factor 발현 증진 작용 등에 의한 것으로 예상되고 있다.

5. animal studies

Dopamine reseptor agonists 중 하나인 pramipexole을 하루에 두 번 1 mg/kg으로 경구 투여한 결과 뇌허혈 gerbil 또는 methamphetamine 모델에서 tyrosine hydroxylase-positive 신경세포들의 손상을 억제하는 효과가 나타났으며 bromocriptine과 R-apomorphine 역시 도파민 신경계의 손상을 억제하는 효과가 있다는 것이 확인되었다.

Ropinirole과 pramipexole은 6-OHDA 또는 MPTP에 의한 선조체의 도파민감소, 도파민 신경세포 손상, lipid peroxidation 등을 억제하는 효과를 가지고 있다. Pramipexole은 도파민 수용체 자극 효과뿐만 아니라 free radical을 생성을 억제하는 효과도 가지고 있다.

MPTP에 의한 신경퇴화모델을 통하여 nigrostriatal pathway에서 일어나는 유전자의 변화를 cDNA array를 통해서 측정한 결과를 통해서 oxidative stress, 염증반응과 관련된 IL-1, IL-6, TNF- α 와 보호작용을 하는 IL-10, NOS, transferrin 수용체, 세포체, GDNF와 같은 neurotrophic factor, 세포주기 조절인자등과 같이 관련이 있는 유전자들이 영향을 받는다는 것이 밝혀졌다.

도파민 수용체 효현작용이 없는 Apomorphine의 S-enantiomer는 하루 11 mg/kg의

용량을 투여할 경우 도파민 결핍을 막아주는 효과를 나타낸다. R-, S-enantiomer 모두 substantia nigra에서 TNF- α 에 의해 유도되어지는 GDNF, MPTP에 의한 cyclin B2 mRNA 등의 증가를 억제한다.

6. *In vitro* studies

세포주 또는 primary cell culture를 이용한 연구는 Dopamine receptor agonists들의 직접적인 효과를 알게 해준다. rat의 배양한 뇌세포를 이용한 실험을 통해서 bromocriptine은 글루타메이트 또는 levodopa에 의한 신경독성을 억제한다는 것을 보여주었다. Pramipexole의 도파민 신경세포주를 이용한 연구를 통해서 도파민 신경세포의 독성억제효과가 밝혀졌다. Dopamine receptor agonists들은 항산화효과와 도파민 수용체 활성화와 같은 기전을 통하여 뇌세포 보호효과를 나타낸다는 다양한 증거들이 있다. R-apomorphine 역시 6-OHDA나 과산화수소에 의한 신경세포독성을 억제하는 효과를 나타내었다.

Bcl-2 나 Bcl-xL 과 같은 apoptosis와 관련된 단백질의 발현을 억제하고 cytochrome C 의 유리를 억제하는 Pramipexole의 anti-apoptotic effect도 밝혀졌으며 R-apomorphine 또한 유사한 효과를 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나 이와 같은 치료제들이 사용되기 위해서는 아직 더 많은 임상실험을 통한 검증이 필요하다.

7. Pramipexole 의 임상치료효과

전임상 실험을 통해 확인된 도파민 신경세포에 대한 보호효과를 기반으로 하여 levodopa와 pramipexole에 대한 임상실험을 통해서 levodopa 투여군에서는 매년 약 5.2%씩 도파민 흡수의 감소가 나타났지만 pramipexole 투여군에서는 그 감소정도가 levodopa 투여군에 비하여 더 적게 나타났다. 비록 연구기간이 짧고 연구대상으로 한 환자수가 적기도 했지만 일부 환자는 더 악화되었다는 보고도 있었다. 그러나 이는 pramipexole이 도파민성 신경세포의 퇴행을 막아줄 수 있는 효능을 가진다는 것

을 보여주는 하나의 증거이다. D2 agonists 중 하나인 ropinirole로 치료를 시작하였을 때 levodopa보다 파킨슨병 환자의 striatum 에서 fluorodopa의 흡수가 더 느리게 일어난다는 것이 보고 되었다.

8. NMDA receptor antagonists

기저핵 부위에서 글루타민성 과 도파민성 경로 사이에는 서로 수많은 상호작용을 하고 있다. 도파민이 억제성 입력을 하는 신경세포에 corticostriatal glutamatergic neurons 으로부터 흥분성 입력이 들어온다. 파킨슨병의 경축증상은 anterior stratum 에 있는 NMDA receptor의 활성화에 의해 또는 subthalamic nucleus, globus pallidus, substantia nigra pars reticulata에 있는 non-NMDA receptor가 활성화 된 후에 발생한다. 그러므로 striatum 이나 globus pallidus 의 중간부분에서 glutamatergic transmission을 억제하는 약물요법으로 파킨슨병 증상을 완화시킬 수 있다.

NMDA 수용체에 의해 매개되는 glutamatergic transmission 이 과도하게 일어나며 흥분독성을 일으켜 신경세포가 죽게되므로 NMDA receptor antagonists들이 흥분독성에 대한 보호작용을 한다.

파킨슨병 환자의 substantia nigra부위에서 반응성 microglia의 증식과 inflammatory cytokines 들의 증가와 같은 염증반응이 확인되었다. 이들은 prostaglandin과 같은 다른 염증매개체들의 생성을 자극하게 되고 이들은 astrocyte 로부터 glutamate 유리를 증가시키게 된다. 이런 과정에서 NMDA receptor의 과흥분이 생길 수 있고 이는 신경세포사멸로 이어질 수 있으므로 NMDA receptor antagonists는 신경세포보호효과를 나타낼 수 있을 것이다.

9. Amantadine

항바이러스제인 amantadine은 우연히 파킨슨병 치료효과가 발견된 삼환계아민이다. 이 약물의 작용기전은 불확실하나 항콜린효과 뿐만 도파민 유리와 도파민 재흡

수 억제효과 등이 알려져 있다. 또한 postsynapse 수용체의 기능변화와 NMDA 수용체 길항효과 등도 알려져 있다. 망막의 ganglion 세포가 죽는 것과 NMDA 신경독성을 막아주는 효과도 있다.

임상적으로 이 약물은 levodopa 합병증 억제효과와 운동 불능, 경직, 경련증상 완화 효과가 일부 있는 것으로 보고되고 있다.

Amatadine 는 levodopa 의 효과에 비해 우수하지는 않지만 유럽에서는 운동이 불가능한 환자의 치료제로 계속 사용하고 있고 환자의 생존율을 높여주는 효과등이 있다고 보고되고 있다. 그러나 아직 이 약물의 도파민성 신경세포에 대한 보호 효과를 인정하기에는 아직 성급하며 임상실험을 통한 Amatadine의 효능에 대한 검증이 더 필요하다.

10. Memantine

비경쟁적 NMDA receptor antagonists 중 하나인 memantine 은 산소결핍으로 인한 신경세포손상에 대한 보호효과가 처음 밝혀진 이후 glutamate나 NMDA의 흥분독성을 완화시키는 효과도 확인되었다. 생체모델에서 hippocampus 의 신경세포손상을 억제해주며 허혈성 뇌손상도 억제한다는 것이 보고되었다. 또한 뇌에서 BDNF 발현을 증가시키기 때문에 이를 바탕으로 하여 뇌의 신경세포에 대한 보호 효과를 나타낸다는 주장도 제기 되고 있다.

11. Riluzole

Riluzole은 antiglutamatergic 특성이 있는 sodium channel antagonists이다. 세포주를 이용한 연구에서 MPP⁺에 의한 신경세포 독성을 억제하는 효과를 나타냈다. 또한 levodopa와 6-OHDA 에 의한 oxidative stress와 Fe³⁺ 와 levodopa에 의한 lipid peroxidation을 억제하였다. 동물실험을 통해서도 MPTP에 의한 도파민성 뇌세포 손상을 억제하고 운동기능이상과 다른 신경학적인 행동능력이상을 개선시키는 효과를 나타냈지만 아직 임상실험에서는 증상개선 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러

나 현재 부작용이 없는 비특이적인 NMDA receptor antagonists도 없을 뿐만 아니라 임상실험에서의 효과가 나타나지 않았기 때문에 앞으로 이를 사용할 가능성은 낮다.

12. Iron chelator

파킨슨병과 다른 신경퇴행성질환들의 발병 원인 중 하나가 퇴행하고 있는 신경세포에 철이 축적된다는 것이다. 파킨슨병 환자의 substantia nigra 부위에 철이 축적되어있었고 microglia, astrocytes, oligodendrocytes 에 철이 축적되어 있는 것이 발견되었다. 그리고 α -synuclein, ubiquitin, TH가 존재하는 lewy bodies 주변에서도 철의 축적이 나타났다.

신경세포 퇴화와 단백질 응집과 밀접한 관련이 있을 것이라는 주장이 계속되고 있는데 이런 응집과정에 철이 중요한 역할을 한다는 근거들이 다양한 *in vitro* 연구를 통하여 제시되고 있다. MPTP 나 6-OHDA 를 투여 동물실험모델에서 iron chelator 인 deferoxamine, apomorphine, epogallocatechin-3-gallate 들이 뇌 보호효과가 있다는 것이 밝혀졌다.

임상적으로 이와 같은 chelator들이 효과가 있다는 직접적인 보고는 없지만 신경학적인 이상증상과 lipid peroxidation 의 진행을 일부 막아준다는 보고는 있었다. chelator를 치료제로 이용하기 위해서는 뇌혈관장벽 통과가 잘되고 중추신경계에 선택적으로 작용하는 효과가 우수한 새로운 후보물질을 찾아야 할 것이다.

13. 식품 항산화제

가. Tocopherol (vitamin E)

free radical을 제거하는 가장 중요한 항산화제는 tocopherol (α -tocopherol, vitamin E) 과 ascorbic acid (vitamin C) 이다. 이들의 주된 역할은 생체막의 phospholipids 에 있는 polyunsaturated fatty acids 를 보호하는 것이다. 토코페롤은

β -amyloid protein, H_2O_2 , 글루타메이트 등에 의해 생성된 활성산소에 의한 oxidative stress를 억제하는 항산화제이다. 1987년 임상실험에서는 파킨슨병 치료에 대한 항산화제의 효과를 밝히는 것이 실패하였다. 그 이유는 투여용량이 낮았거나 투여기간이 짧아서 효과가 없었을 것으로 추측되고 있다. 알츠하이머병에서는 토코페롤의 효과가 일부 나타났었는데 이는 용량이 파킨슨 환자에게 투여된 용량보다 4배 정도 높았기 때문일 것으로 예상되고 있다.

나. Flavonoids 와 Polyphenols

Flavonoids는 차, 적포도주 등과 식물의 열매, 야채 들어있는 polyphenols의 한 종류이다. 이들은 자연에서 얻어지는 항산화제이기 때문에 oxidative stress가 관련된 심혈관계 질환이나 간질환, 암, 퇴행성 신경계 질환 등의 치료제로서 각광을 받고 있다. Flavonoids epicatechin과 은행잎 추출물 등의 항산화효과가 다양한 *in vitro* model 실험에서 밝혀졌으며 블루베리와 딸기도 동물모델에서 노화에 의한 인지기능 손상이나 행동이상을 억제하여 주는 효과를 나타냈다. 또한 최근 임상실험을 통해서 은행잎 추출물이 알츠하이머치매의 치료에 효과가 있다는 것이 밝혀졌다.

14. 비스테로이드성항염증제(NSAIDs): Cyclo-Oxygenase inhibitor

파킨슨병 환자의 실험동물모델의 뇌에서 다양한 염증반응이 관찰되었다. 이를 통해서 항염증제 역시 치료제로 이용할 수 있다는 가능성을 가지게 되었다. Cyclo-oxygenase 효소인 COX-1과 COX-2 COX-2의 발현이 증가되면 특히 염증반응을 증가시켜서 병을 일으키는 역할을 할 수 있으므로 COX-2의 활성을 억제하는 것이 치료에 효과적일 것이다.

COX-1/COX-2를 모두 억제하는 아스피린과 COX-2의 선택억제제인 meloxicam이 MPTP 동물모델에서 일부 도파민 결핍과 신경세포 손상을 억제하는 효과를 나타낸다는 보고가 있기도 했지만 효과가 없다는 보고도 있었다. 게다가 다른 COX-1/COX-2 억제제들인 paracetamol, diclofenac, indomethacin, ibuprofen은

MPTP 독성에 대한 보호 효과가 없었다. 도파민 신경세포를 이용한 실험에서는 glutamate 흥분독성을 아스피린과 ibuprofen이 억제하는 효과를 나타냈다. NAIDs는 통증과 염증치료에 광범위하게 이용되고 있지만 위장관에 대한 안전성이 확보되어 있지 않고 아직까지 장기간 임상실험을 한 예가 없어 파킨슨병 치료제로 이용하기 위해서는 아직 더 많은 연구가 필요하다.

15. neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist

중추신경계의 nicotinic receptor의 구조는 근신경 접합부위의 nicotinic receptor와는 구조적으로나 기능적으로 많은 차이점을 가지고 있다. 주된 기능은 정확하게 알려져 있지 않지만 acetylcholine, dopamine, 그리고 다른 amine류들의 유리와 관련이 있다. 특히 노화와 함께 이 receptor의 수는 감소하지만 친화성은 변하지 않는다. 콜린성 신경계의 변화는 파킨슨 환자의 뇌에서도 나타나지만 특히 알츠하이머 환자에게서 뇌 손상이 많이 나타난다. 파킨슨병에서 나타나는 대뇌피질의 콜린성 신경계 손상의 특징은 basal forebrain nuclei 손상과 대뇌피질로 가는 다른 콜린성 신경계의 투사와 관련이 있다.

16. Neurotrophic factor

파킨슨병 동물모델을 이용하여 가장 많이 연구된 neurotrophic factor 인 GDNF는 substantia nigra의 신경 세포 퇴화를 억제하고 striatum의 TH-positive cell을 증가시켜주는 효과를 나타내었다. 그러나 환자의 뇌실내로 직접 투여하면 효능이 없어지고 부작용만 심각하게 나타났다. 하지만 최근 임상실험에서는 5 명의 환자의 putamen에 직접 주입하였더니 1 년 후에 증상이 개선되고 18 개월 후에는 striatum의 도파민 농도가 유지되었다는 보고가 있었다.

제 2절 허브로부터 유용추출물 분리 및 이를 이용한 신경 보호효능 분석 현황

1. 허브의 항생제 효과

최근 웰빙 (well-being)이 생활모드의 중심으로 떠오르면서 고부가가치 친환경 농축산물에 대한 관심이 증대되어지고 있는 실정이다. 또한 소비자들의 가치기준 또한 가격보다는 품질이 우선이라는 인식의 전환에 따라 농축산물의 생산과정에서의 식품 안전성이 농축산물 생산의 우선순위로 떠오르게 되었다. 이러한 생산과정 중에서도 농축산물의 항생물질 사용은 식품생산차원에서 뿐만 아니라 사회적 문제로 대두되어지고 있는 실정이다. 특히 tetracyclin 또는 penicillin과 같은 항생제의 경우 가축질병 예방과 성장촉진 등을 위하여 사료에 첨가되어져 사용되었으며, 이러한 항생제의 사용에 따라 항생제 저항성병원균의 증가를 초래하였으며, 동물과 인간의 교차전이 등의 문제가 발생되어 다양한 규제조건 등이 개발되어져 항생제 사용에 대한 제한 사항을 두기에 이르렀다. 이러한 항생제 대체제로 봉침을 이용하여 돼지 또는 소에 대한 면역력을 증가시키거나, 천연식물 또는 한약제들을 이용하여 면역력을 증가시키는 방법들이 강구되어지고 있다. 특히 이러한 천연식물 또는 한약제의 경우 phenolic compound, alkaloid, flavonid, saponin 등 천연 항생기능 화합물을 함유하고 있기 때문으로 추정되어진다. 따라서 이러한 허브류의 특성을 이용하여 허브추출물 및 효소제를 복합 처리하여 농축산물에 대한 항생제 대체 물질로서 Kang 등 (2007)년에 의하여 보고되어졌다.

2. 허브의 항산화효과

특히 약용식물의 phenolic compound는 항산화 항염증 활성을 가지고 있으며, 이러한 특성에 의하여 항암효능을 가지고 있는 것으로 많은 연구에서 입증되었다. 특히 이러한 약용식물들은 잠재적이 항암성, 항돌연변이 활성을 가지고 있다고 보고되었

다 (Surh YJ 1999). 호기성 생물의 경우, 생체 내에 필요한 에너지 대사 과정에서 산소를 소모함에 따라 이들에 의하여 반응성이 매우 높은 ROS (reactive oxygen species)를 합성하게 된다 (Halliwell & Gutteridge, 1992). 이러한 ROS는 free radical 또는 hydroperoxide를 합성하게 되며, 생체를 구성하는 lipid membrane과 과산화작용을 유발시키게 된다. 이러한 작용으로 인하여 malonaldehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) 등과 같은 지질 과산화물이 축적되게 되어진다. 특히 ROS는 식균 작용이나 면역체계에서도 생성되어 이물질 침입에 대한 방어기작으로 이용되고 있지만, 체내에 고농도로 존재할 경우 높은 반응성으로 인하여 산화적 스트레스를 유발하고 DNA 변이와 노화를 촉진하게 된다. 따라서 생체 내에서는 superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxide 등을 합성함으로써 산화적 스트레스에 의한 방어체계를 가지고 있다. 그러나 이러한 ROS와 ROS에 대한 방어기작 사이의 균형이 깨져버리게 되면, 앞서 언급한 바와 같이 DNA 변이에 의한 발암이 유발되어지게 된다. 따라서 Chang 등 (2006)은 chinese hamster lung fibroblast (V79-4) cell line을 가지고 15종의 허브에 대한 항산화효과 및 세포독성효과를 분석하였다. 이로부터 허브류의 식품소재로서의 가능성을 평가하였다.

3. 서양허브의 화학분석

허브가 함유하고 있는 화학성분은 탄수화물, 무기질, 지방, 단백질, 비타민 외에 특수성분이 사포닌, 탄닌, 알칼로이드, 정유, 배당체, 펙틴 등이 알려져 있으며, 허브식물의 essential oil은 스트레스 해소 내지는 기분안정 등 정신심리 아로마테라피 요법에 이용되어지고 있다. 이에 대하여 Oh 등 (2003)은 5종의 허브 (로즈마리, 세이지, 타임, 민트, 라벤더)에 대한 일반성분, 무기질, 총폐놀량, 유리당, 지방산 및 향기성분을 분석하였다. 허브의 일반성분은 수분이 69.92 ~ 82.10%이며, 무기질은 나트륨, 칼슘, 망간, 인 마그네슘, 아연 및 철 등이 분석되었으며, 대체적으로 칼슘함량이 높은 것으로 확인되어졌다. 이외에 지방산으로는 대체적으로 포화지방산 보다 불포화지방산이 높게 나왔으며, 유리당으로는 sucrose, glucose 및 rhamnase 등이 분리되

어졌으며, 향기성분으로는 27 종이 확인되어졌다.

4. 허브의 항암활성

허브는 대부분 향기를 지닌 약용식물로서 최근에는 우울증 불면증, 두통, 불안감등과 같은 정신질환 치료, 여드름, 발적, 잇몸질환, 산부인과질환 등과 관련된 항균제로 이용되고 있을 뿐만 아니라, 알러지, 만성통증, 고지혈증, 암, 관절염, 심장질환과 같은 질병치료에 치료효능이 밝혀지고 있다. 이러한 허브는 천연의약품으로 개발되어 부작용이 거의 없으면서 질환개선도 뚜렷하다는 장점이 있다. 최근 들어 허브의 성분에는 강한 항암작용이 있음이 보고되어졌으며, 의학적 적용범위가 확대되어졌다. 이러한 허브들의 항암효능 기작으로는 앞서 언급한 바와 같이 항산화물질, 면역증강효과, DNA 상에서 돌연변이를 억제함으로써 일어나는 것으로 추정되어진다. 그러나 합성되어진 항암제의 경우 치료효과도 미흡할뿐더러, 말기암의 완치율도 매우 낮은 것으로 나타나고 있기 때문에 부작용을 최소화하고 항암효과가 높은 항암제를 개발하기 위하여 천연 허브로 눈을 돌리고 있는 실정이다. 이러한 연구에 발맞추어 Kim 등 (2002)은 체리세이지, 레몬밤, 레몬버베나, 오레가노, 페퍼민트, 스피아민트, 로즈마리, 레몬타임, 스테비아, 바질 등의 추출물을 Murine leukemia cell (LI210) line에 투여하여 항암활성을 분석하였다. 이들 또한 항암활성분석과 관련하여 항산화효능을 분석함으로써 체내의 활성산소가 직간접적으로 nuclear DNA 및 mitochondria DNA를 손상하여 암의 발생에 결정적으로 중요한 작용을 하고 있으며, 암의 병리와 치료 과정에 활성산소의 제거과정이 매우 중요하다는 것을 보고하였다.

5. 허브의 대중적 응용

허브의 경우 고대로부터 약용 및 식용으로 이용되어왔으며, 다양한 향기 성분에 의하여 식욕증진 등과 같은 역할을 하기 때문에 많은 식품의 첨가제로 이용되어지고 있을 뿐만 아니라, 다양한 생리활성에 관련된 기능성이 분석되어져 각광 받고 있다. Jeon & Kim (2006)는 허브를 첨가하여 제조한 두부의 품질 특성을 분석하였으며,

Kim & Jeong (2006) 는 로즈마리와 민트를 첨가하여 쿠키의 관능적 특성 등을 분석하였다. Jung 등 (2006)은 허브를 첨가한 묵은지 요리의 관능적 특성을 분석하였고, Kim & Jeong 등은 허브를 첨가한 빵 및 과자류에 대한 대학생의 소비인식과 허브 바게트의 관능적 특성을 분석하였다. Yoo 등 (2005)는 허브분말을 이용한 기능성 초콜릿 개발 및 항산화적 특성을 분석하였다. 이와 같이 허브는 허브 자체로도 식품첨가물로써 각광을 받고 있을 뿐만 아니라 허브의 기능성에 의한 시너지 효과에 의하여 다양한 식품들이 개발되어지고 있다. 특히 웰빙 식생활과 관련된 소비문화의 이동으로 앞으로도 이러한 허브의 식품첨가물 또는 허브를 이용한 다양한 식품들이 개발되어져 소비자들에게 각광받을 것으로 사료되어진다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 신경보호효과를 가지는 유용허브의 선정

1. 연구의 이론적 배경

Tyrosine hydroxylase (TH)는 도파민 (dopamine:DA)의 전구체인 L-DOPA를 tyrosine으로부터 전환을 촉진하는 효소 (Fig. 1)이며, 이 효소는 카테콜라민 생합성 경로의 첫 번째로 작용하는 rate-limiting enzyme이다 (Molinoff 등, 1971). 카테콜라민 생합성에서 도파민은 노르에피네프린 (norepineprine)과 에피네프린 (epineprine)을 생성하는 전구체이다. TH는 카테콜라민 생합성경로의 활성화에 다양한 기작을 부여하며 카테콜라민을 생성하는 신경세포들의 활성화에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 또한 TH는 카테콜라민성 신경세포에 고도의 특이적인 면역세포화학적 표지효소로 알려져 있으며 조직을 이용한 immunohistochemistry를 실행한 TH의 형태학적인 연구가 활발히 진행되어졌다. TH는 주로 중추신경계 (CNS)인 midbrain, 뇌간, diencephalon, retina와 olfactory bulb에서 발현되고 neural crest에서 발달한 말초신경계통(PNS)인 sympathetic ganglia와 adrenal medullary chromaffin 세포에서도 발현된다 (chan-palay 등, 1984; kiss, 1987). 또한 TH는 adrenal medullary tumor에서 기원한 rat pheochromocytoma (PC) 세포인 PC12에서도 발현되어 (Greene 등, 1996) 연구되었다. TH의 활성화는 퇴행성 질병과 관련이 있어 TH 유전자와 활성화에 대한 많은 연구되었다. TH의 활성화는 여러 가지 환경적, 생리적인 자극과 다양한 인자에 의해 영향을 받는데 주로 glucocorticoid administration (Zhe 등, 1993), drug administration, cold / immobilization stress (Lee 등, 1996)와 같은 다양한 약리적, 생리적인 상태에 따라 변화된다. 특히 reserpine (Nicole 등, 1986), forskolin (Spyridon 등, 2001)은 rat brain과 PC12 세포에서 TH 효소를 유도 발현한다고 보고하였다. 그리고 neurotrophin의 일종인 BDNF (Spyridon 등, 2001; Lewis 등, 1987), NGF (Acheson 등, 1984)와 GDNF (Carl 등, 2000), EGF (Goodman 등, 1980; Lewis

등, 1987), cAMP (Kumakara 등, 1999; Lewis 등, 1993)에 의해 TH를 유도 발현한다고 보고하였다.

한편 뇌에서 카테콜라민 체계의 비정상적인 기능은 정신적인 질병과 연관된다. 특히 Substantia nigra의 mesencephalic dopaminergic 신경세포는 신체 운동성 기능의 degenerate에 중요한 역할을 담당하고 있어 파킨슨병 (PD)과 관련된다. 이러한 dopaminergic 신경세포의 활성화는 TH의 발현 양상에 따라 큰 영향을 받는다. PD는 계속적으로 진행되는 퇴행성 신경질환이며, 전형적인 신경적 형태는 striatum에서의 TH 및 다른 카테콜라민과 연관된 효소와 도파민이 결핍되거나 감소된다. (Birkmayer 등, 1989; Nagatsu, 1984; Riedere 등, 1989). 지금까지 가장 효과적인 PD의 치료법으로서 L-dopa를 처리함으로써 회복된다는 보고 (Weiner 등, 1980)가 있으나 이 도파민 치료는 지속적인 복용으로 인한 여러 부작용을 초래 (Obeso 등, 1989)하고 경제적인 손실이 크기 때문에 현재에는 TH나 L-DOPA의 유도생성에 대한 관심이 모아지고 있다. 또한 이를 생성할 수 있는 세포를 이식하는 방법 (Koji 등, 2000)들이 보고되어지고 있으나 효율성과 윤리적인 면에서 논쟁의 여지가 계속적으로 제기되고 있어 다른 치료법의 개발이 요구되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 수집된 허브에 대한 문헌적 연구조사, 정상세포주인 Human transformed primary embryonal kidney cell line 293, Rat Pheochromocytoma cell line (PC12), 및 Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서의 세포독성을 분석하고, dopamine biosynthesis에 관련되어있는 tyrosine hydroxylase (TH) 및 aromatic amino-acid decarboxylase (AADC)의 유도발현, 신경보호효과분석을 위하여 Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Grial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)의 유도발현을 mRNA level 및 protein level에서 분석함으로써 본 연구에 적합한 허브를 선정하고자 한다.

2. 재료 및 방법

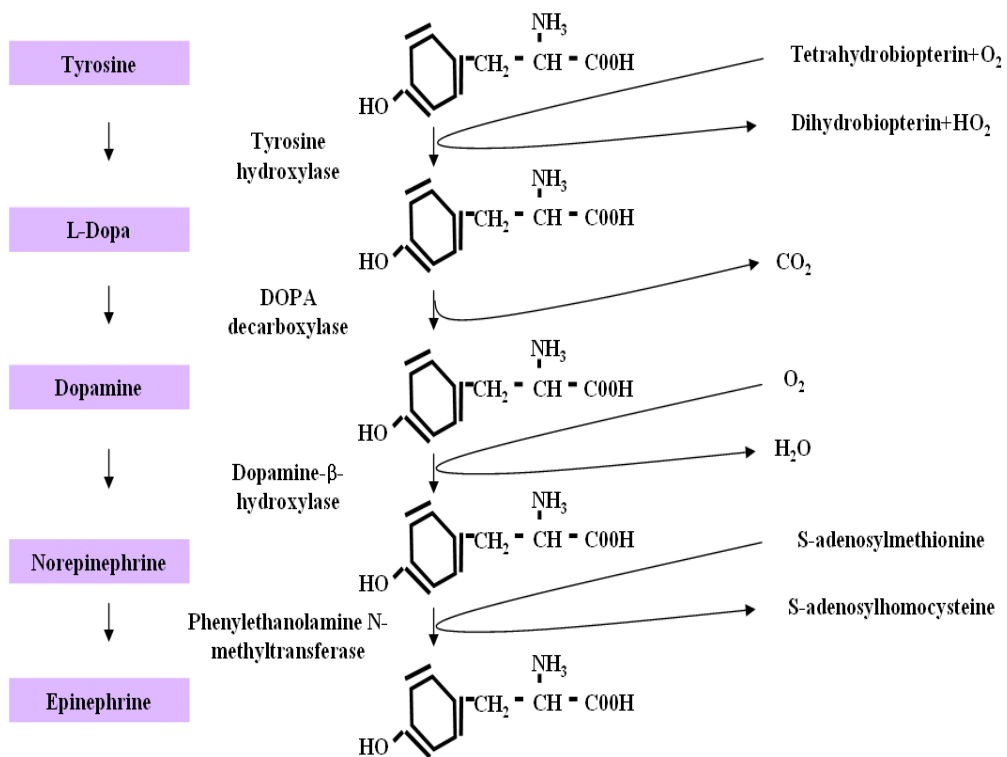


Fig. 1. The pathway of Catecholamine biosynthesis.

가. 재료

본 연구의 실험재료로 사용한 허브는 충북 청원군 부용면 외천리 480번지 상수허브랜드 (<http://www.herbland.co.kr>)로부터 16종의 허브를 구입하여 본 연구에 사용하였다. 본 연구에 사용되어진 허브는 방아, 레몬버베나, 그린타임, 체리세이지, 허니씨클, 애플민트, 레몬밤, 슈퍼민트, 디지털리스, 로즈제라늄, 마리노 라벤더, 스테비아, 레몬그라스, 파인애플 민트, 오레가노, 페퍼민트를 구입하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

나. Herb methanol extraction

허브 잎을 씻어 물기를 건조 시킨 후 잘게 파쇄한 후 각 허브 10 g을 70% methanol 100 ml에 침지하여 72 시간동안 실온에서 방치한 후 상등액을 취하여 7 겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 evaporation하여 농축시킨 후 동결건조하게 된다.

다. 동물세포배양

Human transformed primary embryonal kidney cell line 293 및 Rat Pheochromocytoma cell line (PC12)은 Korean cell line bank (KCLB)로부터 분양받아 RPMI1640 medium내에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin이 첨가되어져 있는 배지를 사용하여 배양하였다. 37°C, 습도 95%, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 72 시간을 주기로 배지를 교체하였다. 또한 세포밀도가 80%에 이르렀을 때 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 또한 Human neuroblastoma cell line은 ATCC (American type culture collection)으로부터 분양받아 DMEM/F12 배양배지에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin이 첨가되어져 있는 배지를 사용하여 배양하였다. 293 및 PC12 세포와 동일한 조건으로 배양하였다.

라. 실험동물사육조건

실험동물은 생후 6-8 주된 약 150 g의 specific pathogenic free male *sprague-dawley rat*를 한국화학연구소 안정성 연구부로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 먹게 하며, 사육실의 온도는 21~24℃, 상대 습도는 40~60%로 유지한다. 또한 사육실의 밤과 낮이 12 시간마다 반복되도록 조절하였다.

마. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석

293 cell, SH-SY5Y 및 PC12를 이용하여 세포독성 검사를 수행하였다. 각 세포는 1×10^5 cell/ml로 평량하여 96 well plate에 접종하여 24 시간 동안 각각의 배지를 처리하여 배양시킨다. 배양된 세포는 potassium phosphate buffered saline (PBS)를 2회 세척시킨 후 각각의 배양배지에 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조한 각각의 허브를 처리하여 24, 48, 72 시간동안 배양시킨 후 MTT assay를 수행한다. 세포독성을 분석하기 위하여 PBS에 5 mg/ml 농도로 녹인 MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 용액 20 μl 씩 첨가하고 다시 4 시간 동안 37℃에서 배양한 후 각 well 당 DMSO 100 μl 를 처리하여 형성된 crystal fomazan을 녹여낸다. 이후 흡광도를 microplate reader (ELISA reader, molecular device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하게 된다. 또한 생존율을 측정하기 위하여 24 well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 세포를 평량시킨 후 trypan blue exclusion 법에 의해 착색 비착색 세포수를 혈구계수기로 세어 생존율을 계산 한다. 생존율은 전체 세포수에 대한 trypan blue 착색 세포수를 백분율로 환산하여 계산되어진다.

바. PC12 및 SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 신경영양인자 유도발현 분석

1) PC12 cell line에 허브 추출물 투여 방법

Pheochromocytoma 12 (PC12) 세포는 rat의 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서 신경세포의 기능을 해석하기 위하여 많이 사용되고 있다. 특히 신경성장 또

는 영양인자 처리로 catecholamine 합성효소가 유도되어지기 때문이다. 따라서 본 연구에서도 신경보호효과를 가지고 있는 허브를 선별하기 위하여 PC12 세포에 허브추출물을 처리하여 도파민합성에 관련되어있는 tyrosine hydroxylase의 유도발현을 분석하게 되었다. 허브 추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 평량하여 PC12 cell에 처리하여 2, 4, 8 시간 동안 처리시킨 후 trypsinization 후 세포를 회수하여 total RNA를 분리하였다.

2) Total RNA 분리

각 허브 추출물을 PC12 cell line에 처리하여 trypsinization 후 회수된 세포는 TriZol reagent를 사용하여 제공사의 매뉴얼에 의하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 세포는 1 ml의 Trizol reagent를 처리하여 pipetting에 의하여 세포를 파쇄시킨 후 5 분 동안 상온에서 반응시킨다. 이후 200 μl 의 chloroform을 처리하여 15 초간 혼합시킨 다음 3분 동안 상온에서 반응 시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 원심분리시킨다. 원심분리 후 무색의 상층액을 약 600 μl 를 조심스럽게 pipette로 회수시킨 후 500 μl 의 isopropanol을 처리하여 total RNA를 침전시키기 위하여 혼합시킨 다음 12,000 rpm, 4°C에서 원심분리 시킨다. 상층액을 제거시킨 후 형성된 pellet은 75% 에탄올에 현탁시킨 다음 7,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거시킨다. 형성된 pellet은 상온에서 에탄올을 제거시킨 후 가볍게 air-dry 시킨 후 DEPC water 또는 RNase-free water에 녹이게 된다. 녹여진 total RNA는 UV/vis-spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 RNA 농도를 측정하게 된다.

3) Total RNA 전기영동

정량된 RNA의 농도 및 분리되어진 RNA 상태를 분석하기 위하여 formaldehyde agarose gel을 이용하여 전기영동하게 된다. Formaldehyde agarose gel을 조제하기 위하여 RNA의 분해를 방지하기 위하여 DEPC-water를 gel-former와 comb을 세척한다. agarose 1.3 g 을 50 ml DEPC water에 녹인 다음 20 ml의 formaldehyde 및 5 ml의 20X MOPS (0.2 M MOPS (morpholinopropanesulphonic acid), 50 mM sodium

acetate, 5 mM EDTA, The buffer is adjusted to pH 7.0 with 1 M NaOH and sterilised by autoclaving)를 섞어 최종 volume을 100 ml이 되도록 맞춘 후 microwave oven에서 열을 가하여 액화시키게 된다. 액화된 용액을 gel-former 및 comb에 부어 약 1 시간동안 상온에서 고화시키게 된다. 정량된 total RNA 2 μ g을 electrophoresis buffer (10 ml 100% deionized formamide, 3.5 ml 40% formaldehyde, 1.5 ml 10X MOPS buffer) 와 혼합하여 70°C에서 5 분간 반응시킨 다음 70 V로 전기영동하여 EtBr 용액에 염색시킨 후 UV 하에서 분석하게 된다.

4) cDNA 합성

분리되어진 total RNA에 포함되어진 mRNA를 cDNA로 전환시키기 위하여 reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 을 수행하였다. 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)) 및 oligo dT primer는 Bionner co.로부터 구입하였으며, 제조회사로부터 제공되어진 매뉴얼에 의하여 합성하였다.

5) Quantity-Polymerase Chain Reaction (PCR)

허브추출물에 의하여 도파민 생합성에 관련되어져 있는 tyrosine hydroxylase (TH), aromatic amino-acid decarboxylase (AADC) 유전자의 유도발현을 분석하기 위하여, 이들에 대한 특이적인 primer를 합성하여 (Table 6) quantity-PCR을 수행하였다. 합성된 PCR-product는 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 영상 분석 프로그램 (GelQuant, DNR Bio-imaging system, USA)를 이용하여 mRNA수준에서의 유도발현을 분석하였다.

사. Western blotting

단백질 수준에서의 도파민 생합성관련 단백질 및 신경영양인자의 유도발현을 분석하기 위하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 수

행하여 각각의 항체를 이용하여 단백질의 유도발현을 정량화 하였다.

1) 단백질 분리 및 정량

각 허브 추출물을 PC12 cell line에 처리하여 trypsinization 후 회수된 세포는 TriZol reagent를 사용하여 제공사의 매뉴얼에 의하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce co., USA)를 이용하여 정량하게 되며, 정량은 제조회사의 매뉴얼에 의하여 정량하였다. 또한 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumin)을 이용하여 단백질 표준곡선을 작성하여 이를 기초로 하여 이용하여 단백질을 정량화하였다. 정량된 단백질은 SDS-PAGE를 수행한 후 coomassie staining을 통하여 정량된 결과를 분석하였다.

2) SDS-PAGE

분리된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 정량화된 단백질을 분석할 뿐만 아니라 western blotting을 수행하기 위하여 수행하게 된다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5X SDS Sample Buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 10 분간 중탕한 후 Protein marker (Cambrex Co.)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue (CBB) R 250으로 염색하고 Destaining buffer로 탈색시킴으로써 단백질 정량화를 확인하게 된다.

3) western blotting

전기영동된 SDS-PAGE를 PVDF membran으로 transfer 하기 위하여 다음과 같은 방법에 의하여 실행하였다. 전기영동후 단백질을 100 V에서 90 분간 PVDF membrane에 transfer하였다. Skim milk를 농도가 5%가 되도록 TBS-T 용액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 녹여 blocking solution을

제조하여 membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려놓고 흔들어 주었다. 한시간 후 TBS-T 용액으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000 비율로 TBS-T 용액에 희석한 일차항체로 4°C에서 12 시간 처리 후 동일한 방법으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBS-T 용액에 희석한 이차항체 (Alkaline Phosphatase conjugated antibody)로 실온에서 2 시간 처리하였으며, 사용되어진 항체는 Table 2에 명시하였다. 이후 발현된 결과는 영상 분석 프로그램 (GelQuant, DNR Bio-imaging system, USA)을 이용하여 결과를 분석하였다.

아. 면역조직화학법

Rat은 흉부를 절개한 후 심장의 정맥을 이용해 PBS로 체내의 혈액을 제거한 뒤 4% Paraformaldehyde로 관류 고정하였다. 고정된 쥐 뇌와 위를 적출하여 microcryocutter를 이용하여 35 μm 두께의 동결절편을 제작하였다. 준비된 뇌의 절편은 PBS로 여러 번 씻어주었다. 30% H_2O_2 로 전처리하여 씻어준 후 Vectastain ABC kit의 normal goat serum을 0.5% BSA/PBS에 섞어 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백질의 결합을 막는다. 일차항체와 0.5% BSA/PBS에 희석하여 실온에서 1 시간에서 2 시간 정도 반응시킨 후, 뇌 절편을 PBS로 3 번 씻은 후, 이차 항체를 1% BSA/PBS에 희석시켜 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음 1% BSA/PBS로 두 번 씻어냈다. 사용하기 30 분 전에 Vectastain ABC kit (1 : 50)를 희석하여 50 분 동안 반응시킨 후 PBS로 2 회 씻고, 50 ml DAB 용액과 0.2 M PBS 용액에 30% H_2O_2 12 μl 를 첨가한 용액으로 5 분간 염색시켜 0.1 M PBS로 5 분간 반응을 동시에 정지시킨 다음, 광학 현미경으로 관찰하였다. 그리고 위에서의 세포 counting은 각각 처리된 4개의 염색된 절편을 선택하여 X400에서 전 층을 대상으로 조직절편의 단위면적당 유전자가 발현된 세포의 수를 측정하였고 계수 결과는 윌콕슨의 순위합 검정 (Wilcoxon rank sum test)를 이용하였다.

Table 1. Primer sequences of gene related dopamine biosynthesis pathway

Genes	Primer sequences
TH	Sense : 5'-GCT GTC ACG TCC CCA AGG TT-3' Antisense : 5'-TCA GAC ACC CGA CGC ACA GA-3'
AADC	Sense: 5'-CTT CAG ATG GCA ACT ACT CC-3' Antisense: 5'-CTT CGG TTA GGT CAG TTC TC-3'
BDNF	Sense : 5'-AAC GAA GAA AAC CAT AAG GA-3' Antisense : 5'-GTC TAT CCT TAT GAA TCG CC-3'
GDNF	Sense : 5'-CAG AGA ATT CCA GAG GGA AA-3' Antisense : 5'-TAC ATC CAC ACC GTT TAG CG-3'
β -actin	Sense : 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3' Antisense : 5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3'

Table 2. Antibodies used in western blotting

	Antibody	Host	Dilution	Company
Primary antibody	TH	Mouse	1 : 1000	Affinity Bio Reagents
	AADC	Mouse	1 : 1000	Abcam
	Actin	Mouse	1 : 400	Biomeda
	GDNF	Mouse	1 : 1000	Santa Cruz biotechnology
	BDNF	Rabbit	1 : 1000	Santa Cruz biotechnology
Secondary antibody	goat anti-mouse IgG-HRP	.	1 : 1000	Santa Cruz biotechnology
	goat rabbit-mouse IgG-HRP	.	1 : 1000	Santa Cruz biotechnology

3. 결과

가. 수집된 허브에 대한 문헌적 조사결과

- 로즈마리 (*Rosmarinus officinalis*) : 약초로 재배하며, 전체에 향이 강한데 향이 뇌의 기능과 기억력을 높인다고 한다. González-Trujano 등 (2007)은 설치류를 이용하여 로즈마리 추출물에 의한 항통증효과를 증진시킴을 보고하였으며, Tahraoui 등 (2007)은 전통 민방에서 고혈압과 당뇨 치료제로서 로즈마리 사용을 보고하였다. Mónica 등 (2007)은 로즈마리 추출물에서의 항산화효능을 보고하였으며, Celiktas 등 (2007)은 로즈마리의 essential oil과 methnaol 추출물의 항미생물효과와 항산화효능을 분석하여 보고하였고, Abutbul 등 (2004)은 로즈마리 추출물이 *Streptococcus* sp.에 대한 항생효과를 가지고 있음을 보고하였다. Visanji 등 (2006)은 로즈마리로부터 분리되어진 carnosol 과 carnosic acid는 cyclin A와 cyclin B level을 변환시킴으로써 G2/M 단계에서 cell cycle을 억제시킴으로써 항암작용효과를 가진다고 보고하였으며, 이와 더불어 Huang 등 (2005)은 carnosol 이 B16/F10 mouse melanoma cell의 전이를 억제시킴을 보고 하였다.
- 체리세이지 (*Salvia officinalis*) : 잎을 삶아서 인후염 및 위장염에 사용한다. 방부·항균·항염 등 살균 소독작용이 있으며 염증의 소염제로도 이용한다. 또한 중풍이나 심한 운동 뒤의 피로도 씻어준다고 한다. S. Weckesser 등 (2007)은 추출물로 피부에 bacteria 와 yeasts의 세균감염억제 screening을 보고하였고, I. Grzegorzcyk 등 (2007)은 체리세이지 추출물로 항산화효능을 보고하였으며, Ana Paula Longaray Delamare 등 (2007)은 체리세이지의 essential oil의 항균효능에 대해 보고하였으며, A. Ferreira 등 (2006)은 체리세이지를 이용하여 항산화효과와 acetylcholinesterase 억제를 위한 screening에 대해 분석하여 보고하였으며, B. Vuković-Gačić 등 (2006)은 *Escherichia coli*와 *Saccharomyces cerevisiae*에서 UV에 의해 유도되어지는 돌연변이에 세이지의 essential oil의 항돌연변이효과에

대해 보고하였다. 또한 Cristovao F. Lima 등 (2005)은 실험용 쥐에 체리세이지를 먹여 간의 항산화상태를 보고하였다.

- 허니씨클 (*Lonicera japonica*) : 한방에서는 잎과 줄기를 인동이라 하여 이뇨제나 해독제로 사용한다. Henry Wing-Cheung Leung 등 (2006)은 항산화효소활성을 가지는 luteolin에 의해 유도되는 인간 폐암 CH27 cell의 apoptosis에 대해서 보고하였고, Jin Tae 등 (2003)은 부종에 대해 허니씨클의 항염증효과에 대해서도 보고하였다.
- 애플민트 (*Mentha suaveolens*) : 잎으로 허브차를 만들어 마시면 소화불량이나 피로회복에 효과가 있다. 약용하기도 하는데, 살균소독, 건위강장, 진정 및 진통작용에 좋다. 입 냄새를 없애는 효과도 있다. G. I. Stafford 등 (2007)은 애플민트에 의해 monoamine 산화효소 억제가 되는 것을 보고했고, Sweetie R 등 (2007)은 방사선으로 가공된 양 고기에 대해 민트의 항산화능력을 보고하였으며, Saeedeh Arabshahi-D 등 (2007)은 애플민트 추출물이 열과 pH에 안정하게 항산화능력을 갖는지 분석하여 보고하였다. 이와 더불어 M. Gulluce 등 (2007)은 애플민트의 essential oils과 메탄올 추출물의 항미생물 효과와 항산화효능을 분석하여 보고하였다. A. Ferreira 등 (2006)은 애플민트의 항산화능력과 acetylcholinesterase 억제제를 위한 screening에 대하여 보고하였고, R. Paul Choudhury 등 (2006)은 애플민트의 필수, 미량원소와 독성중금속과 항산화특성을 보고하였다. 또한, Ewa Capecka 등 (2005)은 신선한 것과 말린 허브의 항산화활성을 측정하여 보고하였다.
- 레몬밤 (*Melissa officinalis*) : 향은 감정을 편안하게 진정시켜 주며 심장 박동수를 낮추고 혈압을 낮춘다. 전갈이나 독거미에 물렸을 때 해독작용이 있고 설사를 완화시키며 바이러스를 막는 데 큰 효과가 있다. 천연두에도 효능이 있고 치통이

있을 때 입가심용으로 사용해 왔다. 독버섯 해독, 복통, 위궤양, 생리통 억제, 생리 촉진에 사용해 왔으며 예로부터 방향요법(향기요법)에 필수적으로 사용해 왔다. 잎과 가지에서 추출한 기름은 탈모방지, 목욕제 등으로 이용되며 차는 진정·건위·강장·신경 고양 등에 효능이 있다. Keyvan Dastmalchi 등 (2007)은 레몬밤의 항산화활성과 화학적 조성을 보고하였으며, D. Ivanova 등 (2005)은 레몬밤의 폴리페놀과 항산화능력에 대하여 보고하였으며, A. Allahverdiyev 등 (2004)은 레몬밤의 휘발성 오일의 항바이러스활성을 보고하였다. S. Asgary 등 (2002)은 쥐의 간세포에서 레몬밤의 항산화효과를 분석하여 보고하였다.

- 슈퍼민트 (*Mentha spicata*) : 잎의 즙은 상처, 벌에 쏘인 데, 입안이 헤졌을 때, 손발이 튼 곳에 약용했다. 잠들기 전 긴장을 완화시키고 마음을 차분하게 하는데 도움을 주며 진통, 멀미, 복통, 메스꺼움과 열에 효과적으로 사용된다. Regina Karousou 등 (1998)은 슈퍼민트 essential oils에 UV-B 강화방사선의 효과를 보고하였다.
- 디지털리스 (*Digitalis purpurea*) : 생약(生藥)에서 잎을 말려 강심제 · 이뇨제로 쓴다. 불쾌한 맛이 나며 매우 쓰다. 양방에서는 강심 · 이뇨약으로 유명하다. 잎에 여러 종류의 강심배당체가 들어 있다. E. Navarro 등 (2000)은 디지털리스 메탄올 추출물로 심장혈관움직임에 대해 보고하였다.
- 로즈제라늄 (*Pelargonium rosium*) : 향유에 들어 있는 게라니올, 시트로넬롤 등은 장미유의 주성분이며, 어린 잎에 많기 때문에 꽃 피기 직전에 가지 끝에서 잎을 떼어낸다. 향유는 화장수이나 크린싱크림과 같은 화장품, 향수 등에 쓰인다. 또 주스·잼·차·아이스크림·과일샐러드·핀치 등에도 쓰인다. 잎과 줄기 등을 말려서 목욕제, 포푸리, 베갯속 등으로도 사용하며, 모기 등의 해충을 없애는 데에도 효과가 있다. N. Wittschier 등 (2007)은 로즈제라늄의 추출물은 *Helicobacter*

pylori이 인간의 위에 부착되는 것을 억제하는 것을 보고하였고, Herbert Kolodziej 등 (2007)은 로즈제라늄의 추출물로 항균성과 면역조절활성에 대하여 보고하였다. 또한, M. Nöldner 등 (2007)은 로즈제라늄의 뿌리를 말린 추출물로 lipopolysaccharid의 억제를 유도하는 병의 특징을 보고하였으며, A. Schwiertz 등 (2006)은 vaginal 감염으로부터 얻은 미생물을 essential oils에서의 활성을 보고하였다.

- 마리노라벤더 (*Lavandula angustifolia*) : 향유는 향수와 화장품의 원료로 사용하고 요리의 향료로 사용할 뿐만 아니라 두통이나 신경안정을 치료하는 데도 쓴다. B.F. Bradley 등 (2007)은 Mongolian gerbil에 불안반응 검사를 하여 마리노라벤더 향기로 불안완화 효과를 보고하였고, D. Shaw 등 (2007)은 rat 피부에 라벤더 오일을 흡수하게 하여 불안완화 효과를 보고하였으며, Cheng-Kuang Hsu 등 (2007)은 버섯의 tyrosinase 활성에 라벤더의 water 추출물의 억제효과에 대하여 보고하였고, Azucena González-Coloma 등 (2006)은 라벤더의 essential oil의 화학적 구성과 antifeedant 효과에 대해 보고하였으며, 또한, Anne Adsersen 등 (2006)은 기억장애에 acetylcholinesterase 억제 활성을 위한 라벤더를 처리하여 분석하여 보고하였으며, T. Moon 등 (2006) 라벤더의 essential oils, hydrosols, 추출물의 항균효능을 보고하였고, M.D. Standen 등 (2006)은 Natural killer 세포 활성과 림프구 활성화에 대하여 라벤더 essential oils의 효과를 분석하여 보고하였으며, M.G. Evandri 등 (2005)는 박테리아 역전변이 분석에서 라벤더 essential oil의 항돌연변이 효능을 보고하였고, S. Sosa 등 (2005)은 라벤더 추출물의 항염증 효능을 보고하였다.
- 스테비아 (*Stevia rebaudiana*) : 파라과이에서는 옛날부터 스테비아잎을 감미료로 이용해 왔는데, 최근 합성감미료인 사카린의 유해성이 문제가 되자, 다시 주목을 끌게 되었다. 잎에는 무게의 6 ~ 7% 정도 감미물질인 스테비오사이드 (stevioside)

가 들어 있는데, 감미성분은 설탕의 300 배로서, 차를 만들어 마시거나 껌 대용으로 하며 청량음료의 감미료로 사용한다. M.B. Tadhani 등 (2007)은 스테비아 잎과 callus의 향산화효능을 보고하였고, A. P.M. Nunes 등 (2007)은 스테비아의 잠재적인 유전독성을 comet assay로 분석하여 보고하였으며, Søren Gregersen 등 (2004)은 당뇨병의 두 가지 타입에 대하여 스테비아의 고혈당억제 효과를 보고하였고, Narissara Lailerd 등 (2004)은 rat 골격근의 insulin-sensitive, insulin-resistant에 당 이동의 스테비아의 효과에 대하여 보고하였다. Ming-Hsiung Hsieh 등 (2003)은 본태성고혈압 환자들에게 스테비아를 복용시켜 효능을 분석하였고, P.B. Jeppesen 등 (2003)은 당뇨병에 걸린 쥐에서 스테비아의 antihyperglycaemic 효능에 대하여 보고하였다. P.B. Jeppesen 등 (2002)은 스테비아는 antihyperglycaemic, 인슐린분비 효과와 glucagostatic 효과를 유도한다는 것을 보고하였다.

- 레몬그래스 (*Cymbopogon citratus*) : 잎과 뿌리를 증류하여 얻은 레몬그래스유(油)에는 시트랄이 들어 있어 비누와 약품의 향료로 사용한다. 또, 주변 공기를 살균하고 정화하는 효과가 뛰어나다. 지친 마음, 우울한 기분에 자극을 주어 생기를 되찾게 해주며 정신적으로 피로할 때 효과가 좋다. 강장, 구풍, 살균, 소화 촉진, 이뇨, 최음, 항우울증에도 많이 쓰이며, 피부 미용에 도움이 된다. Adejuwon Adewale Adeneye 등 (2007)은 레몬그래스의 잎 추출물에서 저혈당효과와 지방 감소효과를 보고하였고, C.R.A. Costa 등 (2006)은 레몬그래스 essential oil의 불안안정 효과를 보고하였으며, P. Lertsatitthanakorn 등 (2006)은 여드름을 억제하기 위한 레몬그래스 essential oil의 생물학적 활성에 대해 보고하였고, Bhusita Wannissorn 등 (2005)은 레몬그래스 essential oils의 항균효능을 보고하였다. 또한, Yoshimasa Nakamura 등 (2003)은 레몬그래스는 A phase II 해독효소를 유도한다는 것을 보고하였고, A.O. Oyedele 등 (2002)은 레몬그래스의 모기 퇴치 효과에 대해 보고하였다.

- 파인애플민트 (*Mentha suaveolens cv. Variegata*) : 기분을 맑게 하는 효과, 감기, 코 막힘, 헛기침, 치통, 식중독, 구토, 설사, 변비, 피부염, 마른버짐 등에 효과가 있다. A. Ferreira 등 (2006)은 파인애플민트의 항산화 효과와 acetylcholinesterase 억제에 대해 보고하였으며, Farouk Zaidi 등 (1998)은 파인애플 민트의 잎으로부터 free flavonoid aglycones를 보고하였다.
- 오레가노 (*Origanum vulgare*) : 건조한 잎과 꽃을 주머니에 넣어 류머티즘 환자의 더운 찜질에 사용하면 효과가 있다. 고대 그리스시대부터 약초로 이용된 오레가노 침출액은 강장·이뇨·건위·식욕증진·진정·살균 작용이 있어 차를 끓여 마시거나 포푸리·목욕제로 사용한다. 배멀미나 신경성 두통, 불면증에도 효과가 크다. E.L. Souza 등 (2007)은 food spoiling yeasts의 성장을 억제하는데 오레가노 essential oil은 효과적이라는 것을 보고하였고, Josè M 등 (2007)은 peroxyinitrite을 유도하는 산화과정에서 오레가노 essential oil은 효과적이라는 것을 보고하였으며, I. Rodríguez-Meizoso 등 (2006)은 오레가노에서의 항산화활성을 갖는 기능성 식품을 보고하였고, P. Hersch-Martínez 등 (2005)은 오레가노 essential oils의 항균효과를 보고하였다. 이와 더불어, Serap Doğan 등 (2005)은 오레가노의 polyphenol 항산화활성에 대해 분석하여 보고하였고, Reena Randhir 등 (2005)은 오레가노 phenolic 추출물을 H₂O₂ 스트레스를 받은 돼지의 근육조직에 처리하여 항산화효소 반응을 보고하였고, D. Ivanova 등 (2005)은 오레가노의 항산화능력과 polyphenols에 대해 보고하였다.
- 페파민트 (*Mentha piperita*) : 정유의 주요 성분인 멘톨은 피부와 점막을 시원하게 해주고, 항균과 통증 완화에 효과적이어서 고대 이집트에서는 식용과 약용 및 방향제로, 고대 그리스에서는 향수의 중요한 성분으로, 그리스와 로마에서는 향수 외에도 원기 강화제와 목욕 첨가제로 사용하였다. 정신적 피로와 우울증, 신경성 발작 등에 효과가 있고, 더울 때에는 차갑게 해주고 추울 때에는 따뜻하게 해주

는 성분이 점액의 유출을 막아주고 해열과 발한을 돕는다. 감기·천식·기관지염·콜레라·폐렴·폐결핵·식중독·신경통 등에 효과가 있다. Ewa Capecka 등 (2005)은 페퍼민트의 잎을 말린 것과 말리지 않은 것에서 항산화활성을 비교분석하여 보고하였고, M.R. Moreira 등 (2005)은 foodborne pathogen 을 감소시키는 페퍼민트 essential oils의 억제능력을 보고하였다.

나. 허브 메탄올 추출물에 의한 정상세포주 293 및 신경세포주 PC12 세포에 대한 세포독성 분석

신경퇴행성 억제효과 효능을 나타내는 허브를 선정하기에 앞서 인체에 독성을 나타낼 가능성을 가지는 허브를 제외시키기 위하여 정상세포주인 293 세포 및 신경퇴행성 연구에 많이 이용되어지는 PC12 세포를 이용하여 세포독성을 분석하였다. 각각의 허브를 methanol extraction 후 동결건조하여 각각의 시료를 평량하여 배양배지에 각 조건의 농도 (1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 조제하였다. 조제된 시료들은 동물세포에 처리하기 위하여 0.22 μm syringe filter를 이용하여 멸균하여 동물세포를 이용한 허브에 대한 cell viability 및 cell toxicity 분석에 이용하였다. 사용되어진 세포주는 정상세포주인 human transformed primary embryonal kidney cell 293 및 PC12를 이용하여 각각의 농도(1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 시간 (24, 48, 72 hr)에 따른 세포독성 및 세포 생존률을 분석하였다. 저농도 (1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 허브 추출물을 처리한 정상세포주 (293)에서는 모든 허브 추출물에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였지만 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 허브 추출물을 처리한 세포에서는 허니씨클 (*Lonicera japonica*), 디지털리스(*Digitalis purpurea*), 스테비아(*Stevia rebaudiana*)에서 IC_{50} 이하의 독성을 나타내고 있음을 확인하였다 (Table 8). 허니씨클은 국내에서는 “인동”이라고 불리우기도 하며, 한방에서는 종기·매독·임질·치질 등에 사용하며, 민간에서는 이뇨와 미용작용이 있다고 하여 차나 술을 제조하기도 한다. 그러나 Thanabhorn 등 (2006)에서의 연구결과에서는 급성 또는 아급성 독성을 나타내는 것으로 보고되어졌다. 뿐만 아니라 본 연구결과의 Table 8 에서와 같이 정상세포주

인 293 세포에서 분석한 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 후 72 시간 후에는 세포독성이 나타나고 있음을 확인하였다. 한편 디지털리스는 생약(生藥)에서 잎을 말려 강심제·이뇨제로 사용되어지는 약용식물 중의 하나이나 Betterman 등 (1947)에 의하여 디지털리스로부터 digitalis glycosides, digoxin, gigitoxine 및 lanatoside를 분리하여 이들 에 대한 특성을 분석하였으며, Smith (1975)에 의하여 디지털리스의 “digitoxin”에 대한 세포독성효과를 분석하여 보고하였다. 본 연구결과의 Table 8 에서와 같이 정상세포주인 293 세포에서도 가장 높은 세포독성을 나타내고 있음이 확인되어졌다. 스테비아 (*Stevia rebaudiana*)는 국내에서도 비교적 잘 알려져 있는 허브로 최근 합성감미료인 사카린의 유해성이 문제가 되자 주목을 끌게 되었다. 스테비아에는 설탕 대체용으로 농가에서 재배되어지고 한다. 그러나 1992년 Xili 등에 의하면 rat 에서의 “stevioside”를 만성적으로 경구 투여 시에 세포독성 또는 발암물질로 작용할 수 있음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 정상세포주인 293 세포에서 분석한 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 후 72 시간 후에는 세포독성이 나타나고 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 세포독성효과가 매우 미약한 것으로 확인되어지는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 허브추출물을 처리하여 시간 (24, 48, 72 hr)에 따른 세포독성효과를 분석하여 Table 9 에서와 같이 분석되어졌다. 모든 처리구에서 세포독성효과가 나타나지 않음을 확인하였다. 그러나 디지털리스, 레몬버베나, 레몬밤 등에서 다른 허브들에 비하여 약간 높은 세포독성을 나타내었으나, IC_{50} 이하의 값이 분석되어지지 않음에 따라 저농도의 허브에서는 세포독성이 매우 미약함을 확인하였다. Dopamine 생합성과 관련되어져있는 PC12에 허브 추출물을 처리하여 세포독성효과를 분석하여 Table 10 과 Table 11 에 명시하였다. 전반적으로 허브 추출물은 293 세포에 처리하였을 때보다 높은 세포독성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 저농도 (1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 허브추출물을 처리하였을 때는 293 세포에서와 유사하게 모든 처리구에서 세포독성효과가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리한곳에서는 레몬버베나, 체리세이지, 애플민트, 디지털리스 등에서 세포독성효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 실험구에서는 그런

Table 3. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against 293 cells according to the concentration in 72 hr.

Extracts	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	1	10	50	100
	Cytotoxicity (%)			
로즈마리	4.1±3.4	20.3±5.0	42.7±5.8	51.6±3.7
레몬버베나	6.5±4.1	25.1±3.1	39.7±3.9	48.7±5.3
그린타임	7.2±5.5	12.5±3.5	43.2±5.3	65.8±5.4
체리세이지	4.3±3.2	18.0±4.2	45.2±4.3	67.4±3.1
허니씨클	6.8±2.6	16.2±4.7	51.5±3.3	68.7±5.9
애플민트	8.2±3.6	19.2±5.8	74.1±4.7	74.3±6.1
레몬밤	5.5±4.1	24.4±4.3	56.3±3.1	75.2±6.3
슈퍼민트	4.5±4.4	18.1±7.1	69.1±3.6	81.6±3.9
디지탈리스	11.8±3.6	23.7±5.1	79.5±4.1	89.6±4.4
로즈제라늄	6.7±5.2	16.8±2.9	49.7±5.1	57.7±4.5
마리노라벤더	3.8±2.8	12.7±4.3	41.2±4.2	52.3±5.3
스테비아	8.2±2.1	20.9±6.4	71.5±6.4	79.5±4.3
레몬그라스	6.3±3.1	21.8±4.2	48.3±2.5	56.7±3.7
파인애플민트	8.1±2.4	15.8±3.8	44.7±3.3	49.4±3.1
오레가노	5.2±4.2	20.1±3.7	47.2±4.6	65.7±3.5
페파민트	5.4±3.3	17.9±6.1	48.3±5.2	61.4±4.8

Table 4. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against 293 cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.

Extracts	Treated time (hr)		
	24	48	72
	Cytotoxicity (%)		
로즈마리	5.1±4.1	16.2±5.1	22.7±4.0
레몬버베나	7.4±5.5	19.8±4.2	27.4±3.5
그린타임	5.5±4.0	10.1±3.4	14.7±4.5
체리세이지	3.3±2.5	15.8±2.9	21.2±3.1
허니씨클	6.9±3.4	11.5±3.7	17.9±3.7
애플민트	7.8±4.7	14.4±4.1	19.2±5.8
레몬밤	8.5±4.1	18.7±5.5	24.4±4.3
슈퍼민트	3.1±2.6	15.9±3.0	13.4±5.3
디지탈리스	9.9±4.8	19.7±5.7	25.9±3.1
로즈제라늄	7.4±5.1	12.0±3.5	15.5±3.2
마리노라벤더	4.7±3.2	8.9±5.3	14.8±5.3
스테비아	4.3±3.1	15.4±2.2	21.5±5.2
레몬그라스	8.4±2.9	15.2±3.6	20.9±3.3
파인애플민트	6.8±3.4	9.5±5.1	17.1±4.2
오레가노	5.6±4.5	13.4±4.2	19.5±4.1
페퍼민트	8.2±5.2	15.1±5.0	23.2±4.3

Table 5. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against PC12 cells according to the concentration in 72 hr.

Extracts	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	1	10	50	100
	Cytotoxicity (%)			
로즈마리	6.3 \pm 2.9	25.4 \pm 3.7	41.8 \pm 5.8	55.9 \pm 4.2
레몬버베나	5.9 \pm 5.2	22.9 \pm 4.7	69.5 \pm 4.0	77.5 \pm 5.3
그린타임	6.9 \pm 3.7	15.7 \pm 4.9	41.1 \pm 3.3	49.9 \pm 4.5
체리세이지	7.3 \pm 4.3	23.0 \pm 5.2	55.9 \pm 5.3	65.7 \pm 4.1
허니썬클	5.9 \pm 3.3	16.2 \pm 4.7	51.5 \pm 3.3	67.5 \pm 4.9
애플민트	10.7 \pm 4.7	16.9 \pm 6.8	71.7 \pm 2.7	80.1 \pm 5.2
레몬밤	3.9 \pm 3.1	21.1 \pm 5.3	41.3 \pm 3.1	51.2 \pm 2.9
슈퍼민트	5.7 \pm 3.4	19.3 \pm 5.1	49.1 \pm 4.7	81.6 \pm 3.9
디지탈리스	9.7 \pm 4.2	31.6 \pm 3.7	69.5 \pm 4.4	90.6 \pm 3.1
로즈제라늄	5.7 \pm 4.3	17.9 \pm 4.0	51.1 \pm 4.1	58.7 \pm 4.5
마리노라벤더	3.3 \pm 3.8	16.7 \pm 2.3	35.6 \pm 5.2	57.3 \pm 4.1
스테비아	9.1 \pm 3.5	18.7 \pm 3.4	48.5 \pm 4.4	80.5 \pm 4.7
레몬그라스	7.7 \pm 4.3	29.4 \pm 5.1	50.9 \pm 4.5	57.9 \pm 2.2
파인애플민트	7.7 \pm 4.2	13.5 \pm 4.1	43.1 \pm 4.3	49.3 \pm 5.1
오레가노	6.2 \pm 3.1	14.1 \pm 4.7	37.6 \pm 3.6	55.2 \pm 4.5
페파민트	5.1 \pm 4.3	18.1 \pm 3.1	38.7 \pm 6.1	64.1 \pm 3.8

Table 6. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against PC12 cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.

Extracts	Treated time (hr)		
	24	48	72
	Cytotoxicity (%)		
로즈마리	5.1±4.1	21.3±4.2	25.4±3.7
레몬버베나	7.4±5.5	17.7±3.1	22.9±4.7
그린타임	5.5±4.0	12.1±3.6	15.7±4.9
체리세이지	3.3±2.5	13.4±4.2	23.0±5.2
허니씨클	6.9±3.4	10.7±3.2	16.2±4.7
애플민트	7.8±4.7	12.9±5.2	16.9±6.8
레몬밤	8.5±4.1	17.7±4.1	21.1±5.3
슈퍼민트	3.1±2.6	14.4±4.7	19.3±5.1
디지탈리스	9.9±4.8	18.3±3.5	31.6±3.7
로즈제라늄	7.4±5.1	15.3±4.6	17.9±4.0
마리노라벤더	4.7±3.2	11.4±3.9	16.7±2.3
스테비아	4.3±3.1	16.1±5.2	18.7±3.4
레몬그라스	8.4±2.9	20.7±3.2	29.4±5.1
파인애플민트	6.8±3.4	10.9±3.7	13.5±4.1
오레가노	5.6±4.5	11.1±3.2	14.1±4.7
페파민트	8.2±5.2	17.5±4.4	18.1±3.1

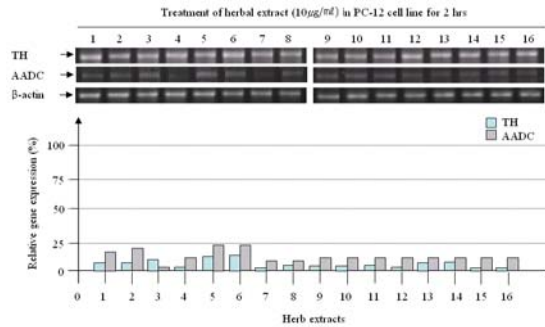
타임, 레몬밤, 파인애플민트를 제외하고 모든 처리구에서 높은 세포독성을 나타내고 있음을 확인 할 수 있었다. 293 세포에서의 처리와 동일하게 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 각각 허브 추출물을 PC12에 처리하여 24, 28, 72 시간 동안 세포독성을 분석하였다. 모든 허브 추출물 처리구에서는 세포독성이 매우 미약함을 확인 할 수 있었다 (Table 11). Table 8, Table 9 의 결과와 유사하게 Table 6, Table 7에서의 결과 역시 모든 허브추출물 처리구에서 생존률이 50%이상으로 확인되어졌다.

다. 허브 추출물 처리에 의한 TH, AADC, 신경영양인자의 유도발현분석 (*in vitro*)

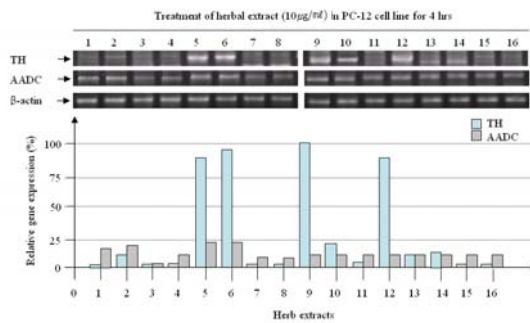
도파민 생합성 효율을 높일 수 있는 허브를 선정하기 위하여 허브추출물을 PC12 cell line에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 2, 4, 8 시간 동안 처리하여 유도발현 되어지는 TH 및 AADC를 분석하였다(Fig. 2). 허브 추출물 처리 후 2 시간에서는 레몬밤에서 가장 높은 TH 유도발현을 나타내었으나, 다른 허브 추출물과 비교하여 거의 비슷한 유도발현을 나타내고 있음을 확인하였다. 허브 추출물 처리 후 4 시간에서는 로즈마리, 레몬밤, 레몬버베나, 마리노 라벤더에서 상대적으로 약 78 ~ 100% 이상의 TH가 유도되어짐을 확인 할 수 있었으며, 또한 TH의 유도발현에 따라 AADC는 로즈마리 및 레몬밤에서 약 25%의 유도발현을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 허브 추출물 처리 후 8 시간에서는 로즈마리 추출물을 처리한 실험구에서 상대적으로 매우 높은 TH 유도발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 BDNF 및 GDNF와 같이 신경의 성장 또는 생존에 필수적인 신경영양인자의 유도발현을 분석하기 위하여 동일한 조건으로 허브 추출물을 처리한 후 유도발현을 mRNA 수준에서 분석하였다 (Fig. 4). 일반적으로 TH의 발현과 더불어 BDNF의 발현이 유도되어짐이 보고되어졌으며, 본 연구에서는 PC12에 허브 추출물을 처리한 결과 처리 2 시간에서는 로즈마리 추출물 및 레몬밤 추출물에서 상대적으로 높은 TH 유도발현이 확인되어졌으며, 특히 로즈마리에서는 GDNF의 유도발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 처리 후 4 시간에서는 로즈마리 추출물, 레몬밤, 마리노 라벤더

에서 약 45% 이상의 높은 BDNF 유도발현을 확인 할 수 있었으며 특히 GDNF는 로즈마리, 레몬밤 추출물에서 대조군에 비하여 30%이상의 유도발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5). 처리 8 시간 후에는 로즈마리 추출물에서 지속적으로 약 30%이상 높은 BDNF 유도발현을 확인 할 수 있었다. 그러나 상대적으로 GDNF는 거의 모든 허브 추출물에 유도발현이 되지 않았다. 따라서 다른 허브 추출물에 비하여 높게 유도발현시키는 로즈마리, 레몬밤, 마리노 라벤더, 레몬버베나에 의하여 유도발현되어지는 TH 및 AADC, 신경영양인자 BDNF 및 GDNF의 유도발현을 시간에 따라 분석한 결과, 로즈마리에서 가장 높은 유도발현을 나타내었으며, 특히 처리 후 2 시간에서는 다른 허브추출물과 다른 허브추출물과 비교하여 비슷한 유도발현을 나타낸 반면 처리 후 4 시간과 8 시간에서 상대적으로 매우 높은 TH 및 AADC를 유도발현시킴을 확인 할 수 있었다. 또한 레몬밤, 마리노 라벤더, 레몬버베나는 처리 후 4 시간에서 대조군과 비교하여 약 90%이상의 높은 유도발현을 나타내고 있음을 확인 할 수 있었다. 뿐만 아니라 로즈마리, 마리노라벤더, 레몬밤 추출물은 신경영양인자인 BDNF 및 GDNF를 대조군에 비하여 약 25%이상 유도발현시키고 있음을 확인하였다. 특히 로즈마리의 경우 2 ~ 8시간까지 25%이상의 유도발현을 시키고 있는 반면, 레몬밤은 처리 2 시간에서만 제한적으로 유도발현시키고 있음을 확인하였다. 단백질 수준에서 이들의 도파민 생합성과 관련되어 있는 TH 및 AADC, 신경영양인자인 BDNF와 GDNF의 단백질 수준에서의 유도발현을 로즈마리, 레몬밤, 마리노라벤더, 레몬버베나를 대상으로 western blotting을 수행하여 분석하였다 (Fig. 6). 로즈마리 추출물을 투여한 실험구에서는 대조구에 비하여 투여 2 시간부터 TH 및 AADC가 유도발현되어짐을 확인 할 수 있었다. 로즈마리 투여구는 2 시간에서는 TH 는 25%이하의 유도발현이 이루어지나 투여 후 4시간 및 8시간에서 대조구에 비하여 50%이상의 지속적으로 높은 유도발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 반면 AADC의 경우 도파민 생합성 경로에서처럼 TH에 의하여 tyrosine이 L-dopa로 변환되어지며, 이후 L-dopa가 AADC에 의하여 도파민으로 전환되어지기 때문에 TH에 비하여 상대적으로 지연되어 발현되는

A.



B.



C.

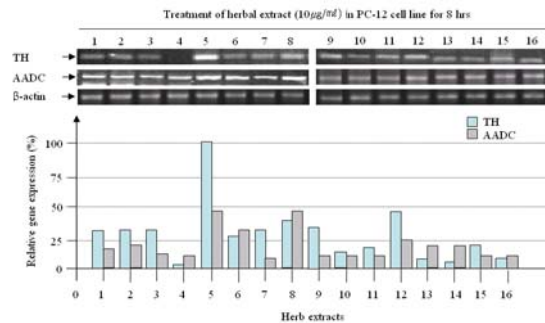


Fig. 2. Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

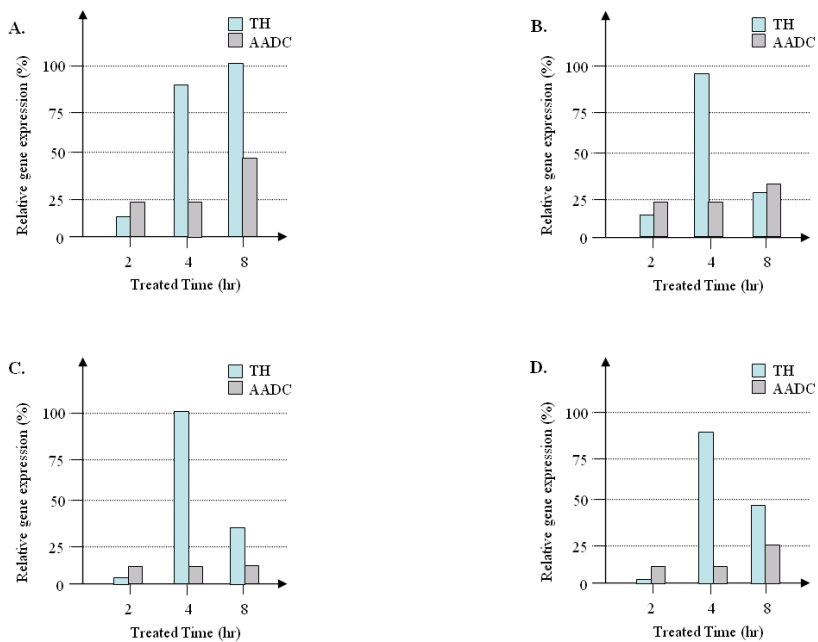


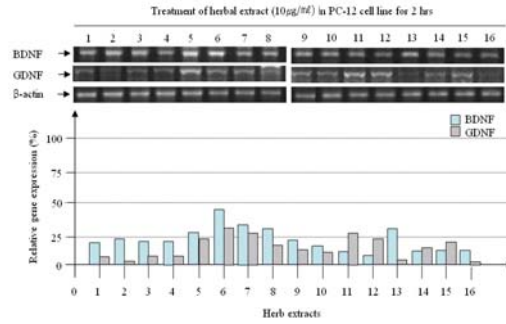
Fig. 3. Compare the Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

양상을 확인 할 수 있었다. AADC의 경우 투여 후 2 시간과 4 시간에서는 크게 유도발현이 이루어지지 않았으나, 투여 후 8 시간에서 약 45%이상의 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다. 또한 레몬밤 및 레몬버베나의 경우 투여 후 2 시간에서는 TH 및 AADC 모두 크게 유도발현이 이루어지지 않았으나, 투여 4 시간 후에는 대조구에 비하여 100%이상 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다. 그러나 로즈마리에 비하여 8 시간에서는 상대적으로 매우 낮은 유도발현이 이루어지고 있었다. 그러나 AADC의 경우 시간에 따라 점진적으로 증가되어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 마리노 라벤더의 경우 TH의 유도발현은 레몬밤의 유도발현과 매우 유사함을 알 수 있는 반면 AADC의 유도발현은 매우 미미함을 확인 할 수 있었다. 한편 신경영양인자의 유도발현은 로즈마리 추출물 처리에 의한 BDNF의 유도발현은 2 ~ 8 시간 까지 지속적으로 대조구에 비하여 약 25%이상의 발현율을 나타내고 있었으며, GDNF는 투여 후 2 시간과 4 시간에서 대조구에 비하여 높게 유도발현되고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7). 레몬밤 추출물은 2 시간과 4 시간에서 상대적으로 로즈마리 추출물에 비하여 높은 BDNF와 GDNF를 유도발현시키고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 마리노 라벤더 및 레몬버베나의 경우 mRNA 수준에서와는 다르게 일반적으로 대조구에 비하여 약간 높은 수준의 BDNF와 GDNF가 유도발현되어짐을 확인 할 수 있었다. 따라서 위의 결과를 종합하여 볼 때 16 종의 허브 추출물을 PC12 cell line에 처리하여 도파민 생합성관련 유전자 유도발현 및 신경영양인자 유도발현에 대하여 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 분석한 결과 신경보호효능을 나타낼 수 있는 후보 허브로써는 로즈마리 및 레몬밤이 우수할 것으로 추정되어진다.

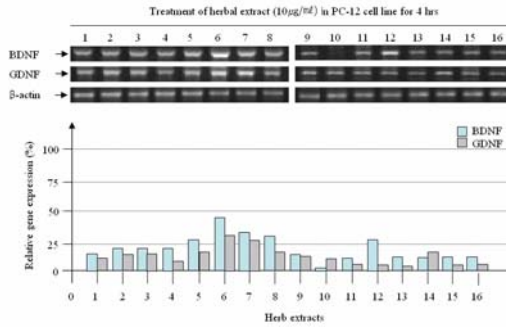
라. 허브 추출물 처리에 의한 TH, AADC, 신경영양인자의 유도발현분석 (*in vivo*)

앞서 PC12 cell line에서의 도파민 생합성과 관련된 유전자 및 단백질의 유도발현 분석과 더불어 신경영양인자의 유도발현을 분석하였으나, 이는 어디까지나 *in vitro*

A.



B.



C.

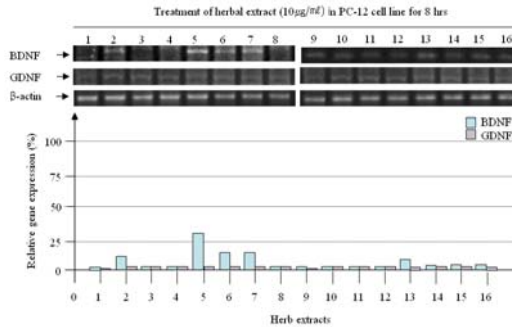


Fig. 4. Gene induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

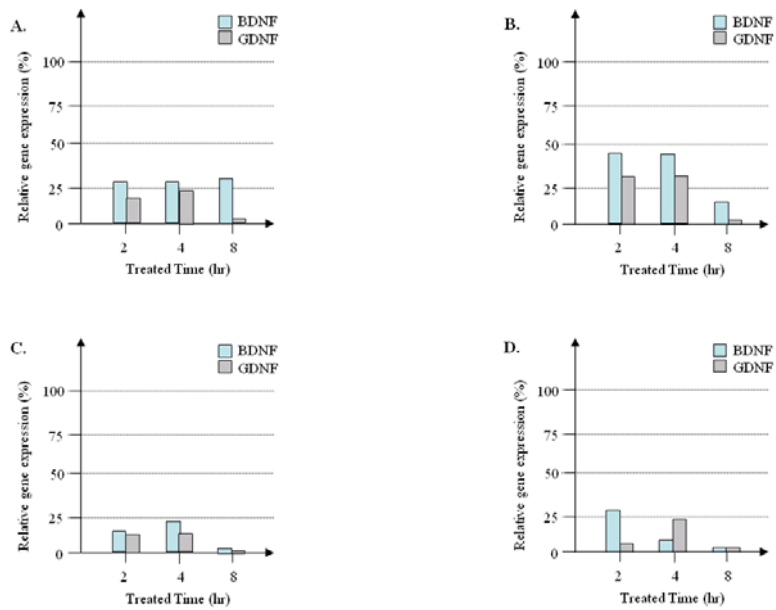


Fig. 5. Compare the Gene induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

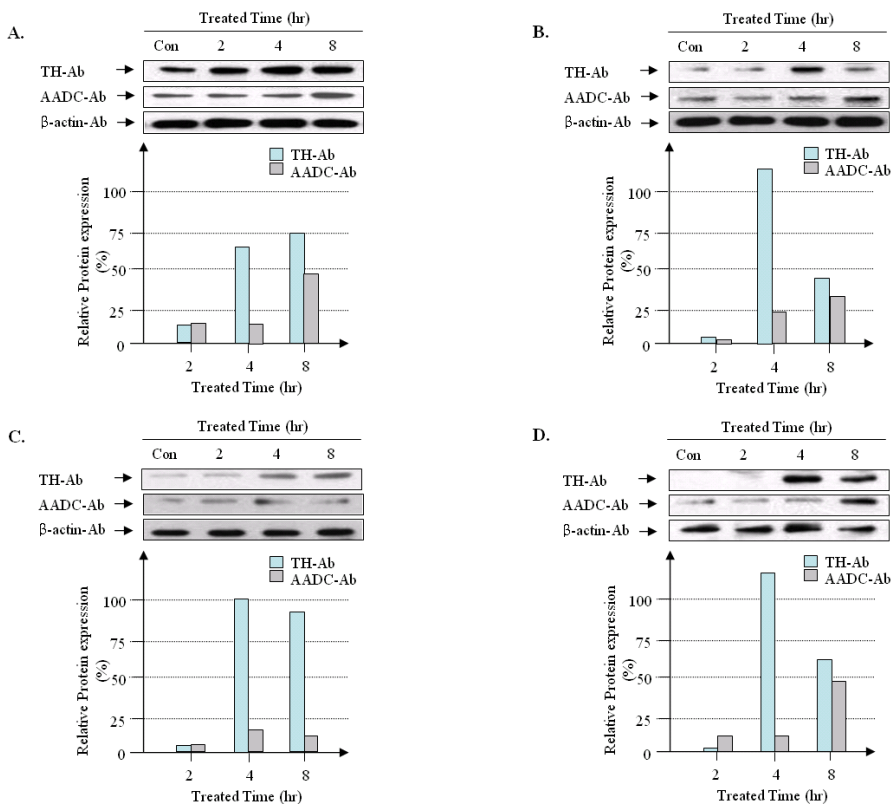


Fig. 6. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

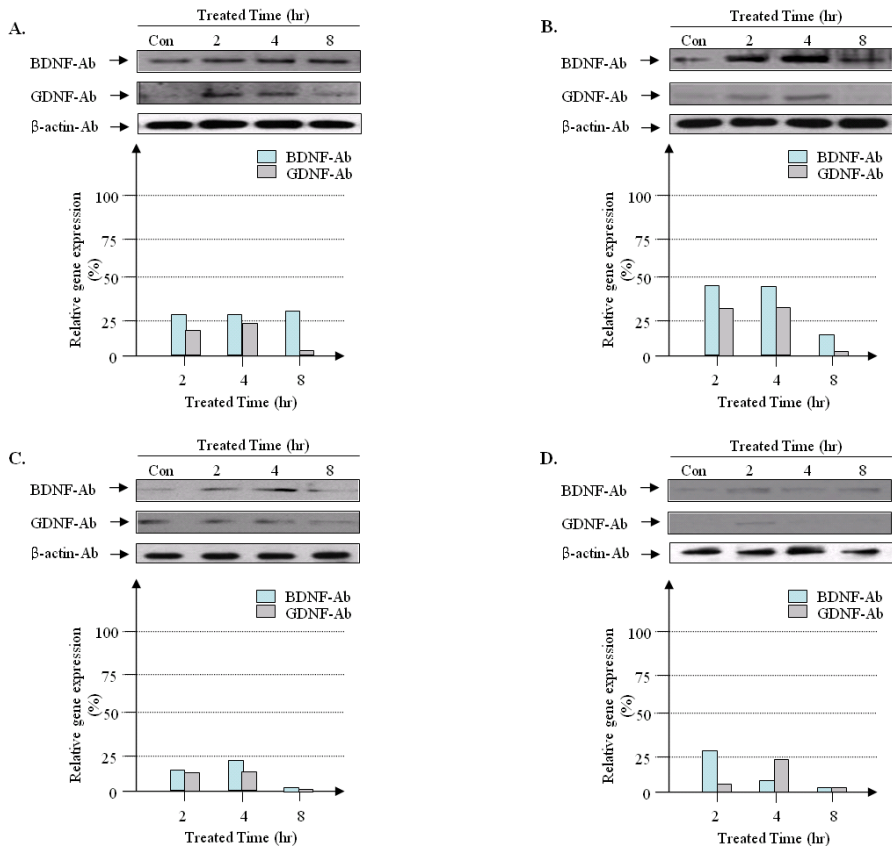
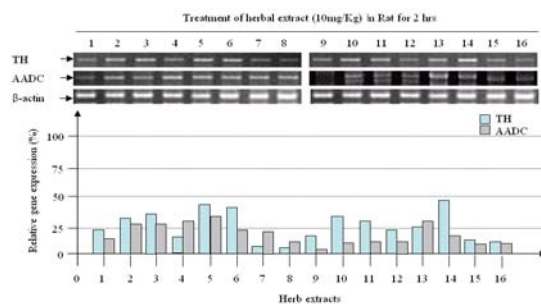


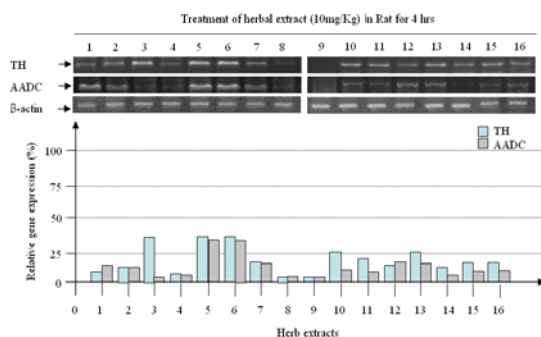
Fig. 7. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

에서의 분석이기 때문에 이에 대한 실험동물 (rat)을 이용하여 rat brain에서의 도파민 생합성 유전자의 유도발현 및 신경영양인자 유도발현을 분석하였다. *in vitro*의 경우는 직접적으로 세포와 허브추출물의 상호작용에 의하여 신경영양인자 및 도파민 생합성관련 유전자의 유도발현이 이루어지지만 *in vivo*의 경우 뇌는 뇌막에 의하여 싸여있기 때문에 허브 추출물과 신경세포사이의 직접적인 상호작용이 이루어지지 않게 된다. 따라서 본 연구에서는 허브 추출물을 rat에 시간에 따라 투여함으로써 이루어지는 유도되어지는 신경영양인자 유도발현 및 도파민 생합성 관련 유전자들의 유도발현을 분석하게 되었다. 실험동물을 12 시간 절식시킨 후 각각 실험동물의 무게를 측정하여 존대를 이용하여 10 mg/kg의 농도로 구강투여하여 2, 4, 및 8 시간 후 실험동물의 뇌를 분리하여 이로부터 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 유도발현을 분석하였다. 투여 후 2 시간에서 PC12 cell에서와 유사하게 특별하게 TH 및 AADC가 유도발현이 이루어지지 않음을 확인 할 수 있었으나, 디지털리스에서 상대적으로 매우 높은 TH가 유도발현되었으며, AADC의 경우는 오레가노 및 디지털리스에서 대조구에 비하여 약간 높은 발현이 유도되어짐을 확인하였다. 그러나 디지털리스의 경우는 강심제로 사용되어지며, 세포독성이 있음에 따라 이는 독성물질 투여에 의한 스트레스에 의하여 유발되어질 것으로 추정되어진다. 투여 후 4 시간에서는 로즈마리, 레몬밤, 체리세이지에서 TH가 유도발현되어짐을 확인하였다. AADC는 로즈마리 및 레몬밤에서 유도발현되어짐을 확인하였다. 투여 후 2 시간에서 강력하게 발현되어졌던 오레가노 및 디지털리스의 경우는 앞서 언급하였듯이 세포독성에 의한 스트레스에 의하여 유발되어졌기 때문에 4 시간에서는 유도발현이 확인되지 않았다. 허브추출물 처리 후 8 시간에서는 PC12 cell에서의 결과에서처럼 동일하게 로즈마리가 지속적으로 TH와 AADC를 유도발현시키고 있음을 확인하였다. 단백질 수준에서 분석하기 위하여 오레가노 및 디지털리스를 제외하고 PC12에서 우수한 활성을 나타낸 허브인 로즈마리, 레몬밤, 마리노라벤더 및 레몬버베나를 투여했던 실험동물의 뇌로부터 단백질을 분리하여 western blotting을 수행하였다. 로즈마리추출물의 경우 투여시간이 증가되어짐에 따라 4 시간과 8 시간에서 약 110

A.



B.



C.

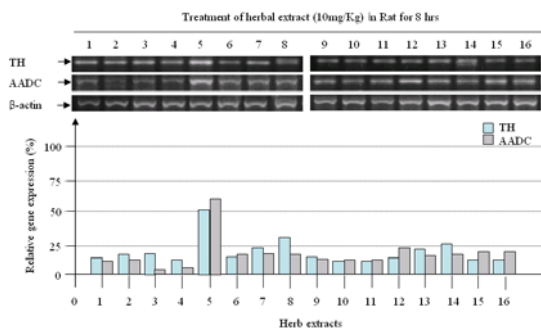


Fig. 8. Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in Rat oral administrated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

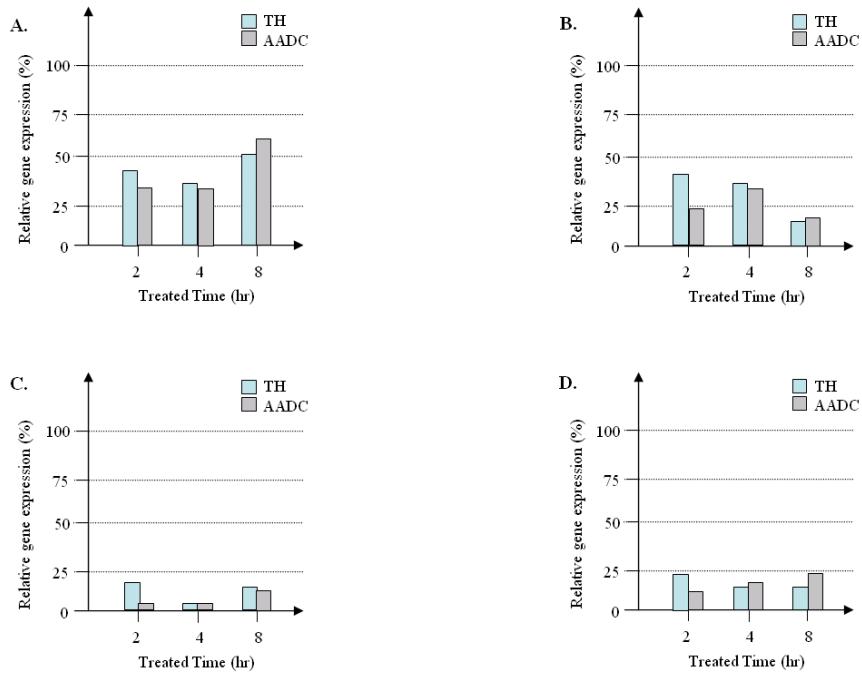
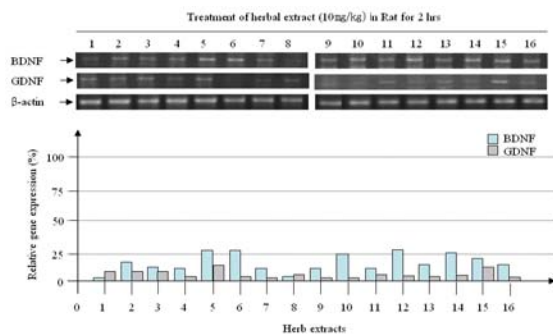
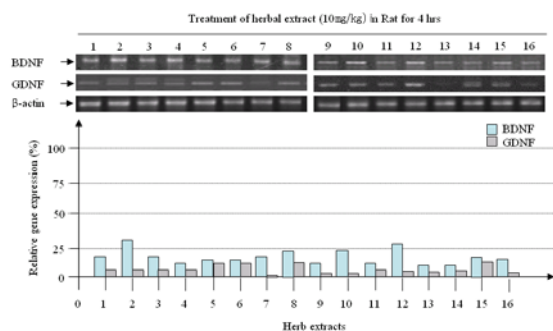


Fig. 9. Compare the Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in Rat treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

A.



B.



C.

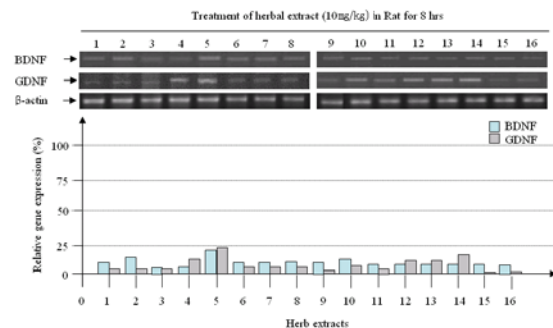


Fig. 10. Gene induction of BDNF and GDNF in rat oral administrated by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

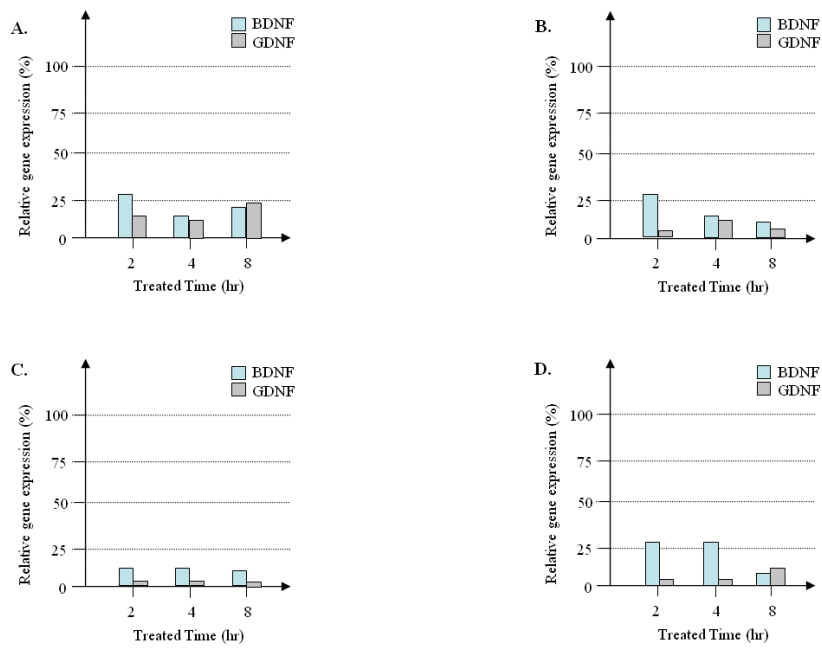


Fig. 11. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in rat oral administrated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

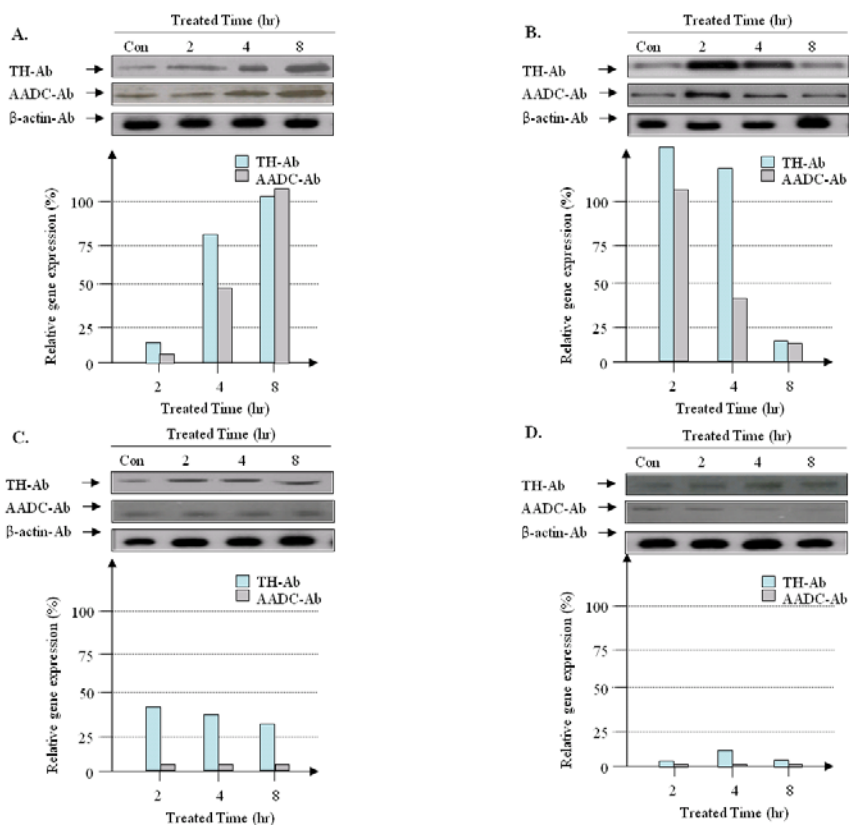


Fig. 12. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in rat oral administrated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

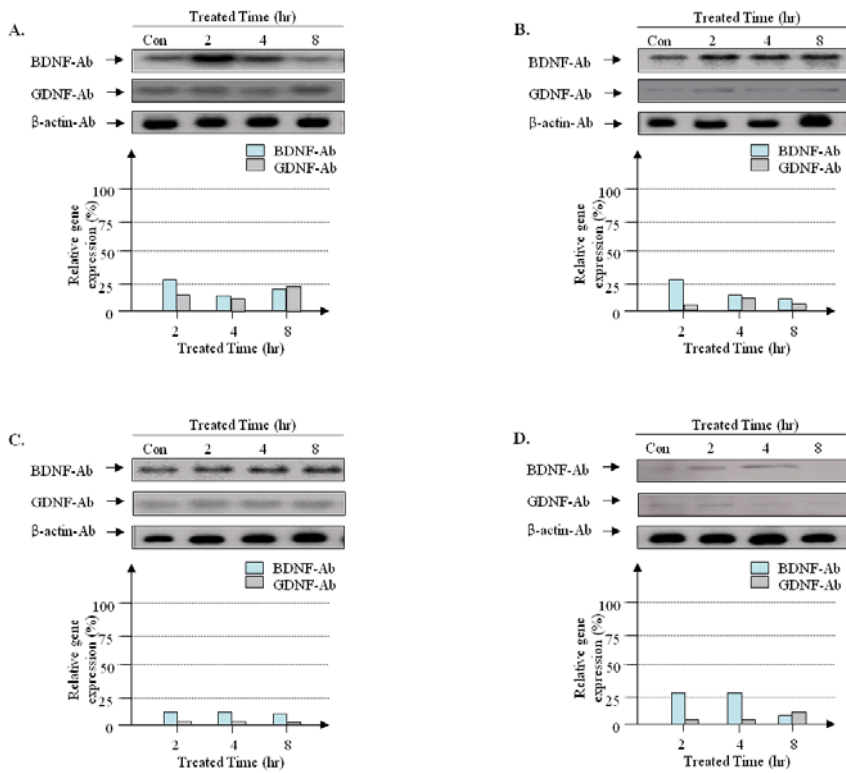


Fig. 13. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in PC12 cell line treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

% 이상의 높은 TH 유도발현이 이루어지고 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 AADC의 경우도 시간에 따라서 매우 높게 증가되어지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 로즈마리 추출물이 rat의 뇌막의 넘어서 신경보호효능 및 도파민 생합성을 유도할 수 있음을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 또한 레몬밤의 경우 로즈마리에 비하여 매우 빠르게 TH 및 AADC를 유도발현시킴을 확인 할 수 있었는데 2 시간에서는 대조구에 비하여 약 110%이상 높은 유도발현이 이루어졌으나, 로즈마리와는 다르게 투여 후 시간에 따라 감소되어지는 것을 확인할 수 있었으며, 8 시간 이후부터는 거의 발현유도가 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다. 마리노 라벤더 및 레몬버베나의 경우는 로즈마리 및 레몬밤에 비하여 상대적으로 매우 미미한 TH 및 AADC 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였으며, 특히 레몬버베나는 PC12 cell 에서의 유도발현과 다르게 다른 허브 추출물과 유사하게 매우 낮거나 또는 거의 유도발현을 하지 않음을 알 수 있었다. 신경영양인자의 유도발현은 상대적으로 TH 및 AADC에 비하여 매우 낮은 수준에서 유도발현이 이루어지고 있으나 로즈마리의 경우 약 20%이상의 유도발현이 2 ~ 8시간동안 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 레몬밤, 마리노 라벤더, 레몬 버베나 등도 대조구와 비교하여 25% 수준에서 유도발현이 이루어지고 있었다.

마. 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 이용한 세포보호효과 분석

조직 내에서 TH 유도발현을 분석하기 위하여 면역조직화학법 (immunohistochemistry) 을 수행하였다. 로즈마리, 레몬밤, 마리노라벤더 및 레몬버베나 추출물을 potassium phosphate buffered saline (pH 7.4)에 현탁시킨 후 0.45 μ m syringe filter 로 여과시킨 후 실험에 앞서 12 시간동안 절식 시킨 실험동물에 각각 10 mg/kg으로 존대를 이용하여 구강투여하여 4 시간 후 케타민을 주사하여 마취시켰다. 마취된 실험동물을 복부 절개시킨 후 saline을 투여하여 혈액을 제거시킨 다음 고정을 위하여 4% paraformaldehyde를 투여 시켰으며, 고정된 뇌조직은 분리하여 post-fixation 을 위하여 다시 4% paraformaldehyde에서 72 시간동안 고정시킨 다음 30%

sucrose 용액에 침지하여 최종적으로 조직을 고정시켰다. 고정된 조직은 cryosection을 사용하여 tissue slice를 만들었으며, TH-antibody, HRP-conjugated 2nd antibody를 이용하여 DAB 및 H₂O₂를 처리시킨 후 발색하여 염색된 세포를 분석하였다. 염색된 조직은 mounting solution을 이용하여 mounting 시킨 후 Nikon TE2000-U 현미경을 이용하여 X40, X100, X200 및 X400로 각각 사진을 촬영하였다. 대조군에 비하여 가장 높게 염색된 실험구는 로즈마리 추출물을 처리한 곳으로 나타났으며, 이외에 레몬밤, 레몬버베나, 마리노라벤더 순으로 확인되어졌다. 위의 실험을 통하여 로즈마리 추출물이 가장 효과적으로 도파민 생합성과 관련된 단백질은 tyrosine hydroxylase를 강하게 유도발현시키고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 14).

바. Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서 허브추출물의 신경보호효능 분석

앞서 시행되어졌던 연구결과들은 모두 실험동물인 rat 또는 rat으로부터 기원된 세포주를 이용하여 분석되어졌던 결과임으로 직접적으로 적용되어질 사람의 결과와의 유의성이 필요로 되어진다. 따라서 이를 검증하기 위하여 인간의 뇌로부터 기원되어진 SH-SY5Y cell line을 이용하여 허브추출물을 처리하여 세포독성, 도파민 생합성관련 유전자 및 단백질의 유도발현과 더불어 신경영양인자 유도발현을 검증할 필요성이 대두되어졌다. 사용되어진 세포주는 정상세포주인 human neuroblastoma cell SH-SY5Y를 이용하여 각각의 농도(1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 시간 (24, 48, 72 hr)에 따른 세포독성 및 세포 생존률을 분석하였다 (Table 12). 저농도 (1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 허브 추출물을 처리한 SH-SY5Y에서는 디지털리스가 약한 세포독성을 나타내고 있음을 확인하였으나 이외의 허브 추출물에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 그러나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 허브 추출물을 처리한 세포에서는 체리세이지, 애플민트, 디지털리스에서 높은 세포독성이 나온 반면, 로즈마리, 레몬버베나, 그린타임, 레몬밤, 슈퍼민트, 로즈제라늄, 마리노 라벤더, 스테비아, 레몬그라스, 파인애플민트, 오레가노 및 페퍼민트에서는 상대적으로 세포독성을 나타내지 않았다.

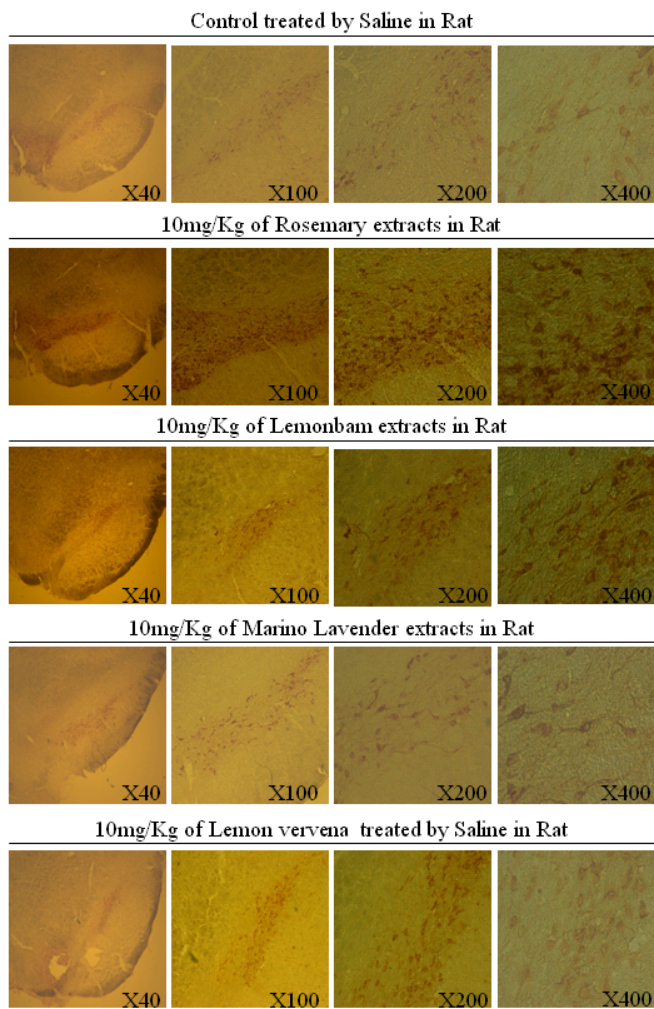


Fig. 14. Immunohistochemical detection of Tyrosine Hydroxylase treated by Herb extracts in substantia nigra of rat brain. Sections were incubated with TH antibodies (1:10000) and visualized by DAB reaction products using the avidin-biotin technique.

그러나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 허브 추출물을 처리한 실험구에서는 마리노라벤더를 제외하고 거의 모든 허브추출물 처리구에서 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 이후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 허브추출물을 처리하고 시간에 따라 24, 48, 72 시간동안 SH-SY5Y에 처리하여 세포독성을 분석하였다 (Table 13). 앞서 수행하였던 농도에 따른 연구결과와 동일하게 디지털리스를 제외하고 모든 허브 추출물에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 이후 허브추출물을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 하여 SH-SY5Y cell line에 2, 4, 8 시간 동안 처리하여 유도발현되어지는 TH 및 AADC를 분석하였다 (Fig. 15). 처리 후 2 시간에서는 로즈마리, 마리노 라벤더에서 대조구에 비하여 각각 47% 및 25%의 TH를 유도발현시키고 있음을 확인하였으나, AADC는 모든 허브 처리구에서 유도발현이 이루어지지 않았다 (Fig. 16). 처리 후 4 시간에서는 레몬그라스 및 로즈마리 추출물을 처리한 실험구에서 약 50% 정도의 TH를 유도발현시키고 있었으며, 이외에 마리노 라벤더, 오레가노 및 로즈제라늄에서 약 15 ~ 20% 내외에서 유도발현되어지고 있었다. 뿐만 아니라 AADC의 경우 레몬그라스 및 로즈마리 추출물을 처리한 실험구에서 대조구에 비하여 약 25% 전후로 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다. 처리 후 8 시간에서는 로즈마리 추출물 처리구 및 마리노 라벤더, 파인애플 민트에서 매우 낮은 농도의 TH가 유도발현되어지고 있었으며, AADC는 로즈마리 추출물 처리구를 제외하고는 모든 허브 추출물 처리구에서 대조구와 비교하여 유의성 내에서 발현이 이루어지지 않고 있었다. 앞선 연구에서 선택되어졌던 로즈마리, 레몬밤, 마리노라벤더, 레몬버베나 추출물을 처리한 실험구에서는 시간에 따라 비교 분석한 결과 로즈마리 처리구에서 2, 4 시간에서 높은 TH 유도발현을 나타내었으며, AADC는 처리 후 4 시간과 8 시간에서 대조구와 비교하여 약 25% 내외에서 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다. 마리노라벤더 역시 2, 4, 및 8 시간 처리 후 TH는 약 20 ~ 25%이내에서 유도발현되어지고 있었으나, AADC는 거의 유도발현이 이루어지지 않음을 확인하였다. 레몬밤 및 레몬버베나의 경우 매우 PC12 cell에서와 다르게 매우 약하게 유도발현이 이루어지고 있었다.

한편 신경영양인자 유도발현을 분석한 결과 처리 후 2 시간에서는 로즈마리, 레몬

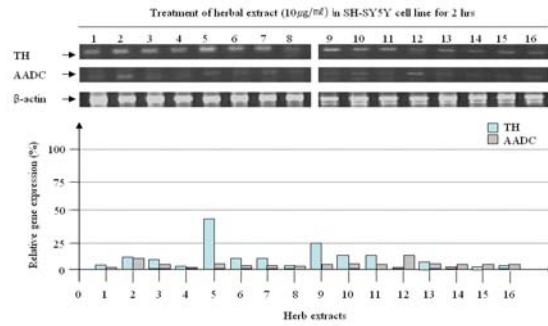
Table 7. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against SH-SY5Y cells according to the concentration in 72 hr.

Extracts	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	1	10	50	100
	Cytotoxicity (%)			
로즈마리	5.2±3.1	16.7±2.8	41.5±3.1	65.1±2.2
레몬버베나	6.1±3.2	22.5±3.6	55.1±3.3	67.6±3.6
그린타임	5.1±3.7	17.8±3.1	39.3±2.7	55.4±3.5
체리세이지	8.1±4.1	27.7±4.7	58.1±3.4	67.1±4.3
허니썬클	4.8±3.1	28.1±3.7	49.9±4.8	68.2±3.3
애플민트	7.7±3.7	18.5±3.8	65.4±4.1	71.4±3.8
레몬밤	4.7±1.5	14.3±3.5	39.8±2.1	49.4±3.3
슈퍼민트	6.1±2.4	21.6±3.6	37.3±4.7	59.4±3.9
디지탈리스	11.5±5.1	48.1±4.7	73.1±4.9	92.1±7.1
로즈제라늄	4.4±2.1	19.4±3.0	47.2±3.1	55.7±2.5
마리노라벤더	3.7±2.9	15.5±4.7	42.1±4.1	49.6±4.9
스테비아	8.8±4.3	20.9±4.3	45.1±3.9	68.7±3.6
레몬그라스	6.8±2.9	26.6±3.1	46.8±4.7	53.9±5.1
파인애플민트	7.0±3.7	18.8±3.5	41.4±3.5	50.9±2.2
오레가노	5.8±4.6	24.8±4.6	35.7±4.6	51.7±4.5
페퍼민트	8.2±3.7	15.4±3.4	40.7±3.5	54.4±3.7

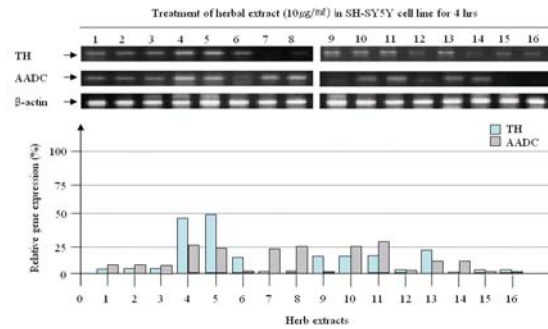
Table 8. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from herbs against SH-SY5Y cells according to the culture time in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract treated.

Extracts	Treated time (hr)		
	24	48	72
	Cytotoxicity (%)		
로즈마리	2.1±1.1	19.7±4.3	18.3±3.3
레몬버베나	3.7±4.3	18.8±3.2	21.7±2.8
그린타임	6.1±3.1	11.9±2.7	19.1±4.1
체리세이지	4.2±2.5	19.4±3.1	26.3±3.1
허니씨클	5.8±2.2	17.7±4.6	30.3±2.8
애플민트	8.1±3.7	16.1±2.1	20.5±4.8
레몬밤	4.7±3.4	13.6±2.9	17.3±2.5
슈퍼민트	3.1±2.6	15.5±3.6	23.9±2.6
디지털리스	11.1±3.9	21.1±4.1	51.8±3.5
로즈제라늄	6.7±3.2	16.1±2.3	21.1±4.2
마리노 라벤더	5.2±2.7	10.3±2.9	18.7±3.1
스테비아	6.9±3.7	14.3±2.6	22.2±2.6
레몬그라스	7.7±4.1	19.8±4.2	25.4±2.1
파인 애플민트	6.5±4.2	13.4±2.6	19.5±3.5
오레가노	4.4±2.1	17.7±3.2	27.1±2.9
페파민트	7.3±2.9	12.6±4.7	18.5±2.4

A.



B.



C.

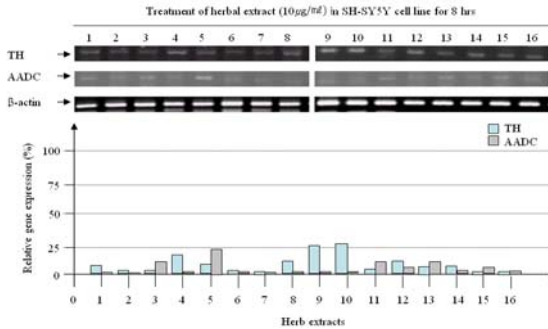


Fig. 15. Gene induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

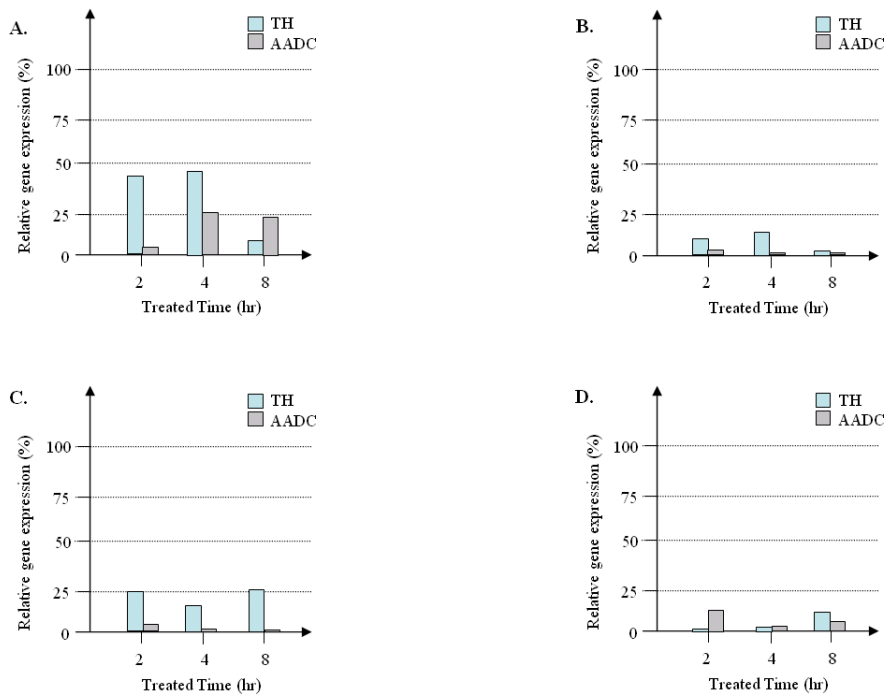
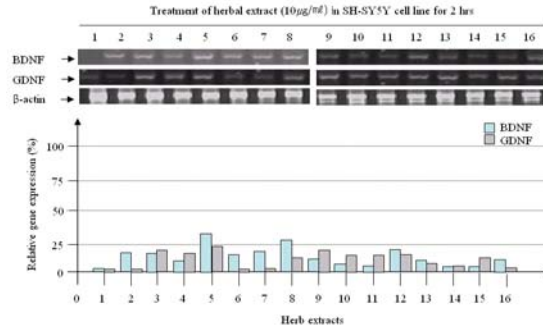
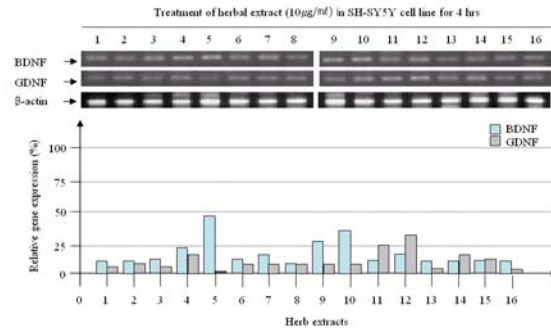


Fig. 16. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

A.



B.



C.

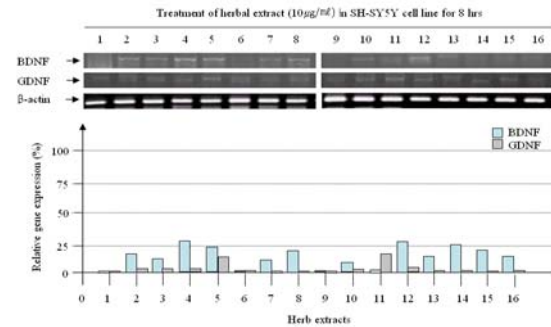


Fig. 17. Gene induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by various herbs extracts regard as after 2 hr (A), after 4 hr, and after 8 hr (C). Lane 1, Super mint; Lane 2, Green time; Lane 3, Apple mint; Lane 4, Lemon glass; Lane 5, Rosemary; Lane 6, Lemon balm; Lane 7, Digitalis; Lane 8, Stevia; Lane 9, Marino Lavender; Lane 10, Pineapple mint; Lane 11, Oregano; Lane 12, Lemon verbena; Lane 13, Rose geranium; Lane 14, Pepper mint; Lane 15, Cherry sage; Lane 16, Honey Suckle

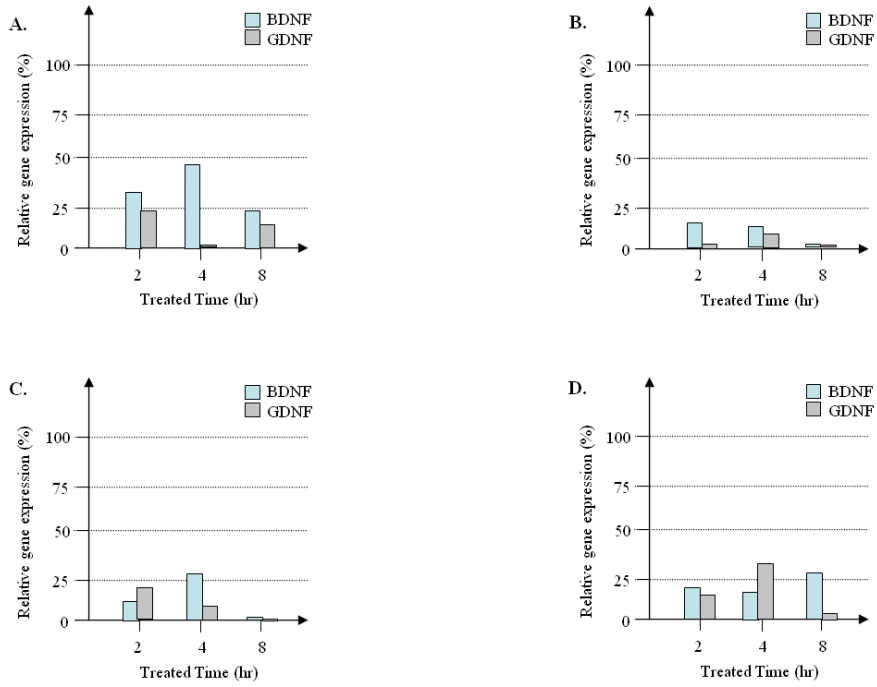


Fig. 18. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

밤 에서 유도발현이 이루어지고 있었으며, GDNF의 경우 대조구와 비교하여 특별히 유도발현이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 17). 처리 후 4 시간에서도 역시 로즈마리 추출물 처리구가 대조구에 비하여 약 48% 정도의 높은 유도발현을 이루고 있었으며, 마리노라벤더 및 파인애플 민트에서 약한 유도발현이 이루어지고 있었다 (Fig. 18). GDNF의 경우 처리 후 2 시간과 비교하여 특별히 유도발현이 이루어지지 않음을 확인하였다. 그러나 처리 후 8 시간에서는 BDNF 및 GDNF 모두 크게 유도발현이 이루어지지 않았다. 따라서 Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에 허브 추출물 처리 시 mRNA 수준에서는 로즈마리 추출물이 신경보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이에 대하여 단백질 수준에서의 TH, AADC, BDNF 및 GDNF의 유도발현을 분석하기 위하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 로즈마리, 레몬밤, 마리노라벤더 및 레몬버베나 추출물을 SH-SY5Y cell line에 투여하고 2, 4, 및 8 시간 후에 trypsinization 후 세포를 회수하였다. 회수된 세포로부터 TriZol reagent를 사용하여 제공회사의 매뉴얼에 따라 단백질을 분리하여 western blotting을 수행하였다. 로즈마리 추출물을 투여한 실험구에서는 TH가 2 시간부터 발현되어 4 시간에 대조구에 비하여 약 90%의 발현율을 나타내었으며, AADC의 경우도 4 시간과 8 시간에 유도발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 19). 뿐만 아니라 BDNF는 TH의 유도발현과 유사하게 처리 후 2 시간부터 유도발현되어 4 시간에서 대조구에 비하여 약 75%의 유도발현을 확인할 수 있었으며, 상대적으로 GDNF는 BDNF에 비하여 유도발현율이 낮았다 (Fig. 20). 레몬밤을 처리한 실험구에서는 투여 후 4 시간에서 대조구의 약 2 배인 100%의 유도발현을 확인하였으며, AADC는 TH에 비하여 상대적으로 매우 낮은 유도발현을 나타내었다. 그러나 신경영양인자인 BDNF와 GDNF는 대조구에 비하여 낮거나 또는 basal level에서의 유도발현을 확인하였다. 마리노라벤더의 경우는 투여 후 2 시간에서 100%이상의 높은 유도발현이 검증되었으나 AADC는 레몬밤과 유사하게 유도발현이 매우 낮음을 확인하였으며, 신경영양인자인 BDNF는 4 시간에서 유도발현이 대조구에 비하여 약 105%정도의 유도발현을 확인하였다. GDNF는 투여후 2 시간에서 약 60%의 유도발현을 나타내었다. 레몬버베나는 투여

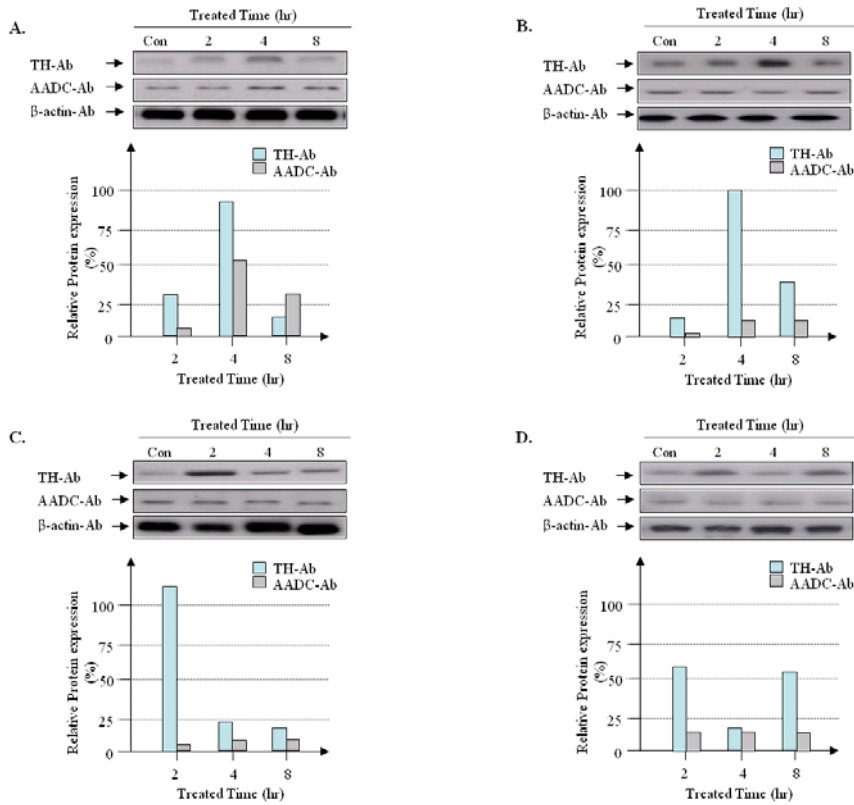


Fig. 19. Compare the Protein induction of TH and AADC related dopamine biosynthesis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

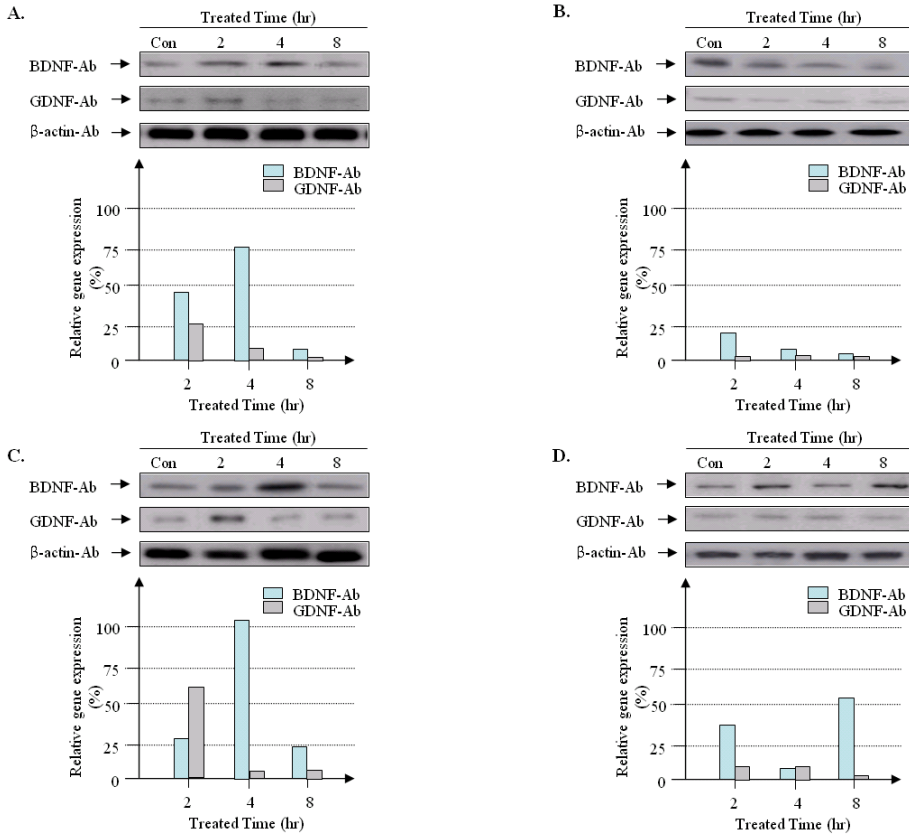


Fig. 20. Compare the protein induction of BDNF and GDNF in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated by Rosemary (A), Lemon Balm (B), Marino Lavender (C), and Lemon verbena regard as the treated time.

후 2 시간과 8 시간에서 유도발현이 약 50%이상 나타남을 확인하였으나, 매우 불규칙적인 유도발현이 나타남을 확인하였고, AADC는 레몬밤, 마리노라벤더의 경우와 같이 거의 유도발현이 이루어지지 않았다. BDNF 또한 TH와 유사하게 불규칙적으로 2 시간과 8 시간에서 유도발현이 나타남을 확인하였으며, GDNF는 매우 낮은 유도발현 또는 기저발현이 일어났음을 확인하였다. 따라서 본 단백질 수준에서 SH-SY5Y cell line에 각 허브를 투여한 결과 우수한 신경보호효과 및 도파민 생합성 관련 단백질을 유도하는 허브로는 로즈마리가 최적임을 확인 할 수 있었다.

4. 결론

본 연구과제를 수행하기 위하여 상수허브랜드로부터 로즈마리, 레몬버베나, 그린타임, 체리세이지, 허니씨클, 애플민트, 레몬밤, 슈퍼민트, 디지털리스, 로즈제라늄, 마리노라벤더, 스테비아, 레몬그라스, 파인애플민트, 오레가노 및 페퍼민트 총 16종의 허브를 수집하여 이들에 대한 항산화, human transformed primary embryonal kidney cell 293 세포, PC12 및 human neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서 농도 및 시간에 따른 세포독성, 도파민 생합성과 관련된 tyrosine hydroxylase (TH) 및 aromatic amino-acid decarboxylase (AADC), 신경영양인자인 brain derived neurotrophic factor (BDNF) 및 gliac1 cell line derived neurotrophic factor (GDNF)의 유도발현을 mRNA 수준 및 protein 수준에서의 유도발현을 분석한 결과 로즈마리 추출물이 신경보호효과 및 신경퇴행성에 있어서 가장 적합할 것으로 사료되어진다.

제 2절 산화적 스트레스에 대한 허브 추출물의 신경세포 보호효과 분석

1. 연구배경

신경퇴행성질병은 substantia nigra (SN) pars compacta에 분포되어져있는 dopaminergic (DAergic) neurone들의 선택적인 상실에 의해 유발되어지는 신경퇴행성 질병 중의 하나이다. 이러한 신경퇴행성에 대한 원인으로는 산화적 스트레스 (oxidative stress), 세포사멸 (apoptosis), 미토콘드리아 기능이상 (mitochondria dysfunction), 그리고 단백질의 응집현상 (aggregation) 또는 잘못된 접힘구조 (misfolding) 등이 세포 사멸 기작에 포함되어져 있을 것으로 추정된다 (Moore et al., 2005). 그러나 왜 DAergic neurone들에서만 제한적으로 퇴행성이 일어나는가에 대해서는 아직도 명확하게 밝혀지지 않았지만 Dopamine, tyrosine hydroxylase (TH), minoamine oxidasem, iron, neuromelanin 등이 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추정하고 있다 (Obata 2002; He et al., 2003; Hirsch et al., 1988). 한편 tetrahydrobiopterin (BH4)는 뇌 신경세포들 중에서도 특히 nigral DAergic cell을 포함하여 monoaminergic neuron에서의 도파민 생합성에 시 Tyrosine hydroxylase를 합성하는데 중요한 인자로 알려져 있다 (kaufmsn, 1993). DAergic cell에서 BH4의 생산은 *in vitro*에서는 Ca^{2+} 에 의하여 유발되어지며 (Hwang et al., 1999), *in vivo*에서는 stress에 의하여 유발되어지는 것으로 보고되어져 있다 (Kim et al., 2000). 합성되어진 BH4는 nitric oxide synthase의 중요한 인자로 작용하게 될 뿐만 아니라 (Kwon et al., 2000), 이러한 BH4는 substatia nigra 에 높은 밀도로 존재하는 macrophage-like immune cell인 microglia를 활성화시키게 된다 (Kim et al., 2000). BH4는 이들 세포로부터 빠르게 방출되어지게 됨에 따라 nigral DAergic neuron은 다른 뇌부위에 비하여 높은 농도의 BH4에 노출되어지게 된다. 이러한 BH4는 Dopamine 합성과 관련된 세포주인 CATH.a, SK-N-BE(2)C 및 PC12 (Choi et al,

2000; Anastasiadis et al., 2001)에서 세포독성을 나타내었으며, Kim et al., 2003, Choi et al., 2003, Kim et al., 2004 등은 BH4를 실험동물에 처리한 결과 유사한 세포독성을 나타냄을 보고하였다. 또한 BH4 도파민에서 도파민 quinone으로의 자연적인 산화작용을 촉진하는 superoxide와 hydrogen peroxide를 빠르게 생산하기 위하여 자연산화가 일어나게 된다 (Kirsch et al., 2004). Dopamine quinone은 quinone oritein을 합성함으로써 세포독성의 원인으로 작용하게 될뿐만 아니라, DArgic cell에서 quinone protein의 축적을 초래하게 된다. 축적된 quinone protein은 산화적 스트레스의 원인으로 작용하게 됨으로써 DArgic neruon에 치명적인 산화적 스트레스를 유발시킴으로써 신경퇴행을 유도하게 된다. 따라서 이러한 산화적 스트레스를 억제시키는 작용은 신경세포의 퇴행을 억제시키는데 있어서 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료되어진다. 따라서 본 연구에서는 수집된 허브에 대한 문헌적 연구조사, 정상세포주인 Human transformed primary embryonal kideny cell line 293, Rat Pheochromocytoma cell line (PC12)에서의 항산화효능 분석과 세포독성을 분석하고, dopamine biosynthesis에 관련되어있는 tyrosine hydroxylase (TH) 및 aromatic amino-acid decarboxylase (AADC)의 유도발현, 신경보호효과분석을 위하여 Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Grial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)의 유도발현을 mRNA level 및 protein level에서 분석함으로써 본 연구에 적합한 허브를 선정하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. Herb methanol extraction

허브 잎을 씻어 물기를 건조 시킨 후 잘게 파쇄하여 각 허브 10 g을 70% methanol 100 ml에 침지하여 72 시간동안 실온에서 방치한 후 상등액을 취하여 7겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 evaporation하여 농축시킨 후 동결건조하게 된다.

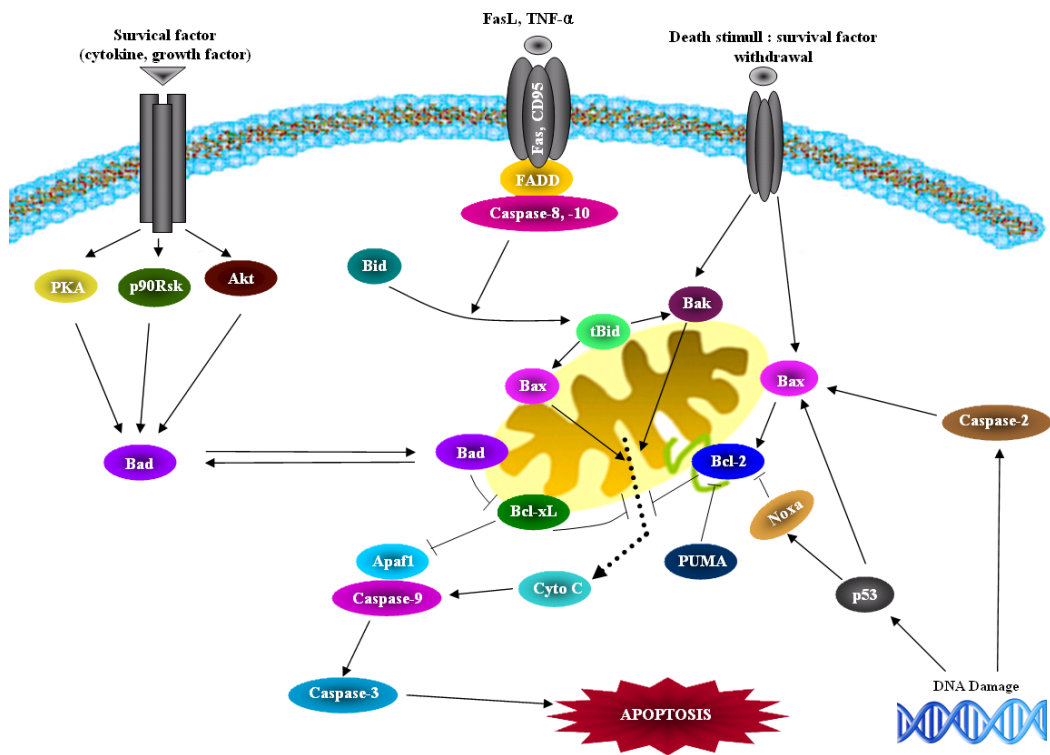


Fig. 21. Apoptosis pathway of oxidative stress-induced in cells.

나. 동물세포배양

Human transformed primary embryonal kidney cell line 293 및 Rat Pheochromocytoma cell line (PC12)은 Korean cell line bank (KCLB)로부터 분양받아 RPMI1640 medium내에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin이 첨가되어져 있는 배지를 사용하여 배양하였다. 37°C, 습도 95%, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 72 시간을 주기로 배지를 교체하였다. 또한 세포밀도가 80%에 이르렀을 때 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 또한 Human neuroblastoma cell line은 ATCC (American type culture collection)으로부터 분양받아 DMEM/F12 배양배지에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin이 첨가되어져 있는 배지를 사용하여 배양하였다. 293 및 PC12 세포와 동일한 조건으로 배양하였다.

다. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석

SH-SY5Y를 이용하여 산화적 스트레스에 의하여 유도되어지는 세포독성 검사를 수행하였다. 세포독성을 분석하기 위하여 PBS에 5 mg/ml 농도로 녹인 MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 용액 20 μ l 씩 첨가하고 다시 4 시간 동안 37°C에서 배양한 후 각 well 당 DMSO 100 μ l를 처리하여 형성된 crystal formazan을 녹여낸다. 이후 흡광도를 microplate reader (ELISA reader, molecular device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하게 된다. 또한 생존율을 측정하기 위하여 24 well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 세포를 평량시킨 후 trypan blue exclusion 법에 의해 착색 비착색 세포수를 혈구 계산기로 세어 생존율을 계산 한다. 생존율은 전체 세포수에 대한 trypan blue 착색 세포수를 백분율로 환산하여 계산되어진다.

라. SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 산화적 스트레스에 의하여 유도되어지는 Apoptosis

로부터 보호효과 분석

1) SH-SY5Y cell line에 허브 추출물 투여 방법

로즈마리 추출물을 10% FBS가 첨가되어있는 DMEM/F12 배지에 50 mg/ml 로 조제하여 0.2 μ m filter로 여과하여 사용하였다. SH-SY5Y cell line은 2×10^7 cell/T-75 culture vessel로 seeding하여 48 시간 후 세포밀도가 70%에 도달하였을 때 100 μ g/ml의 농도로 처리한 후 4 시간 후에 cell scrapper를 이용하여 세포를 회수하였다.

2) Ripa buffer를 이용한 단백질 분리

허브추출물 처리된 SH-SY5Y cell line을 Ripa buffer를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Pierce co.의 BCA 단백질 정량 키트를 구입하여 제조회사의 설명서에 따라 수행하였으며, bovine serum albumin을 이용한 표준곡선에 따라 1.0 μ g/ μ l로 정량하여 9% SDS-PAGE로 단백질 정량 후 coomassie Brilliant blue R-250으로 염색하여 정량됨을 확인하였다.

마. Western blotting

단백질 수준에서의 도파민 생합성관련 단백질 및 신경영양인자의 유도발현을 분석하기 위하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 수행하여 각각의 항체를 이용하여 단백질의 유도발현을 정량화 하였다.

1) 단백질 분리 및 정량

분리된 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce co., USA)를 이용하여 정량하게 되며, 정량은 제조회사의 매뉴얼에 의하여 정량하였다. 또한 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumin)을 이용하여 단백질 표준곡선을 작성하여 이를 기초로 하여 이용하여 단백질을 정량화하였다. 정량된 단백질은 SDS-PAGE를 수행한 후 coomassie staining을 통하여 정량된 결과를 분석하였다.

2) SDS-PAGE

분리된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 정량화된 단백질을 분석할 뿐만 아니라 western blotting을 수행하기 위하여 수행하게 된다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5x SDS Sample Buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 10 분간 중탕한 후 Protein marker(Cambrex Co.)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue(CBB) R 250으로 염색하고 Destaining buffer로 탈색시킴으로써 단백질 정량화를 확인하게 된다.

3) western blotting

전기영동된 SDS-PAGE를 PVDF membran으로 transfer 하기 위하여 다음과 같은 방법에 의하여 실행하였다. 전기영동후 단백질을 100 V에서 90 분간 PVDF membrane에 transfer하였다. Skim milk를 농도가 5%가 되도록 TBS-T용액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 녹여 blocking solution을 제조하여 membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려 놓고 흔들여 주었다. 한시간 후 TBS-T 용액으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000 비율로 TBS-T 용액에 희석한 6X His-tag antibody로 4°C에서 12 시간 처리 후 동일한 방법으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBS-T 용액에 희석한 alkaline phosphatase conjugated antibody (secondary antibody)로 실온에서 2 시간 처리하였으며, 사용되어진 항체는 Table 2에 명시하였다. 이후 발현된 결과는 image master program을 이용하여 결과를 분석하였다.

3. 결과

가. 세포독성분석 (MTT assay)

이를 검증하기 위한 첫 단계로 세포내에서 산화적 스트레스를 일으키는 과산화수소에 의한 SH-SY5Y cell 의 세포독성효과를 분석하였다. SH-SY5Y cell 10% FBS가 포함되어있는 DMEM/F12 배지로 배양한 후 1×10^4 cell/well로 96 well plate에 seeding한 후 24 시간 동안 5% CO₂ incubator에 배양하고 1 μ M/well, 10 μ M/well, 50 μ M/well, 100 μ M/well, 150 μ M/well, 300 μ M/well로 24 시간 동안 처리한 후에 MTT를 통하여 세포독성효과를 분석하였다. 그리고 과산화수소와 로즈마리를 동시에 처리하여 이에 대한 세포독성효과를 분석하였다.

SH-SY5Y cell line에 대한 과산화수소의 세포독성효과를 분석한 결과 과산화수소의 농도가 증가할수록 세포의 생존율은 점점 감소하였으며 300 μ M에서 급격하게 감소하였다 (Fig. 22). 과산화수소와 로즈마리 추출물을 동시에 처리하여 세포독성을 측정한 결과 과산화수소만 처리했던 것과 비교하여 로즈마리를 동시에 처리 하였을 때 세포의 생존율이 증가한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 23).

나. 산화적 스트레스에 대한 로즈마리 추출물의 신경보호효과 분석 (BDNF 및 GDNF 유도발현)

로즈마리 추출물을 처리한 하고 4 시간 후 SH-SY5Y cell line 에서의 brain derived neurotrophic factor와 glial cell derived neurotrophic factor의 유도발현을 분석하였다. 과산화수소만 처리하였을 때 비해 로즈마리와 동시에 같이 처리했을 때 BDNF 및 GDNF가 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 24). 두 신경영양인자인 BDNF와 GDNF의 증가는 과산화수소에 대한 로즈마리의 억제효과가 있음을 의미하며 이는 유도발현된 신경영양인자에 의하여 뇌신경세포의 생존 및 성장에 영향을 미칠 것으로 사료되어진다.

다. 산화적 스트레스에 대한 로즈마리 추출물의 신경보호효과 분석 (tyrosine hydroxylase 및 AADC 유도발현)

로즈마리 추출물을 처리 하고 4 시간 후 SH-SY5Y cell line에서 dopamine 생합성에 관련된 유전자의 유도발현을 분석하였다. BDNF 및 GDNF와 마찬가지로 TH와

AADC 역시 과산화수소만 처리하였을 때 보다 로즈마리와 동시에 같이 처리했을 때 발현량이 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 25).

라. 산화적 스트레스에 의해 발생한 세포사멸에 대한 로즈마리 추출물의 억제 효과

로즈마리 추출물과 과산화수소를 처리하고 4 시간 후 SH-SY5Y cell line 에서의 세포사멸(Apoptosis)과 관련된 유전자의 발현을 분석하였다. 과산화수소와 로즈마리 추출물을 같이 처리한 결과를 보면 과산화수소만 처리한 것에 비해 apoptosis를 유발하는 유전자(Bak, Bax, caspase-9 등)들의 발현은 감소하였지만 억제시키는 유전자 (Bcl-2)의 발현은 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 26). 과산화수소등에 의한 산화적 스트레스를 지속적으로 받게 되면 미토콘드리아내의 DNA의 변화가 일어나며 apoptosis 발생에 관여하는 유전자들의 발현을 유도한다. 발현된 유전자들은 apoptosis 억제에 관여하는 유전자들의 활성을 억제시키며 apoptosis를 일으킨다. 과산화수소와 로즈마리 추출물을 동시에 처리하였을 때 apoptosis 유발 유전자 발현은 감소하고 apoptosis를 억제하는 유전자의 발현의 증가는 로즈마리 추출물이 가지는 항산화능력에 의해 과산화수소의 작용이 억제되었을 것으로 생각되어진다.

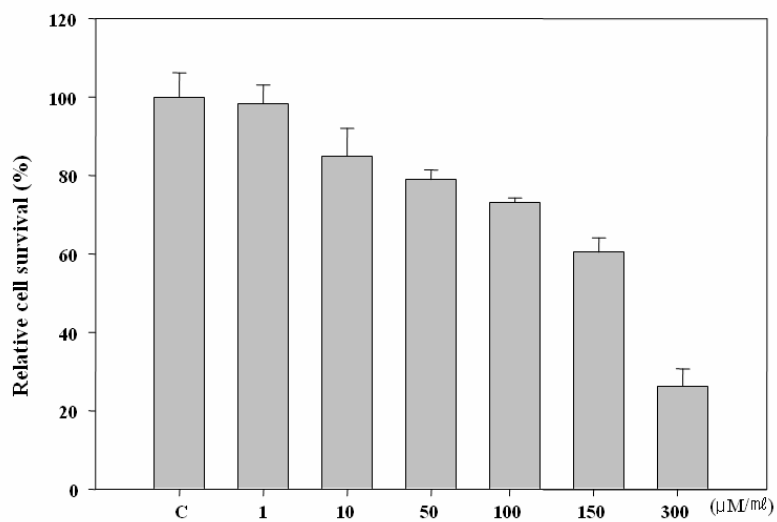


Fig 22. Cell cytotoxicity of Hydrogen Peroxidase (H₂O₂) in SH-SY5Y

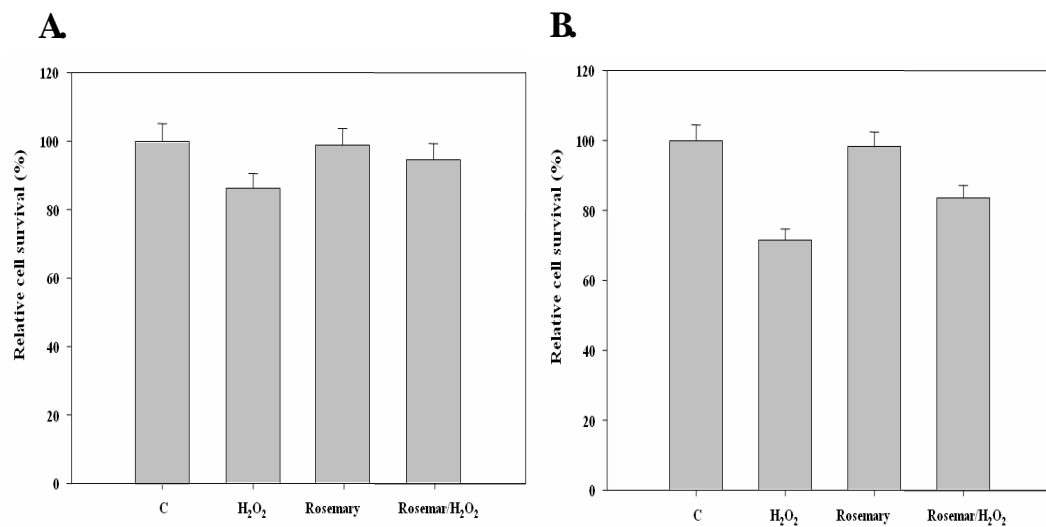


Fig 23. Cell cytotoxicity of co-treated Hydrogen Peroxidase (H₂O₂) with Rosemary in SH-SY5Y. (A: 8hr, B: 12hr)

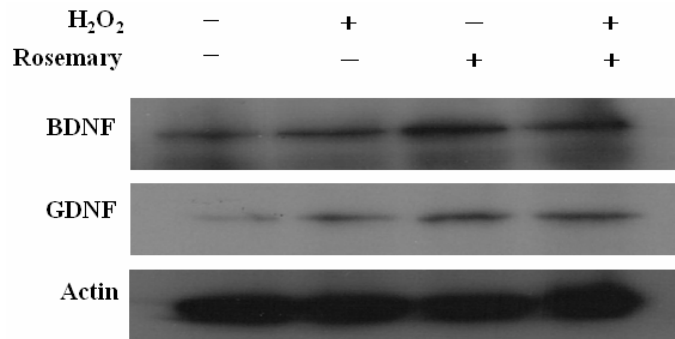


Fig 24. western blot assay of gene expression of BDNF and GDNF of co-treated Hydrogen Peroxidase (H₂O₂) with Rosemary in SH-SY5Y.

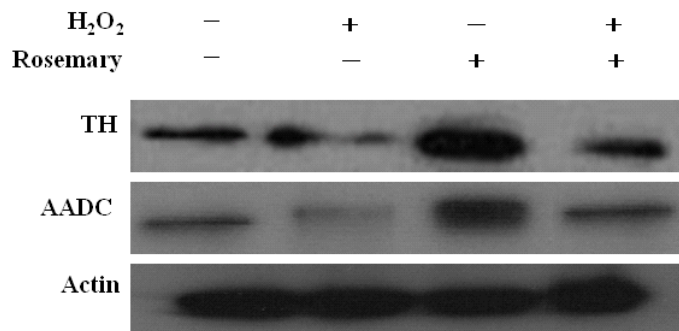


Fig 25. Western blot assay of gene expression of BDNF and GDNF by co-treated Hydrogen Peroxidase (H₂O₂) with Rosemary in SH-SY5Y.

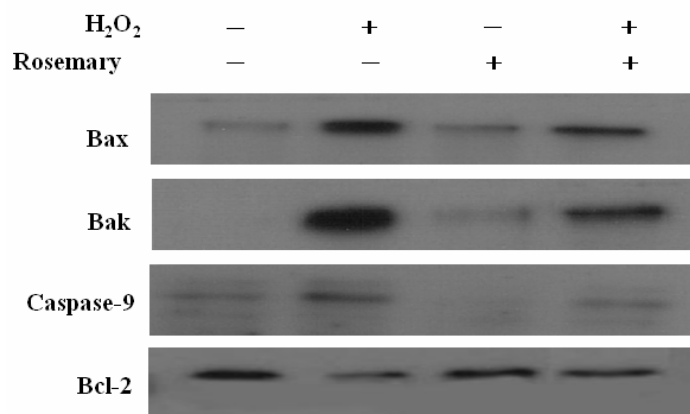


Fig 26. western blot assay of gene expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic factor of co-treated Hydrogen Peroxidase (H₂O₂) with Rosemary in SH-SY5Y.

제 3절 신경보호효과에 관련된 약리활성물질 탐색

1. 연구배경

예방의학과 치료의학의 발달로 인구분포에서 노인이 차지하는 비율이 높아지고 있다. 따라서 신경퇴행성 질환의 치료가 대두되고 있다. 화학적으로 합성되어 개발된 치료제로는 신경퇴행성 질환을 호전시킬 수는 있지만, 장기간 복용해야하며 위장장애, 어지러움증, 자율신경계 이상, 정신기능 이상 등의 많은 부작용이 나타난다. 따라서, 노인질환은 사회적으로 잠재적인 큰 문제가 될 것으로 보인다. 특히, 신경퇴행성 질환을 부작용 없이 예방하고 치료하는 방법을 개발하는 것이 시급하다. 건강한 삶을 누리고 질병을 예방하는 효율적인 방법은 적절한 영양공급과 생리활성이 있는 기능성 식품소재나 이를 이용한 기능성 식품을 섭취하는 것이다. 신경계에서는 끊임없이 신경세포들 간에 신경연접이 이루어지고 있는데, 신경연접을 이루지 못한 상당수의 신경세포는 세포 생존에 필요한 신호를 받지 못해 사멸된다. 산화적 스트레스나 여러 가지 환경독성물질 또는 흥분성 신경전달물질인 glutamate에 과다 노출되면 신경세포는 신경연접을 이루지 못하고 죽게 된다. 신경퇴행성 질환은 치료보다는 예방이 우선되어야 하며, 이러한 측면에서 쉽게 섭취할 수 있고, 부작용이 없는 기능성 생리활성물질의 개발이 절실하다. 생리활성을 가지는 천연물 특히, 허브류에서는 강력한 항산화 효능을 가진 생리활성 물질을 발견할 수 있는데, 본 연구에서는 로즈마리 추출물 중 생리활성 성분인 carnosol을 사용하여 파킨슨병과 관련된 도파민 신경세포사를 막아주는 효과를 검증함으로써 carnosol이 신경세포 보호인자임을 밝혔고, 그와 관련된 신호전달 체계를 규명하였다. 이를 통해, 신경퇴행성 질환인 파킨슨병의 예방과 치료에 적합한 모델을 제시하였다.

2. 재료 및 방법

실험에 사용한 신경세포는 파킨슨병 관련 연구에서 다양한 목적으로 많이 사용하

는 human cell인 SH-SY5Y를 선택하였으며, 이 SH-SY5Y 신경세포를 대상으로 여러 가지 신경퇴행성 질환을 유발하는 것으로 알려진 신경독성물질들을 처리해서 신경세포사를 일으켰다. 신경세포의 손상 정도는 (1) 형태적인 변화, (2) 세포수의 관찰, (3) MTT assay, (4) 세포사에 관련된 Caspase-9, Caspase-3등의 활성화를 조사, 그리고 (5) DNA laddering 정도로 판단하였다. Carnosol을 처리하여 신경세포사가 저해되는지 조사하였다. 일차적으로 carnosol의 효과적인 농도와 시간을 정하는 실험을 수행하였고, 시스템이 확립된 후에는 신경세포 내에서 일어나는 다양한 종류의 신호전달, 물질교환 그리고 시냅스를 중심으로 하는 상호 연결 체제 등 복잡한 현상들을 체계적으로 분리시켜 분석하였다. Carnosol에 의한 신경세포사 보호에 관련된 유전자 혹은 단백질 분석의 일환으로 신경영양인자와 apoptosis에 관련된 유전자 혹은 단백질을 선정하여 조사하였다. 특히, BDNF와 MAP kinase의 활성화가 신경계 질환에서 밀접한 관련성을 보인다는 점을 근간으로 하여 ERK1/2, JNK, p38 등의 MAP kinase family의 활성화와 BDNF 분비 정도를 조사하였다. 신경세포 배양은 Adrenergic/Noradrenergic 생합성 경로를 가지며, 도파민 세포의 특성을 우수하게 갖춘 human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y는 D-MEM/F-12를 기본배지로 하고 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 조건으로 배양하였다. 실험에는 계대수가 8 이내인 세포를 사용하였다. 보통 신경세포에 화학물질을 처리할 때는 하루 전에 serum을 0.5%로 줄인 medium으로 바꾸어서, serum으로 인한 화학물질 작용의 방해를 최소화하였다. 여러 가지 신경질환 유발 환경독성물질들과 화학물질의 농도는 처리 후 24 시간 지나서 보이는 LD₅₀에 기초하여 사용하였다. 또한 신경세포사멸의 정량화를 위하여, tetrazolium compound인 XTT나 MTT를 사용하는 방법과 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포 수를 계산하였다. XTT, MTT 방법에서는, 대사적으로 active한 세포들만이 formazan dye를 형성하는 것을 이용해서, 96 well plate에 cells를 plating하고 색깔의 차이를 plate reader로 읽었다. Apoptotic cell death는 slide culture를 해서 DNA 가닥이 끊어지는 것을 digoxigenin-dUTP로 detect하는 방법과 DNA를 분리하여 DNA가 일정한 크기로 끊

어지는 laddering pattern을 관찰하는 방법으로 확인하였다. Western blot hybridization은 Lysis buffer (62.5 mM Tris, pH 6.75, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol)를 이용하여 단백질을 분리하고, 동량의 단백질을 SDS-PAGE를 실시하여 크기별로 분리하였다. 크기별로 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer 한 다음, 10% non-fat milk 용액으로 1 시간 blocking하고 TBS-T (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20, 2.5 mM $MgCl_2$)로 씻어냈다. Primary Ab를 상온에서 1 시간 처리하고 TBS-T로 15 분씩 4 번 씻어낸 다음 horse radish peroxydase (HRP)가 conjugate되어 있는 secondary Ab를 상온에서 1 시간 처리하고 동일한 방법으로 씻어주었다. 이 후 enhanced chemoluminescence (ECL)을 이용하여 X-ray 필름에 나온 signal을 측정하였다. Caspase-3 assay를 위해 substrate를 Ac-DEVD-pNA (Biomol, Plymouth Meeting, PA)를 사용하고, 405 nm에서 tetrapeptide substrate 의 끊어짐을 모니터 하였다. 유사한 방법으로 Caspase-6, -7, -8, -9 등을 각각의 substrate를 사용해서 활성을 측정하였다. Caspase assay를 위해 cell lysate를 만들 때는 cell lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 μ M DTT, 0.1 mM EDTA)를 사용하였다. Antibody가 있는 Caspase의 경우는 immunoblot으로 활성도를 측정하였다. BDNF 생산의 측정은 SH-SY5Y 세포를 6-well plate에서 2×10^5 cells/well 의 subconfluent 상태로 하룻동안 배양한 후, 1.5 ml의 최소배지(DMEM/F12 + N-2 supplement) 로 바꾸고 나서 BDNF 유도 후보 물질들을 각 well에 첨가하였다. 24 시간 후, 배지를 회수하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 BDNF를 측정하기 전까지 $-80^\circ C$ 에 보관하였다. BDNF의 양은 BDNF E_{max} ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용해서 자동화된 ELISA plate reader를 통해 측정하였다. 모든 실험은 4 회이상 수행하였으며, 평균값과 오차범위로 나타내었다. 결과는 GraphPad Prism data analysis program (GraphPad Software, San Diego, CA) 으로 분석하였고, 유의성은 Student's *t*-test에 의한 2-way ANOVA를 사용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

3. 결과

가. Carnosol의 human 신경세포 보호효과

Carnosol의 신경세포 보호효과 실험에서는 carnosol을 여러 농도로 human 신경세포주인 SH-SY5Y에 처리한 결과 처리하지 않은 대조군보다 오히려 신경세포가 성장이 촉진되는 것을 확인 하였다 (Fig. 27). 다양한 방식의 신경세포사를 유발한 실험에서도, carnosol을 전처리했을 때 상당 부분 신경세포사로부터 보호됨을 알 수 있었다. 신경세포사의 가장 흔한 직접적 원인이 되는 산화적 스트레스를 H₂O₂를 통해 주었을 때 SH-SY5Y 세포는 농도에 따라 30~40% 정도 사멸하였으나, 10 μM의 carnosol 전처리에 의해 100% 살아남음으로써 기대 이상의 효과를 보여주었다. Carnosol을 전처리하고 나서, dopamine 대사산물인 salsolinol 또는 NO donor 인 SNP를 처리한 실험에서는 신경보호효과가 없었다. 또한, 환경 독성물질들인 paraquat와 manganese chloride에 의한 신경세포사를 10 μM의 carnosol 전처리가 완전하게 막아주는 결과를 확인하였다. 살충제 성분인 dieldrin을 유발하는 것으로 알려진 dieldrin에 의한 신경세포사는 dieldrin의 농도에 따라 다른 결과를 보였지만, 20 μM 이하의 dieldrin 농도에 대해서는 10 μM의 carnosol 전처리가 좋은 효과를 보이는 것으로 확인하였다.

나. Carnosol의 BDNF 분비 촉진 작용

신경영양인자들은 신경세포가 성장하고 분화하고 생존하도록 도와주는 단백질인데 중추신경계뿐만 아니라 말초신경계의 분화와 생존을 조절해준다. 특히, BDNF는 도파민 뉴런이 손상을 받았을 때 뚜렷하게 감소하는 신경영양인자이다. 여러 가지 신경퇴행성 질환 동물모델에서 BDNF가 올바르게 전달되거나 발현된 경우 신경세포의 사멸을 효과적으로 막아주었고, 회복을 유도하거나 빠른 치유력을 보여 주었다. 이러한 전 임상 실험 결과를 바탕으로 현재까지 BDNF가 여러 가지 신경퇴행성 질환에 대해 임상실험 단계에 있다. 하지만, BDNF는 그 크기 때문에 혈액-뇌 차단벽(blood

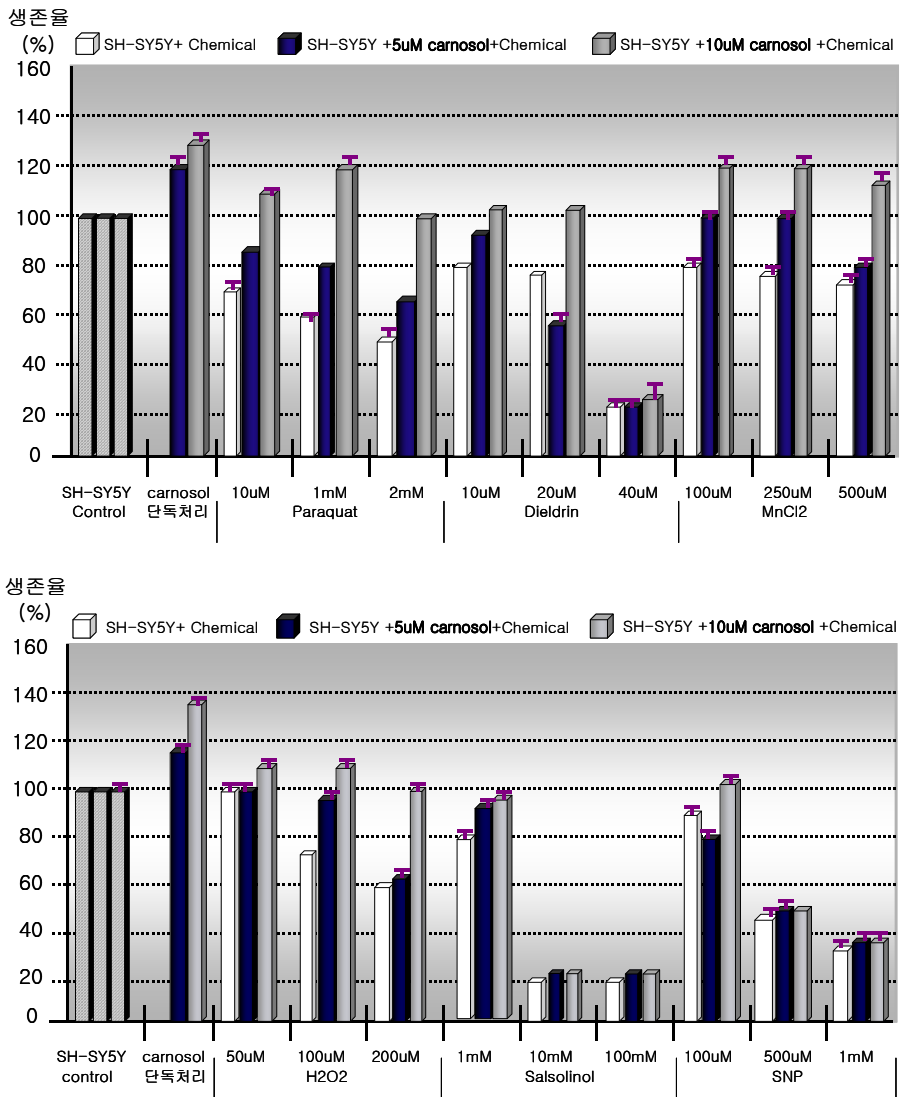


Fig 27. Neuroprotection effect of the carnosal against neurotoxicants induced neuronal cell death. The carnosal pretreatment shows partial or complete neuroprotection against hydrogen peroxide, paraquat, dieldrin or manganese-induced SH-SY5Y neuronal cell death. All chemicals were treated for 24 hr.

brain barrier; BBB)을 통과하지 못하므로 구강 투입 혹은 주사에 의해서는 뇌에 도달하지 못한다. BDNF를 직접적으로 뇌에 투여하는 방법은 수술을 통해 머리에 구멍을 뚫어 전달할 수 있지만 실용적인 방법은 아니다. 가장 실용적인 접근 방법은 뇌혈관장벽을 통과할 수 있는 구강적으로 활동적인 합성물을 투여하고 뇌 속에서 신경영양인자 효과를 생성하거나, 유전자를 이용하여 뇌 속에서 신경영양인자를 생산하는 것이다. 본 연구에서는 뇌혈관장벽을 쉽게 통과할 수 있는 작은 분자들이 도파민 뉴런에서 BDNF 합성 및 분비를 활성화시킬 수 있다는 가설을 세우고, carnosol이 뇌혈관장벽을 통과하고 SH-SY5Y 세포에서 BDNF 분비를 증가시킴으로써 신경세포 보호 효과를 보이는지의 여부를 확인하였다 (Fig. 28). SH-SY5Y 세포를 죽이는 여러 가지 neurotoxicants들은 의외로 BDNF 분비량에 영향을 주지 않았고, carnosol은 신경작용 조절자로 알려진 몇 가지 성장인자들인 BMP4, FGF8b, GDNF, NT-3 등이 보이는 BDNF 분비 촉진 효과에 가까운 BDNF 분비 유도를 하였다 (Fig. 28). 따라서, carnosol이 여러 가지 neurotoxicant의 작용으로부터 SH-SY5Y cell을 보호한 효과는 BDNF 분비 증가로 인한 것이 전부는 아니고, 다른 세포사 관련 신호전달 경로의 차단이 carnosol에 의해 일어난다고 볼 수 있다

다. Carnosol의 신경세포 보호기작 신호전달체계

Carnosol이 BDNF를 증가시키는 것 외에 신경세포 보호 효과를 가지는데 관여하는 신호전달 경로를 확인하였다. 그 결과 MAP kinase family의 일원으로서 세포사에 관여하는 것으로 알려진 JNK의 활성화를 carnosol이 농도별로 뚜렷하게 저지하는 것을 확인하였다 (Fig. 29). 신경세포의 사멸 과정에서는 여러 가지 caspase들이 관여하는데, carnosol의 신경세포 보호 작용이 caspase 활성을 억제하는지의 여부를 조사한 결과 신경세포사가 일어날 때 미토콘드리아와 소포체로부터 방출되어 활성화되는 caspase-9, -12 등이 carnosol에 의해 저해되었고, 세포사의 최종 단계에 작용하는 caspase-3의 작용도 효과적으로 막아주었다 (Fig. 30, Fig. 31). 이러한 결과는 carnosol이 신경세포 보호 효과를 가지는 경로가 BDNF를 증가시키는 것 외에 JNK

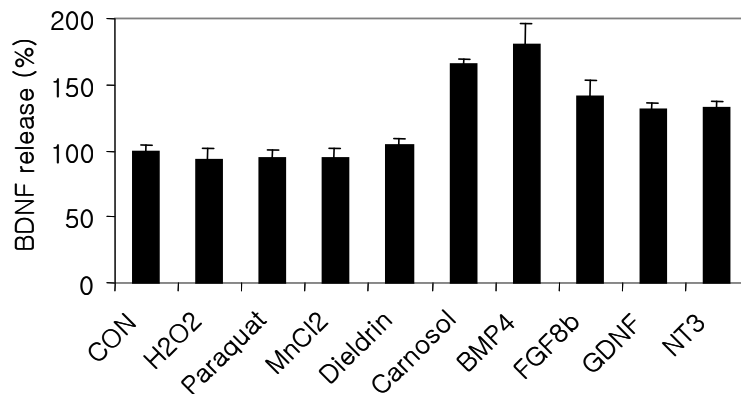


Fig 28. BDNF release in the SH-SY5Y cells by neurotoxicants, growth factors, and carnosol. The response of SH-SY5Y cells to various chemicals for 24 hr was quantified by BDNF ELISA assay. All neurotoxicants tested had no effect on BDNF release. The growth factors, BMP4 and FGF8b caused a statistically significant increase. BMP-4 and FGF8b increased BDNF release by 80% and 40%, respectively. GDNF and NT-3 increased BDNF levels by 31-32%. Carnosol increased the release of BDNF by 66%. H₂O₂ (100 μ M), paraquat (1 mM), MnCl₂ (250 μ M), dieldrin (20 μ M), carnosol (10 μ M), bone morphogenic protein 4 (BMP-4, 200 ng/ml), fibroblast growth factor 8b (FGF-8b, 10 ng/ml), glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF, 20 ng/ml) and neurotrophin-3 (NT-3, 20 ng/ml). All values are the mean \pm SD from four experiments.

와 caspase의 작용을 억제하는 추가적인 기능이 있음을 의미한다.

4. 결론

Carnosol에 의한 최근 연구 결과는 TH발현에 의해 Raf-MEK-ERK1/2 pathway 증가와 caspase-3 방출 억제로 DA neuron에서의 세포사멸 경로를 막아준다. DA neuronal cell model에서 rotenone 독성에 대한 증상완화 효과가 있는 것으로 보아 carnosol이 파킨슨병 치료에 효과가 있을 것으로 보인다.

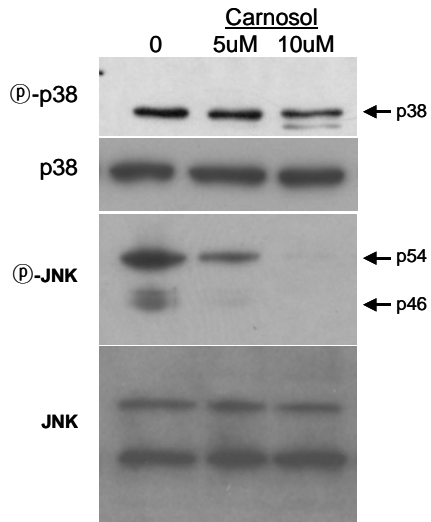


Fig. 29. Active JNKs are significantly decreased by carnosol. SH-SY5Y cells were treated with 100 μM H_2O_2 with or without carnosol pretreatment. H_2O_2 treatment activated p38 and JNK MAP kinases. When the SH-SY5Y cells were treated with each 5 μM and 10 μM carnosol for 1hr before adding H_2O_2 , JNK activation was almost completely blocked.

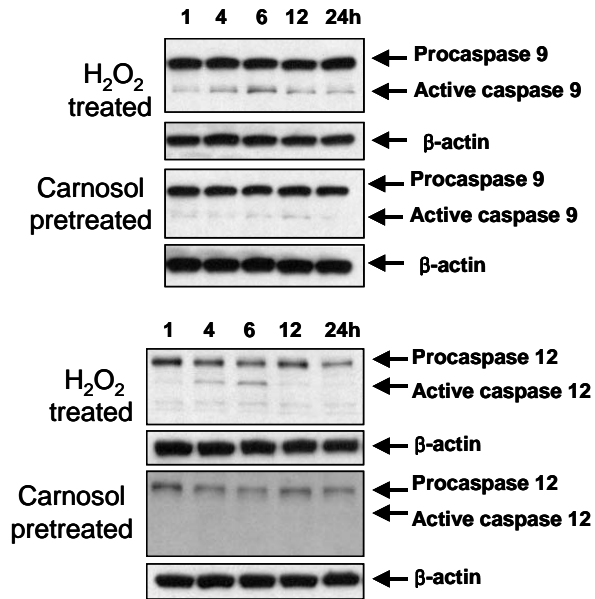


Fig. 30. Carnosol reduced the caspase-9 and -12 activation. SH-SY5Y cells were treated with 100 μ M H₂O₂ with or without 10 μ M carnosol pretreatment. Western blot analysis was performed using a polyclonal anti-caspase-9 and -12.

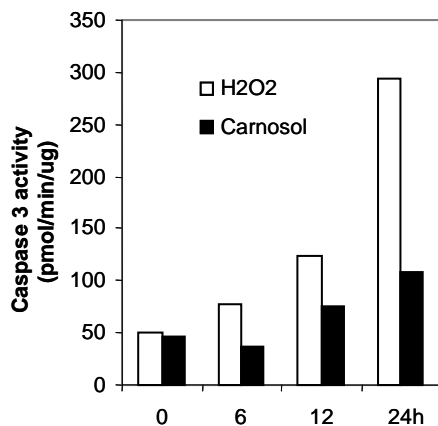


Fig. 31. Carnosol reduced the caspase-3 activation. SH-SY5Y cells were treated with 100 μM H_2O_2 with or without 10 μM carnosol pretreatment. 10 μg of each protein sample was used for the measurement of caspase-3 activity using caspase-3 specific substrate (Ac-DEVD-pNA). Formation of pNA from the reaction was measured using a microplate reader at a 405 nm wavelength. Activity was calculated as pmol substrate hydrolyzed/min/ μg protein.

제 4절 허브추출물로부터 신경보호효과 기능성물질분리를 위한 선행연구

1. 연구배경

앞선 연구에서의 결과와 같이 신경세포의 퇴행성은 신경세포내의 도파민 합성 효율의 저하 및 신경영양인자의 합성효율의 저하에 기인되어진다. 또한 뇌의 substantia nigra에 분포되어있는 dopaminergic neuron의 경우 다른 부분에 분포되어있는 신경세포에 비하여 높은 농도의 산화적 스트레스를 받기 때문에 상대적으로 빠른 신경퇴행성을 나타내게 되어진다. 이러한 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하기 위하여 항산화효소의 작용은 매우 중요한 이슈로 떠오르고 있다.

한편 대다수의 허브들은 높은 수준의 항산화활성을 가지고 있으며, 특히 로즈마리의 경우 carnosol, carnosic acid 및 rosemarinin 등의 항산화물질들이 발견되어졌다. 또한 carnosol에 의하여 신경보호효과를 본 연구팀에 의하여 분석되어졌으며, 이를 기초하여 신경보호효능을 나타낼 수 있는 항산화물질을 분리정제 하고 특성을 분석하고자한다.

2. 재료 및 방법

가. 로즈마리로부터 추출물 조제

로즈마리 잎을 씻어 물기를 건조 시킨 후 잘게 파쇄하여 각각 100 g을 70% methanol 500 ml, 70% ethanol 500 ml에 침지하여 72 시간동안 실온에서 방치한 후 상등액을 취하여 7 겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 evaporation하여 농축시킨 후 동결건조하게 된다. 또한 100 g 의 로즈마리를 500 ml의 멸균수에 침지하여 72 시간 동안 4℃에서 반응시킨 다음 100℃에서 열수추출을 하여 생성된 여액을 동결건조하여 시료를 제조하였다.

나. 동물세포배양

Human neuroblastoma cell line은 ATCC (American type culture collection)으로부터 분양받아 DMEM/F12 배양배지에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin이 첨가되어져 있는 배지를 사용하여 배양하였다. 37°C, 습도 95%, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 72 시간을 주기로 배지를 교체하였다. 또한 세포밀도가 80%에 이르렀을 때 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였다.

다. 세포독성 (Cell cytotoxicity) 및 생존율 (Cell viability) 분석

293, PC12 및 SH-SY5Y를 이용하여 세포독성 검사를 수행하였다. 각 세포는 1 X 10⁵ cell/ml로 평량하여 96 well plate에 접종하여 24 시간 동안 각각의 배지를 처리하여 배양시킨다. 배양된 세포는 potassium phosphate buffered saline (PBS)를 2회 세척시킨 후 각각의 배양배지에 1, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 제조한 다양한 로즈마리 추출물을 처리하여 24, 48, 72 시간동안 배양시킨 후 MTT assay를 수행한다. 세포독성을 분석하기 위하여 PBS에 5 mg/ml 농도로 녹인 MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 용액 20 µl 씩 첨가하고 다시 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 각 well 당 DMSO 100 µl를 처리하여 형성된 crystal fomazan을 녹여낸다. 이후 흡광도를 microplate reader (ELISA reader, molecular device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하게 된다. 또한 생존율을 측정하기 위하여 24 well plate에 1 X 10⁶ cells/ml의 농도로 세포를 평량시킨 후 trypan blue exclusion 법에 의해 착색 비착색 세포수를 혈구 계산기로 세어 생존율을 계산 한다. 생존율은 전체 세포수에 대한 trypan blue 착색 세포수를 백분율로 환산하여 계산되어진다.

라. 전자전달공여능분석

Chin 등 (1999)에 의하여 히말라야삼 또는 네팔인삼으로 알려진 *Panax pseudo-ginseng* 으로부터 항산화효소에 의한 신경세포보호효과 등이 보고됨에 따라 본 연구에서 사

용된 로즈마리, 레몬밤 및 미역줄나무의 항산화효과를 검증하고 이로부터 검증된 결과를 토대로 neurotrophic factor 및 dopaminergic neuron의 발현에 대한 상관관계를 검증해보고자 하였다. 항산화효과는 전자공여능 (EDA; electron donating ability)는 blois의 방법에 준하여 측정하였다. 각 butylated hydroxytoluene (BHT) 및 허브추출물 2 ml에 0.2 mM DPPH (1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 1 ml을 첨가하여 교반한 후 30 분간 방치하여 흡광도 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능은 허브추출물의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{허브추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{허브추출물 무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

마. SH-SY5Y cell line에 로즈마리 추출물 처리에 의한 dopamine biosynthesis에 관련된 유전자 유도발현 및 신경영양인자 유도발현 분석

1) SH-SY5Y cell line에 다양한 로즈마리 추출물 투여 방법

신경보호효과를 가지고 있는 로즈마리 추출물을 선별하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 각각의 로즈마리 추출물을 처리하여 도파민합성에 관련되어있는 tyrosine hydroxylase 및 BDNF의 유도발현을 분석하게 되었다. 허브 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 평량하여 SH-SY5Y에 처리하여 2, 4, 8 시간 동안 처리시킨 후 trypsinization하여 세포를 회수하여 total RNA를 분리하였다.

2) Total RNA 분리

다양한 로즈마리 추출물을 SH-SY5Y에 처리하여 trypsinization 후 회수된 세포는 TriZol reagent를 사용하여 제공사의 매뉴얼에 의하여 total RNA를 분리하였다. 분

리된 세포는 1 ml의 Trizol reagent를 처리하여 pipetting에 의하여 세포를 파쇄시킨 후 5 분 동안 상온에서 반응시킨다. 이후 200 μ l의 chloroform을 처리하여 15 초간 혼합시킨 다음 3 분 동안 상온에서 반응 시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 원심분리시킨다. 원심분리 후 무색의 상층액을 약 600 μ l를 조심스럽게 pipette로 회수시킨 후 500 μ l의 isopropanol을 처리하여 total RNA를 침전시키기 위하여 혼합시킨 다음 12,000 rpm, 4°C에서 원심분리시킨다. 상층액을 제거시킨 후 형성된 pellet은 75% 에탄올에 현탁시킨 다음 7,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거시킨다. 형성된 pellet은 상온에서 에탄올을 제거시킨 후 가볍게 air-dry 시킨 후 DEPC water 또는 RNase-free water에 녹이게 된다. 녹여진 total RNA는 UV/vis-spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 RNA 농도를 측정하게 된다.

3) Total RNA 전기영동

정량된 RNA의 농도 및 분리되어진 RNA 상태를 분석하기 위하여 formaldehyde agarose gel을 이용하여 전기영동하게 된다. Formaldehyde agarose gel을 조제하기 위하여 RNA의 분해를 방지하기 위하여 DEPC-water를 gel-former와 comb을 세척한다. agarose 1.3g을 50 ml DEPC water에 녹인 다음 20ml의 formaldehyde 및 5ml의 20X MOPS (0.2M MOPS (morpholinopropanesulphonic acid), 50 mM sodium acetate, 5 mM EDTA, The buffer is adjusted to pH 7.0 with 1 M NaOH and sterilised by autoclaving)를 섞어 최종 volume을 100 ml이 되도록 맞춘 후 microwave oven에서 열을 가하여 액화시키게 된다. 액화된 용액을 gel-former 및 comb에 부어 약 1 시간동안 상온에서 고화시키게 된다. 정량된 total RNA 2 μ g을 electrophoresis buffer (10 ml 100% deionized formamide, 3.5 ml 40% formaldehyde, 1.5 ml 10X MOPS buffer)와 혼합하여 70°C에서 5 분간 반응시킨 다음 70 V로 전기영동하여 Etidium bromide (EtBr) 용액에 염색시킨 후 UV 하에서 분석하게 된다.

4) cDNA 합성

분리되어진 total RNA에 포함되어진 mRNA를 cDNA로 전환시키기 위하여 reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 을 수행하였다. 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)) 및 oligo dT primer는 Bionner co.로부터 구입하였으며, 제조회사로부터 제공되어진 매뉴얼에 의하여 합성하였다.

5) Quantity-Polymerase Chain Reaction (PCR)

다양한 로즈마리추출물에 의하여 도파민 생합성에 관련되어져 있는 tyrosine hydroxylase (TH), aromatic amino-acid decarboxylase (AADC) 유전자 및 신경영양인자의 유도발현을 분석하기 위하여, 이들에 대한 특이적인 primer를 합성하여 (Table 1) quantity-PCR을 수행하였다. 합성된 PCR-product는 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 image master software를 이용하여 mRNA수준에서의 유도발현을 분석하였다.

바. Western blotting

단백질 수준에서의 도파민 생합성관련 단백질 및 신경영양인자의 유도발현을 분석하기 위하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 수행하여 각각의 항체를 이용하여 단백질의 유도발현을 정량화 하였다.

1) 단백질 분리 및 정량

다양한 로즈마리 추출물을 SH-SY5Y cell line에 처리하여 trypsinization 후 회수된 세포는 TriZol reagent를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 의하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce co., USA)를 이용하여 정량하게 되며, 정량은 제조회사의 매뉴얼에 의하여 정량하였다. 또한 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumin)을 이용하여 단백질 표준곡선을 작성하여 이를 기초로 하여 이용하여 단백질을 정량화하였다. 정량된 단백질은 SDS-PAGE를 수행한 후

coomassie staining을 통하여 정량된 결과를 분석하였다.

2) SDS-PAGE

분리된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 정량화된 단백질을 분석할 뿐만 아니라 western blotting을 수행하기 위하여 수행하게 된다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5X SDS Sample Buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 10 분간 증탕한 후 Protein marker (Cambrex Co.)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue(CBB) R 250으로 염색하고 Destaining buffer로 탈색 시킴으로써 단백질 정량화를 확인하게 된다.

3) western blotting

전기영동된 SDS-PAGE를 PVDF membran으로 transfer 하기 위하여 다음과 같은 방법에 의하여 실행하였다. 전기영동후 단백질을 100 V에서 90 분간 PVDF membrane에 transfer하였다. Skim milk를 농도가 5%가 되도록 TBS-T용액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 녹여 blocking solution을 제조하여 membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려 놓고 흔들어 주었다. 한 시간 후 TBS-T 용액으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000 비율로 TBS-T 용액에 희석한 primary antibody로 4°C에서 12 시간 처리 후 동일한 방법으로 15 분씩 4 회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBS-T 용액에 희석한 alkaline phosphatase conjugated antibody (secondary antibody)로 실온에서 2 시간 처리하였다. 이후 발현된 결과는 image master program을 이용하여 결과를 분석하였다.

사. 면역조직화학법

rat은 흉부를 절개한 후 심장의 정맥을 이용해 PBS로 체내의 혈액을 제거한 뒤

4% Para-formaldehyde로 관류 고정하였다. 고정된 쥐 뇌와 위를 적출하여 microcryocut를 이용하여 35 μm 두께의 동결절편을 제작하였다. 준비된 뇌와 위 절편은 PBS로 여러번 씻어주었다. 30% hydrogen peroxide로 전처리하여 씻어준 후 vectastain ABC kit의 normal goat serum을 0.5% BSA/PBS에 섞어 1 시간동안 반응시켜 비특이적 단백질의 결합을 막는다. TH primary 항체 및 AADC 항체와 0.5% BSA/PBS (1:10000) 희석하여 실온에서 1 시간에서 2 시간 정도 반응시켰다. Sample을 PBS로 3 번 씻은 후, 이차 항체 (biotinylated anti-rabbit IgG in 1% BSA/PBS)를 이용하여 1 시간 동안 반응시킨 다음 1% BSA/PBS로 두 번 씻어냈다. 사용하기 30 분 전에 vectastain ABC kit (1:50)를 희석하여 50 분 동안 반응시킨 후 PBS로 2 번 씻고, 50 ml DAB 용액과 0.2 M PB 용액에 30% hydrogen peroxide 12 μl 를 첨가한 용액으로 5 분간 염색시켜 0.1 M PB로 5 분간 반응을 동시에 정지시킨 다음, 광학 현미경으로 관찰하였다. 그리고 위에서의 세포 counting은 각각 처리된 4 개의 염색된 절편을 선택하여 X400에서 전 층을 대상으로 조직절편의 단위면적당 TH가 발현된 세포의 수를 측정하였고 계수 결과는 윌콕슨의 순위합 검정 (Wilcoxon rank sum test)를 이용하였다.

3. 결과

가. 다양한 로즈마리 추출물의 세포독성효과 분석

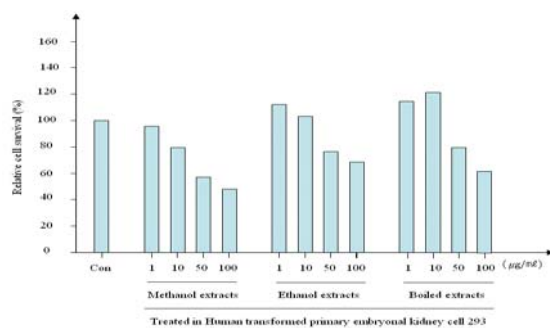
일반적으로 허브를 식용으로 이용할 때는 직접적으로 음식물에 부재료 사용되어지거나 또는 차로 제조하여 섭취하게 되어진다. 특히 차로 제조되어지는 대표적인 허브로 로즈마리를 들 수가 있는데 로즈마리는 흔히 주변에서 볼 수 있는 허브일뿐만 아니라 carnosol, carnosic acid 등 강력한 항산화효소들에 의한 항산화 작용과, 항암 효과, 항종양효과, 항바이러스 효과 등 다양한 생리활성을 가지고 있다. 뿐만아니라 본 연구에서 분석되어진 바로는 강력한 항산화작용에 의한 신경세포보호효과 및 신경세포의 성장과 생존에 있어서 필수적인 신경영양인자 유도발현과 더불어 도파민

생합성에 관련된 유전자들의 유도발현이 일어나는 것을 확인하였다. 따라서 로즈마리로부터 신경보호효과를 가지는 물질을 분리정제 하기 위해서는 일차적으로 가장 흔하게 extracts를 제조하는 메탄올 추출, 에탄올 추출 및 열수추출 방법을 이용하여 이에 따른 세포독성을 분석하였다. 각각의 방법에 따라 추출되어진 용출물을 동결건조 시킨 후 saline에 희석하여 human transfomed primary embryonal kidney cell 293에 농도별 (1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 72시간 후의 세포독성을 MTT 방법에 의하여 분석하였다 (Fig. 32). 메탄올추출물의 경우 처리되는 농도에 따라 점진적인 세포생존률의 감소를 나타내었으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 실험구에서는 세포독성효과가 확인되어졌다. 그러나 이러한 세포독성효과는 로즈마리 메탄올추출물의 영향도 있겠지만, 72 시간 배양에 의한 영양분의 감소에 의해서도 세포 생존률의 감소가 나타날 수 있다. 그러나 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서는 IC_{50} 이상의 값이 확인되어졌기 때문에 이러한 일반적인 저농도에서 로즈마리 메탄올 추출물은 세포독성이 미약함을 확인할 수 있었다. 로즈마리 에탄올 추출물의 경우는 로즈마리 메탄올 추출물에 비하여 모든 처리구에서 IC_{50} 이상의 값이 확인되어졌으며, 로즈마리 에탄올 추출물에서도 투여 농도에 따라 점진적인 세포생존률의 감소가 확인되어졌다. 따라서 이러한 생존률의 감소는 배지 내의 영양분 감소에 의하여 일어남을 추정할 수 있으며, 로즈마리 메탄올 추출물이 로즈마리 에탄올 추출물보다 세포생존률이 낮게 나오는것은 메탄올 자체가 에탄올에 비하여 독성효과가 강하기 때문이다. 마지막으로 일반적으로 허브티로 이용되어지는 것처럼 로즈마리 열수추출물을 처리하여 세포독성을 비교분석하였다. 로즈마리 열수추출물 모든 처리구에서 IC_{50} 이상의 값이 확인되어졌으며, 이는 로즈마리 열수추출물이 음식물로써 섭취하기 세포독성이 낮다는 것을 의미하게 된다. 한편 신경영양인자 및 도파민 생합성에 관련된 단백질을 유도 발현시킬 수 있는 PC12 cell line에 각각의 로즈마리 추출물을 293 세포에 처리한 조건과 동일하게 처리하여 세포독성을 비교하였다. 모든 로즈마리 추출물 처리구에서는 293 세포에 처리했을때의 결과와 유사한 패턴을 나타냄을 확인할 수 있었다. 그러나 293 세포와 비교하여 전반적으로 낮은 수치의 세포생존률을 나타냄을 확인할 수 있었다. 로즈마리 메탄올 추출물의 경우 293 세포에서와 같이 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 구에

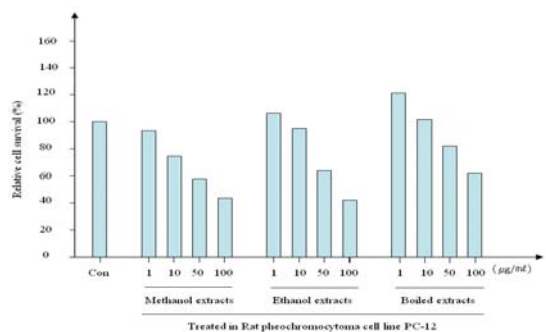
서는 대조구와 비교하여 약 58%의 세포생존률 감소를 나타내었다. 뿐만아니라 로즈마리 에탄올 추출물에서는 로즈마리 메탄올 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리구와 동일하게 세포생존률이 감소되어짐을 확인할 수 있었다. 따라서 로즈마리 메탄올 추출물 및 에탄올 추출물은 저농도에서는 세포독성이 투여량에 따라 감소되어지며 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 세포독성을 가짐을 확인 할 수 있었다. 그러나 로즈마리 열수추출물의 경우 투여량에 따라 세포생존률의 감소가 나타나기는 하였지만 IC_{50} 이상으로 확인되어져 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물에 비하여 세포독성이 낮음을 확인 할 수 있었다. 한편 인간의 뇌로부터 기원된 human neuroblastoma cell line SH-SY5Y 에 각각의 로즈마리 추출물을 투여하여 세포독성을 비교하였다. 일반적인 세포생존률 패턴은 293 세포 및 PC12 세포에 처리하였을 때와 유사하게 나타남을 확인하였다. 특히 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도는 세포독성을 나타내고 있었으며, 로즈마리 열수추출물은 상대적으로 메탄올 및 에탄올 추출물에 비하여 세포독성이 없음을 알 수 있다.

또한 시간에 따른 각각의 로즈마리 추출물의 세포독성을 분석하기 위하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 24, 48 및 72 시간동안 세포독성의 변화를 분석하였다. 정상세포주로 사용된 293 세포에서의 세포독성은 모든 로즈마리 추출물에서 확인되지 않았다 (Fig. 33). 로즈마리 메탄올 추출물은 시간에 따라 세포생존율이 오차범위 이내에서 감소되어지고 있음을 확인 할 수 있는데 이는 메탄올 추출에 의하여 잔존되어있는 독성물질에 의한 영향으로 사료되어지는 반면 로즈마리 에탄올 추출물 및 열수추출물은 처리 시간이 길어짐에 따라 세포 생존율이 증가되어짐을 확인 할 수 있었다. PC12 세포에서의 각 로즈마리 추출물에 의한 세포독성을 분석한 결과 로즈마리 메탄올 추출물은 293 세포에서와 동일하게 세포 생존율이 감소되어짐을 확인 할 수 있었으며, 반대로 에탄올 및 열수추출물은 세포 생존율이 증가되어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 SH-SY5Y 세포에서는 로즈마리 메탄올 추출물은 293 세포 및 PC12 세포에서 같이 처리시간이 늘어남에 따라 세포독성이 증가되어짐을 확인할 수 있었으며, 로즈마리 에탄올 추출물은 293 세포 및 PC12 세포에서의 증가와는 다르게 시간이 지남에 따라 로즈마리 메탄올 추출물 처리구에서와 같이 점진적인 감소율을 나타내었다. 그러나 로즈마리 열수추출물의 경우 대조구보다 높은 세포생존율을

A.



B.



C.

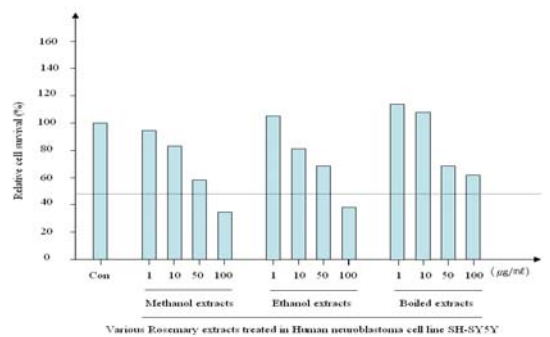
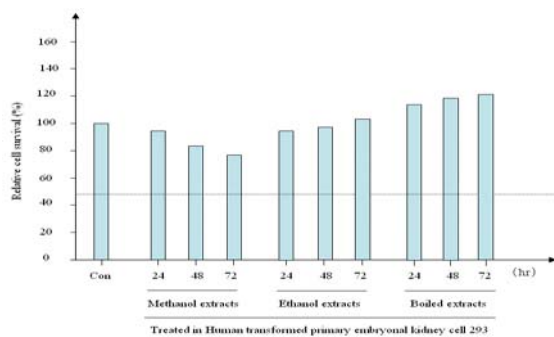
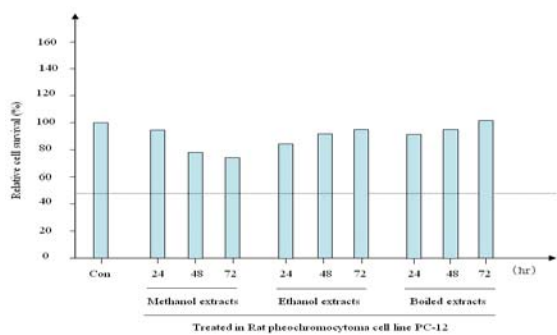


Fig 32. Cell cytotoxicity of various rosemary extracts as the various dose. (A) in human transformed primary embryonal kidney cell 293, (B) PC12 cell, (C) Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.

A.



B.



C.

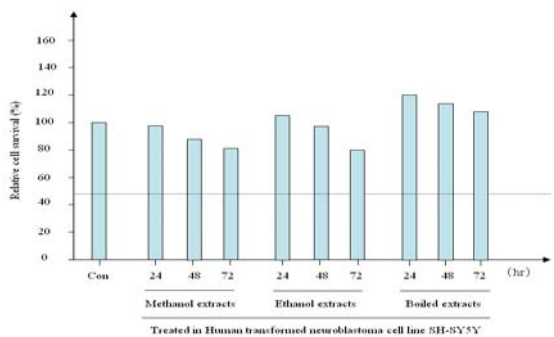


Fig 33. Cell cytotoxicity of various rosemary extracts as the various treatment time. (A) in human transformed primary embryonal kidney cell 293, (B) PC12 cell, (C) Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y.

나타내고 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 식용으로 사용하기 위하여 에탄올 및 열수추출물이 이용되어야 하며, 특히 로즈마리 열수 추출물이 모든 세포에서 상대적으로 안전함을 확인 할 수 있었다.

나. 로즈마리 추출물들의 상대적인 항산화효과 분석

신경퇴행성에 있어서 최근 연구되어진 보고들에 따르면 도파민 생합성관련 신경들이 분포되어져있는 뇌의 substantia nigra는 상대적으로 뇌의 다른 부분들에 비하여 상당히 높은 radical 에 노출되어져 있으며, 이러한 radical들에 의하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 DNA에 손상이 일어나 신경퇴행성이 이루어진다고 보고되어졌다. 따라서 신경보호효과에 있어서 항산화 작용은 매우 중요하다고 할 수 있다. 또한 본 연구에서도 로즈마리로부터 분리되어진 carnosol에 의하여 신경보호효과가 이루어지고 있음을 증명하였기에 각 로즈마리 추출물에 대한 항산화효능 중 전자전달 공여능을 분석하였다 (Fig. 34). 전자전달공여능을 분석한 결과 로즈마리 추출물 중 로즈마리 메탄올 추출물이 대조구로 사용되어진 BHT에 비하여 약 80%의 전자전달공여능을 가지고 있음을 확인하였으며, 로즈마리 에탄올 추출물의 경우도 대조구에 비하여 약 70%의 전자전달 공여능을 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 로즈마리 열수추출물의 경우 열에 의한 항산화효소의 변성작용이 이루어짐에 따라 항산화 활성이 매우 떨어짐을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 로즈마리 추출물로부터 항산화효소 및 항산화물질을 분리정제 하기 위해서는 열수추출보다는 유기용매를 사용하여 추출하여야 될 것으로 사료되어진다.

다. 다양한 로즈마리 추출물에 의한 신경영양인자 유도발현 분석

로즈마리 각 추출물을 SH-SY5Y에 10, 20, 40, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 4 시간 후 세포를 회수하여 이들로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후 BDNF 및 GDNF specific primer를 사용하여 유도발현되어지는 BDNF 및 GDNF를 분석하였다 (Fig. 35). 로즈마리 메탄올 추출물을 처리하였을때 10 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처

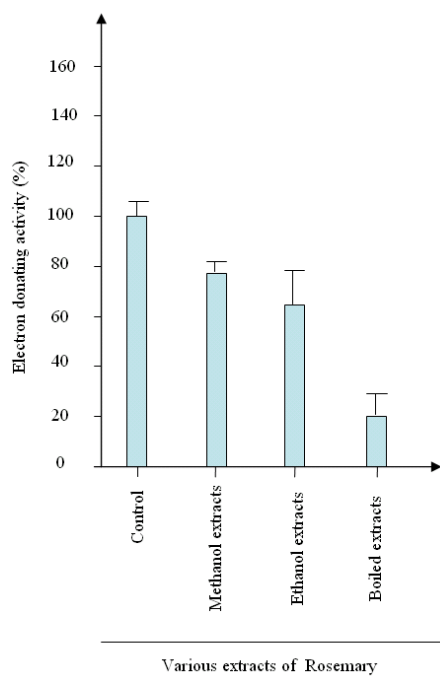


Fig 34. Antioxident activity of various rosemary extracts.

리한 실험구에서는 대조구에 비하여 높은 농도의 BDNF가 유도발현되어지고 있음을 확인 할 수 있는 반면, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도로 처리한 결과 이와는 반대로 BDNF의 감소가 확인되어졌다. 이러한 결과는 고농도의 로즈마리 메탄올 추출물에 의하여 세포내에서 BDNF 유전자 유도발현이 간섭되어지고 있음을 추정할 수 있다. 그러나 GDNF의 유도발현은 BDNF의 유도발현에 비하여 낮은 농도로 유도발현되어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 로즈마리 에탄올 추출물을 처리한 결과 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서 상대적으로 높은 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였으나, 40, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서는 매우 낮은 BDNF 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였으며, 이러한 결과는 메탄올 추출물 및 에탄올 추출물의 극성에 따라 분리되어지는 물질이 다름을 추정할 수 있다. 반면 로즈마리 에탄올 추출물 처리에 의하여 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서는 상대적으로 로즈마리 메탄올 추출물보다 높은 GDNF 유도발현을 확인 할 수 있었다. 그러나 40 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 로즈마리 에탄올 추출물을 처리한 실험구에서는 BDNF에서와 동일하게 유도발현이 감소되어짐을 확인 할 수 있었다. 로즈마리 열수추출물의 경우는 20~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서 대조구에 비하여 20%이상 높은 농도의 BDNF 발현을 나타내었으며, 반면 GDNF는 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 구에서 10%이상의 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다.

한편 실험동물에 존대를 이용하여 각 로즈마리 추출물을 10, 20, 40, 80 mg/kg으로 투여하여 4 시간 후에 뇌를 분리하여 이로부터 BDNF 및 GDNF의 유도발현을 분석하였다 (Fig. 36). 세포의 경우 직접적인 추출물과의 상호작용에 의하여 유도발현이 이루어지기 때문에 상대적으로 뇌막을 가지고 있는 실험동물에 비하여 쉽게 이루어지게 된다. 로즈마리 메탄올 추출물을 처리한 실험구에서는 10 mg/kg으로 처리한 쥐에서 대조구에 비하여 약 30%이상의 높은 BDNF 유도발현을 확인하였으며, GDNF는 20 mg/kg으로 처리한 쥐에서 약간 높은 활성을 나타내었다. 반면 로즈마리 에탄올 추출물을 처리한 실험구에서는 10 ~ 40 mg/kg으로 투여한 쥐에서 상당히 높은 BDNF 유도발현이 확인되어진 반면 GDNF는 10 mg/kg을 투여한 쥐에서 제한적으로

높게 유도발현되어짐을 확인 할 수 있었다. 열수추출물의 경우 20 mg/kg으로 처리한 실험구에서 높은 BDNF 유도발현을 확인 할 수 있었으며, GDNF는 10 및 20 mg/kg으로 투여한 실험구에서 대조구에 비하여 약 30%이상의 높은 GDNF 유도발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 위와 같은 결과를 종합하여 볼때 로즈마리 메탄올 추출, 로즈마리 에탄올 추출, 로즈마리 열수추출물은 모두 이들 추출물을 제조하기에 사용되어진 유기용매에 따라 각각 다른 고유한 다른 물질들을 포함하고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 전반적으로 **메탄올 및 에탄올을 이용하여 추출한 로즈마리 추출물이 상대적으로 열수추출물에 비하여 신경영양인자 유도발현에 적합함을 확인** 할 수 있었다. 한편 다양한 로즈마리 추출물을 시간에 따라 처리하였을 때 변화되어지는 특성을 분석하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 각각 로즈마리 추출물을 SH-SY5Y 세포에 처리하고 2, 4 및 8 시간동안 배양시킨 후 세포를 회수하여 이로부터 BDNF 및 GDNF 유도발현을 분석하였다 (Fig. 37). 로즈마리 메탄올 추출물은 처리 후 2 시간에서 대조구에 비하여 약 40%이상의 높은 유도발현을 하였으며, 처리 후 4 시간까지 유도발현이 지속되었으나, 8 시간 후에는 유도발현이 감소되어짐을 확인하였다. GDNF의 경우 또는 처리 후 2 시간에 대조구에 비하여 약 10% 이상의 유도발현을 나타내었으며, 처리 후 4 시간까지 유도발현을 하였다. 로즈마리 에탄올 추출물 또한 로즈마리 메탄올 추출물과 유사하게 처리 후 2 시간에 가장 높은 유도발현을 나타내었으며, GDNF의 유도발현은 대조구에 비하여 매우 미미한 수준에서 처리 후 2 시간에서 유도발현되어졌다. 반면 로즈마리 열수추출물의 경우 BDNF는 처리 후 2 시간에서 8 시간까지 매우 긴 시간에 걸쳐 유도발현되었으며, GDNF는 2 시간에서 대조구에 비하여 약 15% 내외에서 유도발현을 시키고 있음을 확인하였다. 따라서 각 로즈마리 추출물들은 일반적으로 2 시간에서 높은 수준의 유도발현을 시키고 있음을 추정할 수 있다. 한편 실험동물 rat에 10 mg/kg으로 구강투여시킨 후 뇌에서 유도발현되는 BDNF와 GDNF를 분석하였다. SH-SY5Y cell line에 비하여 전반적으로 감소되어진 신경영양인자 유도발현 패턴을 나타내고 있음을 확인하였다 (Fig. 38). 로즈마리 메탄올 추출물을 처리한 실험구에서는 투여 후 2 시

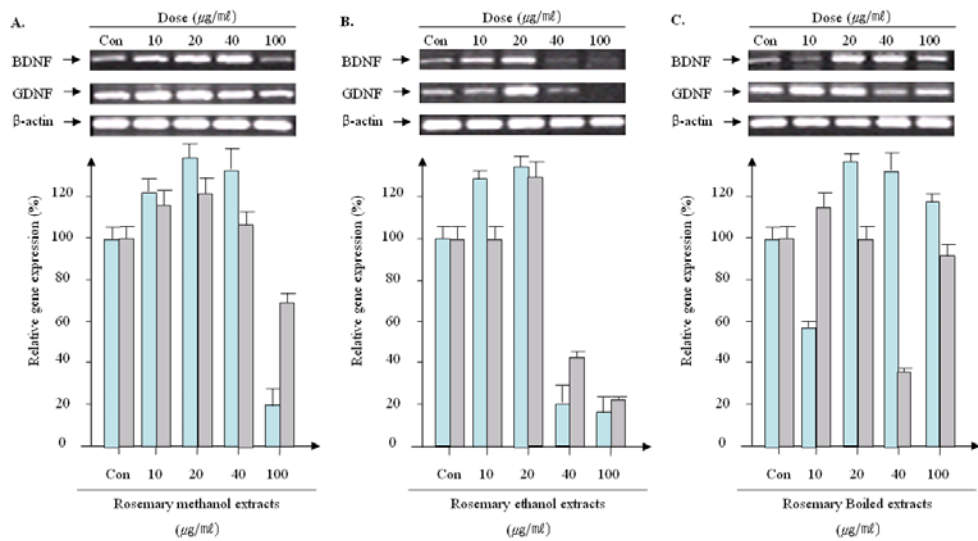


Fig 35. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

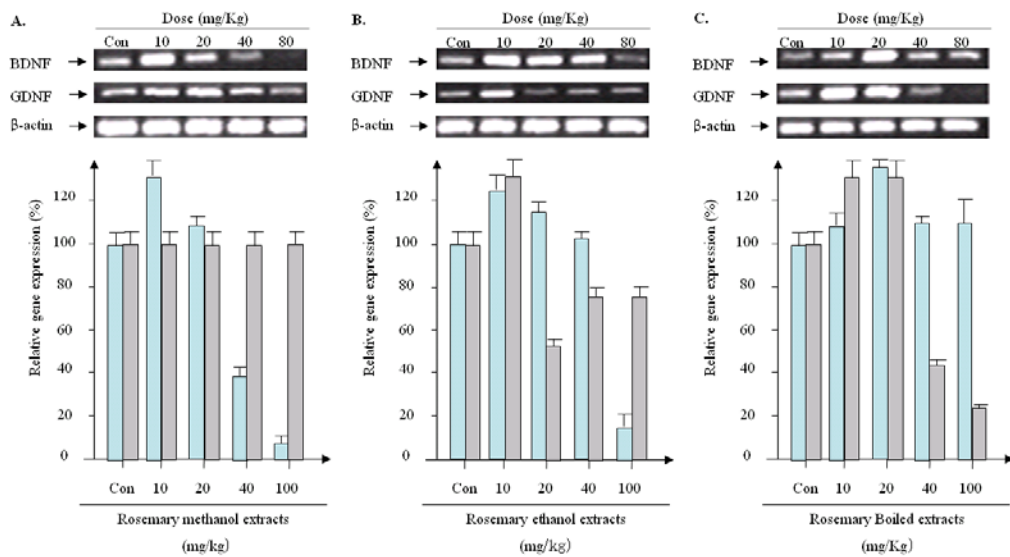


Fig 36. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

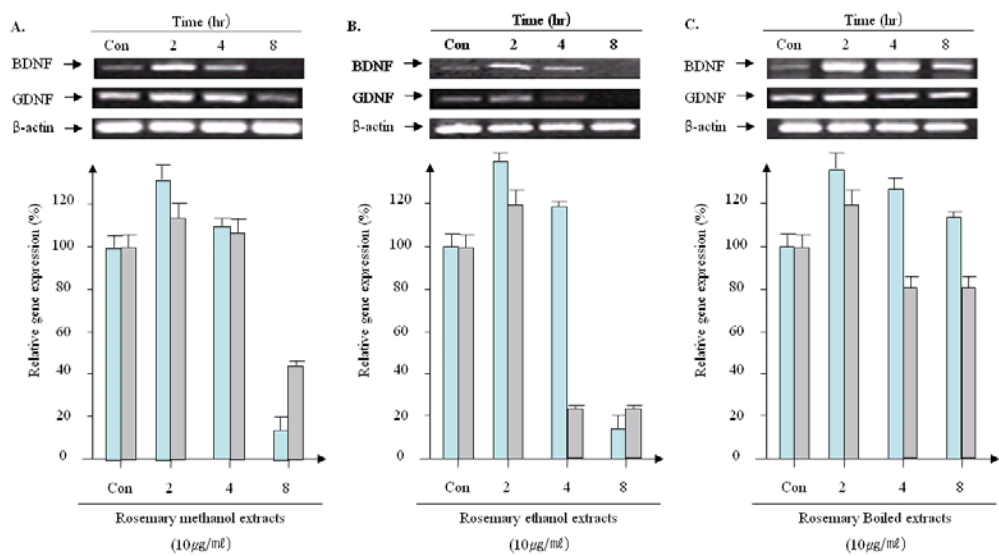


Fig 37. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various treatment time in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

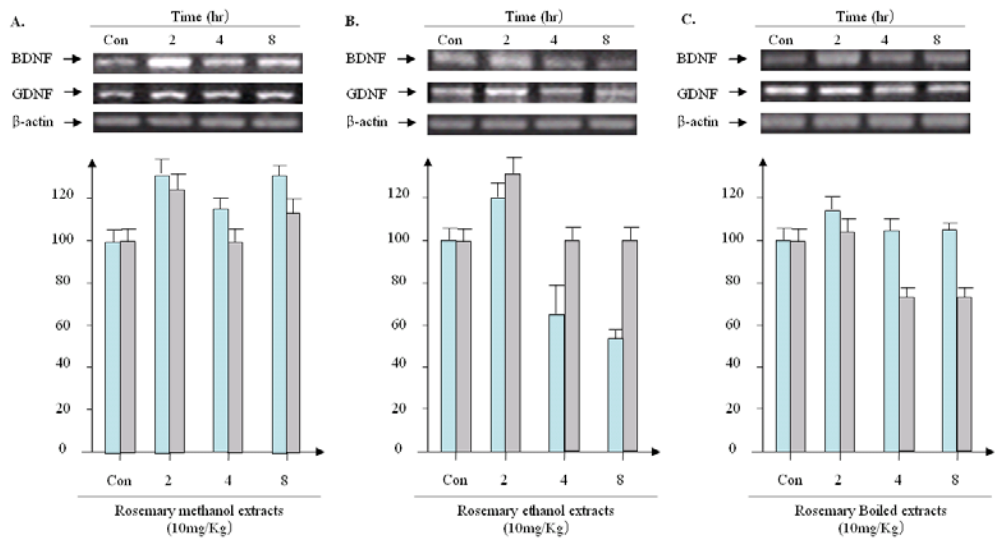


Fig 38. Gene induction of BDNF and GDNF treated by various rosemary extracts as various treatment time in rat brain. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

간에서 대조구에 비하여 약 30%의 높은 BDNF 유도발현이 시작되어 투여 후 8 시간까지 대조구에 비하여 높은 유도발현을 시키고 있음을 확인하였다. 또한 GDNF의 경우는 투여 2 시간에서 8 시간까지 비교적 지속적으로 유도발현이 이루어지고 있었다. 반면 로즈마리 에탄올 추출물을 투여한 결과 로즈마리 메탄올 추출물에 비하여 BDNF의 유도발현이 낮음을 확인하였으며, GDNF는 투여 후 2 시간에서 높은 유도 발현을 확인하였다. 이러한 결과는 로즈마리 메탄올 추출물이 로즈마리 에탄올 추출물 보다 쥐의 뇌막을 쉽게 통과하여 지속적으로 유도 발현시키고 있음을 암시할 뿐만 아니라 메탄올 추출물 내에 분자량이 작은 유도물질이 존재하고 있음을 추정할 수 있다. 반면 로즈마리 열수추출물의 경우 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물에 비하여 현저하게 낮은 발현율을 나타내고 있음을 확인 할 수 있으며, 또한 SH-SY5Y cell line에 비하여 매우 낮은 발현율을 나타내고 있는데, 이는 로즈마리 열수추출물 내에 신경영양인자를 유도 발현시킬 수 있는 물질은 존재하나 뇌막을 통과하기에는 매우 큰 분자량의 물질이 존재함을 추정 할 수 있다.

라. 다양한 로즈마리 추출물에 의하여 도파민 생합성과 관련된 유전자의 유도발현 분석

다양한 로즈마리 추출물에 의하여 도파민 생합성과 관련되어있는 TH와 AADC의 유도발현을 분석하기 위하여 SH-SY5Y 및 rat에 신경영양인자 유도발현분석과 동일한 조건으로 투여하여 이들에 의한 유도발현을 분석하였다. 로즈마리 메탄올 추출물을 SH-SY5Y에 처리한 결과 20 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 실험구에서 TH와 AADC가 유도 발현되어지고 있음을 확인하였으나, 로즈마리 에탄올 추출물을 처리한 결과 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 실험구에서 높은 농도의 TH가 유도 발현되어짐을 확인하였다 (Fig. 39). 로즈마리 열수추출물을 처리한 결과 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험구에서 매우 높은 TH 유도발현을 확인 할 수 있었다. 그러나 AADC의 경우 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물에서와 동일하게 커다란 유도발현을 확인하지 못하였다. 이는 도파민 생합성 경로에서의 TH가 먼저 유도 발현되어 tyrosine을 L-dopa로 전환

시키고 난 후 AADC에 의하여 L-dopa가 도파민으로 전환되어지기 때문에 TH 유도 발현보다 AADC의 유도발현이 지연되어 발현되어지기 때문인 것으로 추정되어진다. 마찬가지로 rat에 구강 투여하여 각 로즈마리 추출물의 유도발현에서도 로즈마리 에탄올 추출물에 의하여 10~40 $\mu\text{g/ml}$ 으로 투여한 처리구에서 높은 BDNF 유도발현이 나타나고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 40). 그러나 SH-SY5Y에서의 결과 동일하게 AADC의 유도발현은 확인되어지지 않았다. 따라서 시간에 따른 유도발현을 분석하게 되었는데 메탄올 추출물의 경우 처리 후 2 시간부터 4 시간에서 높은 유도발현이 이루어졌으며, AADC는 처리 후 4 시간에서 제한적으로 유도 발현됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 41). 로즈마리 에탄올 추출물의 경우 투여 후 2 시간에서부터 TH 유도발현이 이루어지고 있었으며, AADC는 투여 후 2 시간에서 8 시간까지 점진적으로 높은 농도로 유도 발현되어지고 있음을 확인하였다. 로즈마리 열수추출물의 경우 투여 후 2 시간에서 8 시간까지 TH가 유도 발현되어지고 있었으며, AADC는 투여 후 4 시간부터 8 시간까지 유도 발현되고 있음을 확인하였다. 실험동물에서도 SH-SY5Y와 동일하게 처리 후 2 시간 후부터 각각의 로즈마리 추출물에 의하여 TH가 유도 발현되었으며, AADC는 TH가 유도 발현되어진 후에 4 시간에서 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다 (Fig. 42).

마. 단백질 수준에서 TH 및 BDNF의 유도발현 분석

위의 결과를 단백질 수준에서 검증하기 위하여 TH 및 BDNF 항체를 이용하여 western blotting을 수행하였다. AADC와 GDNF는 TH와 BDNF와 비교하여 상대적으로 매우 낮은 유도발현을 나타낸 결과 본 결과에서는 TH와 BDNF의 유도발현을 단백질 수준에서 분석하였다. 로즈마리 메탄올 추출물의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유도발현이 대조구에 비하여 약 30%이상 증가되어짐을 확인하였다. 그러나 40 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하였을 때는 상대적으로 감소되어지는 경향을 나타내었다.

이는 앞서 RNA 수준에서의 결과와 동일하게 고농도의 로즈마리 메탄올 추출물은 상대적으로 이러한 TH 및 BDNF의 유도발현을 간섭하고 있는 것으로 추정되어진

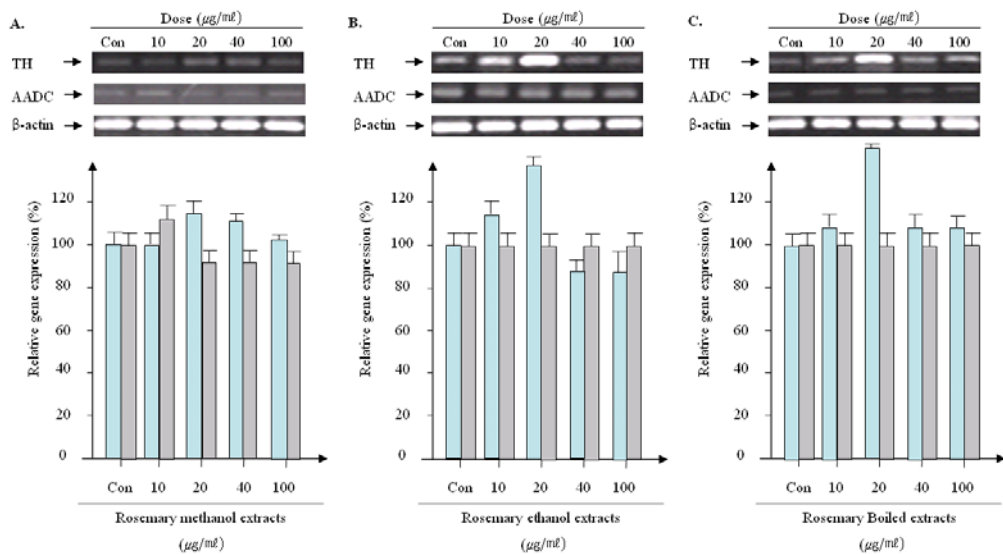


Fig 39. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

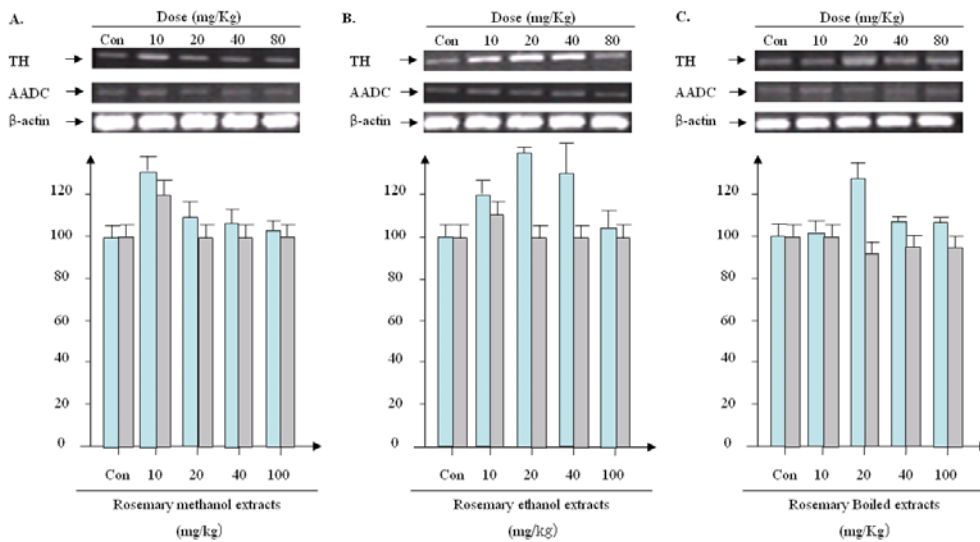


Fig 40. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

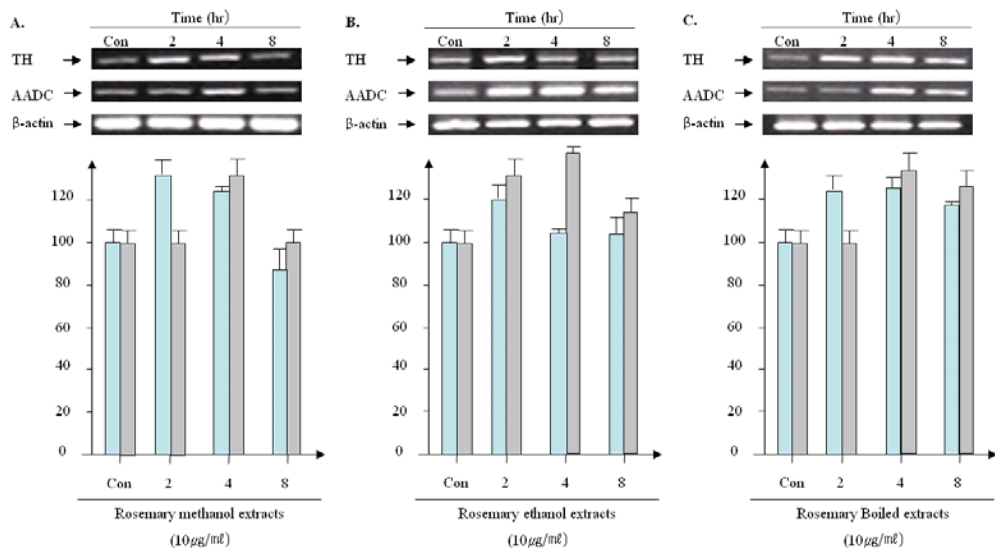


Fig 41. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various treatment time in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

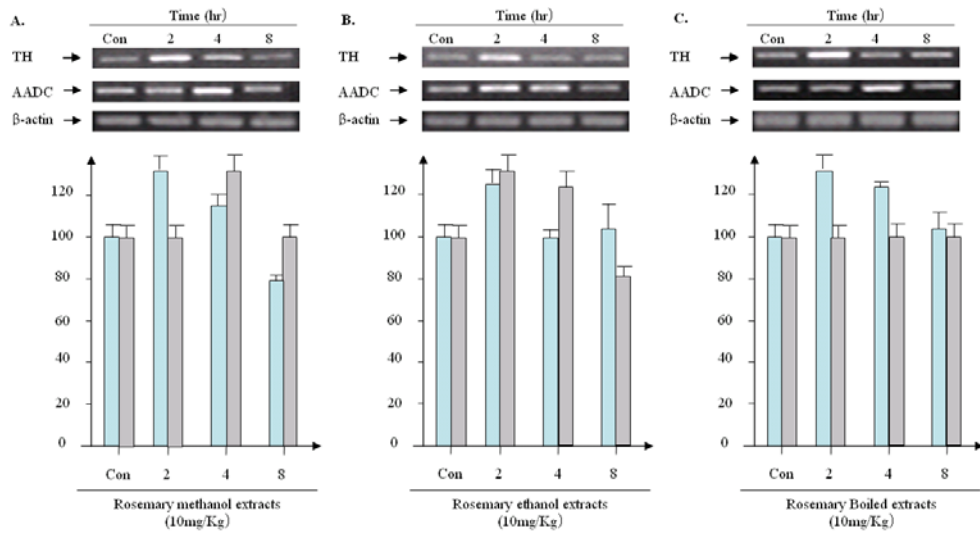


Fig 42. Gene induction of TH and AADC treated by various rosemary extracts as various treatment time in rat brain. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

다. 로즈마리 에탄올 추출물은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여하였을 때 TH 및 BDNF가 매우 높게 유도발현되어짐을 확인 할 수 있었다. 한편 로즈마리 열수추출물의 경우 투여 후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 높은 양의 TH를 유도발현하였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 상대적으로 감소시킴을 확인하였다. 반면 BDNF는 20~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여 농도에서 지속적으로 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다. 한편 실험동물에서의 유도발현은 로즈마리 메탄올, 에탄올 및 열수추출물을 처리하였을 때 40 mg/kg 에서 가장 높은 TH와 BDNF의 유도발현이 이루어지고 있음을 확인하였다.

4. 결과

로즈마리로부터 신경보호효능을 나타낼 수 있는 생리활성물질을 분리하기 위한 기초자료를 준비하기 위하여 메탄올, 에탄올 및 열수추출을 하여 추출물을 조제하였다. 이들의 세포독성을 분석한 결과 로즈마리 열수추출물이 293, PC12 및 SH-SY5Y 모두에서 세포독성이 없음을 확인하였으며, 메탄올 및 에탄올 추출물의 저농도에서도 특이한 세포독성이 없음을 확인하였다. 그러나 로즈마리 메탄올 및 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도로 처리할 경우 세포독성이 나타남을 확인하였다. 또한 이들 추출물에 의한 도파민 생합성 관련 유전자 및 신경영양인자의 유도발현을 분석한 결과 로즈마리 메탄올 추출물이 쥐의 뇌막을 통과하여 BDNF 및 TH의 유도발현이 이루어지고 있음을 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 확인하였다.

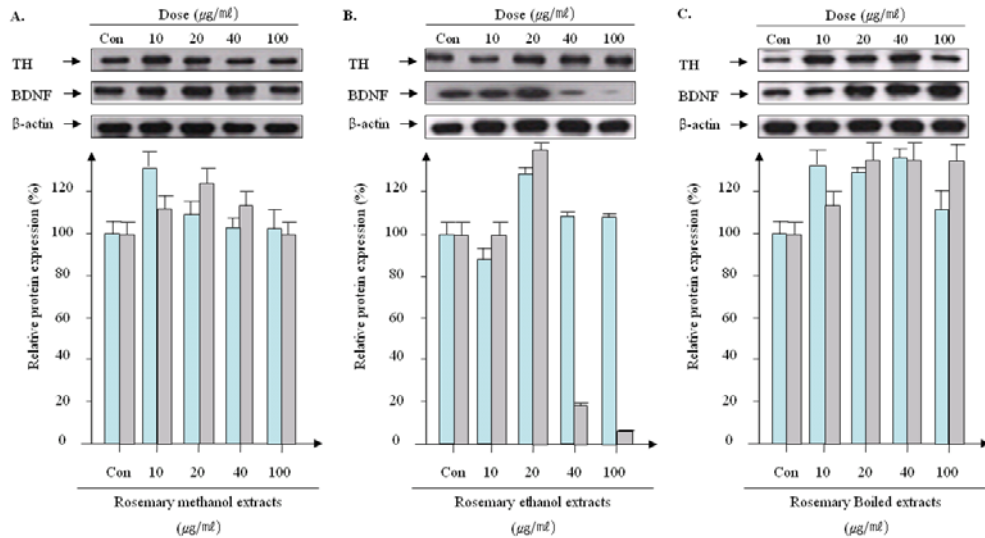


Fig 43. Protein expression of TH and BDNF treated by various rosemary extracts as various dose in rat brain. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

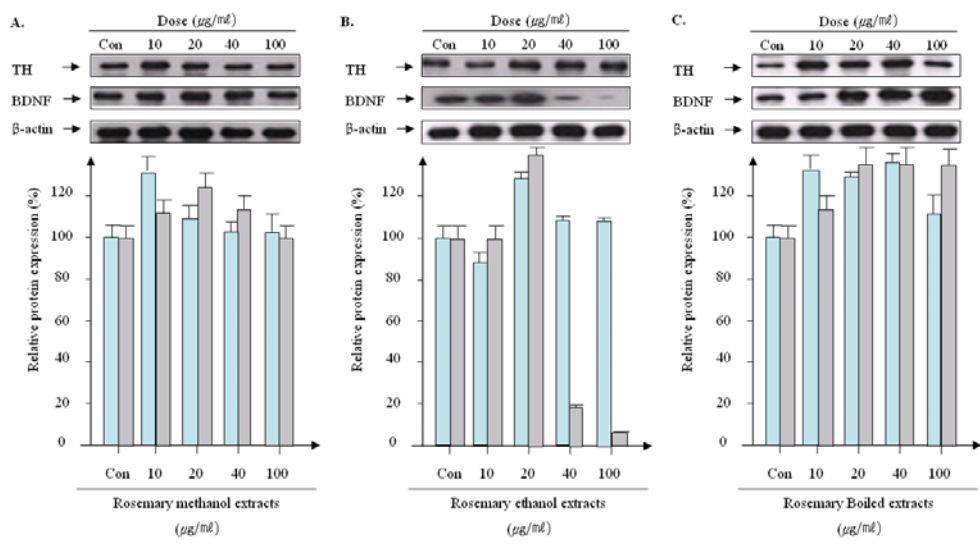


Fig 44. Protein expression of TH and BDNF treated by various rosemary extracts as various dose in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) methanol extracts, (B) ethanol extracts, (C) boiled extracts.

제 5 절 로즈마리로부터 생리활성물질 분리

1. 재료 및 방법

가. Rosemary 추출물 제조

본 실험에 사용한 로즈마리는 전라남도 장흥군 농업기술원에서 제공받아 사용하였다. 로즈마리 1,436 g 을 100% Methanol 5 ℓ 에 넣어 믹서기를 이용하여 잘게 갈아준 다음 2 개월간 암실에서 침지하였다.

나. Rosemary 추출액의 용매 분획

2 개월 동안 암실에서 방치한 Rosemary 추출액을 취하여 1차적으로 Wattman No. 2 paper 여과를 통하여 로즈마리 분쇄물을 걸러낸 후 최종적으로 2회의 원심분리를 이용한 원심분리여과를 통하여 남아있는 찌꺼기를 제거하여 추출액을 제조하였다. 또한 제조된 로즈마리 추출물을 여러가지 용매를 이용하여 활성물질의 용매 이행성을 조사하였다.

다. Rosemary 추출액 고형분 제조

Rosemary methanol 추출액 4 ℓ 를 취하여 50℃ 항온수조에서 rotary evaporator 를 이용하여 methanol을 완전히 제거하여 농축 고형물을 얻었다.

1) Hexane 분획물 제조

Methanol 이 제거된 고형물에 hexane 800 ml을 가하여 녹인 후 원심분리 여과방법으로 hexane 분획과 불용성의 고형물을 분리하였다.

2) Methanol 분획물 제조

3-1. 의 hexane 분획과정에서 hexane에 용해되지 않고 남아있는 고형물에 methanol 230 ml을 가하여 최종적으로 용해시켜 methanol 분획물로 사용하였다.

라. 로즈마리 용매분획물의 분리, 정제, 구조분석

1) Rosemary 추출물의 size에 의한 활성물질분리 : 1차 Sephadex LH-20 column Chromatography

Rosemary 1,436 g을 잘게 분쇄하여 100% methanol 5 ℓ에 2 개월 동안 침지시킨 추출액을 여과 및 원심분리 방법으로 찌꺼기를 제거한 후 rotary evaporator를 이용하여 농축 건조시켰다. 이렇게 얻어진 고형물에 용매 이행성을 확인하기 위하여 hexane 800 ml을 가하여 씻어준 후 rotary evaporator를 이용하여 감압, 농축시킨 후 남은 고형물에 methanol을 230 ml을 가하여 활성물질을 녹여내었다. Methanol 분획 230 ml을 rotary evaporator를 이용하여 감압, 농축시킨 후 얻어진 고형물 (각각 약 9.1 g)을 methanol 20~25 ml에 녹여서 Sephadex-LH 20 column chromatography를 수행하였다.

Sephadex-LH 20 column chromatography 은 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

- Column size : 3.4 X 117 cm
- Sample volume : 20 ~ 25 ml
- Solvent : Methanol
- Fraction volume : 15 ml/fraction
- Flow rate : 45 ml/hr

Column에 담겨진 sephadex LH-20 gel을 충전 시키고 시료 21 ml을 적하한 후 2 bed volume의 methanol로 elution하였다. 받아들인 각 분획들은 TLC (Thin layer chromatography)를 수행하여 물질들의 용출양상을 확인하였으며, 항산화 활성효과를

조사하였다.

2) Rosemary 추출물의 Sephadex LH-20 column chromatography 활성 분획물의 Silica-gel column chromatography 수행

위에서 얻은 항산화 활성을 보이는 시료를 rotary evaporator를 사용하여 건조시킨 후 이렇게 얻어진 고형물에 hexane 30 ml을 가하여 씻어준 용출액 (a), 남는 고형물에 CH_2Cl_2 을 30 ml씩 2 차례 가하여 씻어준 용출액 (b~c), ethylacetate 30 ml로 씻어준 용출액 (d), methanol 10 ml로 씻어준 용출액 (e)들의 항산화 활성을 조사하였다. 이 중 항산화 활성이 우수한 CH_2Cl_2 분획들은 합하여 ethylacetate 3 ml로 농축하여 원심분리한 후 아래와 같은 조건으로 Silica-gel column chromatography를 수행하였다.

- 전개 용매 Hexane : Ethylacetate = 10 : 1; 7 : 2; 1 : 1; 1 : 7

Hexane: Ethylacetate: MeOH = 1 : 7 : 1

- 각 fraction tube의 용출액 10 μl 씩 spotting

- 전개 후 육안, UV, 10% 황산용액 분무 후 가열하여 나타나는 spot 들을 확인하였다.

Column에 hexane에 담겨진 silica gel 을 충전 시키고 시료 10 ml을 적하한 후 5 bed volume의 hexane 용매로 washing 하였다.

Hexane : Ethylacetate = 10 : 1 (22 bed volume), 7 : 2 (21 bed volume),

1 : 1 (15 bed volume), 1 : 7 (9 bed volume)

Hexane : Ethylacetate : MeOH= 1 : 7 : 1 (9 bed volume)로 각각 용출 시켰다. 각 용출 분획물 들의 TLC 상의 spot과 항산화 활성을 조사하였다.

3) Silicagel column chromatography에서 부분 정제된 항산화 물질의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography

위의 과정에서 가장 좋은 활성을 보였던 Hexane:Ethylacetate = 10 : 1 의 두 번째, 세 번째 fraction만을 모아 size에 의한 활성물질 분리를 시행하였다.

가) 3번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography

Sephadex-LH 20 column chromatography 을 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

- Column size : 1.0 X 110cm
- Sample volume : 2 ml
- Solvent : Methanol
- Fraction volume : 3 ml/fraction
- Flow rate : 9 ml/hr

Column에 methanol에 담겨진 sephadex LH-20 gel을 충전 시키고 시료 2 ml을 적하한 후 2 bed volume의 methanol로 elution하였다. 받아진 각 분획들은 TLC(Thin layer chromatography)를 수행하여 물질들의 용출양상을 확인하였으며, 항산화 활성효과를 조사하였다.

나) 2차 Sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석

2차 Sephadex LH-20 column Chromatography를 수행한 후 TLC 분석과 항산화 활성분석을 실시하였다. 이 중 항산화 활성이 강한 27~31 번을 모아서 rotary evaporator를 사용하여 건조시킨 후 고형물을 얻었다. Prep-TLC를 수행하기 전에 이 물질의 TLC 상 최적 조건을 찾기 위한 예비 실험을 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

Hexane: Ethylacetate: Methanol= 10 : 1 : 0.1; 10 : 1 : 0.1 (acid MeOH), 10 : 1 :

0.1(base MeOH); 7 : 2 : 0.1, 7 : 2 : 0.1 (acid MeOH), 7 : 2 : 0.1 (base MeOH)
5 : 1 (3 times)

다) 2번째 fraction의 2차 sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석

2 번째 fraction의 2 차 sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석을 위해 서 2 차 Sephadex LH-20을 통해 나온 fraction 중 항산화 활성을 지닌 28, 29번만을 모아 Prep TLC를 통해 회수 하였다.

4) Rosemary 용매추출물의 Prep-TLC를 통한 최종 순수 분리

Size와 affinity를 통해 부분 정제된 항산화 활성 물질을 analytical TLC를 통하여 활성물질이 분리되는 최적의 전개 용매 조건을 찾는다. Prep-TLC를 이용하여 항산화 물질을 최종적으로 순수 분리한다.

가) Hexane: Ethylacetate=10:1 => 3번째 농축물

2차 Sephadex LH-20 후 얻어진 4-3-2)의 분획물 27번~31번 fraction을 rotary evaporator를 사용하여 Methanol 2 ml로 농축 후 Prep-TLC(10 X 20 cm)를 사용하여 spotting한 후 Hexane: Ethylacetate = 9 : 2 에 2 회 전개 시킨 후 나타난 spot 부분만을 회수하여 acetone 으로 활성물질을 용출시켰다.

나) Hexane: Ethylacetate=10:1=> 2번째 농축물

2차 Sephadex LH-20 후 얻어진 분획물 28번 29번 fraction을 rotary evaporator를 사용하여 Methanol 1 ml로 농축 후 Prep-TLC(10 X 20 cm)를 사용하여 spotting한 후 Hexane : Ethylacetate = 9 : 2에 2 회 전개 시킨 후 나타난 spot 부분만을 회수하여 acetone 으로 활성물질을 용출시켰다.

마. 항산화 물질인 CS H-1, CS H-2의 Carnosic acid와의 TLC 분석

차별성: Rosmarinus officinalis에서 분리된 기지물질인 carnosic acid를 Sigma 사에서 구입하여 본 연구에서 분리한 CS H-1, 2와의 차별성을 조사하였다.

2. 실험결과

가. 용매 이행성에 따른 항산화 효과

로즈마리 추출물의 용매 이행성에 따른 항산화 효과를 보기 위하여 hexane을 가하여 씻어준 후 감압, 농축시킨 후 남은 고형물에 methanol을 가하여 활성물질을 녹여내었다. 이 후 항산화 활성의 검증결과 hexane 층에서는 활성이 나타나지 않았으나, methanol 층에서는 항산화 활성이 있음을 보여주었다. 또한 2 종의 용매 분획물의 항산화 활성효과를 확인한 결과 Fig. 45과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

* 항산화 활성의 경우 DPPH solution 의 sample과의 탈색반응을 518 nm에서 관측함으로써 측정 하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)

$$\% \text{RSA(Radical Scavenging Activity)} = 100 \times (1 - A_E/A_D),$$

A_E : absorbance of the solution, A_D : absorbance of the DPPH solution

나. 각 분획별 항산화 활성 양상

Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하여 size에 따른 활성물질을 분리하여 Fig. 46의 결과와 같이 받아진 각각의 분획들의 항산화 활성이 있는 부분만을 취하여 10 ml에 농축시키고 TLC를 수행하여 물질의 용출양상을 확인하였다. TLC 확인 결과 Fig. 47과 같이 Hexane : Ethylacetate = 7 : 2에서 잘 분리된 Spot들이 확인되었다.

다. 활성 분획물의 Silica-gel column chromatography 수행

Silicagel column chromatography에 의한 물질의 분리를 수행하기 전 2차적으로 용매에 의한 항산화 활성 물질의 이행성을 조사하기 위하여 얻어진 고형물에

hexane 30 ml을 가하여 씻어준 용출액 (a), 남는 고형물에 CH_2Cl_2 을 30 ml씩 2 차례 가하여 씻어준 용출액 (b~c), ethylacetate 30 ml로 씻어준 용출액 (d), methanol 10 ml로 씻어준 용출액(e)들의 항산화 활성을 조사한 결과 Fig. 48 과 같이 CH_2Cl_2 분획인 b와 c에서 가장 높은 항산화 활성이 있음을 확인하였다. 이 중 항산화 활성이 우수한 CH_2Cl_2 분획들은 합하여 Silica-gel column chromatography를 수행하여 활성을 확인한 결과 항산화 활성은 Hexane : Ethylacetate = 10 : 1 과 7 : 2에서 나타난 것을 볼 수 있었는데, 주요 활성은 Hexane : Ethylacetate = 10 : 1에서 용출되어짐을 확인할 수 있었다. 또한 Hexane: Ethylacetate = 10 : 1의 조건으로 TLC 를 수행하여 Fig. 49에서와 같이 TLC 상에 나타나는 spot 들의 pattern에 따라 각 fraction을 아래의 4 group으로 나누어 농축하였다.

- I. fraction number 1번 5 ml로 농축
- II. fraction number 2번 2.5 ml로 농축
- III. fraction number 3~7번 5 ml로 농축
- IV. fraction number 8~22번 10 ml로 농축

농축한 4 가지 시료의 항산화 활성효과를 조사한 결과 Fig. 50와 같이 II, III 분획에서 주요 활성이 나타남을 확인하였다. 두 물질이 다른 것임을 밝히기 위하여 Fig. 53에서와 같이 각 분획별 TLC pattern을 확인한 결과 II번 III번 물질이 다른 물질임을 확인할 수 있었다.

Hexane : Ethylacetate = 7 : 2의 경우는 Fig. 51에서와 같이 TLC 상에 나타나는 spot 들의 pattern에 따라 각 fraction을 아래의 3 group으로 나누어 농축하였다.

- I. fraction number 1~6번 10 ml로 농축
- II. fraction number 7~12번 10 ml로 농축
- III. fraction number 13~21번 10 ml로 농축

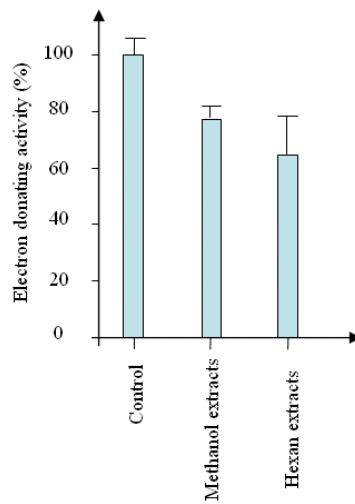


Fig 45. Anti-oxidant activity of different solvent condition.

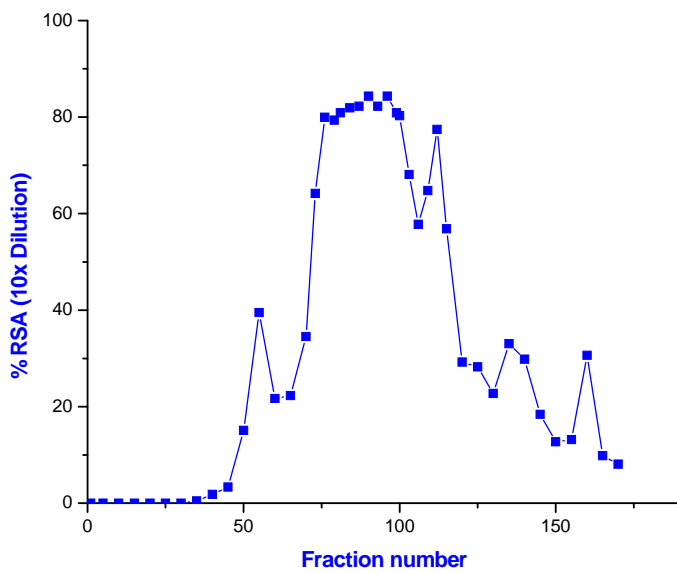


Fig 46. Anti-oxidant aspect of sephadex LH-20 column chromatography fractions.

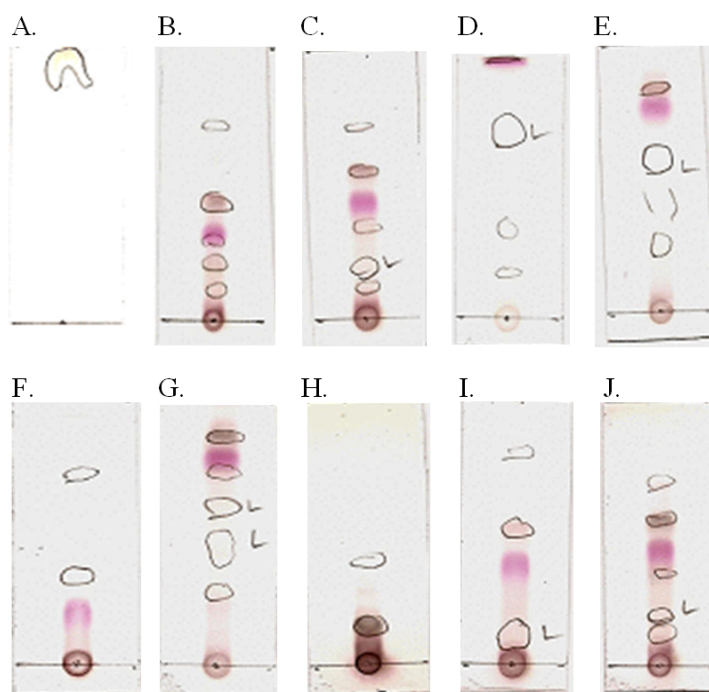


Fig 47. Patterns of TLC analysis.(A. 100% MeOH, B. 5:1, C. 5:2, D. 5:3, E. 5:4, F. 6:1, G. 6:5, H. 7:1, I. 7:2, J. 7:3)

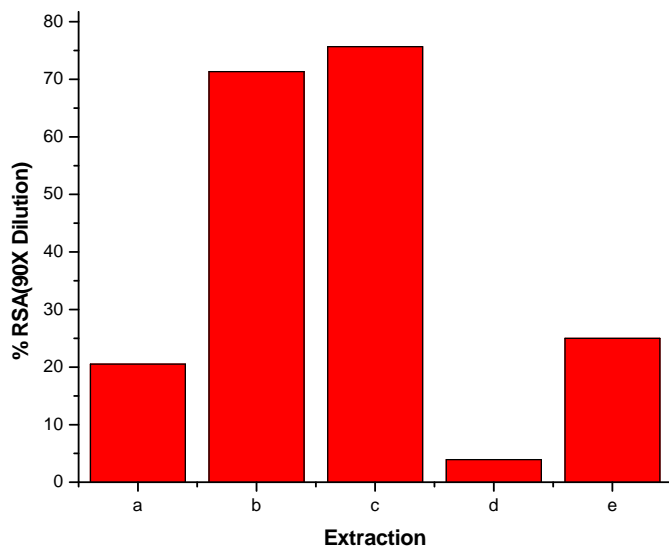


Fig 48. Anti-oxidant activity of rosemary effluent.



Fig. 49. TLC analysis condition in Hexane : EtAC = 10 : 1.

농축한 3 시료의 항산화 활성효과를 조사한 결과 7 : 2의 경우 Fig. 52과 같이 I 분획에서 주요 활성이 나타났다. 그러나 Hexane : Ethylacetate = 7 : 2의 첫 번째 분획의 항산화 활성은 10 : 1에 비교하여 4 배 더 작은 것이므로 대부분의 주요 활성은 Hexane : Ethylacetate = 10 : 1에서 용출되어짐을 확인할 수 있었다.

라. 3번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography

Silicagel column chromatography에 의한 분획물 중 항산화 활성이 있는 Hexane : Ethylacetate = 10 : 1 의 세 번째 fraction만을 모아 재차 Sephadex LH-20 column chromatography의 size에 의한 활성물질을 분리 후 그 분획물 들의 size에 의한 TLC 분석과 항산화 활성 분석을 시행한 결과 Fig. 53 ~ Fig. 57 과 같은 결과를 얻었다. 그 중 항산화 활성이 강한 27 ~ 31번만을 모아 rotary evaporator를 사용하여 건조시킨 후 고형물을 얻었다. Prep-TLC를 수행하기 전에 이 물질의 TLC 상 최적 조건을 찾기 위한 예비 실험을 행하였다. 그 결과 7 : 2 : 0.1의 물질의 분리가 용이함을 확인할 수 있었다.

마. 2번째 fraction 의 2차 Sephadex LH-20 column Chromatography

Silicagel column chromatography에 의한 분획물 중 항산화 활성이 있는 Hexane:Ethylacetate = 10 : 1 의 2번째 fraction의 2차 sephadex LH-20 후 TLC 분석과 항산화 활성분석을 수행한 결과 Fig. 58 ~ Fig. 59 의 결과를 얻을 수 있었다. 2차 Sephadex LH-20을 통해 나온 fraction 중 28, 29번이 가장 높은 항산화 활성을 지닌 것으로 확인 되어 28, 29번만을 모아 Prep TLC를 통해 회수하였다.

바. Rosemary 추출물의 Prep-TLC 최종 순수 분리

로즈마리 추출물의 최종 순수 분리를 한 3 번째 농축물질의 TLC 분석과 항산화 활성을 분석하였으며 이 물질을 CS H-1 로 명명하였다. 또한 2번째 농축물질의 TLC 분석과 항산화 활성을 분석하였으며, 이 물질을 CS H-2 로 명명하였다.(Fig. 60, 61)

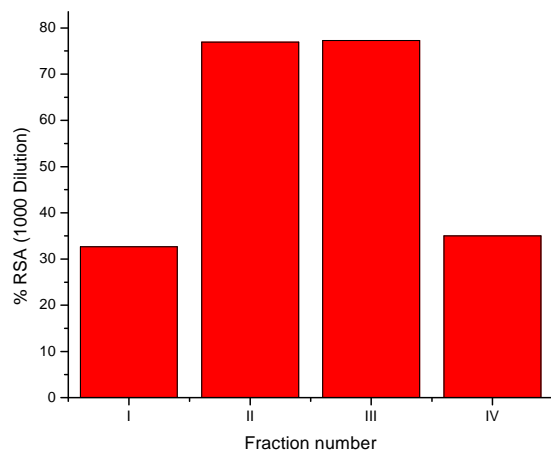


Fig 50. Anti-oxidant activity of Rosemary concentration in Hexane : EtAC = 10 : 1.

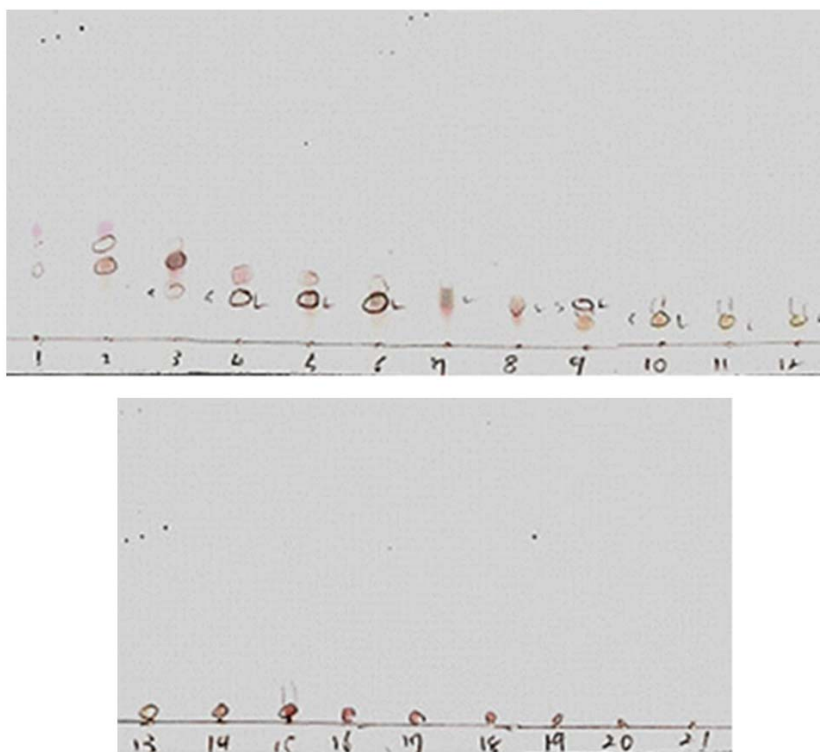


Fig. 51. TLC analysis condition in Hexane : EtAc = 7 : 2.

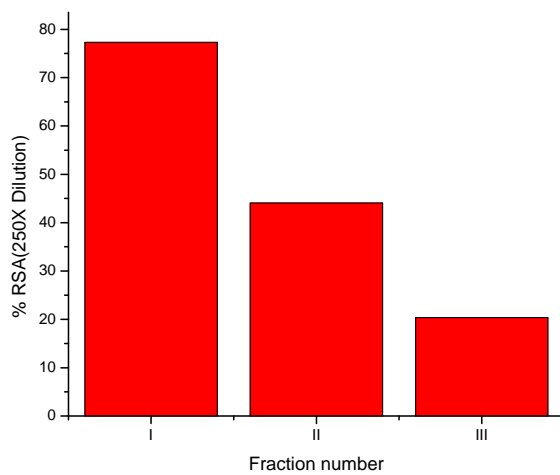


Fig. 52. Anti-oxidant activity of rosemary concentration in Hexane : EtAC =7 : 2.

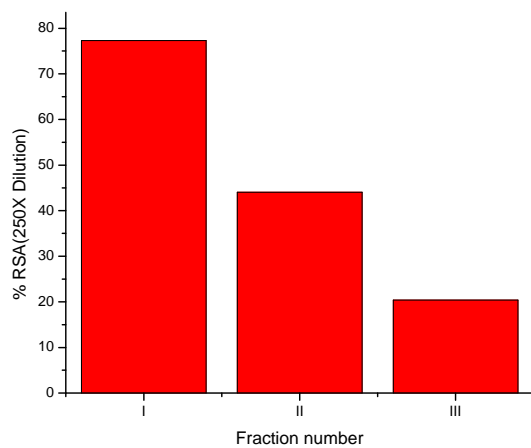


Fig. 53. TLC pattern fraction in Hexane : EtAC = 10 : 1.

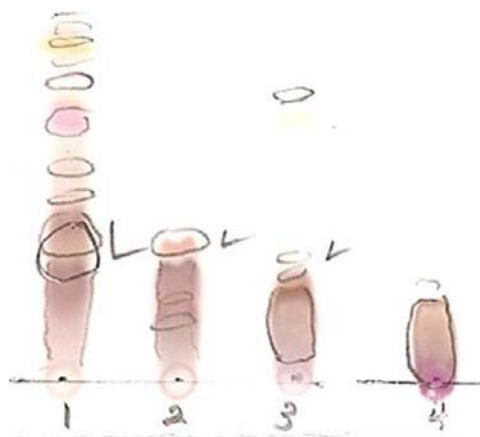


Fig 54. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography. (Hexane : EtAc = 10 : 1)

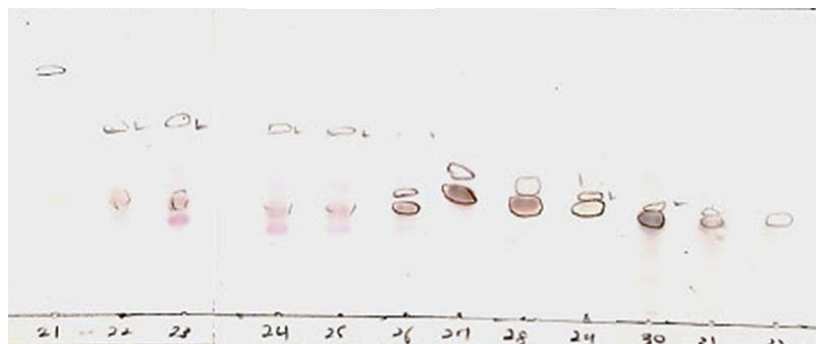


Fig 55. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography. (Hexane : Ethylacetate = 7 : 2 , fraction volume : 3 ml/fraction)

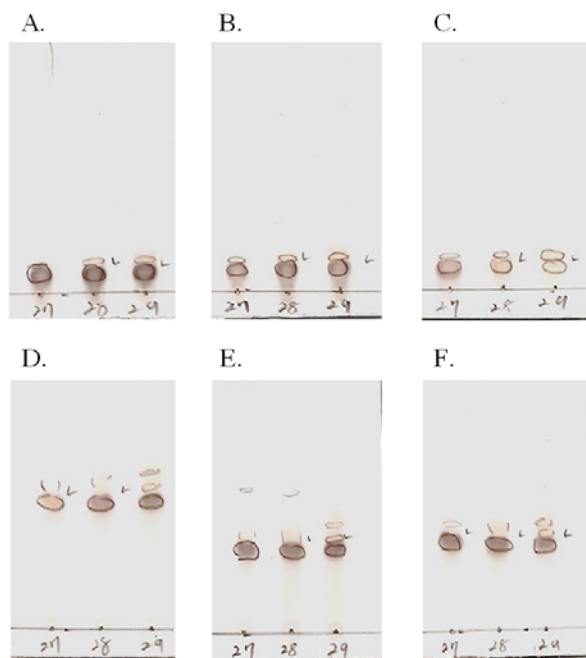


Fig. 56. TLC analysis of Third fraction after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography. (Hexane : Ethylacetate : Methanol = A. 10:1:0.1, B. 10:1:0.1(acid MeOH), C. 10:1:0.1(base MeOH), D. 7:2:0.1, E. 7:2:0.1(acid MeOH), F. 7:2:0.1(base MeOH))

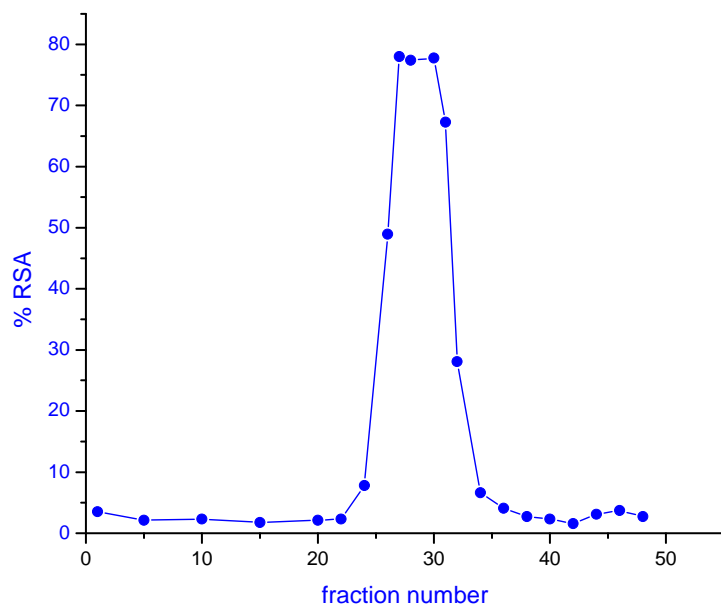


Fig 57. Anti-oxidant activity after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography.

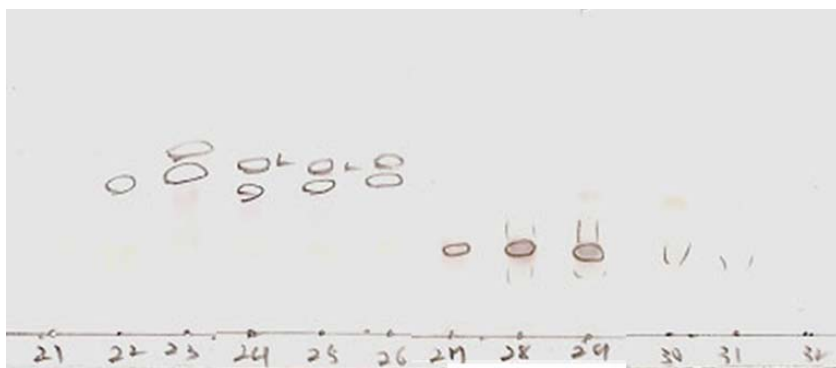


Fig 58. TLC analysis of Second fraction after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography.

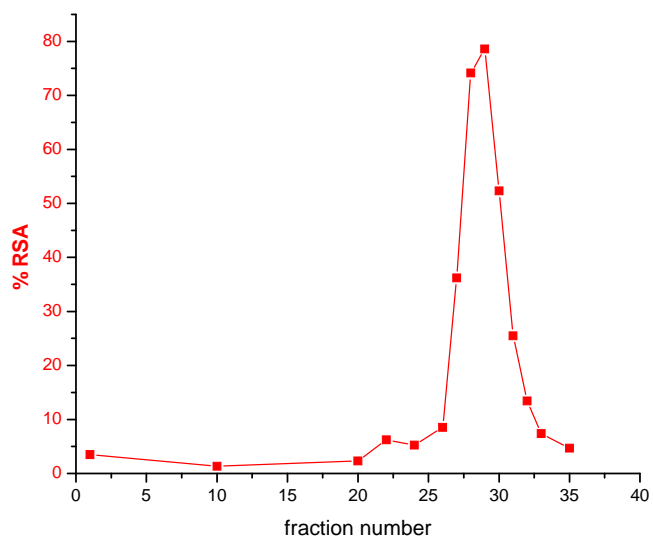


Fig 59. Anti-oxidant activity after 2nd Sephadex LH 20 column chromatography.

사. CS H-1, CS H-2의 Carnosic acid와의 TLC 분석

본 실험에 사용된 Rosemary 추출물에서 분리된 항산화 물질 CS H-1, CS H-2가 항산화 작용이 강력한 것으로 알려진 Rosemary에서 분리된 기지물질인 carnosic acid와 다른 물질임을 규명하고자 carnosic acid를 Sigma사에서 구입하여 본 연구에서 분리한 CS H-1, 2와의 차별성을 조사한 결과 Fig. 62와 같은 결과를 얻을 수 있었다. TLC 상의 분석결과 물질의 고유의 값인 Rf값과 육안으로 볼 수 있는 발색 정도, UV 흡수 pattern, 10% 황산 분무에 의한 변화 등을 비교하였을 때 *Rosmarinus officinalis*로부터 나오는 항산화 활성이 강력한 Carnosic acid와는 다른 항산화 활성을 지닌 물질 CS H-1, CS H-2를 얻었음을 확인 할 수 있었다.

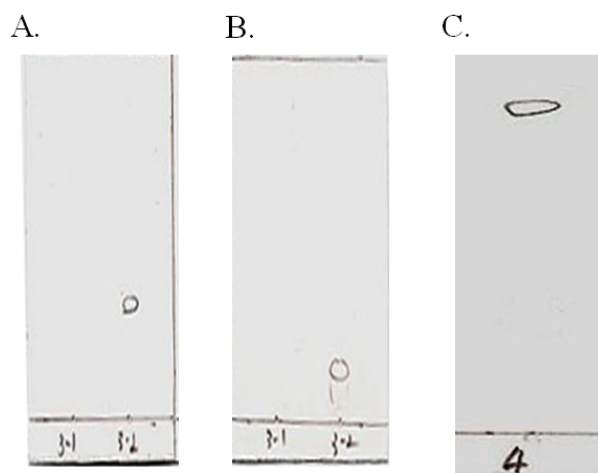


Fig 60. TLC analysis of CS H-1 (Hexane : Ethylacetate = A. 7 : 2, B. 9 : 2) and CS H-2.

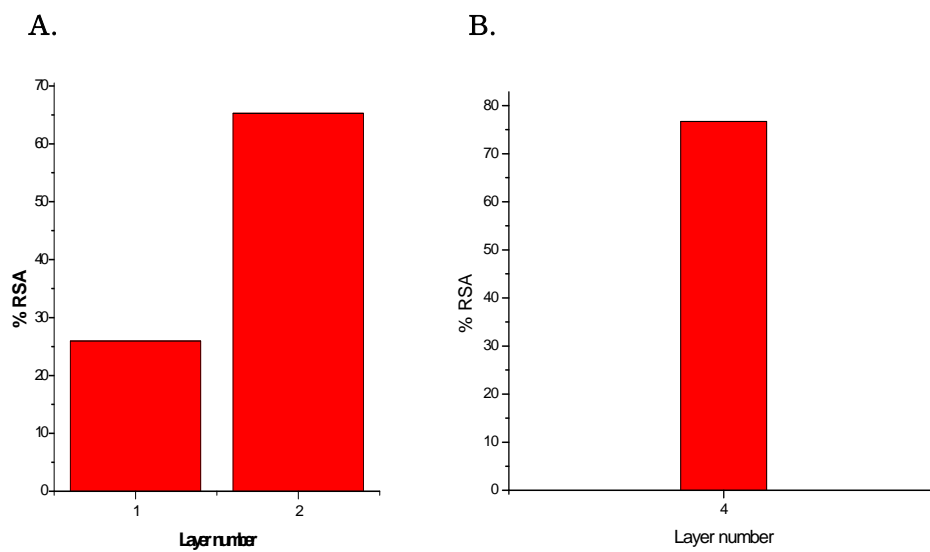


Fig 61. Analysis of CS H-1 (A) and CS H-2 (B) anti-oxidant activity.

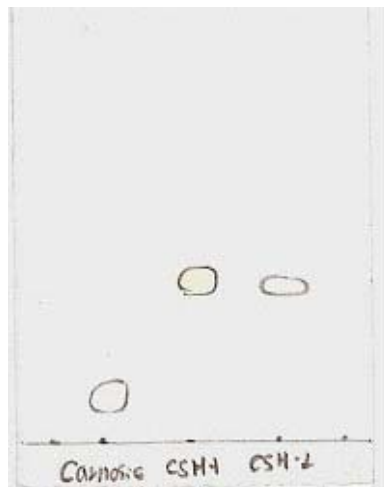


Fig 62. TLC analysis comparing with Carnosic acid.

제 6절 허브를 이용한 기능성시제품 제작 및 이에 대한 신경보호 효과 분석

1. 연구배경

최근 농촌진흥청 원예연구소가 실험용 쥐를 이용해 꽃향기 중에 나팔나리와 나도풍란의 향기가 스트레스 완화효과가 있음을 구명했다. 전기자극으로 실험용 쥐에 스트레스를 가한 후 여러 가지 절화를 꽃아 두고 쥐의 혈중 코티졸 농도를 측정한 결과 꽃이 없는 경우에 비해 나팔나리, 나도풍란 꽃이 있는 곳에서 각각 mL 당 100 ng, 50 ng감소해 스트레스 완화에 가장 효과적인 식물로 밝혀졌다. 또 이를 초등학생이 시험을 치를 때 발생하는 스트레스에 적용한 결과 완화 효과가 있음을 입증했다. 수하시험을 치르는 초등학생 교실에 나팔나리 꽃을 꽃아 두고 시험 전후에 타액 속에 스트레스 호르몬 코티졸 농도를 측정한 결과 꽃이 없는 반에서는 시험으로 인해 코티졸이 mL 당 50 ng 증가한 반면 꽃향기가 있는 반에서는 20 ng정도만 증가했다. 이러한 보고에 앞서 허브의 다양한 향기는 사람들의 스트레스를 완화시키거나, 긴장감 완화 및 근육 이완 등의 다양한 기능을 하고 있으며, 이러한 향기 기능을 이용하여 최근에는 허브에서 추출한 에센셜 오일을 이용한 향기요법이 개발되어졌다. 아로마테라피의 기본 원리는 코와 피부를 통해 향을 뇌에 전달함으로써 정신적, 신체적 치료 효과를 가져오는 것이다. 진통제, 해열제 등 가정에서 필요한 상비약들에 대신하여 간단히 사용할 수 있을 뿐만 아니라 우울증의 개선 효과라든가, 피로감으로부터 탈출시켜주는 작용을 하기도 한다. 또한 피부 미용에도 탁월한 효과를 발휘하여 아로마를 응용한 향수나 화장품들이 이미 많은 사람들에게 호응을 얻고 있으며 주변 환경을 개선하는 방향제로도 아주 효과적이다. 최근 들어서 아로마테라피는 대체의학으로 연구되고 응용 될 뿐만 아니라 임상실험을 통해 그 치료효과가 계속 검증되고 있다. 아직 우리에게는 다소 생소하게 느껴질 수 있는 아로마테라피지만 적절한 에센셜 오일의 사용은 무해할 뿐만 아니라 우리의 생활을 한결 윤택하게 해 줄 것이

다. 따라서 본 연구는 허브재배농가의 새로운 고부가가치 소득원으로 개발하고자 로즈마리 추출물을 포함하는 시제품을 개발하였으며, 천연 식물 추출물로서 무독성이고, 신경보호효과 뿐만 아니라 높은 항산화 활성을 나타내므로 파킨슨 병 등의 퇴행성 질환의 치료 및 예방을 위한 식품, 화장품 및 치료제로서 사용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

2. 재료 및 방법

가. 로즈마리를 이용한 essential oil의 제조

로즈마리 300 g을 세척한 후 70% 메탄올과 함께 증류 플라스크에 첨가한 후 증류 농축기에서 약 120℃ 에서 5 시간 정도 가열하여 생성된 기체를 증류 농축기 내부의 냉각관을 통해 냉각시켜 로즈마리 정유를 추출하고, 이를 0.2 μm filter를 사용하여 여과시켜 로즈마리 정유를 얻었다 (Fig. 63).

나. 실험동물 사육

실험동물은 조선대학교 실험동물센터로부터 specific pathogen free 상태로 사육된 12주의 sprague-Dawley 수컷을 실험에 사용하였고, 온도는 20±2℃, 습도 60±10%, 조명은 하루 12 시간 간격으로 광과 암을 자동 조절하여 사육하였다.

다. 로즈마리 essential oil의 처리

로즈마리로 만든 essential oil을 12 주의 sprague-Dawley rat에 30 분씩 처리 한 후 2 시간, 4 시간, 및 8 시간 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌는 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정시킨 후 30% sucrose에 담궈서 cryo-protection을 한다. sucrose 용액 내에 완전히 가라앉은 뇌를 cryosection기를 이용하여 35 μm 두께로 자른 후 storage solution에 보관하였다.

라. Immunohistochemistry

35 μm 두께로 잘라진 조직을 PBS으로 5 분간 씻어준 다음 3% H_2O_2 에 15 분간 처리한 후 다시 0.25% Triton X-100에 20 분간 처리한다. 3% BSA를 이용하여 1 시간 동안 blocking 시켜준 후 일차항체(anti-TH antibody, anti-AAADC antibody : 각각 1 : 1000으로 희석)를 24 시간 동안 처리한 후 이차항체를 2 시간 동안 처리한다. 각각의 단계 후에는 5 분간 PBS로 씻어준다. Vectastain kit의 A, B reagent의 mixture를 만들어서 30 분간 처리하고 다시 PBS로 5 분간 씻어준다. DAB solution 과 H_2O_2 를 이용하여 조직을 염색시킨다.

3. 결과

가. 로즈마리 essential oil의 한 신경보호효과 분석 (tyrosine hydroxylase 및 aromatic amino acid decarboxylase 유도발현)

로즈마리 essential oil 처리 후 시간에 따른 발현량을 분석한 결과 시간이 경과할 수록 TH 및 AADC의 발현량이 증가함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 64, 65). Rat에 처리 후 4 시간이 경과하면서부터 TH 발현량이 크게 증가하였으며 8 시간에서 가장 높은 유도 발현을 나타냈다. AADC는 2 시간, 4 시간에서는 발현량이 크게 증가하지는 않았지만 8시간에서는 가장 많은 발현량을 나타냈다. 이는 TH에 의하여 tyrosine 이 L-dopa로 전환되어진 후 AADC에 의하여 dopamine으로 전환되기 때문에 TH와 AADC가 발현되는 시간에서 차이를 나타낸 것이다. 이 실험을 통해서 DBH의 발현은 확인되지 않았지만 AADC가 발현되는 것으로 보아 장시간 처리하였을 경우 dopamine이 발현될 것이며 DBH 역시 발현될 것으로 사료 되어진다. Essential oil에 의한 AADC와 TH의 발현은 직접 투여하지 않고 로즈마리 향기를 맡는 것만으로도 dopamine의 합성이 가능하며 dopaminergic neuron에 대한 보호효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여주고 있다.



Fig. 63. Anti-neurodegradative protocyte product using Rosemary extracts.

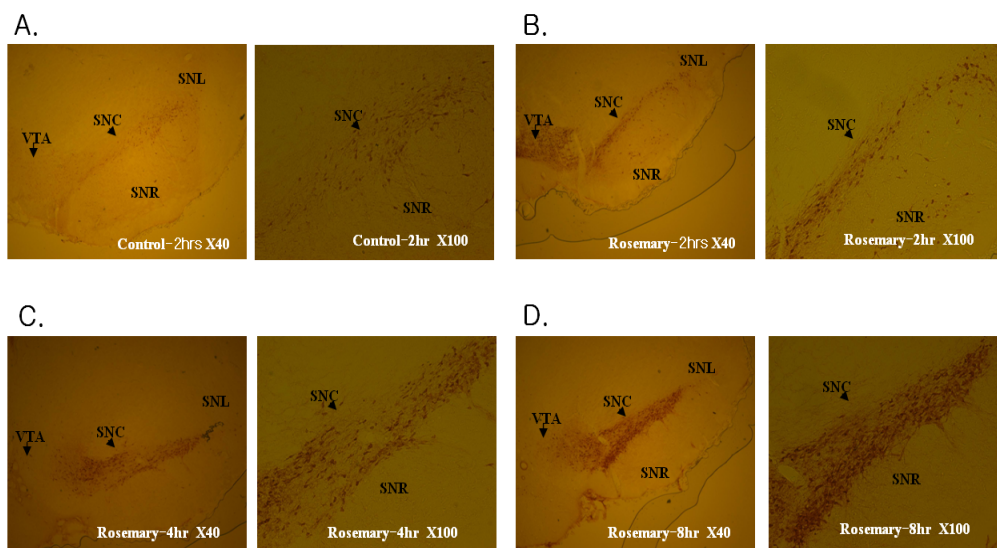


Fig. 64. Time-dependent expression of tyrosine hydroxylase (TH) treated by Rosemary essential oil in rat substantia nigra.

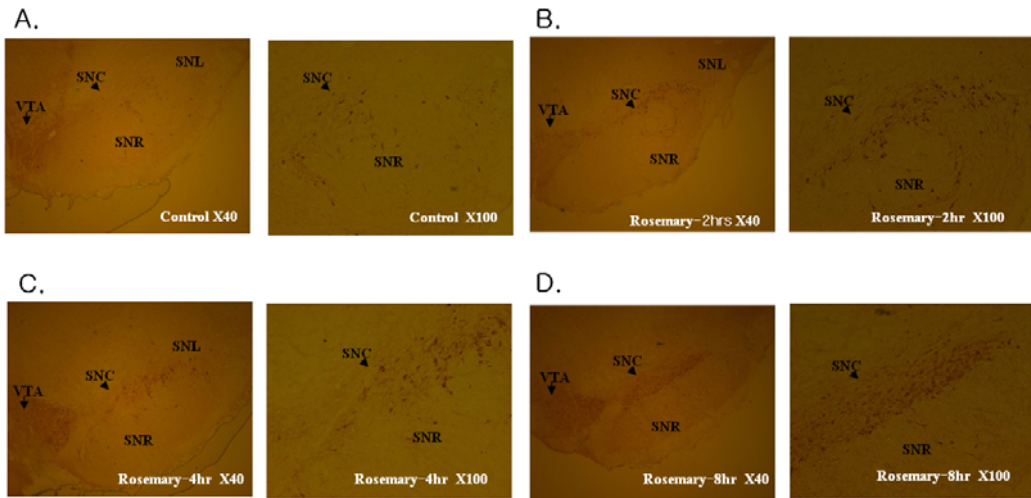


Fig. 65. Time-dependent expression of aromatic amino acid decarboxylase(AADC) treated by Rosemary essential oil in rat substantia nigra.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 1차년도 연구개발 목표 : 도파민 생합성 관련 및 신경영양인자 발현유도에 대한 우수허브 선정

로즈마리, 레몬버베나, 그린타임, 체리세이지, 허니씨클, 애플민트, 레몬밤, 슈퍼민트, 디지털리스, 로즈제라늄, 마리노라벤더, 스테비아, 레몬그라스, 파인애플 민트, 오레가노, 페퍼민트 등 16 종의 국내 자생 허브를 상수허브랜드로부터 구입하여 이를 70% 메탄올 및 70% 에탄올을 이용하여 이들로부터 각각의 추출물을 조제하여 동결 건조 후 시료로 사용하였다. 또한 본 연구를 수행하기 위하여 PC12 cell line, SH-SY5Y, 293 세포를 분양받아 배양하였으며, 이들 세포를 이용하여 각 허브 추출물에 대한 투여 농도 및 투여 시간에 따른 세포독성을 분석하였다. 또한 신경보호효능이 우수한 허브를 선정하기 위하여 일차적으로 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상을 억제시킬 수 있는 허브를 선정하기 위하여 관련 논문 및 문헌조사를 수행하였으며, 각 허브 추출물에 대한 항산화효능을 분석하였다. 또한 도파민 생합성과 관련된 유전자인 TH, AADC의 유도발현과 관련하여 PC12 및 SH-SY5Y (for *in vitro* test), 실험동물 (for *in vivo* test) Rat에서 투여량 및 투여시간에 따른 발현을 분석하기 위하여 mRNA 수준 및 protein 수준에서 분석하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 16종의 허브 중 레몬버베나, 로즈마리, 마리노라벤더, 레몬밤 등 신경퇴행성을 예방할 수 있는 우수 허브를 선정하였다. 한편 신경영양인자는 신경세포의 생존과 성장에 있어서 필수적인 물질로 이들의 유도발현 역시 신경세포의 퇴행성을 억제시키게 된다. 따라서 본 연구에서는 BDNF, GDNF의 유도발현을 관련하여 PC12 및 SH-SY5Y (for *in vitro* test), 실험동물 (for *in vivo* test) Rat에서 투여량 및 투여 시간에 따른 발현을 분석하기 위하여 mRNA 수준 및 protein 수준에서 분석하였다. 뿐만 아니라 직접적인 조직 내에서의 유도발현을 분석하기 위하여 실험동물에 우수

허브로 선정된 허브 추출물을 구강 투여 하여 직접적으로 쥐의 뇌에서 TH의 유도발현을 면역조직화학적 방법을 이용하여 분석하였다.

제 2절 2차년도 연구개발 목표 : 허브에 의한 산화적 스트레스 및 유용약리활성물질 탐색

BH4에 의한 산화적 스트레스에 의하여 신경세포의 미토콘드리아 DNA 손상에 의하여 유도되어지는 신경퇴행성에 관하여 분석하였다. 일반적으로 허브의 다양한 생리활성 기능 중 항산화효능이 가장 잘 밝혀졌다. 특히 로즈마리로부터 강력한 항산화력을 가진 다양한 물질이 분리정제 되어졌는데 대표적으로 carnosol, carnosic acid, rosemarinin 등을 들 수 가 있다. 따라서 2차년도 연구에서는 산화적 스트레스에 의한 신경세포보호효과를 분석하기 위하여 신경세포 퇴행성중 산화적 스트레스에 의하여 유도되어지는 apoptosis에 대한 영향을 분석하였다. 따라서 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도시키고 이에 로즈마리 추출물을 처리하여 caspase-3, caspase-8, caspase-9 등에 의하여 유도되어지는 apoptosis pathway를 중점적으로 분석하여 로즈마리 추출물이 산화적 스트레스를 억제시킴으로써 신경세포를 보호하고 있음을 분자적으로 밝혔다. 또한 carnosol에 의하여 신경세포의 보호효능을 분석하여 국제전문학술지인 **Neuroreport**에 발표하였다. 한편 로즈마리 추출물로부터 유용기능성물질을 분리하기 위하여 로즈마리로부터 메탄올, 에탄올, 열수추출물을 조제하여 이들에 대한 신경영양인자 BDNF 및 GDNF의 유도발현을 PC12, SH-SY5Y, rat에서의 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 분석하여 메탄올 추출물이 가장 적합함을 분자적으로 밝혔다. 이를 기초로하여 로즈마리 핵산추출물, 메탄올 추출물 등을 조제하여 이들을 다양한 분리정제 방법을 통하여 2 종의 항산화활성을 나타내는 물질을 분리정제 할 수 있었다.

제 3절 3차년도 연구개발 목표 : 신경퇴행성 예방 기능성 시제품 제작 및 이에 대한 기능성분석

로즈마리 essential oil 추출 및 방향성 시제품을 제조하여 이에 대한 신경퇴행성 보호효과를 분석하였다. 가슴기의 원리를 이용하여 30 분에 1 분간 로즈마리 기능성 시제품을 분사시켜 2, 4, 및 8시간 동안 반응 시킨 후 쥐 뇌를 적출하여 분석한 결과 TH 및 AADC가 강력하게 유도발현 되어짐을 확인 할 수 있었다. 이를 증명하기 위하여 쥐의 olfactory bulb 및 substantia nigra 부분을 부분 절취하여 이들로부터 mRNA 및 단백질 수준에서의 유도발현을 분석하였으며, 면역조직화학법을 이용하여 시제품에 의한 도파민 생합성관련 유전자들의 유도발현을 분석할 수 있었다. 또한 본 연구결과를 토대로 하여 시제품에 대한 기술특허를 출원하였다. (출원인: 조선대학교 산학협력단, 출원번호 : 10-2007-0048679, 출원일자 : 2007년 05월 18일)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 추가연구의 필요성

본 연구에서는 16 종의 국내 자생 및 재배 허브들로부터 항산화활성 및 세포독성 효과를 분석하고 도파민 생합성 관련 유전자인 AADC 및 TH, 신경영양인자의 유도 발현을 분석하여 이로부터 신경퇴행성 예방가능성을 가진 허브류로 레몬버베나, 로즈마리, 레몬밤, 마리노 라벤더를 선정할 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 매우 광범위한 연구를 수행하여야 되는 관계로 로즈마리에 제한하여 산화적 스트레스에 의한 신경보호효능, 로즈마리로부터 분리된 carnosol에 의한 신경보호효과, 신경영양인자의 유도발현 등을 western blotting을 이용하여 단백질 수준에서의 유도발현을 검증하고, q-PCR 및 관련된 유전자의 primer를 이용하여 mRNA 수준에서 유도발현을 검증하였다. 따라서 레몬버베나, 레몬밤, 마리노 라벤더의 경우 항산화효능 및 세포독성효능이 로즈마리와 매우 유사한 수준으로 이에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료되어진다. 뿐만 아니라 최근 향기에 의한 스트레스 감소에 대한 연구가 진행되어지고 있다. 본 연구에서도 로즈마리 추출물을 이용하여 제조한 시제품의 향기에 의한 신경보호효능을 분석한 바 AADC 및 TH가 유도발현됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 후각신경이 연결되어있는 olfactory bulb에서도 AADC 및 TH 유전자가 매우 빠른 시간 내에 발현되어짐을 확인하였다. 따라서 로즈마리 뿐만 아니라 다양한 허브류의 방향성 성분에 의한 신경보호효능을 분석이 요구되어진다. 또한 본 연구에서는 화훼농가 및 허브 재배 농가에서 상품으로 재배되어지는 서양허브를 수집하여 연구를 진행하였으나, 국내에서도 다양한 방향성 약용식물들이 산재하여있으나 국내 유용식물자원 및 이를 이용한 고부가가치 상품개발을 위해서 국내 방향성 약용식물에 대한 신경퇴행성과 관련된 기능성 분석이 요구되어진다. 또한 본 연구팀에 의하여 연구가 제한되어져 있는 방향족 물질 성분의 포집 및 이에 대한 분석연구가 필요로 되어진다. 특히 로즈마리의 경우 21 가지 이상의 방향족 성분이 포함되어져

있는 것으로 보고되어졌다. 따라서 이러한 방향족 물질의 포집 및 기능성 분석 수행 후 이를 이용한 기능성 상품의 개발이 필요로 되어진다.

본 연구과제의 수행 결과를 토대로 하여 로즈마리 추출물의 도파민 생합성 관련 신경의 보호효과에 대한 연구논문 및 본 연구과제에 사용되어진 허브 추출물의 효능 분석에 대한 결과를 국제 전문학회지 및 국내 학회에 발표함과 동시에 특히, 기술이전 등에 대한 결과를 향후 지속적으로 성과에 반영하여 국내 허브 생산 농가 및 화훼 농가의 소득 증대를 위한 기초자료로 활용코자 한다.

제 2절 기업화 추진방안

1. 가습기 사용 시 허브 기능성 추출물 투여액의 산업화

본 연구팀의 로즈마리를 이용한 시제품의 경우 가습기에 로즈마리 추출물을 일정 비율로 함유시켜 실험용 동물에 분무한 결과 도파민 생합성과 관련된 유전자의 유도 발현이 확인되어졌다. 특히 공기가 건조해지는 시기에는 각 가정마다 가습기를 이용하여 습도를 조절하게 된다. 이때 일정비율의 본 연구팀에 의하여 제조되어진 시제품을 물과 일정량 혼합하여 분무하게 되었을 시에 신경보호효능을 기대 할 수 있기 때문에 이에 대한 신경퇴행성 예방 기능성을 부여한 시제품의 산업화가 가능하리라 사료되어진다. 이에 따라 시제품의 제품화를 완료하고 제품개발에 대한 기초적 제조 과정을 허브생산농가 및 화훼농가 그리고 천연물가공을 전문으로 하는 바이오벤처와 산학연 협력관계를 통하여 기술이전하고 이를 실용화함으로써 고부가가치 산업자원으로 활용코자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 허브관련제품의 시장성분석

기능성식품의 세계 시장은 1997년 650억 달러를 시작으로 2001년 1501억 달러를 달성하였으며, 현재에도 꾸준히 증가하고 있다.

NBJ(Nutrition Business Journal, 2001)에 자료에 따르면, 기능성식품 시장의 형성은 주로 선진국이 형성을 하고 있으며, 미국 건강보조식품의 경우 허브류가 2위를 차지할 정도로 높은 관심을 받고 있음을 알 수 있다.

1997년 미국의 프리벤션지에 의하면, 미국인이 감기, 두통, 화상, 알레르기, 불면증 등의 치료에 42%가 허브를 사용하고 있으며, 연간 허브관련 지출비용이 54억 달러에 이른다.

미국의 허브제품 선호도를 살펴보면, 효능이 입증된 허브류가 그 유용성을 기반으로 에키나시아(Echinacea/면역력증진), 은행잎 추출물(*Ginkgo biloba*/기억력, 혈행 개선), 세인트존스워트(St. Johns's wort/우울증 개선), 마늘(Garlic/혈행 개선), 알로에(Aloe/면역력증진, 배변) 순으로 기능성식품 시장에서 높은 점유율을 보이고 있다. 천연재료를 사용한 기능성식품은 부작용을 최소화시킬 수 있다는 점에서 각광을 받고 있으며, 의약품으로의 대체할 수 있을 것으로 예상된다.

일본 역시 2000년 건강식품 시장규모가 8,100억 엔에 이르며, 품목으로는 비타민, 미네랄, 인삼, 마늘, 영지, 로열제리 등이다. 일본 후생성은 1998년 의약품 범위를 완화를 함으로 많은 허브류가 식품으로 인정되었으며, 이에 따라 미국 등에서도 대체요법으로 이용되는 허브류가 주로 식품으로 개발되고 있는 실정이다.

독일은 1998년 의약품집에 게재된 1,266 가지의 처방이 약용허브에 의한 것이며 약 13.4%를 차지할 정도이다. 1993년부터 약용허브가 의사국가고시의 필수항목이 되어 허브류가 식품 또는 의약품으로 사용되고 있는 실정이다. 현재 대표적으로 이용되는 약용 허브류와 적응증은 Table 13 과 같다.

Table 9. 기능성식품의 세계 시장현황

연 도	1997	1998	1999	2000	2001
시장규모(억달러)	650	1090	1280	1380	1501

자료: Nutrition Business Journal, 2001

Table 10. 미국 건강보조식품 시장현황

단위: \$ billions

항 목	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Vitamins	4.78	5.19	5.46	5.77	6.07	6.02
Herbs/Botanicals	2.99	3.53	3.92	4.29	4.65	4.18
Sports nutrition	1.07	1.27	1.41	1.54	1.66	1.73
Minerals	0.90	1.07	1.13	1.20	1.27	1.39
Meal Supplements	0.62	0.66	0.67	0.69	0.71	2.31
Specialty Ingredients & Others	0.92	0.96	1.11	1.24	1.38	2.13
Total Supplements	11.28	12.68	13.70	14.73	15.74	17.74

자료: Nutrition Business Journal, 2001

Table 11. 미국의 연도별 20대 허브제품

순위	1996년	1997년	1998년	1999년
1	Echinacea	Echinacea	Echinacea	Echinacea
2	Garlic	Garlic	St. Johns's wort	Ginkgo biloba
3	Ginseng	Ginkgo biloba	Ginkgo biloba	St. Johns's wort
4	Ginkgo biloba	Goldenseal	Garlic	Garlic
5	Goldenseal	Saw palmetto	Saw palmetto	Aloe
6	마황	Aloe	Ginseng	Valerian
7	Siberean ginseng	Ginseng	Goldenseal	카바카바
8	Psyllium	Cat's claw	Aloe	Saw palmetto
9	Saw palmetto	Astragalus (황기)	Siberean ginseng	Black cohosh
10	Cascara sagrada	Cayenne	Valerian	Cayenne
11	Cayenne	Siberean ginseng	Cranberry	Ginseng
12	Bilberry Aloe	Thistle	Milk	Cranberry
13	Valerian	Cranberry	Cat's claw	Cascara sagrada
14	Cat's claw	Dong Quai	Grape seed	Siberean ginseng
15	Grape seed	Grape seed	Bilberry	Milk Thistle
16	Primorose	Cascara sagrada	Cascara sagrada	Goldenseal
17	Dong Quai	St. Johns's wort	Cayenne	마황
18	Cranberry	Valerian	Dong Quai	Bilberry
19	Milk Thistle	Ginger	Psyllium	Dong Quai
20	Ginger	Feverfew	마황	Cat's claw

Table 12. 일본 건강식품 시장 추이

연 도	1997	1998	1999	2000
건강식품 시장(억엔)	6,500	6,900	7,500	8,100

Table 13. 독일에서의 대표적인 허브와 적응증

허 브	주적응증
은행잎추출물(Gingo biloba)	뇌순환장애
세인트존스워드(St. Johns wort)	내복: 자율신경장해, 우울증, 불안 외용: 열상, 근육통, 화상
마늘(Garlic)	노화에 의한 혈관변성과 아테롬성 동맥경화증, 고혈압
에키나시아(Echinacea)	내복: 기관, 요로부분의 재발성 감염 외용: 피부표피의 상처
야자(Saw palmetto)	전립선비대증
겐치아나(뿌리)	소화장애, 식욕부진, 팽만감, 방뇨
서양산사자(잎과 꽃)	심기능부전, 심장분문부의 압박감, 폐색감
서양회복의 열매	만성정맥울혈
췌기풀(뿌리)	전립선비대증
서양카보차(종자)	과민방광(빈뇨, 요실금, 잔뇨감), 전립선비대증

제 7 장 참고문헌

1. Azevedo NR, Campos IF, Ferreira HD, Portes TA, Santos SC, Seraphin JC, Paula JR, Ferri PH. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*. 2001 ;**57**(5):733-6.
2. Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*. 2004 ;**11**(7-8):657-61.
3. Abudula R, Jeppesen PB, Rolfsen SE, Xiao J, Hermansen K. Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism*. 2004 ;**53**(10):1378-81.
4. Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci*. 2005 ;**77**(3):266-78.
5. Avato P, Fortunato IM, Ruta C and D'Elia R. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci*. 2005 ;**169**(1): 29-36.
6. Bandonien D, Pukalskas A, Venskutonis PR and Gruzdien D. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Res Intern*. 2000 ;**33**(9):785-791.

7. Broudiscou LP, Papon Y and Broudiscou AF. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim Feed Sci Technol.* 2000 ;**87**(3-4):263-277.
8. Bicchi C, Drigo S, Rubiolo P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *J Chromatogr A.* 2000 ;**892**(1-2):469-85.
9. Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 2001 ;**75**(2-3):125-32.
10. Bondarev N, Reshetnyak O and Nosov A. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sci.* 2001 ;**161**(1)155-63.
11. Bruelheide H and Heinemeyer A. Climatic factors controlling the eastern and altitudinal distribution boundary of *Digitalis purpurea* L. in Germany. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* 2002 ;**197**(6):475-490.
12. Bondarev N, Reshetnyak O and Nosov A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Sci.* 2003 ;**165**(4): 845-50.

13. Bors W, Michel C, Stettmaier K, Lu Y, Foo LY. Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations of caffeic acid oligomer radicals. *Biochim Biophys Acta*. 2003 ;**1620**(1-3):97-107.
14. Bowles EJ, Cheras P, Stevens J and Myers S. A survey of aromatherapy practices in aged care facilities in northern NSW, Australia. *International Journal of Aromatherapy*. 2005 ;**15**(1):42-50.
15. Bailly F, Queffelec C, Mbemba G, Mouscadet JF, Cotelle P. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 ;**15**(22):5053-6.
16. Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. *J Ethnopharmacol*. 2005 ;**99**(3):391-8.
17. Berteà CM, Luciano P, Bossi S, Leoni F, Baiocchi C, Medana C, Azzolin CM, Temporale G, Lombardo MA, Maffei ME. PCR and PCR-RFLP of the 5S-rRNA-NTS region and salvinorin A analyses for the rapid and unequivocal determination of *Salvia divinorum*. *Phytochemistry*. 2006 ;**67**(4):371-8.
18. Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Tehrani AS. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2006;**71**(3 Pt B): 1321-6.

19. Basgel S, Erdemoglu SB. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Sci Total Environ.* 2006 ;**359**(1-3):82-9.
20. Carnat A, Carnat AP, Fraisse D and Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia.* 1999 ;**70**(1):44-49.
21. Corbet SA, Bee J, Dasmahapatra K, Gale S, Gorringer E, Ferla BL, Moorhouse T, Trevail A, Bergen YB and Vorontsova M. Native or Exotic? Double or Single? Evaluating Plants for Pollinator-friendly Gardens. *Ann Bot.* 2001 ;**87**(2): 219-232.
22. Capek P, Hribalova V, Svandova E, Ebringerova A, Sasinkova V, Masarova J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *Int J Biol Macromol.* 2003 ;**33**(1-3):113-9.
23. Capek P, Hribalova V. Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry.* 2004 ;**65**(13):1983-92.
24. Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agric Food Chem.* 2005 ;**53**(7):2511-7.
25. Capecka E, Mareczek A and Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry

- herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* 2005 ;**93**(2):223–226.
26. Chen J, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K. Stevioside counteracts the glyburide-induced desensitization of the pancreatic beta-cell function in mice: studies *in vitro*. *Metabolism.* 2006 ;**55**(12):1674–80.
27. Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R and Tikkanen MJ. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry.* 2003 ;**83**(2):255–262.
28. Dacome AS, Silva CC, Costa CEM, Fontana JD, Adelman J and Costa SC. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem.* 2005 ;**40**(11): 3587–94.
29. Dyrskog SE, Jeppesen PB, Colombo M, Abudula R, Hermansen K. Preventive effects of a soy-based diet supplemented with stevioside on the development of the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism.* 2005 ;**54**(9):1181–8.
30. Duarte MC, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol.* 2007 ;**111**(2):197–201.
31. Ebringerova A, Kardosova A, Hromadkova Z, Hribalova V. Mitogenic and

- comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*. 2003 ;**74**(1-2):52-61.
32. Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2005 ;**100**(3):310-3.
33. Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition*. 2006 ;**22**(3):321-6.
34. Exarchou V, Fiamegos YC, van Beek TA, Nanos C, Vervoort J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J Chromatogr A*. 2006 ;**1112**(1-2):293-302.
35. Freitas H, Prasad MN, Pratas J. Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation-relevance to the management of mine environment. *Chemosphere*. 2004 ;**54**(11):1625-42.
36. Faleiro L, Miguel G, Gomes S, Costa L, Venancio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *J Agric Food Chem*. 2005 ;**53**(21):8162-8.
37. Ferreira A, Proenca C, Serralheiro ML, Araujo ME. The in vitro screening for

- acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol.* 2006 ;**108**(1):31-7.
38. Geuns JM, Augustijns P, Mols R, Buyse JG, Driessen B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food Chem Toxicol.* 2003 ;**41**(11):1599-607.
39. Geuns JM. Stevioside. *Phytochemistry.* 2003 ;**64**(5):913-21.
40. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2004 ;**53**(1):73-6.
41. Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett.* 2001 ;**495**(3):142-7.
42. Hsieh MH, Chan P, Sue YM, Liu JC, Liang TH, Huang TY, Tomlinson B, Chow MS, Kao PF, Chen YJ. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo- controlled study. *Clin Ther.* 2003 ;**25**(11):2797-808.
43. Hohmann J, Rédei D, Máthé I and Blunden G. Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochem Syst Ecol.* 2003 ;**31**(4):427-429.

44. Herode SS, Hadolin M, Skerget M and Knez Z. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* 2003 ;**80**(2): 275-282.
45. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.* 2006 ;**54**(17):6314-21.
46. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005 ;**96**(1-2):145-50.
47. Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine.* 2002 ;**9**(1):9-14.
48. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SE, Jepsen M, Colombo M, Agger A, Xiao J, Kruhoffer M, Orntoft T, Hermansen K. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism.* 2003 ;**52**(3):372-8.
49. Jeppesen PB, Gregersen S, Poulsen CR, Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate – sensitive

- K⁺-channel activity. *Metabolism*. 2000 ;**49**(2):208-214.
50. Kouhila M, Belghit A, Daguene M and Boutaleb BC. Experimental determination of the sorption isotherms of mint (*Mentha viridis*), sage (*Salvia officinalis*) and verbena (*Lippia citriodora*). *J Food Process Eng*. 2001 ;**47**(4):281-287.
51. Koschier H and Sedy A. Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci lindeman*. *Crop Prot*. 2003 ;**22**(7):929-934.
52. Kim SI, Park C, Ohh MH, Cho HC and Ahn YJ. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *J Stored Prod Res*. 2003 ;**39**(1):11-19.
53. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol*. 2003 ;**41**(3): 359-74.
54. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol*. 2003 ;**41**(6): 875-83.
55. Koşar M, Dorman HJD and Hiltunen R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected

- Lamiaceae species. *Food Chem.* 2005 ;**91**(3):525–533.
56. Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* 2006 ;**72**(14):1330–4.
57. Kumaran A and karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.* 2006 ;**97**(1): 109–114.
58. Katalinic V, Milos M, Kulisic T and Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 2006 ;**94**(4): 550–557.
59. Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry.* 2000 ;**55**(3):263–7.
60. Lu Y and Foo LY. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett.* 2001 ;**42**(46):8223–8225.
61. Lee SH, Kim ES, Lee MY. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. *Phytochemistry.* 2001 ;**58**(6):859–864.
62. Lu Y and Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 2001 ;**75**(2):197–202

63. Lee MY. Effects of Na₂SO₃ on the activities of antioxidant enzymes in geranium seedlings. *Phytochemistry*. 2002 ;**59**(5):493-499.
64. Lima CF, Carvalho F, Fernandes E, Bastos ML, Santos-Gomes PC, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2004 ;**18**(4):457-65.
65. Lailerd N, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Toskulkao C, Henriksen EJ. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*. 2004 ;**53**(1):101-7.
66. Lalićević S and Djordjević I. Comparison of benzydamine hydrochloride and *Salvia officinalis* as an adjuvant local treatment to systemic nonsteroidal anti-inflammatory drug in controlling pain after tonsillectomy, adenoidectomy, or both: an open-label, single-blind, randomized clinical trial. *Curr Ther Res*. 2004 ; **65**(4):360-372.
67. Lima CF, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2005 ;**97**(2):383-9.
68. Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. 2001 ;**58**(8):1171-5.
69. Munné-Bosch S, Mueller M, Schwarz K and Alegre L. Diterpenes and

- antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *J Plant Physiol.* 2001 ;**158**(11):1431-1437.
70. Menaker A, Kravets M, Koel M and Orav A. Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *C R Acad Sci II.* 2004 ;**7**(6-7):629-633.
71. Miliauskas G, Venskutonis PR and Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004 ;**85**(2):231-237.
72. Mizushina Y, Akihisa T, Ukiya M, Hamasaki Y, Murakami-Nakai C, Kuriyama I, Takeuchi T, Sugawara F, Yoshida H. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sci.* 2005 ;**77**(17):2127-40.
73. Navarro E, Alonso PJ, Alonso SJ, Trujillo J, Perez C, Toro MV, Ayuso MJ. Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. *heywoodii.* *J Ethnopharmacol.* 2000 ;**71**(3):437-42.
74. Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, Morikawa T, Yoshikawa M. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 ;**14**(8):1943-6.
75. Okamoto K and Satou N. Isolation, identification and characterization of effective bacteria on bioremediation from the waste parts of *Stevia*

- rebaudiana* Berutoni. *Enzyme Microb Technol.* 2006 ;**39**(3):407-13.
76. Oh HM, Kang YJ, Lee YS, Park MK, Kim SH, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Protein kinase G-dependent heme oxygenase-1 induction by *Agastache rugosa* leaf extract protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury. *J Ethnopharmacol.* 2006 ;**103**(2):229-35.
77. Paula C. Santos-Gomes, Seabra RM, Andrade PB and Fernandes-Ferreira M. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 2002 ;**162**(6):981-987.
78. Petersen M and Simmonds SJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry.* 2003 ;**62**(2): 121-125
79. Peters RJ, Croteau RB. Alternative termination chemistries utilized by monoterpene cyclases: chimeric analysis of bornyl diphosphate, 1,8-cineole, and sabinene synthases. *Arch Biochem Biophys.* 2003 ;**417**(2):203-11.
80. Pavela R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia.* 2004 ;**75**(7-8):745-9.
89. Pereira P, Tysca D, Oliveira P, da Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res.* 2005 ;**52**(3):199-203.
90. Pavela R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of

- Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*. 2005 ;**76**(7-8):691-6.
91. Pierce KM, Hope JL, Hoggard JC and Synovec RE. A principal component analysis based method to discover chemical differences in comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC × GC - TOFMS) separations of metabolites in plant samples. *Talanta*. 2006 ;**70** (4):797-804.
92. Ribeiro MA, Bernardo-Gil MG and Esquivel MM. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2001 ;**21**(1):51-60.
93. Rana VS, Juyal JP and Blazquez MA. Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves. *International Journal of Aromatherapy*, 2002 ; **12**(4):216-218.
94. Redman PB, Dole JM, Maness NO and Anderson JA. Postharvest handling of nine specialty cut flower species. *Sci Hortic*. 2002 ;**92**(3-4):293-303.
95. Ram M, Ram D, Roy SK. Influence of an organic mulching on fertilizer nitrogen use efficiency and herb and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*). *Bioresour Technol*. 2003 ;**87**(3):273-8.
96. Radulescu V, Chiliment S, Oprea E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *J Chromatogr A*. 2004 ;**1027**(1-2):121-6.

97. Ramesh K, Singh V and Megeji NW. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy*. 2006 ;**89**: 137-77.
98. Saxena G, Banerjee S, Rahman L, Mallavarapu GR, Sharma S, Kumar S. An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented Pelargonium. *Plant Sci*. 2000 ;**155**(2):133-140.
99. Szentmihályi K, Forgács E, Hajdú M and Then M. In vitro study on the transfer of volatile oil components. *J Pharm Biomed Anal*. 2001 ;**24** (5-6): 1073-1080.
100. Schwab W, Williams DC, Davis EM, Croteau R. Mechanism of monoterpene cyclization: stereochemical aspects of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase. *Arch Biochem Biophys*. 2001 ;**392**(1):123-36.
101. Starratt AN, Kirby CW, Pocs R, Brandle JE. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*. 2002 ;**59**(4):367-70.
102. Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J Plant Physiol*. 2003 ;**160**(9):1025-32.

103. Shankar SS, Ahmad A, Pasricha R, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Immobilization of biogenic gold nanoparticles in thermally evaporated fatty acid and amine thin films. *J Colloid Interface Sci.* 2004 ;**274**(1):69–75.
104. Salah SM, Jager AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol.* 2005 ;**97**(1):145–9.
105. Standen MD, Connellan PA and Leach DN. Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components *in vitro*. *International Journal of Aromatherapy.* 2006 ;**16**(3–4): 133–139.
106. Sharma A, Sharma MK, Kumar M. Protective effect of *Mentha piperita* against arsenic-induced toxicity in liver of Swiss albino mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 ;(4):249–57.
107. Totté N, Charon L, Rohmer M, Compennolle F, Baboeuf I and Geuns JMC. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters.* 2000 ;**41**(33)6407–410.
108. Totté N, Charon L, Rohmer M, Compennolle F, Baboeuf I and Geuns JMC. Corrigendum to “Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway”: [Tetrahedron Letters 41 (2000) 6407]. *Tetrahedron Lett.* 2000 ;**41**(39)7595.

109. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* 2001 ;**49**(1):15-24.
110. Tildesley NT, Kennedy DO, Perry EK, Ballard CG, Wesnes KA, Scholey AB. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiol Behav.* 2005 ;**83**(5):699-709.
111. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M, Impicciatore M. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci.* 2006 ;**78**(13):1419-32.
112. Valachovic P, Pechova A, Mason TJ. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrason Sonochem.* 2001 ;**8** (2):111-7.
113. Vank T, Nepovím A and Valíek P. Determination of Stevioside in Plant Material and Fruit Teas. *J Food Compost Anal.* 2001 ;**14**(4):383-88.
114. Vågen IM, Moe R and Ronglan E. Diurnal temperature alternations (DIF/drop) affect chlorophyll content and chlorophyll a/chlorophyll b ratio in *Melissa officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L., but not in *Viola wittrockiana* Gams. *Sci Hortic.* 2003 ;**97**(2):153-162.

115. Velickovic DT, Milenovic DM, Ristic MS, Veljkovic VB. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrason Sonochem.* 2006 ;**13**(2):150–6.
116. Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol.* 2000 ;**69**(2):105–14.
117. Wise ML, Pyun HJ, Helms G, Assink B, Coates RM and Croteau RB. Stereochemical disposition of the geminal dimethyl groups in the enzymatic cyclization of geranyl diphosphate to (+)-bornyl diphosphate by recombinant (+)-bornyl diphosphate synthase from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron.* 2001 ;**57** (25)5327–5334.
118. Wong KL, Chan P, Yang HY, Hsu FL, Liu IM, Cheng YW, Cheng JT. Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat. *Life Sci.* 2004 ;**74**(19):2379–87.
119. Yoda SK, Marques MOM, Petenate AJ and Meireles MAA. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂⁺ water: extraction kinetics and identification of extracted components. *J Food Process Eng.* 2003 ;**57**(2):125–34
120. Yadav RKP, Halley JM, Karamanoli K, Constantinidou HI and Vokou D. Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative

features and testing of distribution models. *Environ Exp Bot.* 2004 ;**52**(1):63-77

121. Zamorano-Ponce E, Fernandez J, Vargas G, Rivera P, Carballo MA. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. *Toxicol Lett.* 2004 ;**152**(1):85-90.

122. Zamorano-Ponce E, Morales C, Ramos D, Sepulveda C, Cares S, Rivera P, Fernandez J, Carballo MA. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutat Res.* 2006 ;**603**(2):145-50.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.