

## 들깨 메탄올 추출물의 acetylcholinesterase 억제활성 및 세포독성 보호효과

최원희 · 엄민영 · 안지윤 · 김성란 · 강명화<sup>1</sup> · 하태열\*  
한국식품연구원 식품기능연구본부, <sup>1</sup>호서대학교 식품영양학과

### Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Protective Effect against Cytotoxicity of Perilla Seed Methanol Extract

Won-Hee Choi, Min-Young Um, Ji-Yun Ahn, Sung-Ran Kim,  
Myung-Hwa Kang<sup>1</sup>, and Tae-Youl Ha\*

Food Function Research Division, Korea Food Research Institute  
<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Hoseo University

Acetylcholinesterase inhibitory activity and protective effect against cytotoxicity of PC 12 cell induced by beta-amyloid protein and glutamate were examined in perilla seed methanol extract and its solvent fractions. Methanol extract of perilla seed showed dose-dependent acetylcholinesterase inhibitory activity, with *n*-butanol fraction showing strongest activity. Perilla seed methanol extract also decreased glutamate- and  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ )-induced cytotoxicities of PC12 cells dose-dependently. Formation of TBARS induced by  $FeSO_4-H_2O_2$  in rat brain was significantly reduced by perilla seed methanol extract, with strongest protective activity formation of TBARS shown in *n*-butanol fraction. Results suggest perilla seed methanol extract may attenuate acetylcholinesterase activity and cytotoxicity induced by glutamate and  $\beta$ -amyloid protein through suppression of oxidative stress.

**Key words:** perilla seed, acetylcholinesterase, cytotoxicity, glutamate,  $\beta$ -amyloid protein

## 서 론

퇴행성 뇌질환의 하나인 치매는 가벼운 기억력의 장애에서부터 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 노인성 질환으로 오늘날의 노령화 사회에서 노인의 건강수명을 단축시키는 큰 요인 중의 하나이다(1). 치매의 원인에는 다양한 가설들이 제기되고 있으나 노인성 치매는 주로 뇌혈관성 치매와 알츠하이머이며, 특히 알츠하이머 병은 노인반(senile plaques)과 뇌신경섬유종(neurofibrillary tangles)을 주요 특징으로 한다(2). Senile plaque의 주요 구성성분은 precursor protein으로부터 유도되는  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ )으로서 fibrillar 및  $\beta$ -sheet 구조로 응집되는 경향이 있다(3,4). 이러한 알츠하이머 병에는 많은 원인가설들이 거론되고 있으며 그 중 유력한 가설로서  $A\beta$ 의 과도한 축적을 들 수 있는데(5)  $A\beta$ 의 과도한 축적은 apoptosis pathway를 활성화시키고(6,7) free radical을 유도하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포를 지속적으로 파괴시키고(8-9) 인지기능 및 기억능력을 점진적으로 상실하게 함으로써 지속적인 neurode-

generation을 유도한다(10,11). 뿐만 아니라 뇌 속의  $A\beta$ 의 축적은 acetylcholine의 합성을 저해시킴으로서(12) 뇌신경세포의 콜린성 신경전달물질의 결핍을 초래하고 이는 대뇌의 기억 및 인지기능 장애를 유발할 수 있다고 보고되어 있다(13,14). 현재까지 개발된 치매치료제로서 acetylcholine을 분해하는 acetylcholinesterase를 저해하는 acetylcholinesterase inhibitor를 많은 관심이 집중되어 왔으나 최근에는  $A\beta$ 를 target으로 하여  $A\beta$ 의 생성과 축적을 억제하는 화합물 개발을 위한 노력이 활발히 진행되고 있다.

한편, 우리나라 고유의 유지자원인 들깨는 적정온도로 볶음 처리한 뒤 압착법으로 들깨유를 착유하며(15,16), 이러한 들깨유 착유 시 필수적으로 수반되는 부산물인 착유박에는 암세포의 증식 억제 효과, 혈압 저하 및 혈전증 개선, 두뇌발달을 촉진시키는 등의 인체에 유효한 성분들이 다량 함유되어 있고 탈지 들깨박에서는 들깨유의 다가 불포화 지방산의 산패를 막아 주는 강한 항산화 효과가 있다고 보고되고 있다(17). 또한 볶은 들깨의 용매 분획물로부터 토코페롤을 비롯하여 여러가지의 항산화성분과 스테롤, monoterpene류 등의 특수성분들이 분리됨으로써 이들이 생체내에서 여러 가지 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있다(18,19). 따라서 본 실험에서는 들깨의 이러한 항산화효과에 주목하여, 들깨 추출물에 대하여 뇌속의 콜린성 신경전달물질인 acetylcholine의 수준을 조절하는 AChE 활성 억제효과를 검토하고 L-glutamate 및  $A\beta$ 으로 유도된 PC12의 세포사멸 억제효과를 검토하고자 하였다.

\*Corresponding author: Tae-Youl Ha, Food Function Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyon-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea  
Tel: 82-31-780-9054  
Fax: 82-31-780-9225  
E-mail: tyhap@kfri.re.kr

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용한 들깨(2002년산)는 경상남도 산청군으로부터 구입하였고,  $\beta$ -amyloid protein( $A\beta_{25-35}$ ), L-glutamate, MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 및 acetylcholinesterase 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 시료의 추출 및 분획물 조제

들깨는 정선, 세정하여 건조, 볶음 처리한 다음 착유법으로 탈지하여 시료로 사용하였다. 탈지된 들깨는 분쇄하여 10배(w/v)의 80% 메탄올을 첨가하여 실온에서 150 rpm으로 16시간 shaking하여 추출한 뒤 여과지(Toyo No. 2)로 여과하였고 다시 80% 메탄올 용액을 시료중량의 5배를 가하여 3시간 shaking 한 다음 여과하였다. 여액은 모아서 40°C 이하의 감압농축기를 사용하여 농축한 뒤 동결건조하여 메탄올 추출물로 사용하였다. 또한 메탄올 추출액을 silica gel(Merk)을 충전한 open column에 loading하여 극성이 다른 각 용매로 순차적으로 분획하여 감압 농축하여 hexane 획분, chloroform 획분, ethyl acetate 획분, *n*-butanol 획분, methanol 획분을 각각 조제하였다. 추출물과 각 분획물은 dimethylsulfoxide(DMSO)로 일정 농도가 되게 녹인 후 분석에 사용하였다.

### Acetylcholinesterase 억제활성 측정

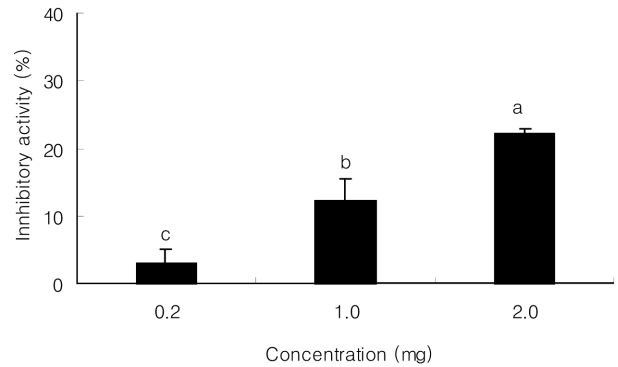
Acetylcholinesterase(AChE)의 활성은 Ellman 등의 방법(20)을 응용하였다. 즉, 3 mL용 cuvette에 37°C로 보온한 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 3.0 mL 가하고, 기질용액 0.075 M acetylcholin iodide 20  $\mu$ L, 0.01 M dithiobisnitrobenzonic acid (DTNB)/phosphate buffer(pH 7.0) 100  $\mu$ L를 각각 가하여 잘 혼합한 다음 적정농도의 시료를 첨가하고 acetylcholinesterase(Sigma, USA)를 첨가하여 효소반응을 시작하였으며 효소활성도는 412 nm에서 효소반응초기부터 5분간의 흡광도 변화를 측정하여 산출하였다. 시료의 AChE 억제활성도는 시료를 가하지 않은 상태의 효소활성도에 대한 시료 첨가후의 효소활성도로부터 환산하였다.

### 세포배양

본 실험에서 사용한 세포주는 rat pheochromocytoma PC12로서 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 세포는 10%의 horse serum(Gibco, NY, USA)과 5%의 FBS(Gibco, NY, USA), 100 unit/mL penicillin, 100 unit/mL streptomycin이 첨가된 RPMI 1640(Gibco, NY, USA)배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 포화습도 상의 37°C의 배양기에서 2-3일 마다 medium change를 하고 1주일마다 계대배양을 통하여 실험 사용 시까지 배양하였다.

### 세포독성 보호능 측정

배양 세포들을 96 well plate에 2.5×10<sup>4</sup> cell/well 수준으로 접종하여 24시간 후 각각 20 mM의 L-glutamate와 25  $\mu$ M의  $A\beta_{25-35}$ 를 첨가하여 세포독성을 유발시켰고 각 실험시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양을 시켰다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay에 의하여 측정하였다(21). 즉, 각 well에 0.1 mg의 MTT를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를



**Fig. 1. Acetylcholinesterase inhibitory activity of perilla seeds methanol extracts.**

Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glutamate 또는  $A\beta_{25-35}$  유래 세포독성에 대한 각 시료의 세포독성 보호능은 대조군의 생존율에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

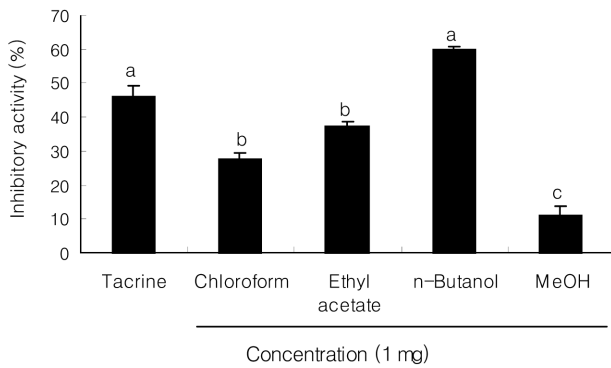
### 과산화 지질생성 억제능 측정

Rat(Sprague-Dawley, 웅성, 6주령)의 whole brain을 적출하여 균질화하여 사용하였고 산화적 스트레스원으로는 FeSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하였다. 즉, 뇌조직 균질액에 FeSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 각 시료를 농도별로 첨가한 후에 37°C에서 20분 incubation한 후, 20% acetic acid 1.5 mL과 8.1% SDS 0.2 mL 그리고 0.8% TBA 1.5 mL을 첨가한 후 100°C에서 20분간 가열하였다. 냉각 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하여 산화적 스트레스 억제활성을 환산하였다.

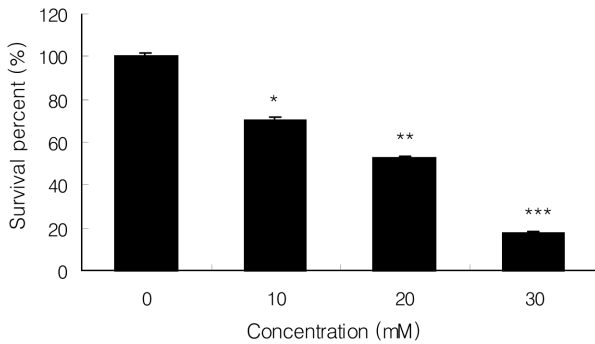
## 결과 및 고찰

### Acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제효과

들깨 메탄올 추출물 및 각 용매별 분획물이 AChE 활성에 미치는 영향을 분석한 결과, 추출물의 첨가농도가 높을수록 AChE 억제활성이 유의적으로 증가하였으며 용량 의존적 반응을 나타내었다(Fig. 1). AChE는 acetylcholine을 분해하는 효소로서 뇌중 AChE의 농도가 증가할수록 acetylcholine 함량이 감소하고 amyloid 화합물의 신경독성이 증가하여 치매가 유발될 가능성이 높다고 보고되어 있다(13,14). Tacrine, donepezil, rivastigmine 등의 AChE inhibitor를 인지기능이 손상된 환자에게 투여함으로써 뇌중의 acetylcholine 함량을 증가시켰고 이는 곧 알츠하이머병 환자들에게서 인지기능과 학습기능의 개선이 있었다는 많은 연구보고(22-24)가 있다. 이러한 점에서 볼 때 들깨 메탄올 추출물도 *in vitro*에서 AChE 활성을 억제하는 작용이 있는 것으로 나타났으며 이는 들깨 메탄올 추출물이 인지기능 개선에 효과적인 가능성을 시사하고 있다. 들깨 메탄올 추출물의 각 용매분획물에 대한 AChE 저해활성을 AChE inhibitor(22)인 tacrine과 비교한 결과(Fig. 2), 100 nM의 tacrine은 46%의 AChE 억제효과를 나타내었고 전반적으로 메탄올 추출물에서보다 분획물에서 높은 억제 활성을 나타내었다. 분획물 중에서는 *n*-butanol층에서 59.8%로 가장 높은 억제율을 보였고 다음으로 ethyl acetate, chloroform의 순으로 나타났으나 methanol획분은 약 10%로서 가장 낮은 AChE 억제효과를 나타내었다. 들깨에는 phenolic compound, 스테롤, monoterpene류 등의



**Fig. 2. Acetylcholinesterase inhibitory activity of various solvent fractions of perilla seed methanol extract.** Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

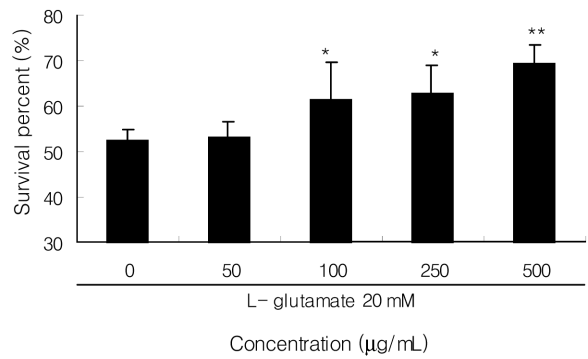


**Fig. 3. Cytotoxicity of L-glutamate in PC12 cells.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compares with control group.

특수성분이 함유되어 있다고 보고되어 있으나(18,19) AChE 억제효과와의 연관성에 대해서는 향후 높은 활성을 보였던 *n*-butanol 획분을 중심으로 AChE 억제활성을 나타내는 물질의 확인, 구조 등에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

**L-glutamate에 유도된 세포사멸 억제효과**

Glutamate는 흥분성 신경전달 물질로서 뇌속의 과다축적은 뇌세포의 사멸과 변성을 초래하고 인지기능을 손상시키는 것으로 보고되어 있다(25). 본 실험에서는 PC12 cell에서 glutamate로 유도된 세포독성에 미치는 들깨 메탄올 추출물 및 분획물의 영향을 검토하였다. 우선, glutamate를 첨가하지 않은 경우의 세포생존율을 100%로 보았을 때, glutamate를 10, 20 및 30 mM 수준으로 첨가했을 때의 생존율은 각각 70.3%, 52.5% 그리고 17.6%로 감소하여 glutamate의 농도가 증가할수록 PC12의 생존율이 감소하였다(Fig. 3). 들깨 메탄올 추출물이 glutamate에 의하여 유도된 PC12의 사멸을 억제하는지의 여부를 검토하기 위하여 PC12 세포에 약 50% 전후의 세포생존율을 나타내는 20 mM의 glutamate와 추출물 시료를 동시에 첨가하여 48시간 배양한 후 세포생존율을 측정하여 그 결과를 나타내었다(Fig. 4). 50  $\mu$ g/mL의 들깨 메탄올 추출물은 53.1%의 생존율을 나타내어 glutamate에 유도된 세포사멸 억제효과가 관찰되지 않았으나 100, 250 및 500  $\mu$ g/mL 농도의 추출물은 농도가 증가할수록 생존율이 각각 61.4, 62.8, 69.3%를 나타내어 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 각 용매 분획물을 100  $\mu$ g/mL 농도로 첨가하여 glutamate에 의하여 유도되는 세포사멸 억제효과를 조



**Fig. 4. Effect of perilla seed methanol extract on L-glutamate induced cytotoxicity in PC12 cells.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compares with control group.

**Table 1. Effects of various solvent fractions of perilla seed methanol extract on L-glutamate and  $\beta$ -amyloid protein fragment 25-35 induced cytotoxicity of PC12 cells**

Fractions (100 $\mu$ g/mL)	Treatment	
	20 mM Glutamate	25 $\mu$ M $\beta$ A <sub>25-35</sub>
Control	52.5 $\pm$ 2.5 <sup>b1)</sup>	64.2 $\pm$ 1.5 <sup>NS)</sup>
Chloroform	62.8 $\pm$ 6.4 <sup>a2)</sup>	62.5 $\pm$ 0.9
Ethyl acetate	66.7 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	65.7 $\pm$ 1.6
<i>n</i> -Butanol	67.9 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	67.7 $\pm$ 2.4
Methanol	62.9 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	63.9 $\pm$ 3.1

<sup>1)</sup>Values are mean standard errors.

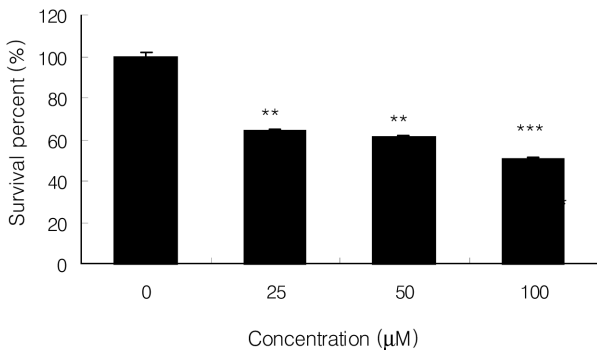
<sup>2)</sup>Values with different superscripts within same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>NS)</sup>Not significant.

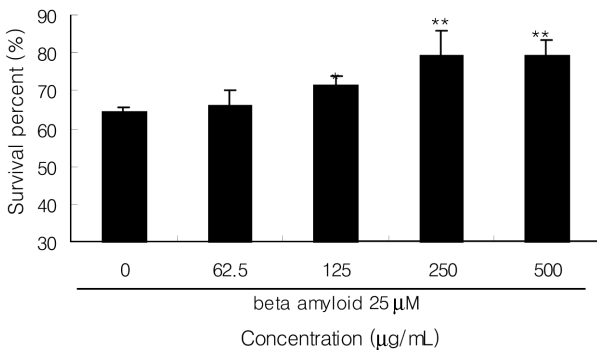
사한 결과(Table 1), glutamate만 처리한 대조군에 비하여 각 분획물 첨가시에는 유의적으로 높은 생존율을 나타내었고( $p < 0.05$ ), 분획물간에는 통계적 유의차는 없었으나 ethyl acetate 및 *n*-butanol 획분에서 약간 높은 경향을 나타내었다. Probuticol, flupirtine, retigabine, vitamin E 등의 항산화제는 glutamate에 의해 유도된 PC12 세포의 세포독성을 완화시킬 수 있다는 연구가 많이 보고 되어 있으며(25-27) 이러한 항산화제들은 glutamate 등에 의한 지질과산화물, free radical의 생성 등으로 인한 oxidative stress로부터 세포를 보호하는 작용을 한다고 알려져 있다(28,29). 따라서 본 실험에서도 들깨 메탄올 추출물에 함유되어 있는 항산화성분이 위와 같은 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

**$\beta$ -amyloid protein에 의하여 유도된 세포사멸 억제효과**

$\beta$ 는 알츠하이머 질환에서 나타나는 brain senile plague 형성의 주된 구성성분이며 뇌신경세포에서 oxidative stress를 유발하여 신경세포의 손실을 초래하고 나아가서는 점진적인 인지기능의 상실을 초래하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 PC12 cell에 있어서  $\beta$ A<sub>25-35</sub>에 유도된 세포사멸에 대하여 들깨 추출물이 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다.  $\beta$ A<sub>25-35</sub>를 첨가하지 않은 경우의 세포생존율을 100%로 보았을 때, 25  $\mu$ M의  $\beta$ A<sub>25-35</sub>를 첨가하였을 때에는 64.1%의 생존율을 나타냈으며 100  $\mu$ M의 농도에서는 50.6%의 생존율을 나타내어  $\beta$ A<sub>25-35</sub>의 농도가 증가할수록 PC12의 생존율이 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). 25  $\mu$ M의  $\beta$ A<sub>25-35</sub>과 들깨 메탄올 추출물을 첨가하여 48시간



**Fig. 5. Cytotoxicity of  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta_{25-35}$ ) in PC12 cells.**  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compares with control group.

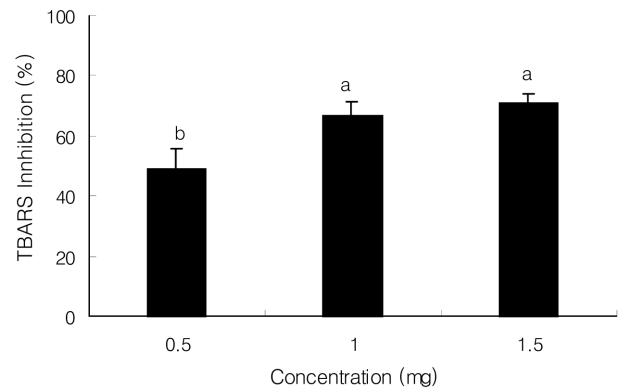


**Fig. 6. Effect of perilla seed methanol extract on  $\beta$ -amyloid protein fragment 25-35 induced cytotoxicity in PC12 cells.**  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compares with control group.

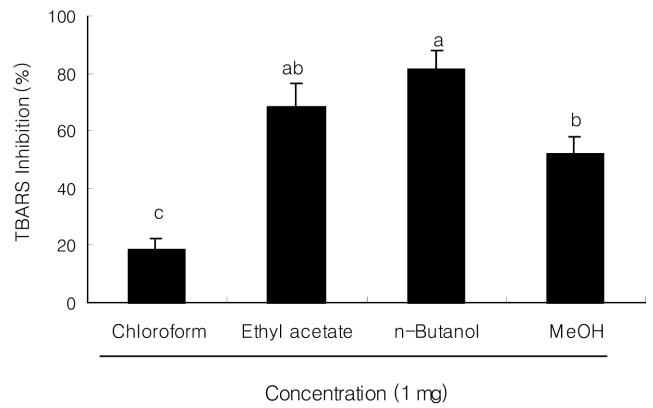
배양한 후 세포생존율을 조사한 결과(Fig. 6) 추출물의 첨가농도가 증가할수록 세포생존율이 증가하여 들깨 메탄올 추출물은  $A\beta_{25-35}$ 에 의하여 유도된 세포사멸을 억제하는 것으로 나타났다. 즉,  $A\beta_{25-35}$ 에 의하여 감소된 세포 생존율은 추출물을 125  $\mu$ g/mL 또는 250  $\mu$ g/mL 농도로 처리함으로써 생존율이 각각 71.3, 79.1%로 증가하였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).  $A\beta$ 에 의한 신경세포의 사멸에 대한 기전은 1)  $Ca^{2+}$ 와 K의 세포내 항상성의 파괴(30-31) 2) 산화적 stress(8-9) 3) proapoptotic bax의 upregulation 및 neuroprotective Bcl의 downregulation(32-33) 등이 제안되고 있으며 resveratrol(34), green tea catechin(35), ferulic acid(36)와 같은 천연 항산화제 등은  $A\beta$ 에 의한 세포사멸을 억제한다고 알려져 있다. 한편, 들깨 메탄올 추출물의 각 용매 분획물 100  $\mu$ g/mL을  $A\beta_{25-35}$  25  $\mu$ M과 동시에 첨가하여 세포생존율을 조사한 결과(Table 1) 각 분획물들은  $A\beta_{25-35}$ 에 의하여 유도된 세포사멸에 대하여 뚜렷한 억제효과가 나타나지 않았다. 이는 들깨 메탄올 추출물의 효과가 어떤 단일 성분에 의한 것이 아니라 여러 성분의 상승효과에 의한 가능성도 배제할 수 없으며 이에 대한 향후의 심도 있는 연구가 요구된다.

**뇌조직의 산화적 stress 억제활성 효과**

들깨 메탄올 추출물의 glutamate 또는  $A\beta_{25-35}$ 에 의하여 유도된 세포사멸을 억제하는 효과가 항산화 효과에 의한 것인지의 여부를 검토하기 위하여 rat brain homogenate에  $FeSO_4 \cdot H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발시켜 메탄올 추출물 및 분획물이 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)의 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 그 결과 0.5, 1.0, 및 1.5 mg의



**Fig. 7. Oxidative stress inhibitory activity of perilla seeds methanol extracts.**  
Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 8. Oxidative stress inhibitory activity of various solvent fraction of perilla seed methanol extract.**  
Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

들깨 메탄올 추출물을 첨가했을 때의 TBARS 생성 억제활성은 각각 49.0, 66.6 그리고 71.0%로 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라서 억제활성이 증가하였다(Fig. 7). 또한 분획물에 대한 TBARS 생성 억제활성을 조사한 결과 chloroform층과 methanol층에서는 각각 18.7%, 51.9%의 억제율을 보였으며 특히 ethyl acetate 분획분과 n-butanol 분획물에서는 각각 68.3%와 81.6%의 매우 높은 억제활성을 나타내었다(Fig. 8). 최근 Nagatsu(18) 등은 붉은 들깨 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획으로부터 5-(3,4-dihydroxyphenyl-methyl) oxazolidine-2,4-dion과 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactamide 2종의 새로운 항산화 성분을 분리하였고 이 등(37) 역시 들깨 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 우수한 항산화력을 증명하였다. 본 실험에서도 들깨 메탄올 추출물, ethyl acetate 및 n-butanol 분획에서 산화적 스트레스 억제활성이 확인되어, 다른 연구의 결과와 일치함을 알 수 있었다. Tada 등(38)도 들깨로부터 2가지의 새로운 항산화 성분(vinyl caffeate, trans-p-menth-8-en-7yl cafeate) 등을 분리하였다. 한편, Yan 등(36)의 연구에서는 PC 12 cell을  $A\beta$ 에 노출시켰을 때 reactive oxygen species(ROS) 형성이 증가하는 것으로 나타났으며, Choi 등(35)은 rat의 hippocampal neuron에  $A\beta$ 을 처리함으로써 지질 과산화물이 증가한다고 보고하였다. 이러한 점들로 미루어 볼 때, 들깨 메탄올 추출물은 PC12 cell

에서 glutamate 또는 A $\beta$ 에 의하여 유도된 산화적 스트레스를 억제하는 항산화 작용에 의하여 세포사멸을 억제하는 것으로 사료되었다.

## 요 약

들깨 메탄올 추출물이 acetylcholinesterase(AChE)의 활성 및 PC 12 cell의 세포사멸에 미치는 영향을 검토하였다. AChE에 대한 억제활성은 들깨 메탄올 추출물의 농도가 높을수록 유의적으로 높았으며 추출물의 분획물 중에서는 *n*-butanol층이 가장 높은 억제율을 나타내었다. L-glutamate 또는  $\beta$ -amyloid protein (A $\beta$ )으로 유도된 PC 12 cell에 대한 세포사멸 억제효과도 추출물의 농도가 높을수록 유의적으로 증가하였다. 또한 rat brain에 FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발시켜 추출물의 TBARS 생성 억제활성을 조사한 결과 들깨 메탄올 추출물은 농도가 높아질수록 산화적 스트레스에 대한 억제활성이 증가하였으며 분획물 중에서는 *n*-butanol층에서 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 들깨 메탄올 추출물은 AChE 활성을 억제하고 glutamate 또는 A $\beta$ 에 의하여 유도된 PC12 cell의 세포사멸을 억제하며 이러한 효과는 들깨 메탄올 추출물의 항산화력에 기인할 수도 있을 것으로 사료되었다.

## 문 헌

- Choi KG. The long-term care and dementia policy in welfare states. Soc. Welfare Policy 17: 55-75 (2003)
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature 399: A23-A31 (1999)
- Tanzi RE, Gaston S, Bush A, Romano D, Pettingell W, Peppercorn J, Paradis M, Gurubhagavatula S, Jenkins B, Wasco W. Genetic-heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer-disease. Genetica 91: 255-263 (1993)
- Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. Annu. Rev. Genet. 32: 461-493 (1998)
- Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron. 6: 487-498 (1991)
- Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. Brain Res. 842: 311-323 (2000)
- Yan XZ, Qiao JT, Dou Y, Qiao ZD. Beta-amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. Neurosci. 92: 177-184 (1999)
- Goodman Y, Mattson MP. Secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative injury. Exp. Neurol. 128: 1-12 (1994)
- Behl C, Davis JB, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid  $\beta$  protein toxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 944-950 (1992)
- Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 20: 154-159 (1997)
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 924: 17-25 (2000)
- Pederson WA, Kloczewiak MA, Bluszajin JK. Amyloid beta-protein reduces acetylcholin synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8068-8071 (1996)
- Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech Aging Dev. 122: 1961-1969 (2001)
- Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. 294: 187-194 (2000)
- Fukuda Y, Namiki M. Recent studies on sesame seed and oil. J. Jpn. Soc. Food Sci. Tech. 35: 552-559 (1988)
- Park WK, Park BH, Park YH. Encyclopedia of food and food science. Shin Kwang Publishing Co. Seoul, Korea. p. 243 (2000)
- Kurowska EM, Dresser GK, Deutsch L, Vachon D, Khalil W. Bioavailability of omega-3 essential fatty acids from perilla seed oil. Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids 68: 207-212 (2003)
- Nagatsu A, Tenmaru K, Matsuura H, Murakami N, Kobayashi T, Okuyama H, Sakakibara J. Novel antioxidants from roasted perilla seeds. Chem. Pharm. Bull. 43: 887-889 (1995)
- Karp F, Mihaliak CA, Harri JL, Croteau R. Monoterpene biosynthesis specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha pipertia*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. Arch Biochem. Biophys. 276: 219-226 (1990)
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JV, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Pharmacol. 7: 88-95 (1961)
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942 (1987)
- Giacobini E. Cholinesterase inhibitors do more than inhibit cholinesterase. pp. 227-235. In: Cholinesterase and cholinesterase inhibitors. Giacobini E (ed.), Martin Dunitz, London, UK (2000)
- Jenike MA, Albeit MS, Baer L. Oral phytostigmine as treatment for dementia of the Alzheimer's type: a long term outpatient trial. Alzheimer's Dis. Assoc. Disod. 4: 226-231 (1990)
- Sclar DA, Skaer TL. Current concepts in the treatment of Alzheimer's disease. Clin. Ther. 14: 2-10 (1992)
- Naito M, Umegaki H, Iguchi A. Protective effect of probucol against glutamate induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12. Neurosci. lett. 186: 211-213 (1995)
- Seyfried J, Evert BO, Rundfeldt C, Schulz J, Karl B, Kovar A, Klockgether T, Willner U. Flupirtine and retigabine prevent L-glutamate toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. Eur. J. Pharmacol. 400: 155-166 (2000)
- Osakada F, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A. Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. Eur. J. Pharmacol. 465: 15-22 (2003)
- Bondy SC, Lee DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonist. Brain Res. 610: 229-233 (1993)
- Puttfarcken PS, Getz RL, Coyle JT. Kainic acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluen and U78517F in primary cultures of cerebella granule cells. Brain Res. 624: 223-232 (1993)
- Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE.  $\beta$ -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 16: 409-414 (1993)
- Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ, Appel SH. Role of potassium channels in amyloid induced cell death. J. Neurochem. 70: 1924-1934 (1998)
- Behl C, Hovey L, Krajewski S, Schubert D, Reed JC. Bcl-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid beta protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 197: 949-955 (1993)
- Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. Amyloid peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulate Bax expression in human neurons. J. Neurosci. 16: 7533-7539 (1996)
- Jang JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on  $\beta$ -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. Free Radic. Biol. Med. 34: 1100-1110 (2003)
- Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Suh MH, Park JH, Park CW, Suh SI. The green tea polyphenol epigallocatechin gallate attenuates  $\beta$ -amyloid induced neurotoxicity in cultured hippocampal neuron. Life Sci. 70: 603-614 (2001)
- Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW,

- Kim YH, Song DK. Protective effects against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity in vivo with long term administration of ferulic acid. *Bri. J. Pharm.* 133: 89-96 (2001)
37. Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Shin JI. Antioxidative effects of some edible plant solvent extracts with various synergist. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 683-688 (1993)
38. Tada M, Matsumoto R, Yamaguchi H, Chiba K. Novel antioxidants isolated from perilla *Frutescens britton* var. *crispa* (Thunb). *Biosci. Biotech. Biochemi.* 60: 1093-1095 (1996)
- 
- (2004년 6월 26일 접수; 2004년 11월 17일 채택)