

## 치료제 Dehydroevodiamine · HCl(DHED)의 변이원성 연구

성이숙 · 정성윤 · 정주연 · 채규영 · 진미령 · 최봉웅\* · 장병모\* · 김대경\*

중앙대학교 약학대학, \*제일약품(주)

(Received April 12, 2002; Revised May 16, 2002)

### Study on Mutagenicity of Dehydroevodiamine · HCl (DHED)

Yi Sook Sung, Sung Yun Jung, Ju Yeon Jeong, Gyu Young Chae, Mi-Reyoung Chin,  
Bong Woong Choi\*, Byeung Mo Chang\* and Dae Kyong Kim#

Dept. of Environmental and Health chemistry, College of Pharmacy,  
Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

\*Jeil Pharmaceutical Co. Ltd., Seoul 137-041, Korea

**Abstracts** — Dehydroevodiamine HCl (DHED), which is a component separated from *Evodia rutaecarpa* Bentham, has novel anticholinesterase and antiamnesic activities in the scopolamine-induced amnesia model. Several studies suggest that DHED might be an effective drug for the Alzheimer's disease and the vascular type of dementia. In order to evaluate the mutagenic potential of DHED, *Salmonella typhimurium* reversion assay, chromosomal aberration test on Chinese hamster lung cells, *in vivo* micronucleus assay using mouse bone marrow cells, and comet assay were performed. DHED did not increase the number of revertant in the reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100. DHED HCl, at concentration of 5 and 10 µg/ml, increased the number of chromosome aberrated Chinese hamster lung cells with 5 and 10%, respectively. In mouse micronucleus test, no significant increase in the occurrence of micronucleated polychromatic erythrocyte was observed in ICR mice orally administered with DHED. DHED was tested for ability to induce genotoxic effect in L5178Y cells (mouse lymphoma cells) using the single cell gel electrophoresis assay (comet assay). In comet assay, tail moment did not increase in L5178Y cells treated with 10, 100, 300 µM DHED.

**Keywords** □ *Salmonella typhimurium* reversion assay, chromosomal aberration test, micronucleus assay, Comet assay, DHED

알츠하이머 병은 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 알려져 있는데 이것은 뇌섬유의 신경전달부위에 아세틸콜린 전달과정에 결함이 있을 때 발병하는 것으로 연구되어지고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 신경전달부위에 아세틸콜린의 양을 증가시키는 약물을 사용함으로써 이 병을 치료하고자 하는 노력이 이어져 왔다. 그 약물들 가운데서도 아세틸콜린 가수분해효소 저해약물은 임상적으로 가장 높은 치료효율을 나타낸다. 그러나, tacrine, physostigmine과 같이 치료효율이 높은 아세틸콜린 가수분해효소 저해약물조차 임상적인 응용에 많은 제약이 있는 것이 사실이다. 그 이유는 이를 약물이 대부분 생물학적 반감기가 짧고 뇌내침투능력이 낮으며 혈액내에서 불안정할 뿐 아니라 유해한 부작용이 많고 치료범위가 좁

다는 한계점이 있었기 때문이다.<sup>2)</sup>

또한, 뇌혈류의 흐름이 원활하지 않을 때 치매가 유발된다는 보고가 있다.<sup>3)</sup> 허혈성 뇌질환의 모델에서 아세틸콜린 양이 학습과 기억을 수행하는 Hippocampus에서 현저히 낮음을 볼 수 있는데, 이것은 뇌내 혈류방해로인해 부교감신경이 기능적인 장해를 받고 있기 때문으로 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup>

Dehydroevodiamine · HCl(DHED)는 *Evodia rutaecarpa* Bentham에서 추출된 indole alkaloid 성분으로서 혈압강하,<sup>6)</sup> 혈관확장, 뇌혈류 강화 작용,<sup>7)</sup> ion channel depression<sup>8)</sup> 등의 약효를 지니고 있다.

이 약물은 기존의 치매 치료제인 tacrin, donepezil과 같이 아세틸콜린 가수분해효소의 활성을 억제하고 기억력 감퇴 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 현재 새로운 노인성 치매 치료제로 개발되고 있는 화합물이다.

이러한 아세틸콜린 가수분해효소 억제 작용에 의한 기억력 증

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5610 (팩스) 02-816-7338  
(E-mail) dkkim@cau.ac.kr

진효과 뿐만 아니라 LTP 증진 및 뇌허혈에 의한 뇌세포사멸을 억제하는 효과가 있으며, 또한 알츠하이머의 주 원인단백질중의 하나인 아밀로이드베타 단백질의 독성을 억제하는 효과가 알려져 있어 알츠하이머병 치료제로 개발되고 있다.

본 연구에서는 알츠하이머병 치료제로서 가능성 있는 Dehydroevodiamine · HCl(DHED)에 대한 안전성을 조사할 목적으로 복귀돌연변이시험, 배양세포를 이용한 염색체이상시험, 마우스에서의 소핵시험 및 comet assay 등의 변이원성시험을 실시하였다.

## 실험방법

### 시험물질의 조제

시험물질인 Dehydroevodiamine · HCl(DHED · HCl)은 제일약품에서 치매치료제로 연구중인 화합물로 구조식은 Fig. 1 과 같으며, dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해하여 실험에 사용하였다.

### 노약

양성대조물질로는 복귀돌연변이 시험에서는 2-aminoanthracene, 2-aminoanthracene, 2-nitrofluorene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, sodium azide, 9-aminoacridine 등을 염색체이상 시험에서는 mitomycin C, benzo[a]pyrene을 각각 중류수와 DMSO에 용해하여 사용하였으며, 소핵시험에서는 mitomycin C를 중류수에 용해하여 사용하였다.

### S9 mix의 조제

Maron과 Ames<sup>9)</sup>의 방법에 따라 S9 분획을 얻었다. 체중 약 200 g의 Sprague-Dawley rat에 Acroclor 1254를 500 mg/kg 용량으로 복강내 투여하였다. 투여 5일째에 간을 적출하여 3 배 용량의 0.15 M KCl 용액을 넣고 균질화하였다. 원심분리(9,000 g, 10분)한 후 상정액을 취하여 S9 분획을 얻었다. 이 S9 분획에 첨가물을 가하여 S9 mixture를 만들어 사용하였다. S9 mixture의 조성은 10%(v/v) S9, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphate, 4 mM NADP, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)이다.

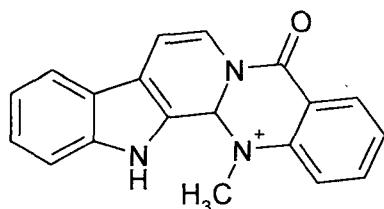


Fig. 1 – Chemical structure of dehydroevodiamine HCl (DHED).

### 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

*Salmonella typhimurium* 균주 4종(TA1535, TA1537, TA98, TA100)을 이용하여 Maron과 Ames<sup>9)</sup>의 방법에 따라 복귀돌연변이시험을 실시하였다. DHED를 DMSO에 녹일 수 있는 최대한의 농도로 용해하여 5,000 µg/plate를 본 시험에서의 최고농도로 설정하였다. 50, 16.67, 5.56, 1.82, 0.62 mg/ml의 시험물질용액 0.1 ml, 10시간 배양한 시험균 0.1 ml, S9 mix 혹은 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 ml을 37°C에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 top agar 2 ml을 혼합하여 minimal glucose agar plate에 중층하여 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락의 수를 계측하였다. 복귀돌연변이 집락의 수는 plate 3매의 평균치로 나타내었으며 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 집락 수가 2배 이상을 보이거나 용량상관성 있게 증가하는 경우에 양성으로 판정하였다.

### 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Chinese Hamster Lung(CHL) cells을 이용하여 Dean과 Danford<sup>10)</sup>의 방법에 따라 *in vitro* 염색체이상시험을 실시하였다. 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium(EMEM)을 이용하여 배양(5% CO<sub>2</sub>, 포화습도, 37°C)하였다. DHED를 DMSO에 용해하여 시험 가능한 최고농도로 10 µg/ml을 설정하였다. 양성대조물질로는 직접법에는 mitomycin C(0.2 µg/ml)를 대사활성화법에는 Benzo[a]pyrene(50 µg/ml)를 각각 배양액에 녹여 사용하였다. 대사활성화법에 이용되는 대사계(S9 mix)는 랙트의 간 균질액(S9)과 cofactor를 1 : 9로 혼합하여 사용하였다. 25 cm<sup>2</sup>의 플라스크에 5 ml의 CHL 세포현탁액(2.5 × 10<sup>4</sup> cells/ml)을 분주하여 24시간 배양한 후, 직접법은 시험물질 또는 양성대조물질을 함유한 신선한 배양액을 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 시험물질 및 양성대조물질 처리 개시 후 6시간 후에 시험물질 및 양성대조물질이 첨가된 배지를 신선한 배지로 교환해 준 다음 추가로 18시간 동안 배양한 후 분열증기세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 용매대조군은 희석용완충액으로 배양액에 물질처리군과 같은 농도로 처리하였다. 대사활성화법은 시험물질 또는 양성대조물질을 함유한 신선한 배양액에 S9 mix가 10%가 되도록 첨가하여 6시간 동안 배양하였다. 시험물질 및 양성대조물질 처리 개시 후 6시간 후에 각 물질이 첨가된 배지를 신선한 배지로 교환해 준 다음 추가로 18시간 동안 배양한 후 분열증기세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 직접법 및 대사활성화법 모두의 경우에 분열증기세포 수거 2시간 전에 colcemid를 최종농도 0.2 µg/ml가 되도록 각 플라스크에 처리하였으며 분열증기세포를 trypsin-EDTA(0.25%) 용액을 사용해서 수거하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 저장액(0.075 M KCl)을 가해 37°C 수욕상에서 15분간 처리하였다. 다시 원심분리하여 상층액

을 제거한 후 냉각된 고정액(메틸알콜 : 빙초산=3:1, v/v)을 가하여 20분간 전고정을 하였다. 다시 원심분리하여 고정액을 2회 교환해준 다음 공기건조법으로 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa 액(pH 6.8 인산염 완충액으로 희석)으로 염색해서 cover glass로 봉입하였다. 염색체이상세포의 계수를 위해 분열중기세포를 각 시험군 당 염색체표본 3매를 제작하고 100개의 분열중기세포로부터 구조적 이상유무를 관찰하였고 polyploidy세포의 계수를 위해 각 시험군 당 100개의 분열상의 세포를 관찰하였다.

#### 마우스에서의 소핵시험

7주령의 SPF ICR 암컷, 수컷마우스를 대한 바이오링크로부터 분양받아 온도  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 환기횟수 10-18회/시간, 조명시간 12시간 조건의 동물실험실에서 1주일간 순화시켜 사용하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(신촌사료(주))를 자유롭게 섭취토록 하였으며 물은 수도물을 자유섭취시켰다. 투여 용량은 50% 치사량의 1/2용량으로 결정하였다. DHED를 수컷 마우스는 450 mg/kg, 암컷마우스는 396 mg/kg으로 미리 4시간 절식시킨 마우스에 하루 간격으로 2회 투여하고 24시간 후에 마우스를 경추탈구에 의하여 도살하여 대퇴골을 분리하였다. 대퇴골 내부를 fetal bovine serum으로 씻어내어 골수세포 혼탁액을 얻었고 원심분리(1,000 rpm, 5 min)하여 상정액을 버렸다. 최종 혼탁액의 적당량을 slide glass에 도말하여 실온에서 하루동안 건

조하였다. 메탄올에 5분간 고정한 후 4% Giemsa 용액(in PBS, pH 6.8)에서 25분간 염색하였다. 염색액을 흐르는 물로 씻어내고 0.004 % citric acid 용액에 잠깐 담그었다 꺼낸 후 다시 물로 씻어 자연건조하였다. 현미경으로 관찰하여 1,000개의 다염성 적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte) 중 MNPCE(micronucleated PCE)의 비율 및 500개의 적혈구 중 PCE의 비율을 결정하였다.

#### Comet assay

L5178Y cells(mouse lymphoma cells)에 DHED를 농도별로 2시간 처리하여 세포독성을 trypan blue exclusion으로 관찰했을 때 20%이하인 농도를 기준으로 하여 comet assay<sup>11)</sup>를 실시하였다. 슬라이드를 각 시료 당 네개씩 준비하였다. Microscopic slides에 1% regular melting agarose( $40-42^{\circ}\text{C}$ ) 110  $\mu\text{l}$ 를 가하고 coverslip을 올린 다음  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 방치하였다. 한편, 농도별로 DHED를 2시간 처리한 세포현탁액에 1% low melting agarose( $37^{\circ}\text{C}$ )을 1:1비율로 넣었다. Microscopic slides위에 있는 coverslips를 조심스럽게 제거한 후 세포현탁액과 agarose가 들어있는 시액 110  $\mu\text{l}$ 를 그 위에 덮고 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에 10분간 방치하였다. cover slip를 제거하고 0.5% low melting agarose 110  $\mu\text{l}$ 를 슬라이드위에 덮어씌운 후 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에 10분간 방치하여 고정시켰다. 이렇게 만든 슬라이드를 lysis solution(2.5 M NaCl,

**Table I – Reverse mutation test of DHED in *Salmonella typhimurium***

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 mix	No. of revertant colonies per plate (Mean $\pm$ S. D.)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	
Vehicle	-	-	19 $\pm$ 5	132 $\pm$ 9	25 $\pm$ 3	22 $\pm$ 6	
DHED	5,000	-	7 $\pm$ 3*	60 $\pm$ 12**	0**	9 $\pm$ 3*	
	1,667	-	16 $\pm$ 7	141 $\pm$ 17	16 $\pm$ 1**	16 $\pm$ 3	
	556	-	9 $\pm$ 1*	119 $\pm$ 17	17 $\pm$ 1*	20 $\pm$ 7	
	182	-	13 $\pm$ 6	150 $\pm$ 14	26 $\pm$ 6	25 $\pm$ 5	
	62	-	13 $\pm$ 2	150 $\pm$ 13	13 $\pm$ 4*	24 $\pm$ 8	
2-NF	10	-	1571 $\pm$ 161				
MNNG	10	-	2542 $\pm$ 189				
SAZ	0.5	-	75 $\pm$ 10				
9-AA	80	-	395 $\pm$ 140				
Vehicle	+	+	22 $\pm$ 4	150 $\pm$ 26	20 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3	
DHED	5,000	+	12 $\pm$ 2**	79 $\pm$ 20*	3 $\pm$ 1**	5 $\pm$ 2**	
	1,667	+	30 $\pm$ 3	146 $\pm$ 62	15 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2	
	556	+	22 $\pm$ 2	123 $\pm$ 9	17 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4	
	182	+	29 $\pm$ 10	131 $\pm$ 9	16 $\pm$ 2	16 $\pm$ 4	
	62	+	29 $\pm$ 8	130 $\pm$ 11	21 $\pm$ 4	13 $\pm$ 4*	
2-AF	10	+	3460 $\pm$ 875	785 $\pm$ 19	30 $\pm$ 4	142 $\pm$ 31	
2-AA	2	+					

<sup>a</sup>Numbers represent the mean  $\pm$  SD of three plates

<sup>b</sup>2-AF, 2-aminoanthracene; 2-AA, 2-aminoanthracene; 2-NF, 2-nitrofluorene; MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; SAZ, sodium azide; 9-AA, 9-aminoacridine were used as positive controls for the corresponding strains.

\*cytotoxic; significantly different from the control ( $p < 0.05$ )

\*\*cytotoxic; significantly different from the control ( $p < 0.01$ )

100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10, 1% N-lauroylsarcosine, 1% Triton X-100)에 넣고 4°C에서 1시간 반 동안 방치하였다. 슬라이드를 다시 알카리성 완충액(300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13)에 4°C에서 30분간 담가 DNA의 이중나선를 풀리도록 한 후 전기영동을 300 mA, 25 Volt에서 20분간 실시하였다. 반응이 끝난 후 슬라이드를 neutralization buffer(0.4 M Tris HCl, pH 7.5)에 10분씩 3번 담가서 세척하였다. 마지막으로 탄율에 담갔다가 실온에서 건조시킨 후 슬라이드를 50 μl ethidium bromide(10 μg/ml)로 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 손상된 DNA는 comet 모양을 나타내게 되는데 밝은 형광을 내는 head부위와 tail이 보이고 정상적인 DNA는 head 부분만 보이게 된다. 처리물질에 대한 손상정도는 tail의 형광강도 즉 DNA양과 관련이 있는데 각 세포에 대한 DNA 손상의 양적인 측정은 tail moment로 나타내었다.

### 실험결과 및 고찰

*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 및 TA100을 이용하여 수행한 복귀돌연변이시험 결과를 Table I에 표시하였다. DHED는 5, 1.667, 0.556, 0.182, 0.062 mg/plate의 모든

농도에서 대사활성화 여부에 관계없이 복귀돌연변이 colony의 증가를 일으키지 않았다. 반면, 양성 대조물질들은 각 시험군주에 대하여 복귀돌연변이 colony를 증가시켰다.

CHL세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험 결과는 Table II에 나타냈다. 대사활성화계가 존재할 때나 존재하지 않을 때 모두 DHED 5 μg/ml에서 5% 이상의 염색체이상 빈도를 보였으며 10 μg/ml에서는 10% 이상의 빈도를 나타내 염색체이상 유발 양성으로 판명되었다. 이때 양성 대조물질인 mitomycin C, benzo[a]pyrene은 각각 25%, 41%의 빈도를 나타내었다.

마우스를 이용한 소핵시험에서 DHED는 음성 대조군과 비교하여 소핵을 지닌 다염성적혈구(MNPCE)의 유의한 증가를 가져오지 않았으며 적혈구 중 PCE의 비율에 있어서도 유의한 증가나 감소가 관찰되지 않았다(Table III). 반면, 양성 대조물질인 mitomycin C 투여군에서는 MNPCE가 유의하게 증가하였고 PCE의 비율이 유의성 있는 감소를 보였다.

L5178Y세포에 DHED를 2시간 처리했을 때 음성 대조군에 비해 80% 이상 세포가 살아있는 농도를 comet assay에 적용시켰다(Fig. 2). 10, 100, 300 μM DHED를 L5178Y세포에 처리하고 comet assay를 실시하였을 때 농도에 따른 comet tail moment의 증가를 나타내지 않았고 이때 양성대조물질인 MMS

Table II - Chromosomal Aberration test of DHED on CHL cell with or without metabolic activation

Compound	Dose (μg/ml)	S9 Mix	No. of Structural Aberration					Normal cell	Observed cell
			ctg	ctb	cte	csg	csb		
Vehicle	0	-	0	0	1	0	0	99	100
DHED	2.5	-	2	0	1	0	0	97	100
	5	-	3	1	1	0	1	94	100
	10	-	6	3	1	1	1	88	100
MMC	0.2	-	7	5	11	2	0	75	100
Vehicle	0	+	2	0	0	0	0	98	100
DHED	2.5	+	1	1	2	0	0	96	100
	5	+	3	0	2	3	2	90	100
	10	+	5	2	2	3	0	88	100
B[a]P	50	+	5	12	24	0	0	59	100

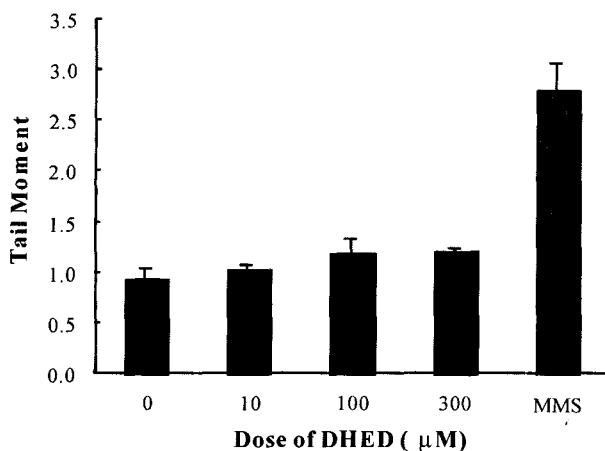
MMC: mitomycin C, B[a]P: benzo[a]pyrene

Ctg : Chromatid Gap, Ctb : Chromatid Break, Cte : Chromatid Exchange, Csg : Chromosomal Gap, Csb : Chromosomal Break, Cse : Chromosomal Exchange

Table III - Micronucleus test in ICR mice treated orally administered with DHED

Compound	Route	Dose (mg/kg)	No. of animals	MNPCE (Mean ± S.D./1000PCE)	PCE/(PCE+NCE) (%, Mean ± S.D.)
Vehicle	p.o.	0	male	6	0.39 ± 0.57
DHED	p.o.	450	male	10	0.45 ± 0.35
MMC	i.p.	0.5	male	6	2.45 ± 0.59
Vehicle	p.o.	0	female	6	0.36 ± 0.78
DHED	p.o.	396	female	10	0.46 ± 0.38
MMC	i.p.	0.5	female	6	2.65 ± 0.67

Mitomycin C, MNPCRs: Mononucleated polychromatic erythrocytes, PCEs: Polychromatic erythrocytes, Each value represent mean ± S.D.



**Fig. 2** – Mean comet tail moment exposed to different doses of DHED. L5178Y mouse lymphoma cells were treated with DHED and analyzed in the comet assay. Results represent the mean values  $\pm$  standard error of four slide counting. Positive control used 200  $\mu\text{M}$  MMS (Methylmethane sulfonate).

(methylmethane sulfonate)의 경우 comet tail moment의 값이  $2.8 \pm 0.27$ 이었다.

이상과 같이 치매치료제로서 개발 가능성이 있는 신약후보물질인 DHED에 대한 유전독성에 대하여 실험하였다. 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 돌연변이를 생성 하지 않았으며, comet assay에서도 DNA손상을 일으키지 않아 유전 독성의 위험이 없는 것으로 결과가 나온 것에 반하여, 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 처리 용량에따라 염색체 이상이 증가되는 용량-반응 상관성을 나타내어 유전 독성의 가능성성을 나타내었다. 이상의 *in vitro* 실험에서 일관성있는 결과를 얻지 못하였으므로, 유전독성을 명확히 판단하기 위하여 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험을 행한 소핵실험에서는 변이유발성을 나타내지 않았다. 따라서, 본 연구자들은 이상의 시험결과를 종합하여 DHED는 유전독성을 나타내지 않는 것으로 판단하였다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 G7 신약개발사업 연구비로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

### 문헌

- Whitehouse P. J., Price D. L., Struble R. G., Clark R.W., Coyle J. T., and DeLong M. R. : Alzheimer's disease and senile dementia:loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. **215**, 1237 (1982).
- Marx J. L. : Alzheimer's drug trial put on hold. *Science*. **238**, 1041 (1987).
- Rogers R. L., Meyer J. S., Mortel K. F., Mahurin R. K., and Judd B. W. : Decreased cerebral blood flow precedes multi-infarct dementia, but follows senile dementia of Alzheimer type. *Neurology*. **36**, 1 (1986).
- Ni J. W., Ohta H., Matsumoto K., and Watanabe H. : Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res.* **653**, 231 (1994).
- Yonemori F., Yamada H., Yamaguchi T., Uemura A. and Tamura A. : Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 973 (1996).
- Yang H. Y., Li S. Y. and Chen C. F. : Hypotensive effects of dehydroevodiamine,a quinazolinocarboline alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Asia Pac. J. Pharmacol.* **3**, 191 (1998).
- Haji A., Momose Y., Takeda R., Nakanishi S., Horiuchi T., and Arisawa M. : Increased feline cerebral blood flow induced by dehydroevodiamine hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **57**, 387 (1994).
- Loh S. H., Lee A. R., Huang W. H., and Lin C. I. : Ionic mechanisms responsible for the antiarrhythmic action of dehydroevodiamine in guinea-pig isolated cardiomyocytes. *Bz. J. Pharmacol.* **106**, 517 (1992).
- Maron, D. M. and Ames, B. M. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- Dean, B. J. and Danford, N. : Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In *Mutagenicity testing*, Venitt, S. and Parry, J. M. (eds.), IRL Press, Oxford, pp. 187-232 (1983).
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184 (1988).