

백삼과 홍삼추출물의 학습수행과 Acetylcholinesterase 억제에 미치는 효과

이미라 · 손백신 · 고리주안 · 왕춘년 · 모은경* · 양선아* · 이선영** · 성창근#

충남대학교 식품공학과, *(주)대덕바이오, **충남대학교 식품영양학과
(2008년 11월 18일 접수; 2008년 12월 3일 수리)

Effects of white ginseng and red ginseng extract on learning performance and acetylcholinesterase activity inhibition

Mi-Ra Lee, Bai-Shen Sun, Li-Juan Gu, Chun-Yan Wang, Eun-Kyoung Mo*,
Sun-Ah Yang*, Sun-Young Ly** and Chang-Keun Sung#

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*DBIO Research Institute, Daejeon, Korea

**Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received November 18, 2008; Accepted December 3, 2008)

Abstract : In the present study, we assessed the effects of white ginseng and red ginseng extract on the learning and memory impairments induced by scopolamine. The cognition-enhancing effect of ginseng extracts was investigated using the Morris water maze and Y-maze test. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (2 mg/kg, i.p.), an antagonist of muscarinic acetylcholine (ACh) receptor. Tacrine was used a positive control. Ginseng extract (200 mg/kg, p.o.), tacrine (10 mg/kg, p.o.) administration significantly reduced the escape latency during training in the Morris water maze ($p < 0.05$). At the probe trial session, scopolamine significantly increased the escape latency on day 5 in comparison with control ($p < 0.01$). The effect of ginseng extracts on spontaneous alternation in Y-maze was similar to that of scopolamine treated group. In addition, numbers of arm entries were similar in all experimental groups. Moreover, red ginseng extract significantly inhibited acetylcholinesterase activity in the cortex and serum ($p < 0.05$). Brain ACh contents of ginseng extract treated groups increased more than that of scopolamine group, which did not show statistically significant. These results suggest that ginseng extract may be useful for the treatment of cognitive impairment.

Key words : Scopolamine, Ginseng, Morris water maze, Y-maze, Acetylcholinesterase

서 론

의학의 발달과 생활수준의 향상으로 평균수명이 증가되어 세계적으로 노인성 질환에 대한 연구의 중요성이 강조되고 있다. 노인성 질환 중 관심이 집중되고 있는 질환인 치매(dementia)는 기억력과 감각, 공간 및 지각능력이 떨어지는 후천적 만성 퇴행성질환으로 혈관성치매(cerebrovascular dementia)와 노인성 치매(Alzheimer type dementia)로 구분되는데, 그 중에서도 65세 이상의 치매환자 중 50~60%가 알츠하이머형 치매로 알려졌다.^{1,2)}

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-6722; (팩스) 042-822-2287
(E-mail) kchsung@cnu.ac.kr

알츠하이머 질환은 학습과 기억에 있어서 중요한 역할을 수행하는 cholinergic system의 심각한 손상과 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 감소로 인지기능이 악화되는 질환이다.^{3,4)} 이와같은 콜린성 기능저하유도는 사람의 인지기력 저하를 위한 효과적인 실험모델로 제시되었다.

Scopolamine은 체내 ACh 수용체에 대하여 항무스카린성 효과를 내는 약물로 Acetylcholinesterase(AChE)의 활성을 증가시켜 신경접합부에 있는 ACh를 분해하여 인지력을 감소시키는 약물로 새로운 항치매 약물의 평가를 위한 실험모델에 많이 사용되고 있다.^{5,6,7)}

알츠하이머 치매 치료를 위해서 cholinergic agonist, ACh 전구체, AChE inhibitors를 사용하여 뇌의 콜린성 작용을 활성화하는 연구가 수행되고 있다.^{8,9)} AChE inhibitor는 ACh

의 가수분해를 억제하여 대뇌의 ACh 수준을 증가시켜 콜린성 신경전달물질의 활성을 회복시키는 것으로 알려졌다.

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae)의 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로 주요 생리활성물질인 사포닌, 페놀성 성분, 폴리사세틸렌, 알칼로이드, 다당체 등의 성분이 함유되어 있다.¹⁰⁾ 또한 항암, 항통증, 항당뇨, 간 기능 강화작용, 심혈관 장애개선, 중추신경계 및 각종 스트레스 등에 대한 약리작용들이 밝혀졌다.^{11,12)} 인삼은 뇌의 노화방지, 뇌혈류량 증가작용을 하며, Rb1, Rg1, Rg2 등의 주요사포닌은 전기적으로 기억을 손상시킨 실험동물과 scopolamine, cycloheximide, anisodine 등의 약물에 의해 기억손상이 유도된 동물실험에서 학습 및 기억을 개선시키는 것으로 보고되었다.^{13,14)}

본 연구는 백삼과 홍삼추출물 투여가 scopolamine으로 기억 손상을 유도한 실험동물의 학습수행 개선과 관련 효소의 억제에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 항치매 약물인 tacrine 과 비교하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 인삼추출물 제조

본 실험에 사용한 백삼과 홍삼은 충남 금산의 수삼센터에서 6년근 인삼으로 구매하였다. 각각의 인삼을 분쇄하고 80% 에탄올을 10 배량(v/w) 가하여 80°C에서 3시간씩 추출한 후 상정액을 여과하여 3회 반복 추출하였다. 원심분리하여 여과한 상정액을 혼합하고 60°C 이하에서 감압농축하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험동물

체중이 25~30g의 수컷 ICR mice와 6주령 Sprague-Dawley계 수컷을 (주)샘타코에서 구입하여 온도 23 ± 2°C, 습도 50 ± 5°C, 12시간 dark/light cycle 조건의 사육실에서 일주일간 적응시켰다. 물과 사료섭취는 제한하지 않고 공급하였다. 실험군은 대조군, Scopolamine 투여군, Tacrine 투여군, 백삼과 홍삼 추출물 투여군으로 나누어 각 군당 8마리씩 5군으로 구성하였다.

2) 약물투여

인삼추출물과 Tacrine은 인지시험 1시간 전에 각각 200 mg/kg, 10 mg/kg의 농도로 경구투여 하였으며, 기억손상 유발을 위해 인지시험 30분 전에 scopolamine hydrobromide 를 2 mg/kg의 농도로 복강투여하였다. 인삼추출물과 tacrine,

scopolamine은 생리식염수에 녹여 사용하였고, 대조군은 동일 용량의 생리식염수를 투여하였다.

3) 수중미로 시험 (Morris water maze task)

실험동물의 공간기억을 평가하기 위해 Sprague-Dawley계 rat을 이용하였다. 수중미로 시험은¹⁵⁾ 원형 pool(직경 150cm, 높이 65cm)안에 물을 30cm 높이로 채우고(23 ± 2°C), 수조 4분면의 한 구획에 직경 10cm의 도피대(escape platform)를 수면아래 1cm에 위치하도록 하고 탈지분유를 풀어 받침대가 보이지 않게 하였다. 실험 첫날은 platform 없이 수조안에서 실험동물이 60초간 자유롭게 수영하도록 하였고, 4일 동안 매일 입수하는 사분면을 달리하여 하루 2번씩 반복하여 인지적응훈련을 수행하였다. 실험동물이 platform에 도달하면 10초 동안 platform에 머물도록 하였으며, 120초 안에 platform을 찾지 못할 경우에는 10초 동안 platform에 머물도록 하여 platform을 기억하도록 하였다. 수중미로 실험은 20분 간격으로 반복하였으며, 실험 5일째에는 working memory를 측정하기 위하여 platform을 제거하고 platform을 찾아가는 시간(escape latency)을 기록하는 probe test를 실시하였다.

4) Y-미로 시험 (Y-maze task)

Y-미로 시험은 단기기억형태의 순간 공간인지력을 평가하기 위한 방법으로¹⁶⁾ ICR mice를 이용하여 실험하였다. 미로시험 1시간 전에 인삼추출물과 tacrine을 경구투여하고, scopolamine 을 2 mg/kg 용량으로 시험 30분 전에 복강투여한 후 미로시험을 실시하였다. Y-미로는 검은 색 아크릴로 규격(길이 40cm, 너비 4cm, 높이 12cm, 각 arm의 각도 120°)에 맞추어 제작한 Y자 모양의 사방이 막힌 미로에서 세 가지를 각각 A, B, C로 정한 후 한 쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 후 마우스가 들어간 가지를 순서대로 기록하였다. 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 계속하였으며, 한 번 들어갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점을 부여하였다(ABC, CAB, BCA; 실제 변경, actual alternation). 변경행동력(alternation behavior)은 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

$$\text{변경행동력(\%)} = \frac{[\text{실제 변경(actual alternation)} / \text{총 출입 횟수} - 2]}{\times 100}$$

변경행동력은 단기기억회복의 측정지표로 사용되며 총 출입횟수는 활동성 변화를 나타낸다.

5) 뇌조직 Acetylcholinesterase (AChE) 활성

AChE 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법¹⁷⁾을 변형하여 분석하였다. Water maze 시험

종료 후 실험동물을 희생시켜 대뇌피질과 해마를 적출하여 10배의 homogenization buffer(12.5 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. 실험 방법은 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 2.6 ml, 10 mM Ellman's 용액(10 mM DTNB, 15 mM sodium bicarbonate) 100 μ l, 효소원 0.2 ml을 cuvette에 넣고 410 nm에서 흡광도를 측정 한 후 75 mM acetylthiocholine iodide 20 μ l을 첨가한 후 410 nm에서 2분간 흡광도 변화를 측정하여 계산하였다.

6) 혈청 AChE 활성

혈청의 acetylcholinesterase 활성은 Rappaport¹⁸⁾방법을 이용하였다. 혈청 0.5 ml을 0.15M NaCl로 희석하여 60°C에서 10분간 배양한 후 얼음에 박아 냉각시켰다. 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액 0.4 ml를 취해 blank로 사용하였다. 혈장 0.2 ml을 동량의 0.15M NaCl로 희석한 후 3 ml의 증류수, 2 ml의 nitrophenol 용액, 0.2 ml의 acetylcholine chloride를 혼합하여 25°C에서 30분간 배양한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 acetic acid를 단계적으로 희석하여 사용하였으며, 효소활성 범위는 0~120 Rappaport units/ml에서 측정하였다.

7) ACh 함량

아세틸콜린 측정은 Hestrin 등의 방법¹⁹⁾에 의하여 alkaline hydroxylamine을 가진 o-acyl 유도체의 반응을 기초로 측정하였다. 모든 hydroxylamine은 산용액에서 ferric ion과 결합하여 붉은 자줏빛을 나타낸다. 해마와 대뇌피질 균질액(12.5 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl) 50 μ l를 취하여 1% hydroxylamine 50 μ l를 첨가하여 혼합한 후 HCl을 이용하여 pH를 1.2 \pm 0.2로 조절하였다. FeCl₃ (10% in 0.1N HCl)을 500 μ l를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 ACh 함량을 측정하였다.

8) 통계처리

통계처리는 SPSS 통계 package program(statistical package social science, version 14.0)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 처리군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 p < 0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. Morris water maze test

Scopolamine으로 유도한 치매 흰쥐의 공간학습에 대한 백

삼과 홍삼추출물의 효과는 Morris water maze test를 실시하여 Fig. 1에 나타내었다. Scopolamine 처리군은 시험훈련 기간 동안 escape latency 시간이 대조군에 비해 증가하였으며, tacrine과 인삼추출물 투여군은 시험훈련 3일째부터 도피대를 찾아가는 시간이 유의적으로 감소하였다(p < 0.05). 훈련 5일째 도피대를 제거한 후 probe test를 시행한 결과 scopolamine 투여군은 75.43 \pm 7.62sec로 대조군의 25.27 \pm 16.71sec보다 현저히 증가하였다(p < 0.01). Tacrine 처리군은 17.28 \pm 6.83sec, 백삼 및 홍삼추출물 투여군은 각각 13.85 \pm 11.54sec, 23.52 \pm 7.66sec로 대조군과 비슷한 결과를 보여주었다. Morris water maze test에서 escape latency 감소는 장기기억과 관련된 학습능력을 나타낸다. 치매유발 물질인 scopolamine 처리구는 4일간의 반복시험으로 escape latency가 감소하지 않아

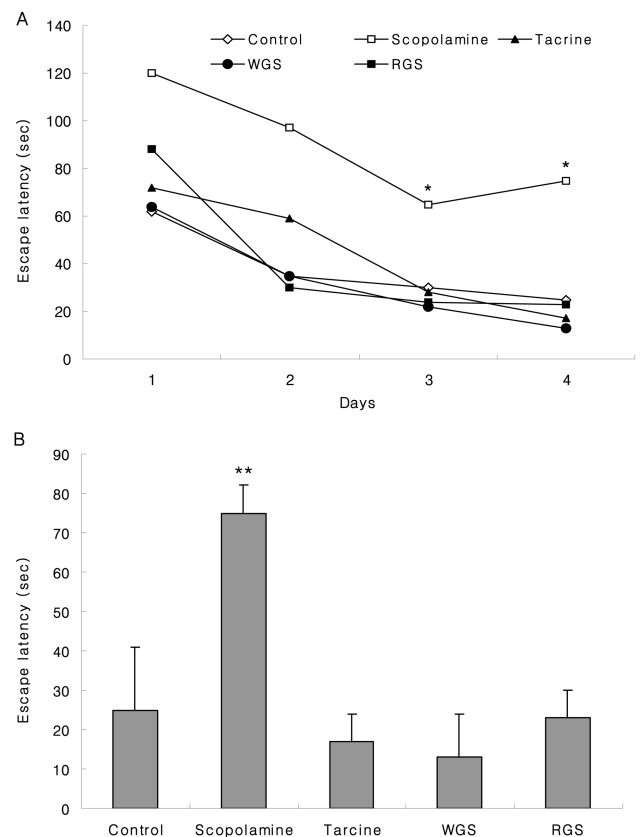


Fig. 1. Effect of ginseng extract on escape latency of rats with memory impairment induced by scopolamine in Morris water maze test. (A) Training trial session for 4 days (B) The probe trial section on 5 day. At 60 min before maze test, tacrine(10 mg/kg, p.o.), control(same volume of saline), white, red ginseng extract (200 mg/kg, p.o.) were administered to rats. Memory impairment was induced by scopolamine treatment (2 mg/kg, i.p.). The test was carried out 30 min after a single scopolamine treatment. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 8). Significant difference was compared with control at *p < 0.05, **p < 0.01.

장기기억(long-term memory)이 손상된 것을 알 수 있었다. 반면 tacrine과 인삼추출물 처리군에서는 scopolamine에 의한 기억손상이 개선되어 대조군의 escape latency 수준으로 회복되었다. 도피대를 제거한 probe test에서 대조군과 대비하여 tacrine 투여군은 68%, 백삼과 홍삼 추출물 투여군은 각각 50%, 92% 수준으로 escape latency가 감소하였다. 인삼추출물 투여군은 4일간의 인지훈련기간 동안 수중미로상의 platform의 위치를 인지하고 반복되는 연속적인 훈련을 통해 공간 지각력을 확실하게 기억하고 있음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 볼 때 인삼추출물은 scopolamine으로 유도한 치매 환쥐의 장기기억 개선효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

2. Y-maze test

단기기억의 지표인 working memory를 반영하는 Y-maze test에 의한 행동변경력과 총 출입횟수는 Fig. 2와 같다. Scopolamine 투여군의 행동변경력은 51.25%로 대조군 56.87% 보다 감소한 경향을 보였으며, 다른 처리군은 대조군과 비슷한 값을 나타냈다. 총 출입회수는 모든 군에서 차이가 없었다. 이는 인삼추출물이 실험동물의 일반적 운동성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

3. 뇌조직 및 혈청 AChE 활성

인삼추출물의 AChE 활성 억제효과를 Table 1에 나타내었다. 해마조직액의 AChE 활성은 scopolamine 투여군이 96.03 ± 14.52 units/min/mg protein으로 대조군 85.14 ± 23.01 units/min/mg protein보다 활성이 약간 증가되었으나 유의적 차이는 없었다. Tacrine 처리군과 인삼추출물 처리군은 대조군과 비슷한 활성을 보였다. 대뇌피질의 AChE 활성은 scopolamine 투여군에서 154.20 ± 47.99 units/min/mg protein으로 대조군의 활성 116.49 ± 16.60 units/min/mg protein 보다 30%이상 증가하였다. 백삼추출물 처리구는 scopolamine 처리군보다 약 15%의 저해효과를 보였으며, tacrine 처리군

은 20%, 홍삼추출물 처리군은 30%의 저해효과를 나타내어 유의적으로 AChE 활성을 억제하는 것으로 나타났다.

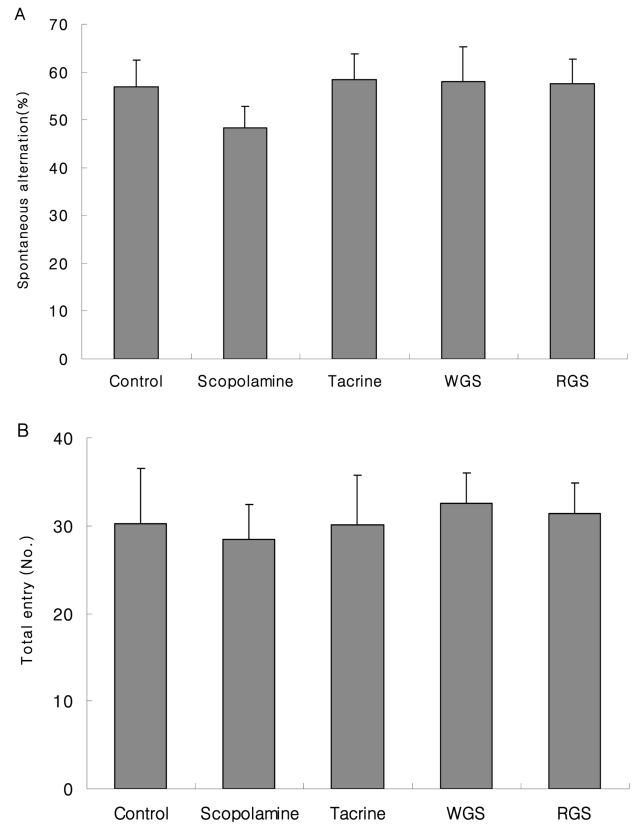


Fig. 2. Effect of a single administration of ginseng extracts on scopolamine-induced memory impairment mice in the Y-maze test. At 60min before maze test, tacrine(10 mg/kg, p.o.), control(same volume of saline), white, red ginseng extract(200 mg/kg, p.o.) were administered to mice. Memory impairment was induced by scopolamine treatment(2 mg/kg, i.p.). The test was carried out 30 min after a single scopolamine treatment. (A) Spontaneous alternation behavior (B) The number of arm entries during an 8 min session were measured. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 8).

Table 1. Effect of ginseng extracts on acetylcholinesterase activity in rat brain treated with scopolamine

Group ¹⁾	Hippocampus	Cortex	Serum
	(units/min/mg protein)		Rappaport units/ml
Control	85.14 ± 23.01 ²⁾	116.49 ± 16.60 ^{b3)}	19.61 ± 6.36 ^{ab}
Scopolamine	96.03 ± 14.52	154.20 ± 47.99 ^a	25.82 ± 6.92 ^a
Tacrine	81.87 ± 15.18	127.76 ± 17.18 ^{bc}	16.65 ± 4.42 ^{ab}
WGS	82.80 ± 17.76	131.79 ± 16.64 ^{ab}	16.72 ± 4.52 ^{ab}
RGS	86.77 ± 21.41	105.55 ± 32.59 ^c	13.75 ± 5.07 ^b

1) Scopolamine (2mg/kg, i.p.) was administered 30 min before trial. Ginseng extracts(200 mg/kg, p.o.) and tacrine(10 mg/kg, p.o.), control(same volume of saline) were administered 60 min before acquisition trial for 5 days (WGS : white ginseng extract treated group, RGS : Red ginseng extract treated group).

2) Mean \pm SD

3) Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$

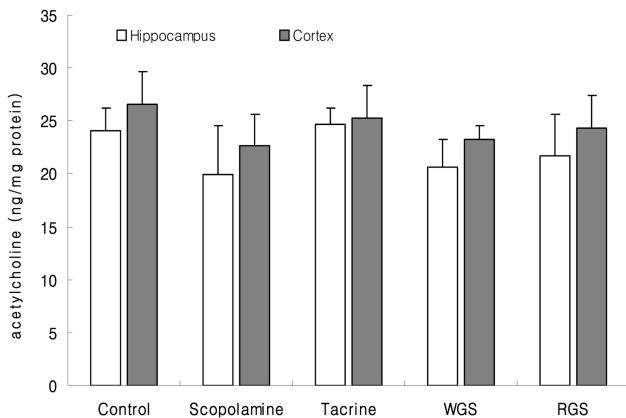


Fig. 3. Effect of ginseng extracts on acetylcholine contents in rat brain treated with scopolamine. At 60min before maze test, tacrine(10 mg/kg, p.o.), control(same volume of saline), white, red ginseng extract (200 mg/kg, p.o.) were administered to rats for 5 days. Memory impairment was induced by scopolamine treatment(2 mg/kg, i.p.). The test was carried out 30min after a single scopolamine treatment. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 8).

Scopolamine 처리구의 혈청 AChE 활성은 25.82 ± 6.92 Rapaport units로 대조군의 활성보다 1.25배 높았으며, tacrine 과 백삼추출물 처리군은 대조군과 비슷한 억제효율이 보였다. 반면 홍삼추출물 처리군은 scopolamine 처리군의 AChE 활성보다 40% 이상을 억제하여 가장 높은 AChE 저해효과를 보여주었다($p < 0.05$). 이 결과를 통하여 볼 때 인삼추출물은 tacrine, donepezil 같은 치매 치료제의 작용처럼,²⁰⁾ 시냅스에서 ACh를 분해하는 AChE를 억제하여 ACh의 활성을 촉진하므로 기억 및 학습 개선에 영향을 주는 것으로 사료된다.

4. ACh 함량

뇌조직의 ACh 함량은 Fig. 3과 같다. 해마조직의 ACh 함량은 대조군이 24.12 ± 2.15 ng/mg protein이었으며, 대조군을 대비하여 각 군의 ACh 함량을 보면, scopolamine 투여군 19.93 ± 4.64 ng/mg protein(83%), tacrine 투여군 24.67 ± 1.53 ng/mg protein(103%), 백삼추출물 투여군 20.71 ± 2.50 ng/mg protein(86%), 홍삼추출물 투여군 21.73 ± 3.82 ng/mg protein(90%)으로 scopolamine 투여군보다 증가하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 대뇌피질의 ACh함량은 대조군 26.52 ± 3.14 ng/mg protein보다 scopolamine 투여군은 22.68 ± 2.93 ng/mg protein으로 15% 감소하였으며, tacrine 투여군 과 인삼추출물 투여군은 scopolamine 투여군보다 ACh함량이 증가하는 경향을 보여주었다. 단일 ginsenoside와 콜린성 작용과의 관계에 대한 많은 연구가 보고되고 있는데 Sloey 등은 인삼추출물이 scopolamine을 처리한 흰쥐의 synapsome에서

의 choline uptake가 증가되었다고 보고하였고,²¹⁾ 그 밖에 Zhang²²⁾과 Salim²³⁾ 등은 Rb1과 Rg1이 실험 쥐의 뇌에서 ACh를 합성하는 choline acetyltransferase를 증가시켰다고 보고하였다. 따라서 본 연구 결과는 scopolamine에 의한 AChE의 활성을 인삼추출물이 억제하여 시냅스에서 ACh의 활성이 증가되고, 관련효소의 활성화로 신경전달물질인 ACh의 함량이 증가된 것으로 사료된다.

요 약

백삼과 홍삼추출물 투여가 scopolamine으로 기억을 손상시킨 실험동물의 학습수행 개선과 뇌조직의 AChE 억제 및 ACh 함량을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백삼과 홍삼추출물(200 mg/kg, p.o.) 투여는 scopolamine (2 mg/kg, i.p.)으로 유발된 기억손상 동물모델의 Morris water maze 시험에서 tacrine 투여군과 대조군처럼 인지훈련이 반복될수록 escape latency 시간이 현저히 감소하였다. probe test에서도 scopolamine 투여군보다 유의적으로 감소하여 인삼추출물이 장기기억(Long-term memory)과 working memory의 개선에 효과가 있음을 확인하였다.
2. Y-maze test를 통한 실험동물의 자발적 변동행동력은 실험기간 차이가 없었으며, 총 출입회수도 차이가 없어 인삼추출물은 실험동물의 일반적 운동성에 영향을 주지 않았다.
3. 해마조직의 AChE 활성은 인삼추출물 군에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다. 대뇌피질과 혈청 AChE 활성은 홍삼추출물 투여군에서 유의적으로 감소하였다.
4. 인삼추출물 투여군의 뇌조직 ACh 함량은 대뇌피질과 해마조직에서 scopolamine 투여군보다 증가하는 경향을 보였으나 그룹간의 유의적인 차이는 없었다.
5. 이를 통하여 볼 때 인삼추출물 특히 홍삼추출물은 장기 기억 활성촉진, AChE 억제, ACh 활성촉진으로 콜린성 신경계를 자극하여 기억 및 학습증진에 매우 효과적으로 작용하는 항치매 물질로 사료된다.

인용문헌

1. Evans, D. A., Funkenstein, H. H., Albert, M. S., Scherr, P. A., Cook, N. R., Chown, M. J., Hebert, L. E., Hennekens, C. H. and Taylor, J. O. : Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA*. **262**, 2551-2556 (1989).
2. Nordberg, A. : Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* **168**, 87-92 (1996).

3. Giovannini, M. G., Casamenti, F. Bartolini, L. and Pepeu, G. : The brain cholinergic system as a target of cognition enhancers. *Behav. Brain Res.* **83**, 1-5 (1997).
4. Fodale, V., Quattrone, D., Trecroci, C., Caminiti, V. and Santamaria, L. B. : Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br. J. Anaesth.* **97**, 445-452 (2006).
5. Bartus, R. T. : On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**, 495-529 (2000).
6. Mishima, K., Iwasaki, K., Tsukikawa, H., Matsumoto, Y., Egashira, N. and Abe, K. : The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. *Jpn J Pharmacol.* **84**, 163-73 (2000).
7. Yamada, N., Hattori, A., Hayashi, T., Nishikawa, T., Fukuda, H. and Fujino, T. : Improvement of scopolamine-induced memory impairment by Z-ajoene in the water maze in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **78**, 787-791 (2004).
8. Canal, N. and Imbimbo, B. P. : Relationship between pharmacodynamic activity and cognitive effects of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**, 218-228 (1996).
9. Davies, P. and Maloney, A. J. F. : Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer type disease. *Lancet* **2**, 1403 (1976).
10. Park, C. K., Jeon, B. S. and Yang, J. W. : The chemical components of Korea Ginseng. *Food Industry and Nutrition* **8**, 10-24 (2003).
11. Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J. and Tode, T. : Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenosides Rh2 and effects to cisplatin *in vivo*. *Anti-cancer Drugs* (England). **2**, 63-67 (1991)
12. Yokozawa, T., Zhou, J., Hattori, M. and Inaba, S. : Effects of ginseng in nephrectomized rats. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1485-1489 (1994)
13. Lawrence, C. H., Wang, B. W. and Lee, T. F. : Effects of ginseng saponins on β -amyloid-induced amnesia in rats. *J. Ethnopharmacology* **103**, 103-108 (2006).
14. Yuan, Q. L., Yang, C. X., Xu, P., Gao, X. O., Deng, L., Chen, P., Sun, Z. L. and Chen, Q. Y. : Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on transient cerebral ischemia in rats. *Brain Research* **1167**, 1-12 (2007)
15. Morris, R. G. : Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci. Meth.* **11**, 47-60 (1984)
16. Sarter, M., Bodewitz, G. and Stephens, D. N. : Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carboline. *Psychopharmacology* **94**, 491-495 (1988).
17. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, Jr. V. and Featherstone, R.M. : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).
18. Rappaport, F., Fischl, J. and Pinto, N. : An improved method for the estimation of cholinesterase activity in serum. *Clinica Chimica Acta* **4**, 227-230 (1959).
19. Hestrin, S. : The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of Biological Chemistry* **180**, 249-261 (1949)
20. Dawson, G.R. and Iversen, S.D. : The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. *Behavioural Brain Research* **57**, 143-153 (1993).
21. Sloley, B. D., Pang, P. K., Huang, B. H., Ba, F., Li, F. L. and Benishin, C. G. : American ginseng extract reduces scopolamine induced amnesia in a spatial learning task. *J Psychiatry Neurosci* **24**, 442-452 (1999).
22. Zhang, J. T., Qu, Z. W., Liu, Y. and Deng, H. L. : Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1. *Chin Med J.* **103**, 932-938 (1990).
23. Salim, K. N., McEwen, B. S. and Chao, H. M. : Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **47**, 177-182 (1997).