

# 기억력 감퇴모델에서 산사의 기억력 개선 효과에 관한 연구

왕수빈<sup>1</sup>, 안은미<sup>2</sup>, 정지욱<sup>1\*</sup>

1: 대구한의대학교 한약재약리학과 2: 대구한의대학교 한방식품약리학과

## The Fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates Learning and Memory Impairments Induced by Scopolamine

Su Bin Wang<sup>1</sup>, Eun-MI Ahn<sup>2</sup>, Ji Wook Jung<sup>1\*</sup>

1: Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University

2: Department of Herbal Foodceutical Science, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objectives** : In the present study, we assessed the effects of the ethanolic extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge on the learning and memory impairments induced by scopolamine using the passive avoidance and the Morris water maze tasks in mice.

**Methods** : The cognition-enhancing effect of *C. pinnatifida* was investigated using a passive avoidance test, the Morris water maze test and Y-maze test in mice. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (1 mg/kg, i.p.).

**Results** : The ethanolic extract of *C. pinnatifida* (100, and 200 mg/kg) significantly reversed the scopolamine-induced cognitive impairments in the passive avoidance test ( $p < 0.05$ ). Moreover, *C. pinnatifida* (200 mg/kg) also improved escape latencies in training trials and increased swimming times and distances within the target zone of the Morris water maze ( $p < 0.05$ ). On the Y-maze test, *C. pinnatifida* (100, and 200 mg/kg) also significantly reversed scopolamine-induced cognitive impairments in mice ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions** : The ethanolic extract of *Crataegus pinnatifida* dramatically possesses the anti-amnesic and cognitive-enhancing activities related to the memory processes, and these activities were parallel to treatment duration and dependent on the learning models.

**Key words** : *Crataegus pinnatifida*, learning and memory, scopolamine

### 서 론

현대인에게 기억력은 급변하는 생활에서 그 중요성이 증대되고 있으며, 사회적으로 학습량이 많은 청소년에서부터 노년에 이르기까지 주요 관심 대상이 되고 있다. 이러한 기능의 저하는 사회적으로 문제가 되고 있으며 노인인구 비율증가 추세에 사회에서 치매와 같은 퇴행성 질병에 이완된 환자의 사회생활 가능 여부는 기억력 저하가 매우 중요한 요소이기도 하다<sup>1)</sup>.

의학적으로 건망증(amnesia)은 단기기억 장애 혹은 뇌의 일시적 검색능력 장애로 정의되는데 특히 루이소체병(Lewy body disease), 픽병(Pick's disease), 혈관질환, 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease) 등에서 나타난다<sup>2)</sup>. 또한 이런 질환 외에 여러 가지 화학물질이나 외부 손상 등에 의해 건망증이 유발될 수 있다. 동물실험에서 항건망증 약물의 효과는 주로 무스카린 수용체 저해제인 scopolamine을 이용하여 연구되고 있다<sup>3)</sup>. 건망증과 치매는 기억력에 문제가 생기는 것으로 증상은 비슷하지만

\* 교신저자 : 정지욱, 경북 경산시 유곡동 290번지 대구한의대학교 한약재약리학과

· Tel : 053-819-1337 · E-mail : jwjung@dhu.ac.kr

· 접수 : 2009년 11월 23일 · 수정 : 2009년 12월 12일 · 채택 : 2009년 12월 21일

건망증은 시간적·공간적인 맥락에서 과거와 현재를 잇는 고리인 기억현상에 차질이 생긴 것으로 개선이 가능한 반면 치매는 단기기억뿐 아니라 기억력 전체가 심각하게 손상됨은 물론 판단력과 언어능력, 작업능력도 현격히 떨어지게 된다. 따라서 치매모델에 효과가 있는 약물이라도 건망증 모델에서는 그 효능이 나타나지 않을 수 있다.

韓醫學에서 중추신경계에 영향을 끼치는 한약들이 예로부터 임상에서 널리 사용되어 왔으며, 韓方에서 중추신경계의 질환에는 痴呆, 躁證, 鬱證, 頭痛, 中風, 癱瘓, 不寐 등이 있다. 그 중에서 현대의학에서 말하는 치매는 한 방에서 痴呆, 呆病, 健忘 등의 용어로 표현되고 있으며, 이러한 질환을 益氣活血, 調心補腎, 化痰開竅시키는 처방을 주로 하여 치료하고 있으나 아직까지 韓方에서 사용하는 이러한 한약재들이 어떠한 작용기전을 가지고 있는지는 여전히 불분명하여 현대의학에서 배척당하고 있는 실정이다<sup>4)</sup>.

산사(*Crataegi Fructus*)는 장미과(*Rosaceae*)에 속한 낙엽교목인 산리홍(*Crataegus pinnatifida* Bunge)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 韓方에서 消食化積, 活血散瘀의 효능을 가지고 있어 肉積食滯로 인한 증상과 產後에 瘀阻腹痛에 사용되고 있는 약물이다<sup>5)</sup>. 산사의 성분 및 약리효능으로는 citric acid, crataegolic acid 외에 당류와 플라보노이드 성분을 함유하고 있으며 관상동맥의 혈류량을 증가시켜 혈압을 낮추는 작용이 증명되었으며<sup>6)</sup>, *in vitro*에서 적리균에 대한 강한 항균작용이 보고되었다<sup>7)</sup>. 또한 최근 연구에 의하면 산사나무의 잎으로부터 우수한 항산화 작용이 있는 활성성분을 분리하여 지질 및 체지방의 증가 억제, 고지혈증의 개선<sup>8)</sup> 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 산사의 신경계와 관련된 질병에 대한 연구는 아직까지 미약한 실정이다.

최근 치매 등으로 인해 저하된 인지능력 및 학습능력을 개선시키고 향상시키는 다양한 치료전략을 수립하고 효과적인 약물을 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있다. 현재까지 개발된 기억력 개선 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor), 수용체 활성화제(Receptor agonist), 아세틸콜린분해 억제제(Acetylcholine esterase inhibitor) 등이 있으나 효과가 미약하고 심각한 부작용 및 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다<sup>9,10)</sup>. 그러므로 부작용이 적으며, 효능이 좋고, 원인적 치료(뇌병변의 개선)까지 가능한 새로운 기억력 개선 및 치매치료제를 찾아내고 효과를 입증하여 개발하는 노력이 절실히 요구되고 있다.

이에 본 실험에서는 산사 추출물이 건망증에 대한 효과를 scopolamine으로 유도된 건망증 모델을 이용하여 수동 회피 시험(passive avoidance test)과 Morris 수중 미로 장치(Morris water maze test) 및 Y-maze test를 이용하여 행동학적 변화를 통하여 산사의 기억력 개선 능력 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse (SPF/VAF CrljBgi: CD-1) 5주령을 주식회사 오리엔트(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대학교 동물실에서 7일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 각 군당 10마리로 구성하였고, 온도  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$  내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

#### 2) 재료

본 실험에 사용한 산사는 서울 경동시장에서 구입하였고, 대구한의대학교 약용식물학실험실에서 동정한 후, 본 연구실의 표본실에 보관하고 있다(No. DHUHMP-09-01). 또한 본 실험에 사용한 tacrine (9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), (-) scopolamine hydrobromide, acetylthiocholine iodide and DTNB (5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid])는 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

산사 추출물은 증류수로 2회 세척한 뒤 원한약재의 10배의 70% 에탄올을 가하여 3회 초음파 추출하였다. 추출이 완료된 다음 Whatman (No. 1) filter paper로 여과하고, 이를 rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기(Eyela, model FDU-2000, Japan)에서 건조한 뒤 얻어진 분말을 실험에 사용하였다(수득률 18.1 %).

#### 2) 수동회피시험(passive avoidance test)

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이며 수많은 연구자들이 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 실험으로 본 실험에서는 LeDoux의 방법을 응용하여 시행하였다<sup>11)</sup>. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 약물투여는 산사추출물 및 tacrine은 10% Tween 80에 녹인 후 경구 투여하였고 (5 ml/kg), 대조군에는 10% Tween 80을 같은 용량으로 경구 투여하였다. 경구 투여 30분 후에 증류수에 녹인 스코폴라민을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, 스코폴라민 투여 30분 후에 mouse를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문(gillotin door)을 열어 어두운

구획으로 들어갈 수 있게 하였다(Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 각 구획은 20 × 20 × 20 cm의 공간이다. 이때 길로틴문이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외시켰으며 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문(gillotin door)이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 되는데 이 때 길로틴문(gillotin door)이 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다(학습 시험; training trial). 학습시험(training trial)이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 산사 70% 에탄올 추출물의 효과를 확인하고자 실시하였다(기억시험; test trial). 실험동물은 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 길로틴문(gillotin door)이 열리고 어두운 쪽으로 mouse의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 180초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다<sup>12)</sup>. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

### 3) Morris 수중미로시험(Morris water maze test)

Morris water maze를 통한 공간학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 본 maze의 재원은 지름 90cm, 높이 45cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6cm로 구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다. 실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1cm 밑에 설치하였다. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 maze를 4분원이 되도록 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, maze의 한 4분원에 플랫폼을 설치하였다. Morris water maze test는 6일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 마우스들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1분간 maze 안에서 자유로이 수영하도록 하였으며, 이때 플랫폼은 설치하지 않고 두 번째 날부터 5일째 되는 날까지는 하루에 각각의 마우스가 1일 4회씩 1분 동안 10분 간격으로 maze에서 수영하도록 하였다. 두 번째 되는 날부터 5일째 되는 4일간 1회의 실험 방법은 이미 maze안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마치고 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하였으며, 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6일째 되는 날에는 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있던 위치에 마우스가 머문 시간을 측정하였다. 건망증 유발 물질로는 스코폴라민(scopolamine)을 사용하였으며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30분 전에 1 mg/kg로 복강으로 투여

하였고, 모든 실험 data는 Ethovision program (Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

### 4) Y-미로시험(Y-maze test)

약물 투여는 수동회피시험(passive avoidance test)에 서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로시험에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 팔이 접하는 각도는 120°이다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산된다<sup>14)</sup>.

변경 행동력(%)

$$= \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최고변경(maximum alternation)}} \times 100 (\text{최고변경 : 총 입장횟수} - 2)$$

## 3. 통계처리

모든 실험 결과는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여  $p < 0.05$  수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 결 과

### 1. 산사추출물의 수동회피실험(passive avoidance test)에서의 효과

스코폴라민(1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물 모델을 이용하여 산사추출물이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였다.

Scopolamine (1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 scopolamine 그룹은 기억시험(test trial)에서 latency time이  $35.25 \pm 5.96$ 초로 control 그룹의  $180.00 \pm 0.00$ 초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 이는 학습시험(training trial)시의 전기 충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 scopolamine에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각된다. 한편 산사추출물 25, 50, 100 및 200 mg/kg을 경구 투여한 결과 100, 및 200 mg/kg 그룹에서 각각  $97.50 \pm 20.53$ 초 및  $124.13 \pm 18.99$ 초로 scopolamine 그룹의  $35.25 \pm 5.96$ 초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가

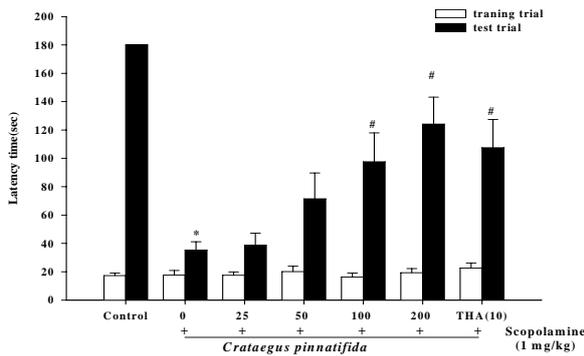


Fig. 1. Effect of the 70% EtOH extract of *Crataegus pinnatifida* fruit (25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice

Data represent means ± S.E.M (N = 8-10). THA : tacrine (10 mg/kg, p.o.). \* :  $p < 0.05$  as compared with the control group, # :  $p < 0.05$  as compared with the scopolamine-treated group.

하였으며, 특히 200 mg/kg의 용량에서 대조군의 68.9 % 수준으로 회복하는 것을 확인하였다 ( $p < 0.05$ , Fig. 1). 뿐만 아니라 양성 대조군으로 사용한 THA (tacrine; 10 mg/kg, p.o.)이 대조군의 59.7 % 수준의 latency time을 보여준 것에 비해 훨씬 높은 개선 효과를 나타내었다.

## 2. 산사추출물의 Morris 수중미로 장치에 의한 학습 및 기억력 효과

Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제 1일째 Control 군은  $49.2 \pm 4.2$ 초, scopolamine 투여군은  $51.6 \pm 3.6$ 초, scopolamine + 산사추출물 투여군은  $50.6 \pm 3.1$ 초, scopolamine + tacrine 투여군은  $48.3 \pm 0.9$ 초로 각 집단간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 Control군은  $16.5 \pm 2.2$ 초, scopolamine 투여군은  $53.0 \pm 2.5$ 초, scopolamine + 산사추출물 투여군은  $29.6 \pm 2.9$ 초, scopolamine + tacrine 투여군은  $16.4 \pm 2.5$ 초로 집단간 유의성 있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 이에 측정일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 scopolamine 투여군에서 control군에 비해 학습능력이 현저히 저하되었다. 마찬가지로 산사추출물 및 양성대조군인 tacrine 투여군에서도 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, 즉 2일째부터 플랫폼에 도달하는 소요시간이 scopolamine 투여군에 비해 통계적( $p < 0.05$ )으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2A).

Morris 수중미로 학습에서 마지막날인 제6일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 실시하고 이를 Ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였다. 각 군의 기억력 측정결과는 control군은  $25.2 \pm 1.6$ 초,

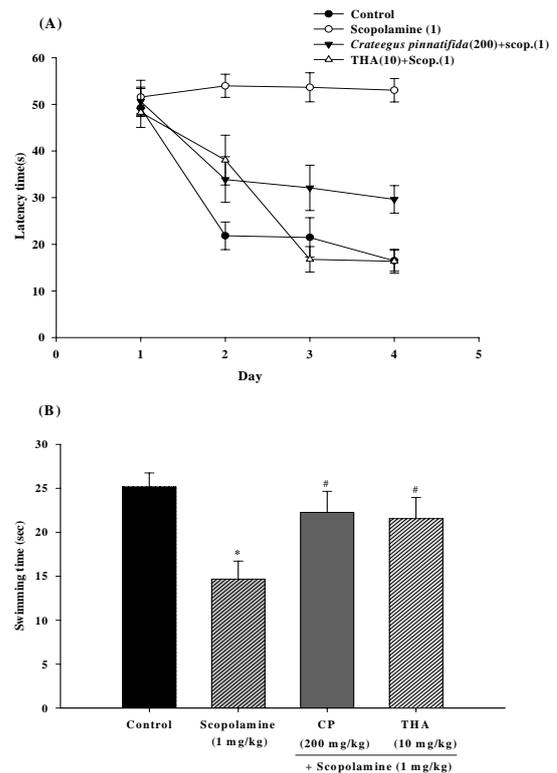


Fig. 2. Effect of the 70% EtOH extract of *Crataegus pinnatifida* fruit (CP) on latency time during the training trial sessions (A) and on swimming time during the probe trial session (B) of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice

At 60 min before training trial sessions, CP (200 mg/kg, p.o.), tacrine (THA, 10 mg/kg, p.o.) or control (same volume of 10% Tween 80) solution was administered to mice. Memory impairment was induced by scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.). The training trial and probe trial sessions were performed as described in Materials and methods. Data represent means ± S.E.M (\* :  $p < 0.05$  versus vehicle control group. # :  $p < 0.05$  versus the scopolamine-treated group).

scopolamine 투여군은  $14.7 \pm 2.0$ 초, scopolamine + 산사추출물 투여군은  $22.2 \pm 2.4$ 초, scopolamine + tacrine 투여군은  $21.6 \pm 2.4$ 초로 집단 간 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 차이를 보였다. 이에 플랫폼에 머무는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, scopolamine 손상군은 control군에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 감소가 나타났고 산사추출물 투여군에서 scopolamine 손상군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ , Fig. 2B.).

## 3. 산사추출물의 Y-미로시험(Y-maze test)에서의 효과

스코폴라민(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의해 spontaneous alternation이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 반면 산사추출물 100, 및 200 mg/kg의 투여에 의해 spontaneous alternation이 scopolamine 투여

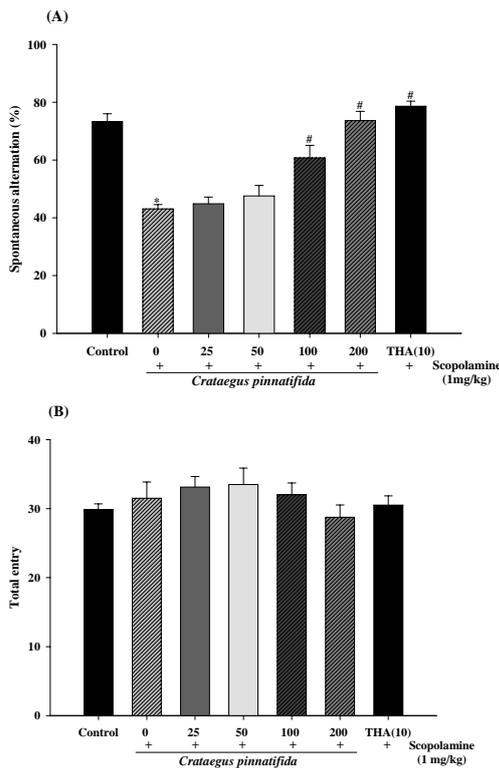


Fig. 3. Effect of the 70% EtOH extract of *Crataegus pinnatifida* fruit on scopolamine-induced memory deficits in Y-maze test in mice

A : spontaneous alternation. B : total arm entry. Data represent means  $\pm$  S.E.M (N = 8-10). THA(10), tacrine (10 mg/kg, p.o.). \* :  $p < 0.05$  as compared with the control group, # :  $p < 0.05$  as compared with the scopolamine-treated group.

군에 비해 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ , Fig. 3A). Spontaneous alternation이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미한다. 반면 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 total entry에서는 변화가 없는 것으로 나타나 수동 회피 시험(passive avoidance test)에서 확인하였듯이 spontaneous alternation이 mouse의 활동성 변화에 의해 나타난 것이 아님을 알 수 있었다 (Fig. 3B).

## 고찰

Scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 모델을 이용한 본 연구에서 산사추출물 투여군에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과를 나타냄을 확인하였다. 수동회피실험(passive avoidance test)에서 산사추출물 100 및 200 mg/kg를 투여한 결과 scopolamine 그룹에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었으며 또한 수중미로실험(Morris water maze test)에서도 산사추출물 200 mg/kg 투여군이 마지막날인 6일째 기억검사를 시행한 결과 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간이 scopolamine 그룹에 대해

유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

최근에는 우리나라의 경우 전통적으로 사용되어 온 한약재로부터 치매예방 및 기억력증진소재 개발에 관심이 집중되고 있으며, 다양한 약물에서 그 가능성들이 점차적으로 보고되고 있다. 韓醫學에서 현대의학의 기억과 관련된 분야는 痴呆, 呆病, 健忘 등의 용어로 표현되고 있다. 韓醫學에서는 이러한 질환을 益氣活血, 調心補腎, 化痰開竅시키는 處方을 주로 하여 치료하였으며 또한 이외에도 痴呆의 원인을 痰飲, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷으로 분류하여 割痰順氣, 填精補髓, 滋補肝腎 등의 방법으로 치료법을 제시하고 있으나 한방에서 사용하는 이러한 한약재들이 어떠한 작용기전을 가지고 있는지는 여전히 불분명하여 현대의학에서 배척당하고 있는 부분이 다소 있는 실정이다<sup>15,16</sup>. 이러한 사실을 배경으로 다양한 한약재를 선별하여 *in vitro*에서 아세틸콜린 분해 효소에 대한 활성 억제실험을 스크리닝 한 결과 산사추출물이 우수한 억제효능을 나타내어(data not shown) scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴모델에서 passive avoidance test, Morris water maze 및 Y-maze test를 이용하여 산사추출물의 기억력 개선 효능을 검토하고자 하였다.

산사(Crataegi Fructus)는 韓醫學에서 消食化積, 活血散瘀의 효능을 가지고 있으며 약리작용으로는 일시적 국부 뇌허혈 모델에서 항산화 효능을 바탕으로 한 신경보호 효과를 나타낸다고 보고하고 있다<sup>17</sup>. 또한 최근 연구에 의하면 관상동맥의 혈류량을 증가시켜 혈압을 낮추는 작용이 보고되어 있으며<sup>18</sup> 지질 및 체지방의 증가 억제, 고지혈증의 개선 등이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>19</sup>. 또한 산사의 플라보노이드 및 triterpenic acid를 이용하여 혈압저하효과를 확인하였으며 chloral hydrate나 피로로 생기는 심박동을 강화시킨다고 보고되어 있다<sup>20</sup>. 그러나 산사의 기억력 관련 질병에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

기억력과 관련된 신경계는 cholinergic 신경계, glutamatergic 신경계, GABAergic 신경계, serotonergic 신경계, adrenergic 신경계 등이 알려져 있으나 특히 cholinergic 신경계가 주로 기억력과 관계가 있다고 알려져 있다<sup>21,22</sup>. Scopolamine은 cholinergic 신경의 subtype 중 하나인 무스카린 수용체를 차단하기 때문에 이 모델에서 효과가 있는 약물은 cholinergic 신경계를 경유하여 효능을 나타낼 것이라 생각할 수 있다<sup>23</sup>. 현재까지 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor), 수용체 활성화제(Receptor agonist), 아세틸콜린분해 억제제(acetylcholinesterase inhibitor) 등이 있으나 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다<sup>24,25</sup>. 국내외에서 현재 사용되고 있는 기억력 개선 치료제들은 증상개선을 위한 항콜린약물, 대사를 비특이적으로 향진시키는 대사향진약물, 혈액순환을 좋게 해주는 혈액순환개선제 등이 있으나 이들 약물의 효과는 일시적이며 부작용을 나타내고 우울증, 불면증, 고혈압, 변비 등을 야기하

기도 한다<sup>26)</sup>. 따라서 오랜 역사를 가진 한의학적 사고방식에서 출발하여 부작용이 적으며, 근본치료가 가능한 새로운 한방제제의 기억력 개선 및 치매 치료제를 도출하는 것이 필요하다.

기억력 개선 및 인지능력 향상에 사용되고 있는 모델에는 passive avoidance test나 radial maze, Morris water maze, Y-maze test, noble object recognition test, fear conditioning test 등이 있는데 이 중 passive avoidance test는 흔히 단순기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다. 또한 Morris water maze test는 사물에 대한 공간인지능력을 알아보기 위해 maze에 4개의 marker를 사용하여 실험동물이 공간에 대한 식별능력을 관찰하는 실험이다.

이에 본 연구에서는 산사추출물이 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는지를 검색하기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 passive avoidance test, Morris water maze test 및 Y-maze test를 실시하였다. 실험동물에 전기충격을 가하여 전기 자극을 기억하는 시간을 측정하는 방법으로 학습 및 기억능력을 측정하는 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 산사추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 생쥐의 수동회피실험에서 latency time이 길어졌다는 것은 산사추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억력과 인지기능감퇴 증상뿐만 아니라 치매질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 공간의 학습과 기억을 검사하는 실험 장치로 사용되는 Morris 수중미로 실험에서도 4일 동안 실시되는 획득시행에서 양성대조군인 tacrine 그룹과 비슷한 양상으로 공간 기억 능력의 향상이 관찰되었으며 마지막 날 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있는 분원에 머문 시간을 측정한 결과 산사추출물 및 tacrine 투여군 모두 대조군과 유사하게 학습 및 기억능력이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A and 2B). 또한 Y-maze test에서도 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이상의 결과 산사추출물 100 및 200 mg/kg의 경구투여에 의해 효과적으로 기억력 및 공간지각능력을 개선시키고 향상시킬 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

결론적으로, 본 연구의 결과에서 산사추출물은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효능을 가지는 천연물이라고 생각되며, 이러한 작용이 특히 콜린성 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다. 향후 산사추출물의 기억력 개선 작용의 평가를 위하여 다양한 활성성분에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱

상세히 진행되어야 할 필요성이 있다고 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 산사의 에탄올 추출물의 기억력 개선 효과를 조사하기 위하여 scopolamine으로 유도된 건망증 모델을 이용하여 수동회피실험(passive avoidance test)과 Morris 수중미로장치(Morris water maze test) 및 Y-maze test를 이용하여 행동학적 변화를 통하여 산사의 기억력 개선 능력 여부를 확인하고자 하였다.

1. 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 산사추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 생쥐의 수동회피실험에서 latency time이 길어졌다는 것은 산사추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억력과 인지기능감퇴 증상뿐만 아니라 치매질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각된다.
2. 공간의 학습과 기억을 검사하는 실험장치로 사용되는 Morris 수중미로실험에서도 4일 동안 실시되는 획득시행에서 양성대조군인 tacrine 그룹과 비슷한 양상으로 공간 기억 능력의 향상이 관찰되었으며 마지막 날 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있는 분원에 머문 시간을 측정한 결과 산사추출물 및 tacrine 투여군 모두 대조군과 유사하게 학습 및 기억능력이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.
3. Y-maze test에서도 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과 산사추출물 100 및 200 mg/kg의 경구투여에 의해 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효능을 가지는 천연물이라고 생각되며, 이러한 작용이 특히 콜린성 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 오세관. 신경전달물질과 뇌질환. 서울 : 신일상사. 2005 : 345-64.

2. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004 ; 82(3) : 1 71-7.
3. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest.* 1998 ; 28(11) : 944-9
4. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울 : 신일상사. 2005 : 29-41.
5. 서부일, 이재현, 최호영, 권동렬, 부영민. 한약본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 498-50.
6. Wang JM. Chinese Herbal Pharmacology. Shanghai : Shanghai Science & Technology Publisher. 1985 : 67-8.
7. Benli M, Yiğit N, Geven F, Güney K, Bingöl U. Antimicrobial activity of endemic *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers and observation of the inhibition effect on bacterial cells. *Cell Biochem Funct.* 2008 ; 26(8) : 844-51.
8. Kang I, Cha J, Lee S, Kim H, Kwon S, Ham I, Hwang B, Whang W. Isolation of Anti-oxidant from Domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge Leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* 2005 ; 36(2) : 121-8.
9. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol.* 1997 ; 74(3) : 225-41.
10. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. *J Neural Transm Suppl.* 2000 ; 59 : 231-42.
11. LeDoux JE. Emotional memory system in the brain. *Behav Brain Res.* 1993 ; 20 ; 58(1-2) : 69-79.
12. LeDoux JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 ; 702 : 149-57
13. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984 ; 11(1) : 47-60.
14. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carboline. *Psychopharmacology.* 1998 ; 94(4) : 491-5.
15. 황의완, 김지혁. 동의정신의학, 서울 : 현대의학서적사. 1989 ; 605-6.
16. Chi JF, Niu JZ, Xu SQ, Li J, Wang JF, Liu JP. Treatment of Alzheimer disease: an evidence-based review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2007 ; 5(3) : 247-54.
17. Elango C, Jayachandaran KS, Niranjali Devaraj S. Hawthorn extract reduces infarct volume and improves neurological score by reducing oxidative stress in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Int J Dev Neurosci.* 2009 ; 27(8) : 799-803.
18. Chang WT, Dao J, Shao ZH. Hawthorn: potential roles in cardiovascular disease. *Am J Chin Med.* 2005 ; 33(1) : 1-10.
19. Shanthi S, Parasakthy K, Deepalakshmi PD, Devaraj SN. Hypolipidemic activity of tincture of *Crataegus* in rats. *Indian J Biochem Biophys.* 1994 ; 31(2) : 143-6.
20. Walker AF, Marakis G, Simpson E, Hope JL, Robinson PA, Hassanein M, Simpson HC. Hypotensive effects of hawthorn for patients with diabetes taking prescription drugs: a randomised controlled trial. *Br J Gen Pract.* 2006 ; 56(527) : 437-43.
21. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev.* 2003 ; 41 : 268-87.
22. Blokland A. Acetylcholine. a neurotransmitter for learning and memory. *Brain research. Brain Res Rev.* 1995 ; 21 : 285-300.
23. Nobili L, Sannita WG. Cholinergic modulation, visual function and Alzheimer's dementia. *Vision Res.* 1997 ; 37(24) : 3559-71.
24. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol.* 1997 ; 74(3) : 225-41.
25. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. *J Neural Transm Suppl.* 2000 ; 59 : 231-42.
26. Bachurin SO. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2003 ; 23(1) : 48-88.