

발효유 산물인 LHFМ의 인지기능 개선 효과

전용진 · 김준형 · 이명재 · 전우진 · 이승훈 · 연승우* · 강재훈
일동제약(주) 중앙연구소

Cognitive-enhancing Effects of a Fermented Milk Product, LHFМ on Scopolamine-induced Amnesia

Yong-Jin Jeon, Jun-Hyeong Kim, Myong-Jae Lee, Woo-Jin Jeon, Seung-Hun Lee, Seung-Woo Yeon*, and Jae-Hoon Kang

ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co. Ltd.

Abstract Probiotics and their products, such as yogurt and cheese have been widely consumed in many countries with proven health benefits including anti-microbial activity and anti-diarrheal activity. LHFМ (*Lactobacillus helveticus*-fermented milk) is a processed skim milk powder, fermented by a probiotics, *L. helveticus* IDCC3801. In the present study, we aimed to investigate the neuroprotective effects and the cognitive improvements of LHFМ. LHFМ itself did not show any cytotoxicity to the human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y; however, it dose-dependently protected against glutamate-induced neuronal cell death. LHFМ also attenuated scopolamine-induced memory deficit in Y-maze and Morris-water maze. In the analysis of hippocampus after a behavior test, LHFМ significantly increased the acetylcholine level and also inhibited acetylcholine esterase activity. Therefore, the raised acetylcholine release partially contributes to the improvement of learning and memory by a treatment with LHFМ. These results suggest that LHFМ is an effective material for prevention or improvement of cognitive impairments caused by neuronal cell damage and central cholinergic dysfunction.

Keywords: *Lactobacillus helveticus* - fermented milk, *Lactobacillus helveticus*, acetylcholine, cognition, apoptosis.

서 론

복잡한 현대 사회에서 인지기능과 기억력은 청소년기에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이 되고 있다. 기억력의 저하는 현대 사회활동에서 많은 문제점을 일으키며, 특히 고령화로 인해 자연적으로 또는 치매 등의 퇴행성 질환에 의해 인지기능이 감퇴된 경우, 본인의 사회 활동뿐 아니라 주변인들의 생활에 많은 장애를 초래한다는 점에서 이에 대한 연구의 중요성은 증대되고 있다. 의학적으로 건망증(amnesia)은 단기 기억 장애 혹은 뇌의 일시적 검색능력 장애로 정의되는데 특히 루이소체병(Lewy body disease), 픽병(Pick's disease), 혈관성 치매, 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease) 등에서 나타난다(1,2). 또한 이런 질환 외에 여러가지 화학물질이나 외부 손상 등에 의해 건망증이 유발될 수 있다(3-5). 건망증과 치매는 기억력에 문제가 생기는 것으로 증상은 비슷하지만 건망증은 시간·공간적인 맥락에서 과거와 현재를 잇는 고리인 기억현상에 일시적인 차질이 생긴 것으로 개선이 가능한 반면 노화나 치매로 인한 기억력 손상은 단기

기억뿐 아니라 기억력 전체에 영향을 주는 것은 물론 판단력과 언어능력, 작업능력도 현격히 떨어지게 된다. 현대 과학에서 기억력 손상의 원인은 콜린 가설(Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's disease)을 이용하여 설명한다(6-8). 알츠하이머 환자는 여러 종류의 신경이 손상되는데, 그 중에서 콜린성 신경의 손상이 가장 심각한 것으로 알려졌고, 이런 콜린성 신경의 손상에 의하여 기억력 감퇴, 언어, 공간 지각력 및 판단장애 등의 증상이 나타난다는 것으로 간주하고 있다(9,10). 무스카리닉 수용체의 활성 저해물질인 scopolamine을 쥐에 처리하면 일시적인 단기 기억상실증이 유도되는 현상 또한 콜린 가설을 뒷받침하는 결과이다. 따라서 알츠하이머 환자의 기억력 및 인지기능 저하를 개선하고자 대뇌 기저부 내 acetylcholine(ACh)의 농도를 유지시키기 위한 여러 약물이 개발 중이거나, 시판 중에 있다. Acetylcholinesterase(AChE)의 활성저해물질인 Tacrine, Donepezil, Rivastigmine, Galantamine 등이 시판 중이며, ACh의 생성에 관여하는 효소인 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성 증가제, 무스카리닉 수용체의 활성 증가제 등도 개발 중에 있다.

유산균은 인류가 오랜동안 복용하면서 그 안전성 및 효능이 입증되어 왔다. 또한 유산균의 다양한 기능에 대해서도 알려졌는데, 정장작용과 소화촉진작용 이외에도 최근에는 다양한 만성질환의 개선에도 효과가 예상되고 있다(11-13). 최근에는 유산균뿐만 아니라 유산균에 의해 생성되는 2차 대사산물도 산업적으로 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있는데, 대표적으로 신경전달물질인 γ -aminobutyric acid(GABA)의 생산을 예로 들 수 있다(14). 따라서 전통적인 유산균의 산업적 개발은 유산균이 직접적

*Corresponding author: Seung-Woo Yeon, ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co. Ltd., Hwaseong, Gyeonggi 445-710, Korea
Tel: 82-31-371-2831
Fax: 82-31-371-2900
E-mail: swyeon@ildong.com
Received January 12, 2012; revised June 8, 2012;
accepted July 5, 2012

으로 작용하여 나타내는 효능에 국한되었지만, 최근에는 유산균이 생산하는 물질을 이용하는 방향으로 개발이 진행되고 있다.

본 연구팀의 선행 연구 결과에서는 skim milk를 *L. helveticus* IDCC3801로 발효시킨 배양액의 한외여과물을 주정 침전하고, 침전물에 대한 BACE 저해효과를(15) 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 하여 공정 개선과 대량 생산을 통해 얻은 LHFМ(*Lactobacillus helveticus* - fermented milk)의 BACE 저해 효과 외에 추가적인 기능성을 확인하고 기전의 작용점을 밝히고자 하였다. 이를 위해 scopolamine으로 기억 손실을 유발한 mouse에서 LHFМ에 의한 인지기능 개선 효과, 뇌 조직 내 ACh 함량과 AChE 활성에 미치는 영향, LHFМ의 신경세포 보호 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 약물투여

실험동물은 ICR 마우스(25-30 g, 수컷)를 (주)오리엔트 바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 일주일간의 순화기간을 거친 후에 각 군당 8마리씩 나누어 실험에 사용하였다. 동물은 한 케이지당 네 마리씩 수용하였으며, 물과 사료는 자유섭취 방법으로 급여하였다. 동물 사육실의 환경은 일정습도(60±10%)와 일정온도(23±1°C)를 유지하였고, 명암은 12시간(08:00-20:00)을 주기로 하였다. 동물실험은 일동제약 동물실험윤리위원회(ILDONG Institutional Animal Care and Use Committee; ILDONG IACUC)의 승인을 받아 과학적이고 윤리적으로 사용하였다. LHFМ(500, 750 mg/kg)과 donepezil(4 mg/kg)을 1% CMC에 녹여서 14일 동안 경구로 투여하였으며, normal과 scopolamine군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. 투여시작 후 15일 후에 행동실험을 시작하였으며 행동실험을 하는 날은 실험 60분전에 약물을 경구로 투여하고, 30분 후에 scopolamine(1 mg/kg, *i.p.*, saline)을 투여하여 기억손상을 유발하였다.

LHFМ의 제조

Skim milk가 10% 첨가된 SG배지에 *L. helveticus* IDCC 3801 전배양액을 3%(v/v) 접종하고 37°C, 16시간 혐기배양하였다. 배양액을 18,000×g에서 10분간 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 회수한 상등액은 불순물과 단백질 등 고분자 성분을 제거하기 위해 ultrafiltration(M.W. 8,000 cut-off)을 수행하였다. 여액을 10배 감압농축하고 농축액 부피 대비 2.5배 양의 95% 에탄올을 처리한 후 16시간 교반, 반응시켰다. 반응물을 18,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 45°C에서 20시간 건조한 후 분말화하여 최종 시료로 사용하였다.

신경세포 보호 효과

본 실험에 사용된 세포주는 SH-SY5Y로써 한국 세포주 은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 96-well plate에 5×10⁴/90 μL/well의 농도로 세포를 분주하여 1일 동안 배양 후 2% acetic acid에 용해한 LHFМ을 배양액으로 희석하고 세포에 16시간 전처리하였다. 50 mM의 sodium glutamate를 처리한 뒤, 48시간 방치하여 세포 독성을 유도하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide, 5mg/mL in PBS)용액을 각 well당 15 μL씩 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 반응시키고 well당 100 μL의 lysis buffer(0.01 N HCl, 10% SDS)를 처리하여 형성된 formazan이 완전히 용해되도록 37°C에서 24시간 동안 방치한 후 570/652 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Acetylcholinesterase(AChE) 활성 측정

효소 활성은 Ellman's coupled enzyme assay방법에 따라 Acetylcholinesterase assay kit(Amplite™ Colorimetric Acetylcholinesterase Assay Kit, AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. *In vitro* AChE의 활성을 측정하기 위해 전기뱀장어에서 추출한 AChE 10 mU와 증류수에 혼합 시킨 LHFМ 또는 증류수와 혼합하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 이후, ACh와 DTNB(5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid))를 처리한 뒤, 15분간 반응시키고 412 nm에서 흡광도를 측정하여 AChE의 활성을 측정하였다.

수중미로(Morris water maze) 실험

Morris water maze는 Morris(16)의 방법으로 다음과 같이 수행하였다. 여러 표식이 있는 큰 방에 직경 120 cm, 높이 50 cm의 원형 수조의 한 사분면의 중앙에 원형의 platform을 놓고, 물의 높이를 platform보다 2 cm 높게 채웠고 온도는 23±2°C를 유지하였다. 실험 동안은 수조에 40 mL의 인공식용색소를 섞어서 platform이 보이지 않게 하고 reference memory test를 실행하였으며, 수조 내의 동물의 움직임을 비디오 추적시스템(EthoVision, Noldus, Netherlands)으로 모니터링 하였다. 실험 시작 하루 전에 platform이 없는 수조에서 60초 동안 자유롭게 수영하게 하여 상황에 적응시킨 다음 매일 1회에 60초 동안 4회 인지 시험을 5일 동안 실시하였다. 매일 적응훈련 때마다 3개의 위치 중 하나에 무작위적인 순서로 입수시켰다. platform은 수조의 경계와 중심에서 같은 거리인 특정 사분면의 중간에 위치를 유지하였다. 첫째 날과 둘째 날의 처음 두 번은 platform을 찾아가는 적응 훈련을 시켰다. 각 훈련마다 숨겨진 platform을 찾아가는 탈출 시간을 기록하였으며, 찾지 못하는 경우에는 실험자가 10초 동안 platform에 인도시켜서 기억하도록 하였다. platform을 찾았지만 10초를 머무르지 않은 경우 platform에 머무른 총 시간이 10초가 될 때까지 머물게 인도시켰다. 실험 6일째에는 probe test를 실시하는데 platform을 치우고 60초 동안 수영시키며, 하루 동안 총 2회 시행한다. platform이 있던 자리를 지나가는 횟수를 기록하였다.

Y-미로(Y-maze) 시험

공간기억능력을 평가하기 위해서 Y-maze test를 실시하는데, 약물은 실험 실시 1시간 전에 투여하였고, 30분 후에 scopolamine(1 mg/kg, *i.p.*, saline)을 투여하여 기억손상을 유발하였다. Y자형 미로의 각 가지를 A, B, C로 정한 후 세 가지가 만나는 정중앙 부분에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여한다. 변경 행동력(alternation behavior)은 Yamaguci 등(17)에 의한 아래의 식으로 계산하였다.

Alternation behavior (%)

=actual alternation/maximum alternation×100

(maximum alternation=총 입장횟수-2)

ACh 함량 및 *ex vivo* AChE 활성 측정

행동실험이 끝난 mouse의 hippocampus를 추출한 뒤, 액체질소에서 급속 냉각시킨 뒤, ACh 및 AChE의 활성을 측정할 때까지 deep-freezer에서 보관하였다. LC-MS/MS를 이용한 ACh 측정은 Lee 등의 방법(18)을 참고하여 진행하였다. ACh의 양을 측정하기 위해 시료의 무게를 측정한 뒤, 20 mg/mL의 농도가 되도록

saline 용액을 넣고 homogenization 하였다. Hippocampus homogenate 100 μ L와 MeOH 400 μ L를 혼합하여 최종농도 4 mg/mL이 되도록 처리한 뒤, 상온에서 30분간 방치하였다. 20,000 \times g에서 10분간 원심분리 후, 상층액을 회수하여 LC-MS/MS(Agilent 6460 Tripquad LC/MS system, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 ACh의 양을 측정하였다. 이동상으로 0.1% formic acid를 함유하고 있는 HPLC급 증류수와 메탄올의 혼합액(20%:80%, v/v)을 사용하였으며, 유속은 2 mL/min이었다. 칼럼은 Zobrax SB-C18(4.6 \times 50 mm, 1.8 mm, Agilent)를 사용하였으며 온도는 40°C를 유지하였다. 이온화는 ESI(electrospray ionization) positive mode를 이용하였으며, 피크 검출은 MRM(multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하고, nebulizer gas와 collision gas, sheath gas는 300°C의 질소가스를 사용하였다. MRM model를 이용한 ACh의 검출은 fragmentor 135 V에서 m/z 146의 수소화된 분자이온을 검출하였으며, collision energy 15 eV를 주었을 때 생성된 production은 m/z 87로 모니터링 하였다.

Ex vivo AChE의 활성 측정은 Kwon 등의 방법(19)을 참고하여 진행하였다. 냉동 보관중인 조직에 300 mL의 sodium phosphate buffer(0.1 mM, pH 7.4)를 넣고 homogenization을 한 뒤, 얼음에 30분간 방치하였다. 20,000 \times g로 10분간 원심분리 후 상층액을 얻었고 이 분획을 AChE 효소원으로 사용하였다. 각 분획을 단백질 정량하여 동일한 양으로 조정된 후 AChE assay kit를 이용하여 AChE 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

LHFM에 의한 신경세포 사멸억제 효과

알츠하이머를 포함한 퇴행성 신경질환들에서는 신경세포 사멸이 보고되고 있으며, 대표적인 요인들 중 하나로 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor의 과도한 자극으로 유입된 칼슘으로 인한 신경세포 사멸이다(21).

LHFM이 glutamate에 의한 신경세포 사멸을 억제하여 신경세포 보호효과를 보이는지 조사하기 위해 인간 유래 신경모세포종 세포인 SH-SY5Y를 대상으로 glutamate에 의한 사멸 조건을 확립하였다. 배양중인 SH-SY5Y에 다양한 농도로 glutamate를 처리한 결과, 처리농도 50 mM에서 48시간 처리 시 세포독성(미발표 자료)을 보이는 것을 확인하였다. 다음으로 LHFM 자체가 세포독성을 보이는지를 조사하였다. LHFM을 다양한 농도로 72시간 동안 처리하였을 때, LHFM은 처리한 가장 높은 농도인 1,000 μ g/mL에서도 SH-SY5Y의 생존뿐 아니라 증식에도 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 이상의 조건에서 LHFM에 의한 신경세포 사멸 억제효과를 확인하기 위해 다양한 농도의 LHFM을 SH-SY5Y에 16시간 동안 전처리 한 뒤, 48시간 동안 50 mM의 glutamate를 처리하여 세포사멸을 유도하고 MTT assay를 진행하여 세포 사멸을 관찰하였다. 각 실험군을 glutamate만 처리한 실험군과 비교했을 때, LHFM은 glutamate에 의한 세포 사멸을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 특히 LHFM은 500 μ g/mL 처리 시 세포 사멸을 유도하지 않은 SH-SY5Y와 동일한 수준으로 세포의 생존이 회복되어 우수한 신경세포 사멸 억제 효과가 있음을 확인하였다. 퇴행성 신경질환에서 신경 세포 사멸을 유도한다고 보고되어 있는 oxidative stress, inflammation 등에 의해서도(22) LHFM이 신경세포 보호효과를 보이는지 추가적인 연구가 필요하지만, 현재의 결과는 LHFM이 glutamate가 밀접하게 관련된 알츠하이머 병 등 퇴행성 뇌 질환에서 신경세포를 보호할 가능성을 제시한다(20,21).

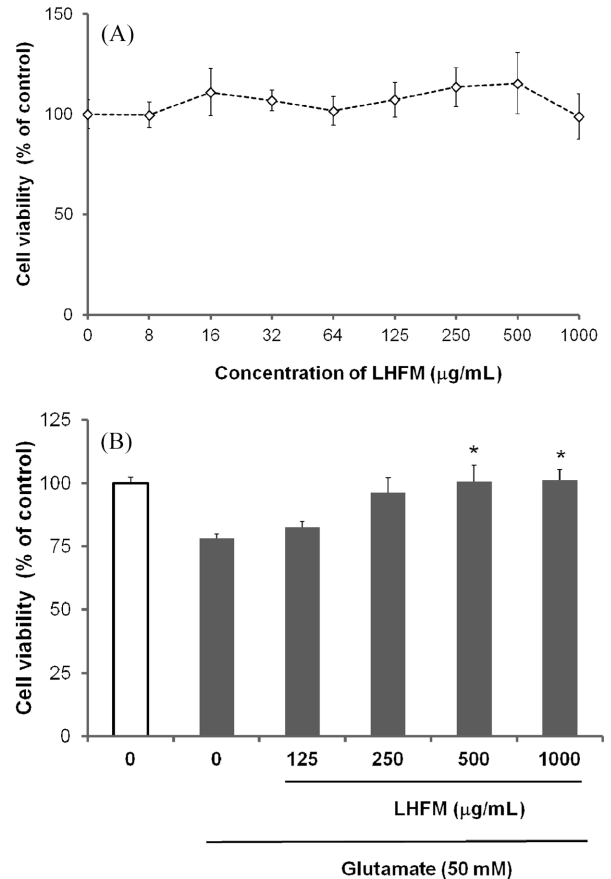


Fig. 1. Effects of LHFM on glutamate-induced cell death of SH-SY5Y human neuroblastoma cell. (A) The effect of LHFM on the viability of SH-SY5Y was estimated. (B) Cells were pre-treated with varying concentrations of LHFM for 16 h and followed by the treatment with 50 mM of glutamate for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. Bars are means \pm SE of cell viability from three independent cultures. Statistical significance was estimated by Student's T-test (* p <0.05, ** p <0.01 compared with glutamate along groups.)

LHFM의 AChE 활성저해 효과

신경전달물질의 90% 정도를 차지하는 ACh는 기억과 학습의 중추적 역할을 담당한다. 알츠하이머 환자에서는 뇌 내 ACh과 이를 합성하는 효소인 ChAT의 활성의 감소뿐 아니라 중격(septum)과 메이너트 기저핵(nucleus basalis of Meynert)에 있는 콜린성 신경 세포수의 감소로 중추 콜린성 신경전달이 장애를 받아 인지 기능이 감퇴되는 것으로 알려져 있다(23). 알츠하이머 환자의 콜린성 신경전달을 증가시켜 인지 기능을 개선하고자 donepezil을 비롯한 여러 AChE inhibitor가 개발되어 사용되고 있다.

본 연구팀에서도 LHFM이 학습과 기억력 개선에 효과가 있는지 조사하기 위해 기억과 밀접한 관련이 있는 신경전달 물질인 ACh의 함량에 영향을 줄 수 있는 AChE의 활성을 전기뱀장어 유래 AChE를 이용하여 평가하였다. LHFM은 농도 의존적으로 AChE의 활성을 억제하였으며 처리 최고 농도인 200 μ g/mL에서는 50% 이상 억제효과를 나타내었다(Fig. 2). 양성 대조 물질로 사용한 donepezil은 처리 농도가 낮아 AChE 저해 활성이 적었지만 유의적인 억제 효과를 보였다. 이상의 결과는 LHFM은 donepezil과 동일한 기전을 갖는 것을 확인한 결과로, AChE 활성 억제를 통해 ACh의 함량을 높여 인지기능 개선 효과를 나타낼 수

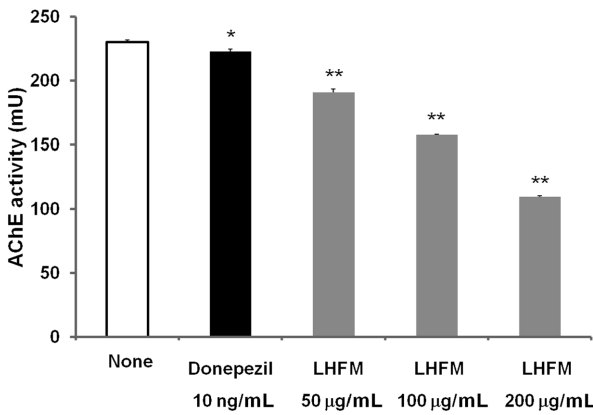


Fig. 2. The inhibitory effect of LHFМ on AChE activity. The effect of LHFМ on *in vitro* AChE activity was evaluated by Ellman’s coupled enzyme assay method. Donepezil was used as a positive control. Values were expressed as mean±SE of three replicate determinations. Statistical significance was assessed by Student’s T-test (* p <0.05, ** p <0.01 compared with control groups).

있음을 보여준다.

Scopolamine 모델에서 LHFМ의 학습과 기억 개선 효과

LHFМ의 인지기능 개선 효과를 평가하기 위해 scopolamine으로 기억 손상을 유발한 mouse에서 Morris water maze와 Y-maze를 이용한 행동 시험을 수행하였다. LHFМ은 2주 동안 사전 투여 후 행동 시험 기간 동안 매일 scopolamine과 함께 투여하였다.

LHFМ의 Morris water maze 시험은 하루 4번씩 5일 동안 실시하였다. Scopolamine을 단독으로 처리한 군은 수중미로 상의 platform의 위치를 찾아가는 escape latency시간이 감소하지 않아 scopolamine에 의한 기억손상이 정상적으로 유도된 것을 확인하였다. 동일 조건에서 scopolamine 투여 전에 양성대조물질인 donepezil을 처리한 실험군은 학습 4일째부터 scopolamine 처리군과 비교하여 유의적으로 escape latency시간이 감소하는 것을 확인하였다. LHFМ 500 mg/kg 처리군은 학습 3일째부터, LHFМ 750 mg/kg 처리군은 2일째부터 escape latency시간이 scopolamine 처리군과 유의적인 차이를 나타내어 scopolamine에 의한 기억 손상을 개선하였고 LHFМ 750 mg/kg 처리군은 5일째에서는 정상 동물과 동일한 수준의 개선효과를 보였다(Fig. 3A). 실험 동물의 기억력을 조사하기 위한 probe trial에서 platform제거 후 처음 위치해 있던 platform으로 찾아가는 비율을 측정한 결과 scopolamine을 처리한 그룹에 비해 양성대조물질인 donepezil과 LHFМ 750 mg/kg 처리군에서 처음 위치해 있던 platform을 찾아가는 비율이 각각 44.4±20.3%, 77.8±44.8%로 유의적으로 증가하였음을 확인하였다(Fig. 3B).

Y-maze 시험에서도 LHFМ은 뚜렷한 개선 효과를 보였다. 정상군과 scopolamine 처리군, donepezil 처리군, LHFМ 처리군 모두 Y-maze에서 총 교차횟수에서 유의한 차이가 없어 각 약물 처리에 의한 행동능력 이상은 없는 것으로 판단하였다. 이상의 조건에서 자발적 교차 행동력을 측정한 결과, 정상군에서는 70.2±3.4%의 변경 행동력을 보인 반면, 대조군인 scopolamine 처리군은 37.1±5.3%로 나타나 정상군과 뚜렷한 차이를 나타내었다. 양성대조 물질인 donepezil을 처리한 실험군은 56.8±2.8%의 변경 행동력을 보여 scopolamine 처리군 대비하여 유의한 행동개선 효과가 나타났으며, LHFМ 투여군들도 모두 scopolamine 처리군과 비교하여 유의한 행동개선 효과를 나타내었다(500 mg/kg; 53.5±1.9%,

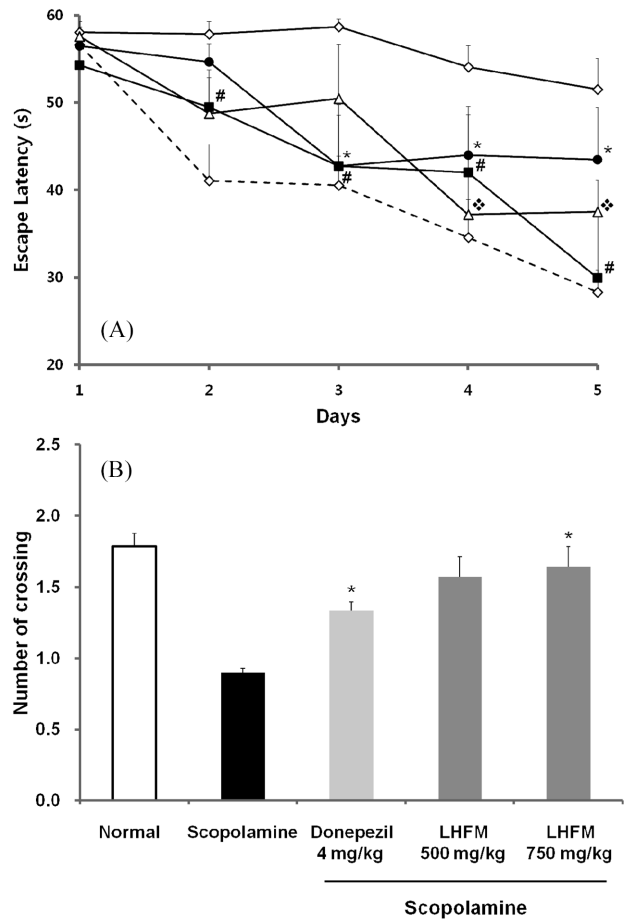


Fig. 3. Effect of LHFМ on the scopolamine-induced amnesia model in Morris water maze test. LHFМ was administered according to the schedule described in Material and Method. Escape latency of the acquisition training and the probe trial were monitored. Values are expressed as mean±SE. Student’s T-test was applied to assess the statistical significance of differences among the scopolamine, donepezil, LHFМ500 and LHFМ750 treatment groups (*, #, * p <0.05 compared with scopolamine groups). (A): Escape latency of the acquisition training. The symbols used are as follows: ◇, the part shown in dotted line, Normal treatment group; ◇, the part shown in solid line, scopolamine treatment group; △, donepezil 4 mg/kg+scopolamine treatment group; ●, LHFМ 500 mg/kg+scopolamine treatment group; ■, LHFМ 750 mg/kg+scopolamine treatment group. (B): Mean values of the number of crossing on the probe trial

750 mg/kg; 54.2±1.9%, Fig. 4). 또 다른 행동 시험인 passive avoidance에서도 비록 유의성은 없었지만 LHFМ 투여군에서 농도 의존적으로 개선 경향(미발표 자료)을 보여 LHFМ은 기억과 학습 개선에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Acetylcholine 증가효과

신경화학적 연구를 통해 입증된 결과에 의하면 기억력은 뇌의 콜린성 신경계가 매우 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다 (18). 특히 알츠하이머 환자에게서 나타나는 학습능력 및 기억력의 감퇴는 콜린성 신경의 손상에 의한 것이라고 간주하는 콜린 가설이 여러 연구를 통해 입증되고 있다(6-10). 이 가설에 의하면 알츠하이머 환자를 포함한 인지기능 장애 환자의 뇌 조직 내 ACh를 증가시킬 수 있는 물질은 기억력 개선효과를 나타낼 수 있음을 의미하는 것으로 LHFМ이 뇌 조직에서 AChE 활성 저해 및

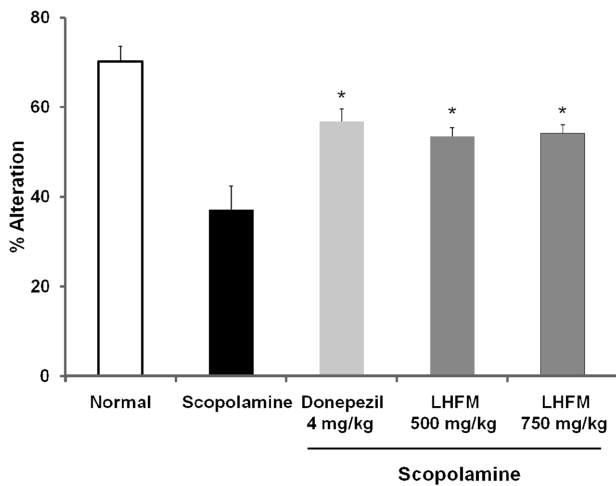


Fig. 4. Effect of LHF on the scopolamine-induced amnesia model in Y-maze test. LHF was administered according to the schedule described in Material and Method. The percentage of alteration on the Y-maze was monitored. Values are expressed as mean±SE. Student's T-test was applied to assess the statistical significance of differences among the scopolamine, Donepezil, LHF500 and LHF750 treatment groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with scopolamine groups).

ACh 증가 효과를 나타내는지 조사하였다. 행동실험이 완료된 mouse의 hippocampus를 적출한 뒤 ACh를 측정된 결과, scopolamine 처리군에서는 정상군에 비해 ACh의 양이 현저하게 감소하였으나(Fig. 5A) 양성 대조 물질인 donepezil 처리군에서는 scopolamine 처리군과 비교하여 유의적으로 $18.1 \pm 5.7\%$ 증가하였다. ACh의 함량은 LHF 투여 시에도 투여 농도에 비례하여 증가하였으며 750 mg/kg 처리군은 scopolamine 처리군과 비교하여 $19.4 \pm 5.3\%$ 유의적으로 증가하였다.

LHF 처리는 AChE 활성에도 영향을 주었다. Scopolamine 처리군에서는 정상군 보다 AChE 활성이 24% 이상 증가하였으나 donepezil 처리군은 scopolamine 단독 처리군 대비 AChE 활성이 $9.5 \pm 4.8\%$ 감소하였다(Fig. 5B). LHF를 투여한 모든 실험군에서도 scopolamine에 의한 AChE 활성 증가가 정상군 수준으로 유의적으로 감소되었다.

행동시험 개선과 함께 hippocampus 조직 내 ACh 함량 증가, AChE 활성 감소 결과들을 종합하여 보면 LHF 내 유효 성분들이 혈관 뇌 장벽(blood brain barrier)를 통과한 후 시냅스에 존재하는 AChE의 활성 억제로 인한 ACh 함량 증가가 기억과 학습 개선에 기여하는 것으로 사료되며 LHF 내 어떤 성분이 이러한 작용을 나타내는지 유효성분 규명 연구를 현재 진행 중에 있다.

요 약

본 연구팀의 선행 연구 결과, *L. helveticus* IDCC3801의 발효유 주정 침전물이 BACE의 활성 억제를 통한 amyloid beta(Aβ) 생성 저해효과를 갖고 있음을 확인하였다(15). 이러한 결과를 바탕으로 *L. helveticus* IDCC3801의 발효유 주정 침전물의 산업화를 위한 공정 개선연구를 진행하였고, 대량생산을 통해 LHF를 확보하였다. 본 연구는 LHF의 인지기능 개선 기능성 입증 연구로써 Aβ 저해효과 외에 신경세포 보호효과 및 기억력 개선 효능을 확인하고 어떠한 작용 기전으로 개선 효과가 나타나는지 조

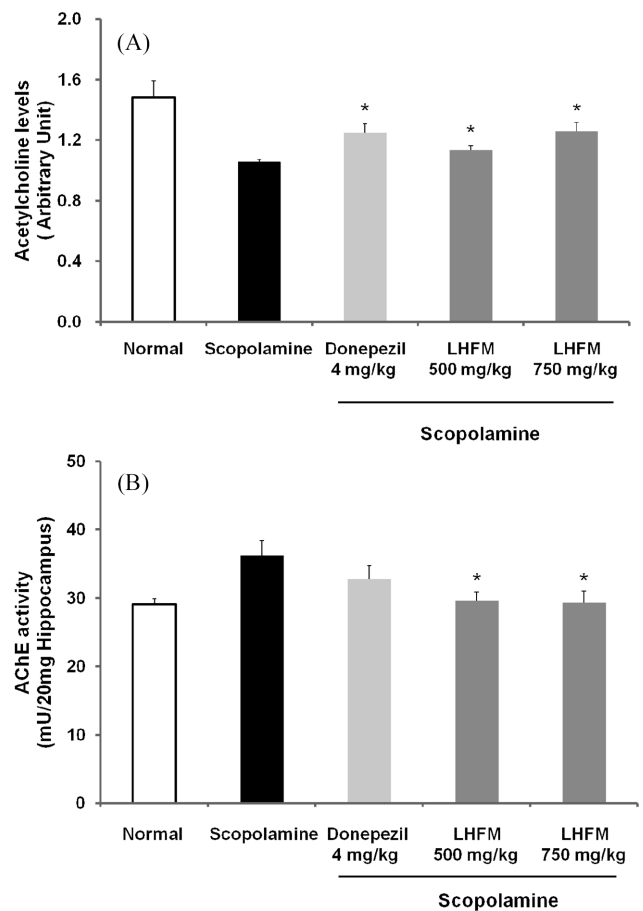


Fig. 5. Effect of LHF on scopolamine-induced changes of acetylcholine level and AChE activity in hippocampus. After experimental behavior test, the hippocampal tissues were extracted and ACh level (Fig. 5A) and AChE activities (Fig. 5B) in hippocampal extracts were measured. Values are mean±SE. Statistical significance was estimated by Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with scopolamine groups).

사한 것으로 scopolamine으로 기억 손상을 유발한 mouse에서 학습 능력과 기억력 개선 효과, 신경세포 보호 효과, AChE 저해와 ACh 증가 효과 등을 평가하였다. LHF는 신경세포 사멸을 유도하는 고농도의 glutamate가 존재하는 환경에서 농도 의존적으로 신경세포의 사멸을 억제하여 신경세포를 보호하였다. 또한 LHF는 *in vitro*에서 농도 의존적으로 강력하게 AChE의 활성을 저해하였다. 이러한 *in vitro* 결과들을 근거로 scopolamine으로 기억 손상을 유발한 mouse에서 Morris water maze와 Y-maze 행동 시험을 통해 LHF의 학습능력과 기억 개선 효과를 조사하였다. LHF는 Morris water maze에서 실험 2일째부터 escape latency시간을 유의적으로 감소시켰으며 5일째에서는 정상 mouse와 동등한 수준으로 감소되어 우수한 학습 효과를 보였다. 실험 6일째 platform을 치운 후 시행한 probe trial에서도 platform이 있던 위치에 머무는 회수가 scopolamine을 단독으로 처리한 것보다 유의적으로 높아 장기기억의 개선에도 효과가 있었다. Y-maze 시험에서도 LHF는 scopolamine 단독 처리군과 비교하여 뚜렷하게 변경 행동력을 증가시켜 여러 행동 시험을 통해 LHF의 인지기능 개선 효과를 확인하였다. 행동실험 후 hippocampus를 적출하여 ACh 및 AChE의 활성을 측정된 결과, donepezil과 마찬가지로 LHF는 AChE의 활성을 유의적으로 억제하였으며 또한

ACh 함량도 증가시켰다. 결론적으로 LHFМ은 신경세포 보호 효과와 신경전달물질인 ACh의 뇌 조직 내 농도를 높여 인지기능 개선 효과를 보이는 것을 확인하였다.

문 헌

1. Snow RE, Arnold SE. Psychosis in neurodegenerative disease. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 1: 282-293 (1996)
2. Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: Current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern. Med. Rev.* 13: 85-115 (2008)
3. McNally RJ. Experimental approaches to cognitive abnormality in posttraumatic stress disorder. *Clin. Psychol. Rev.* 18: 971-982 (1998)
4. Welch KA. Neurological complications of alcohol and misuse of drugs. *Pract. Neurol.* 11: 206-219 (2011)
5. Vakil E. The effect of moderate to severe traumatic brain injury (TBI) on different aspects of memory: A selective review. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 27: 977-1021 (2005)
6. Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174: 788-794 (1971)
7. Davies P, Maloney AF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403-1410 (1976)
8. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414 (1982)
9. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer's disease: Evidence of selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10: 408-414 (1981)
10. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190 (1983)
11. Usinger L, Ibsen H, Jensen LT. Does fermented milk possess antihypertensive effect in humans? *J. Hypertens.* 27: 1115-1120 (2009)
12. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci.* 39: 13-126 (1999)
13. Bengmark S. Bio-ecological control of chronic liver disease and encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 24: 223-236 (2009)
14. Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39: 1107-1116 (2010)
15. Yeon SW, You YS, Kwon HS, Yang EH, Ryu JS, Kang BH, Kang JH. Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 reduces beta-amyloid and attenuates memory deficit. *J. Funct. Foods* 2: 143-152 (2010)
16. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Neurosci. Methods* 11: 47-60 (1984)
17. Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, Mouri A, Kim HC, Saito K, Matsuno T, Kawashima S, Nabeshima T. Effects of a novel cognitive enhancer, spiro[imidazo-[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446), on learning impairments induced by amyloid-beta1-40 in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1079-1087 (2006)
18. Lee B, Jung K, Kim DH. Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice. *Pharmacol. Biochem. Be.* 93: 121-127 (2009)
19. Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim HC, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY, Jang CG. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 649: 210-217 (2010)
20. Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML. Neurotoxicity: Pharmacological implications. *Fund. Clin. Pharmacol.* 5: 755-767 (1991)
21. Choi DW. Possible mechanisms limiting *N*-methyl-D-aspartate receptor overactivation and the therapeutic efficacy of *N*-methyl-D-aspartate antagonists. *Stroke* 20: 1120-22 (1990)
22. Michael TL, M. Flint Beal. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795 (2006)
23. Kálmán J, Engelhardt JI, Le WD, Xie W, Kovacs I, Kása P, Appel SH. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *J. Neuroimmunol.* 77: 63-74 (1997)