

천마 추출액이 Scopolamine으로 유발된 기억력 감퇴 흰쥐에 미치는 영향

김진호¹ · 추한나¹ · 박은혜¹ · 정종길² · 김경옥³ · 김정삼^{1*}

¹동신대학교 한의과대학 해부학교실

²동신대학교 한의과대학 본초학교실

³동신대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

Effects of *Gastrodia elata* Extracts on Scopolamine-induced Memory Impairment in Rats

Jin-Ho Kim¹, Han-na Choo¹, Eun-hye Park¹, Jong-Kil Jeong²,
Kyeong-Ok Kim³, and Jeong-Sang Kim^{1*}

¹Dept. of Anatomy, ²Dept. of Herbology, and ³Dept. of Neuropsychiatry,
College of Oriental Medicine, Dongshin University, Jeonnam 520-714, Korea

Abstract

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by a gradual decline in memory associated with shrinkage of brain tissue, with a localized loss of neurons mainly in the hippocampus and basal forebrain. This study investigated the neuroprotective effect of *Gastrodia elata* aqueous extracts against scopolamine-induced neurotoxicity in the hippocampus of male Sprague-Dawley rats. The animals (n=25) were divided into five different groups with five animals per each group. The normal group (Nor) was administered with saline, while the control (Con) group was administered saline after scopolamine treatment. The experimental group (Exp) was administered *Gastrodia elata* aqueous extracts (200 mg/kg body weight) for 20 or 30 days after scopolamine treatment. From a light microscopy study, the nuclei of neurons in the hippocampus were more shrunken or condensed in the 20 or 30 day control groups compared to experimental groups. The densities of neurons from the CA1 and CA3 area of the hippocampus in the Exp increased compared with the Con. Amyloid β protein, containing PAS-positive materials, was lower in the Exp compared with the Con. The present study demonstrates that *Gastrodia elata* aqueous extracts possess neuroprotective potential, thus validating its use in alleviating the toxic effects of scopolamine.

Key words: *Gastrodia elata*, hippocampus, scopolamine

서 론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 나이가 든 사람들에서 나타나는 만성적인 신경퇴행성 치매로 기억력 손실로 인한 인지기능에 현저한 감소와 행동장애를 일으킨다(1). AD 환자의 주요 병리학적 특징은 amyloid 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 발생된 amyloid- β (A β)가 광범위하게 뇌 조직에 축적된다(2). 인지기능이 저하되면 중추신경계의 포도당 대사가 감소하며, 신경조직에서는 β -amyloid가 축적된 노화반(senile plaque)이 나타난다(2,3). 주요 우울장애에서 보이는 감정표현과 기억과정의 조절 이상은 해마와 편도가 관련된 기능적 회로가 연관 있다고 알려져 있고, 성인과 노년기 우울장애 환자들에서 이 구조들의 이상이 관찰된다고 하였다(4,5). 또한 우울증 환자에서는 해마의 용적이 줄어든다고 하였다(6,7).

해마는 학습에 의한 기억의 형성에 관여하며, 해마의 신경세포는 신경의 발생기 동안뿐만 아니라 그 이후에도 생성되는 특징이 있다(8,9). 그러므로 해마 신경세포들은 유효한 약물을 투여하면 새로운 신경연접을 형성하여 기능을 보다 활성화하며(10), 지속적인 운동은 해마의 줄기세포(stem cells) 증식을 유도하여 새로운 신경세포로의 분화도 가능하다고 하였다(11).

Scopolamine은 무스카린성 콜린 수용체(muscarinic cholinergic receptor) 길항제로서 실험동물의 인지능력 결핍 연구에 널리 사용되고 있다. 흰쥐에 scopolamine을 복강 투여하면 콜린성 신경전달물질이 차단되어 콜린성 기능장애(cholinergic dysfunction)와 인지 능력의 손상이 온다. 그러므로 scopolamine으로 유발된 기억력 결핍 흰쥐는 항치매 약물의 효능을 조사할 목적으로 많이 사용되고 있다(12-14).

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초과(Orchidaceae)에

*Corresponding author. E-mail: jskim@dsu.ac.kr
Phone: 82-61-330-3512, Fax: 82-61-330-3519

속한 다년생 기생초본의 근경을 건조한 것이다. 주요 성분은 vanillyl alcohol, vanillin 및 gastrodin, phenolic compounds, hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzyl alcohol 등이 있다 (15-17). 천마에 대한 연구로는 중추신경계의 혈류 개선(18, 19), 뇌조직의 출혈이나 부종(20), 뇌허혈 시 신경보호 효과(21)에 대한 연구가 이루어져 왔으나, 천마의 추출액이 기억의 형성과 저장과정에 관여하는 해마의 신경세포에 미치는 영향에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 생산되는 천마의 물추출물을 scopolamine을 투여하여 해마의 신경세포를 손상시킨 흰쥐에 투여하여 그 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

체중 200 ± 10 g 내외의 7주령 흰쥐(Sprague-Dawley)를 샘타코(주)(Osan, Korea)로부터 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도, $21 \pm 2^\circ\text{C}$; 습도, 50~60%; 12시간 주기 명/암) 하에서 일반 고형사료(샘타코(주), 흰쥐 용)와 물을 충분히 공급하면서 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험은 동신대학교 동물실험윤리위원회의 허락을 얻은 다음 수행하였다.

시료 준비

천마를 수증기로 삶고서 70°C 에서 120시간 숙성시킨 다음 40 g을 물 900 mL에 넣고 약탕기로 3시간 동안 가열하였다. 얻은 추출액은 3,000 rpm으로 원심분리 하여 상층액을 감압 농축(CCA-1100, Eyela, Tokyo, Japan)한 다음 저온순환수조(COOL ACE CA-1500, Eyela)에서 1차 동결 후 동결건조기(FD8508, Ilshin, Dongducheon, Korea)로 동결건조 하여 5.5 g의 분말을 얻었다.

기억력 감퇴 동물모델 구축

정상군을 제외한 모든 실험동물은 scopolamine(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 mg/kg을 0.9% 식염수 1 mL에 용해하여 7일 동안 1일 1회 복강 주사하여 동물모델을 구축하였다.

실험군 분류와 처치

실험군은 기억력 감퇴를 유발시키지 않는 정상군(Nor), scopolamine를 7일간 복강 주사하여 기억력 감퇴를 유발시킨 다음 음용수만 20일과 30일 동안 공급한 20일 대조군(C-20)과 30일 대조군(C-30), scopolamine을 대조군과 동일한 방법으로 투여한 다음 성인의 1일 복용량에 해당하는 천마 추출물(200 mg/kg)을 동일기간 동안 투여한 20일 실험군(G-20)과 30일 실험군(G-30)으로 구분하였다. 실험동물은 각 군마다 5마리씩 사용하였다.

뇌조직의 적출 및 조직 처리

모든 실험이 끝난 직후 실험동물을 urethane(75 mg/kg)

으로 마취시킨 다음 심장을 통하여 phosphate buffered saline(PBS) 100 mL에 이어 4% paraformaldehyde 용액으로 관류고정 하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액에 넣어 4°C 에서 보관하였다.

광학현미경 관찰

흰쥐를 도살한 후 각각 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde에 24시간 고정시킨 다음, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 I, 100II와 같이 알코올 농도를 상승시켜 조직 속의 수분을 제거한 후 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하였고, 포매된 조직을 microtome을 사용하여 $5 \mu\text{m}$ 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시키고 xylene으로 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담그어 흡수 과정을 거치게 하였다. Cresyl violet 염색을 한 다음 탈수 후 Canada balsam으로 봉입하고 카메라 부착 광학현미경(Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다. 또한 염색이 끝난 조직은 광학현미경을 사용하여 저배율($\times 100$)에서 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp., Frederick, MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

Periodic acid Schiff(PAS) 염색

뇌 조직 절편을 PBS로 수세한 후 0.5% periodic acid와 함께 10분간 상온에서 배양하였다. Schiff's reagent로 5분씩 2회 처리한 후 sulfurous rinse 용액으로 각각 2분씩 3회에 걸쳐 씻어내고 이어서 흐르는 물에 10분간 수세하였다. Harri's hematoxylin으로 1분간 염색한 후 1% acid alcohol에 2~3회 담그는 방법으로 탈수시키고 다시 흐르는 물에 수세 과정을 거친 후 ammonia액에 5~10회 담가 염색하였다. Alcohol을 이용한 탈수 과정을 거친 후 Canada balsam으로 봉입하였다.

통계처리

실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 로 나타냈으며, 대조군과 실험군 사이의 평균 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

Hippocampus의 광학현미경 관찰

Scopolamine은 무스카린성 콜린 수용체(muscarinic cholinergic receptor) 길항제로서 작용을 하기 때문에 흰쥐에 투여하면 뇌신경뿐만 아니라 해마의 신경세포들이 손상되거나 위축이 된다고 하였다(12-14). 본 연구에서도 실험동물에 7일간 scopolamine을 투여한 다음 20일 동안 음용수를 공급한 대조군(Fig. 1B)에서는 정상군(Fig. 1A)에 비하여 해마의 신경세포는 매우 응축되어 있었다. 천마의 효능을 검증

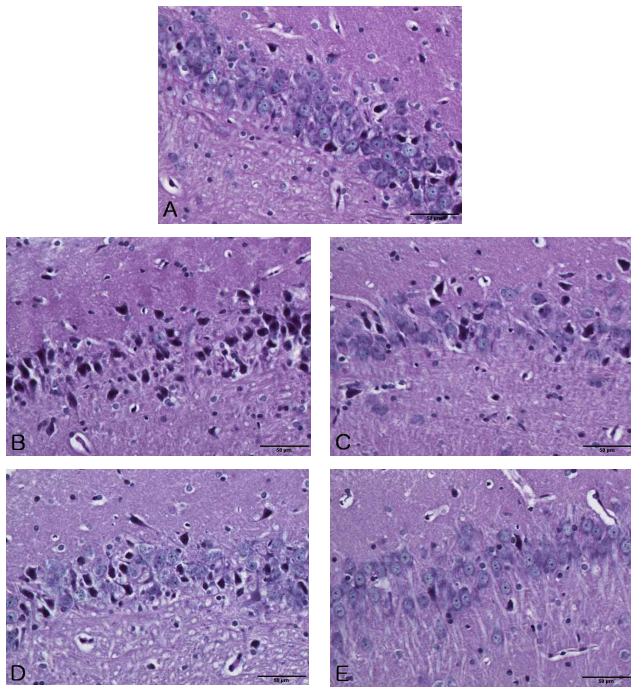


Fig. 1. The light micrographs of hippocampus. A, normal group; B, C-20 control group administered saline for 20 days after scopolamine treatment; C, G-20 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 20 days after scopolamine treatment; D, C-30 control group administered saline for 30 days after scopolamine treatment; E, G-30 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 30 days after scopolamine treatment. PAS stain. $\times 400$.

하고자 성인의 1일 복용량(200 mg/kg)에 해당하는 물추출물을 실험동물에 투여한 결과, 실험군(Fig. 1C)에서는 대조군에 비하여 손상이나 응축 정도가 미약하였다. 30일군에서는 대조군(Fig. 1D) 해마의 신경세포의 손상 정도가 보다 현저하여 그 수가 감소하였으나, 실험군(Fig. 1E)에서는 손상 정도가 미약하였다. 이와 같은 결과로 보아 scopolamine에 의하여 손상된 흰쥐에 투여된 천마 추출액이 해마의 신경세포 손상을 억제하는 것으로 보인다.

Hippocampus의 신경세포 밀도

Scopolamine을 투여한 흰쥐의 해마를 AChE 염색을 하여 밀도를 분석한 결과 40~50% 감소하였다고 하였다(22). 또한 Probst 등(23)에 의하면 해마의 피라미드 세포 밀도는 정상인에 비하여 치매 환자에서 매우 감소한다고 하였다. 본 연구에서는 뇌조직을 cresyl violet으로 염색한 후 Scion image program(Scion Corp.)을 이용하여 세포 밀도를 측정하였다. 그 결과 해마의 CA1 영역의 신경세포 밀도는 정상군(140.0 density)에 비하여 C-20군(96.0 density)은 약 32% 감소하였고 실험군인 G-20군(130.5 density)과 G-30군(134.6 density)은 정상군에 비하여 다소 감소하였으나, 대조군에 비하여 각각 통계적으로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2, Table 1). 해마의 CA3 영역의 신경세포 밀도 또한 정상군(161.6 density)이 가장 높았으며, C-20군(113.6 density)은

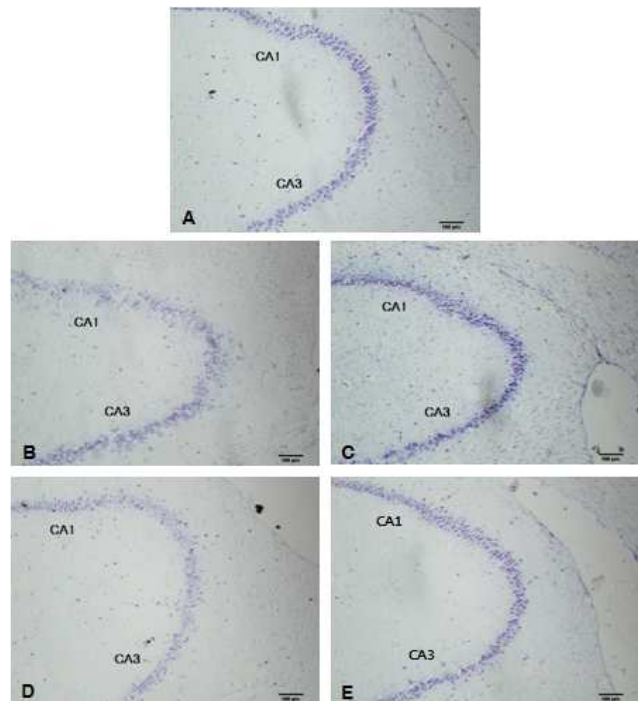


Fig. 2. The light micrographs of hippocampus. A, normal group; B, C-20 control group administered saline for 20 days after scopolamine treatment; C, G-20 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 20 days after scopolamine treatment; D, C-30 control group administered saline for 30 days after scopolamine treatment; E, G-30 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 30 days after scopolamine treatment. Cresyl violet stain. $\times 100$.

Table 1. The densities of neurons from CA1 and CA2 areas of hippocampus

Groups	Area	
	CA1	CA3
Nor	140.6 \pm 7.17	161.6 \pm 12.66
C-20	96.0 \pm 1.38	113.6 \pm 5.84
G-20	130.3 \pm 5.37*	137.8 \pm 6.26*
C-30	102.8 \pm 3.48	126.2 \pm 11.12
G-30	134.6 \pm 7.09*	134.0 \pm 7.95

Nor, normal group; C-20, control group administered saline for 20 days after scopolamine treatment; G-20, group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 20 days after scopolamine treatment; C-30, control group administered saline for 30 days after scopolamine treatment; G-30, group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 30 days after scopolamine treatment. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$. (n=5).

정상군에 비하여 약 30% 감소하였다. 실험군에서는 G-20군(137.8 density)과 G-30군(134.0 density) 밀도가 대조군에 비하여 높았으며, G-20군은 통계적으로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2, Table 1). 이와 같은 결과는 위 연구자의 결과와 일치한다고 할 수 있을 것이다.

뇌조직의 PAS 염색

인지기능이 저하되면 중추신경계의 포도당 대사가 감소하고 신경조직에서는 β -amyloid가 축적된 노화반(senile

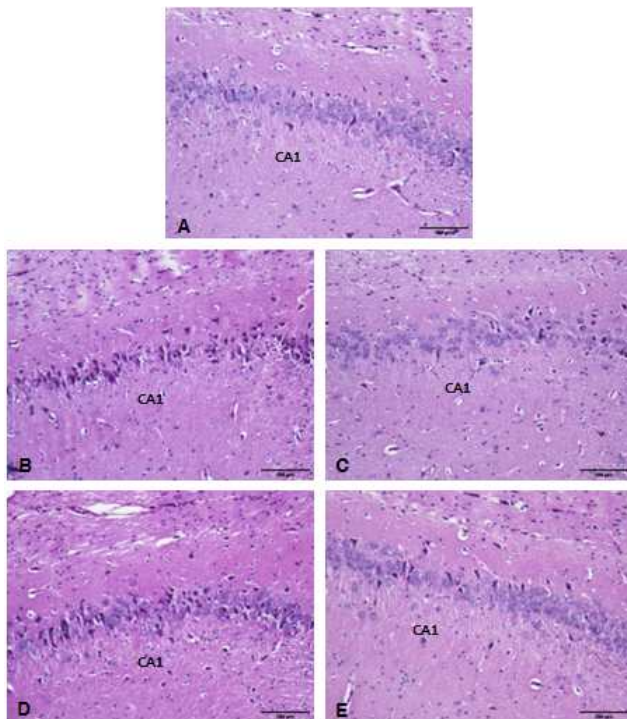


Fig. 3. The light micrographs of CA1 area from hippocampus. A, normal group; B, C-20 control group administered saline for 20 days after scopolamine treatment; C, G-20 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 20 days after scopolamine treatment; D, C-30 control group administered saline for 30 days after scopolamine treatment; E, G-30 group administered *Gastrodia elata* extract (200 mg/kg/day) for 30 days after scopolamine treatment. PAS stain. $\times 200$.

plaque)이 나타난다(2,3)고 하였으며, scopolamine으로 유발된 알츠하이머병 생쥐모델의 해마를 Congo Red 염색을 한 결과 노화반이 관찰되었다고 보고하였다(24). 알츠하이머병에서 노화반은 PAS 염색을 통하여 확인할 수 있으며(25), 본 실험에서도 scopolamine으로 유도된 동물 모델의 뇌조직을 PAS로 염색한 결과 정상군(Fig. 3A)에 비하여 C-20군(Fig. 3B)의 신경세포는 핵들이 응축되어 있었고 신경섬유는 PAS-양성반응이 보다 높게 관찰되었으며, 실험군인 G-20군(Fig. 3C)에서는 응축된 세포의 수가 현저히 감소하였을 뿐만 아니라 PAS-양성반응도 대조군에 비하여 낮았다. 30일군에서는 C-30군(Fig. 3D)에서는 여전히 신경세포의 핵이 응축되어 있었으며 신경섬유는 PAS-양성반응이 높았고, 실험군인 G-30군(Fig. 3E)에서는 신경세포의 핵이 뚜렷이 관찰되었으며 신경섬유에서 관찰되는 PAS-양성반응은 낮았다.

위와 같은 결과로 보아 천마 물추출액은 scopolamine으로 유발된 신경 독성을 개선하는 효과가 있는 것으로 보인다. 그러나 해마의 신경세포를 독성으로부터 보호 또는 회복 효과를 나타내는 성분이나 기전에 관한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되었다.

요 약

알츠하이머병은 신경세포가 점차적으로 퇴화되는 질환으로 특히 해마와 기저쪽 앞뇌의 뇌조직이 위축되어 점진적으로 기억력을 잃어간다. 본 연구는 scopolamine(1 mg/kg, 7일 동안 1회)으로 유발된 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 해마의 신경독성에 대한 천마 물 추출액의 효과를 규명하기 위하여 수행하였다. 실험동물(n=25)은 5군으로 나누었으며, 각 군마다 5마리씩 사용하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 정상군(Nor), scopolamine으로 유발한 다음 생리식염수를 20일(C-20)과 30일(C-30) 동안 투여한 대조군, scopolamine으로 유발한 다음 천마 추출액(200 mg/kg)을 20일(G-20)과 30일(G-30) 동안 투여한 실험군으로 구분하였다. 광학현미경으로 관찰한 결과 해마의 신경세포 핵은 G-20과 G-30에 비하여 C-20과 C-30에서 보다 응축되었거나 위축되어 있었다. 해마의 CA1과 CA3의 세포밀도를 조사한 결과 실험군이 대조군보다 높게 나타났다. 해마 주변의 뇌세포를 PAS로 염색한 결과 amyloid β 단백질을 함유한 PAS-양성물질이 대조군에 비하여 실험군에서 감소하였다. 이상의 결과로 보아 천마 물추출액은 scopolamine으로 유발된 신경 독성을 개선하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

문 헌

- Caselli RJ, Beach TG, Yaari R, Reiman EM. 2006. Alzheimer's disease a century later. *J Clin Psychiatry* 67: 1784-1800.
- Dickson TC, Vickers JC. 2001. The morphological phenotype of β -amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105: 99-107.
- Meier-Ruge W, Bertoni-Freddari C, Iwangoff P. 1994. Changes in brain glucose metabolism as a key to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gerontology* 40: 246-252.
- Coffey CE, Wilkinson WE, Weiner RD, Parashos IA, Djang WT, Webb MC, Figiel GS, Spritzer CE. 1993. Quantitative cerebral anatomy in depression. A controlled magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 50: 7-16.
- Altshuler LL, Curran JG, Hauser P, Mintz J, Denicoff K, Post R. 1995. T2 hyperintensities in bipolar disorder: magnetic resonance imaging comparison and literature meta-analysis. *Am J Psychiatry* 152: 1139-1144.
- Krishnan KR, Tupler LA, Ritchie JC Jr, McDonald WM, Knight DL, Nemeroff CB, Carroll BJ. 1996. Apolipoprotein E-epsilon 4 frequency in geriatric depression. *Biol Psychiatry* 40: 69-71.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157: 115-118.
- Tohda C, Kuboyama T, Komatsu K. 2005. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals* 14: 34-45.
- Eriksen JL, Janus CG. 2007. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration. *Behav Genet* 37: 79-100.
- Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. 2012. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D₃-

- MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep* 2: 535.
11. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680-8685.
 12. Fan Y, Hu J, Li J, Yang Z, Xin X, Wang J, Ding J, Geng M. 2005. Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neurosci Lett* 374: 222-226.
 13. Chen J, Long Y, Han M, Wang T, Chen Q, Wang R. 2008. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 441-446.
 14. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. 2006. Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function. *J Neurosci* 26: 9520-9529.
 15. Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim I. 1981. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* BLUME. *Chem Pharm Bull* 29: 55-62.
 16. Sha Z, Sun W. 1985. HPLC determination of gastrodin and 4-hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodia elata*. *Yaowen Fenxi Zashi* 5: 218-221.
 17. Liu J, Mori A. 1993. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology* 32: 659-669.
 18. Park SH, Cho CH, Ahn BY. 2007. A study on the application of *Gastrodiae rhizoma* for food stuffs—Effects of *Gastrodiae rhizoma* on the regional cerebral blood flow and blood pressure—. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 554-562.
 19. Jung IC, Na HY, Lee YH, Park SH. 2007. Study on the *Gastrodiae rhizoma* as applications in YackSun (medicated diets) for preventing of cerebral cardiovascular disease (2). Development and sensory characteristics of *Dasik* made from *Gastrodiae rhizoma*. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 250-257.
 20. Lee JY, Ku JS, Lee DE, Shin JW, Kim SJ, Sohn NW. 2010. Effects of *Gastrodiae rhizoma* on brain edema and aquaporin expressions following intracerebral hemorrhage in rats. *Kor J Herbology* 25: 85-93.
 21. Kim HC, Ahn DK. 1999. Neuroprotective effect of *Gastrodiae rhizoma* on global ischemia induced by 4-vessel occlusion in rats. *Kor J Herbology* 14: 121-129.
 22. Marques Pereira P, Cosquer B, Schimchowitsch S, Cassel JC. 2005. Hebb-Williams performance and scopolamine challenge in rats with partial immunotoxic hippocampal cholinergic deafferentation. *Brain Res Bull* 64: 381-394.
 23. Probst A, Cortés R, Ulrich J, Palacios JM. 1988. Differential modification of muscarinic cholinergic receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease: an autoradiographic study. *Brain Res* 450: 190-201.
 24. Hernandez CM, Kaye R, Zheng H, Sweatt JD, Dineley KT. 2010. Loss of $\alpha 7$ nicotinic receptors enhances β -amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30: 2442-2453.
 25. Raskin LS, Applegate MD, Price DL, Troncoso JC, Hedreen JC. 1995. Comparison of new and traditional methods for detection of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 8: 125-131.

(2012년 12월 4일 접수; 2013년 1월 10일 채택)