

Scopolamine 유도 치매동물모델에서 고려인삼(백삼, 홍삼 및 흑삼)의 기억력 개선 효과

강신정¹ · 우정화² · 김애정^{3*}

¹중부대학교 한약자원학과

²경희대학교 임상영양연구소

³경기대학교 대체의학대학원

The Effects of Korean Ginseng on Memory Loss in a Rat Models

Shin-Jyung Kang¹, Jeong-Hwa Woo², and Ae-Jung Kim^{3*}

¹Dept. of Medicines Resources, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

²Dept. of Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

³The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea

ABSTRACT The purpose of this study was to investigate the mechanism and effects of different types of ginseng on memory improvement in an experimental rat model. In this study, SD rats were induced for memory deficits through scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.) then administrated with ginseng extract for 7 weeks. The rats were divided into five groups: saline (1 mL/kg, NC: negative control), white ginseng (300 mg/kg, WG), red ginseng (300 mg/kg, RG), black ginseng (300 mg/kg, BG), and scopolamine (1 mg/kg, PC: positive control). The step through latency of the BG and RG groups was significantly longer than the PC group in the retention trial of multiple trial passive avoidance test. In the spatial reference memory triads of the Morris water maze test, the latency time of BG and RG was significantly lower than the PC group. In addition, in the prove test, the time spent in the platform quadrant of BG and RG groups were significantly longer than the PC group. Brain choline acetyltransferase (ChAT) activities BG and RG groups significantly increased compared to other groups. On the other hand, the levels of malondialdehyde (MDA) were significantly lower in the BG and RG groups compared to other groups. These result suggested that black ginseng could be useful to enhance learning memory and cognitive function by regulation of cholinergic enzymes.

Key words: white ginseng, red ginseng, black ginseng, ChAT, MDA

서 론

현대 사회에서 기하급수적으로 늘어나는 정보의 홍수 속에서 인지능력과 기억력은 청소년에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 기억력 감퇴 및 Alzheimer's disease(AD)에 의한 인지능력 감퇴는 정상적인 개인생활은 물론 사회생활 자체를 불가능하게 만들며, 많은 사회적 비용 증가를 유발시킨다. 특히 치매환자의 경우 사회생활 가능 여부는 기억력 저하가 주된 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 이유로 기억력 저하 개선과 예방에 대한 연구의 중요성이 대두되어 현재 활발히 진행되고 있는 실정이다.

Alzheimer's disease는 발병 원인이 뚜렷치 않으나, 일반적으로 콜린성 신경의 손상, 산화적 스트레스, 아밀로이드 침착, 염증성 인자, 스테로이드호르몬의 결핍, 흥분성 신경

독성 등이 나타나는 것으로 보고되어 있고, 콜린성 신경세포 퇴화에 의한 acetylcholine의 부족이 중요한 원인 중의 하나로 알려져 있다(2).

그러한 현상은 acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 활성 증가로 더욱 심화된(2). 65세 이상의 치매환자 중에서 AD 질환이 50~60%를 차지하고 있으며, 여성이 남성보다 발병 빈도가 2~3배 높은 것으로 알려져 있다(3).

AD 환자의 뇌에서는 여러 종류의 신경이 손상되는 것으로 보고되고 있으며, 그중에서도 콜린성 신경의 손상이 가장 심각하여 AD 환자의 학습, 기억력, 인지력의 저하에 깊이 관련되는 것으로 알려져 있다(4,5). 스코폴라민(scopolamine)은 시냅스의 무스카린 수용체(muscarinic receptor)의 길항제로서 시냅스에서 유리되는 신경전달물질인 아세틸콜린과 무스카린 수용체 간의 결합을 저해하여 정보전달을 일시적으로 차단함으로써 학습과 기억력을 손상시킨다. 따라서 학습과 기억력 증진효과를 검증하고자 하는 기억력감퇴 동물모델에 흔히 이용되고 있다(6,7).

Received 11 April 2013; Accepted 7 May 2013

*Corresponding author.

E-mail: aj5249@naver.com, Phone: 82-2-390-5044

Choline의 활성감소로 기억력이 저하되기 때문에 시냅스의 기억력을 향상시키기 위하여 acetylcholine의 작용을 활성화시키는 cholinergic agonist, acetylcholine 전구체, AChE를 억제하는 AChE inhibitor를 사용한 연구가 많이 수행되고 있다(8). 그중 AChE 억제제인 tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine 등이 알츠하이머병 치료제로 개발되어 왔다(9-12).

그러나 현재까지 직접 손상된 뇌세포를 재생시키거나 자연적인 뇌세포 손상을 효과적으로 억제하는 것은 어렵기 때문에, 효과적인 인지기능 개선제를 개발하는 것은 치매 환자의 증상호전뿐만 아니라 정상인의 기억력 증진제로도 의미가 있다고 생각된다.

그동안 백삼이나 홍삼이 뇌의 노화방지와 뇌혈류량을 증가시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 인삼의 성분인 Rb₁, Rg₁, Rg₂ 등의 주요 사포닌은 전기적으로 기억을 손상시킨 실험동물과 scopolamine, cycloheximide, anisodine 등의 약물에 의해 기억손상이 유도된 동물실험에서 학습 및 기억을 개선시키는 것으로 보고되고 있다(13).

따라서 본 연구에서는 이러한 백삼이나 홍삼의 기억력 개선 효과 연구를 기초로 흑삼의 기억력 개선 여부를 알아보고자 치매모델(scopolamine을 1 mg/kg 농도로 단회 복강 투여하여 알츠하이머병)을 대상으로 인삼(백삼, 홍삼 및 흑삼) 유래 시험물질을 7주간 투여한 후 행동학적 평가 및 관련 효소활성 평가를 통해 기억력 및 학습능력 손상에 대한 3종류의 인삼(백삼, 홍삼 및 흑삼) 시험물질의 개선효과를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

인삼 시료

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 시료는 Daedong Korea(Geumsan, Korea)에서 6년근으로 구입하여 열수추출 후 수분함량을 20% 수준으로 맞추어 감압농축 후 동결건조 하여 시료로 사용하였다.

실험동물

체중 120~150 g 되는 Sprague-Dawley계 수컷을 (주) Samtaco(Osan, Korea)에서 구입하여 표준사료로 일주일 동안 사육실에서 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 임의로 각 군당 10마리씩 5군으로 나누어 실험에 사용하였다. 대조군으로는 NC군(negative control)과 PC군(positive control), scopolamine을 복강 투여한 비교군으로는 WG군, RG군 및 BG군이였다. 실험동물용 사료(Agribrands Purina Korea Inc., Seoul, Korea)와 물은 자유섭취 방법으로 급여하였으며, 실험실의 사육조건은 온도 22±2°C, 습도 50±20%, 조명시간 및 명암주기는 12 h/day/night, 조도 150~300 lux로 설정하였다(Table 1).

Table 1. Experimental design

Groups ¹⁾	Dose	Rats
NC	0 mg/kg	10
PC	scopolamine hydrobromide treatment+ 0 mg/kg	10
WG	scopolamine hydrobromide treatment+ 300 mg/kg	10
RG	scopolamine hydrobromide treatment+ 300 mg/kg	10
BG	scopolamine hydrobromide treatment+ 300 mg/kg	10

¹⁾NC (negative control): rat fed only with saline without ginseng extract, PC (positive control): scopolamine hydrobromide induced rat fed sterilized water without ginseng extract, WG (white ginseng): scopolamine hydrobromide induced rat with white ginseng extract (300 mg/kg), RG (red ginseng): scopolamine hydrobromide induced rat with red ginseng extract (300 mg/kg), BG (black ginseng): scopolamine hydrobromide induced rat with black ginseng extract (300 mg/kg), breeding condition (22±2°C, 50±20%, 12 h/day/night, 150~300 lux).

시료 투여

시료물질은 7주간의 전 처치 기간과 시험기간 동안 인지 시험 1시간 전에 300 mg/kg의 용량으로 음수용 정제수에 녹여 경구투여 하였다. 기억손상 유발을 위해 인지시험 30분전에 PC군과 시료물질 투여군에 scopolamine hydrobromide를 1 mg/kg 용량으로 주사용 생리식염수에 희석하여 Sonde를 이용하여 7주간 주 7회 복강 투여하였다.

수동회피시험(multiple-trial passive avoidance test)

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 수많은 연구자들이 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 실험으로서 본 실험에서는 Le-Doux의 방법(14)을 응용하여 시행하였다. 수동회피시험의 원리는 설치류가 어두운 곳을 선호하는 성향을 이용하여 기억력을 측정하는 실험방법이다. 시험물질의 기억력 손상 예방 효과를 알아보기 위하여 scopolamine 투여 30분 후 수동회피시험을 실시하였다(Fig. 1). 측정기기는 내부가 두 개의 방으로 구성된 아크릴 상자(shuttle box, 53 cm W×44 cm H×33 cm D)의 가운데에 guillotine door가 있으며 바닥

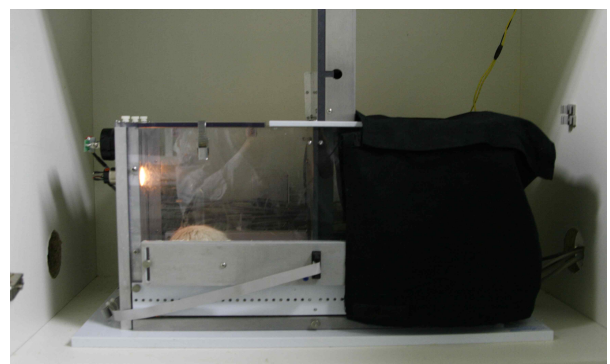


Fig. 1. Rat passive avoidance test cage.

(grid floor) 전체에 전기쇼크(scrambled foot-shock)를 가할 수 있는 장치가 되어 있다. 좌측 방은 전구가 켜져서 밝은 환경을 조성하고, 우측 방은 어두운 환경이지만 동물이 이동했을 경우 센서가 작동하여 전기 자극(0.3 mA, 5 sec)을 주었다. 동물을 좌측 방에 넣으면 전구가 켜지면서 30초 동안은 빛과 아크릴로 된 방에서 순화를 시킨다. 30초 후에 guillotine door가 열리면서 밝은 방에 머무는 시간이 측정되며 동물이 우측 방으로 네 발이 다 들어가면 문이 닫히고 0.3 mA, 5초 조건의 전기 자극을 줘서 회피할 수 있게 인식시켰다(학습시험: training trial). 위와 같은 방법으로 동물이 우측 방으로 120초 동안 이동하지 않을 때까지 반복하였다. 1차 측정 24시간 후 문이 열려도 밝은 방에 머무는 시간, 즉 쇼크실 도달시간(step-through latency time: 머무름 시간)을 최대 300초(cut-off time)까지 측정하였다.

수중미로시험(Morris water maze test)

Reference memory test: Morris water maze를 통한 공간학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있는 방법(15)으로 다음과 같이 실시하였다.

원형수조(직경: 140 cm, 높이: 45 cm) 안에 19~23°C의 미지근한 물을 약 70% 채우고 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 주위환경 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다(Fig. 2). 원형수조에 가상의 사분면을 만들고 한쪽 사분면 중앙에 platform(도피대, 높이: 72 mm, 지름: 50 mm)을 수면 아래 1미터에 위치하도록 물높이를 조절하고 탈지분유를 풀어 platform이 보이지 않도록 하였다. 분면 중 platform이 없는 3개의 사분면에서 출발 위치를 매번 변경하며 동물을 수조에 넣어 platform을 찾아가도록 하고 그 시간(escape latency)을 video tracking system을 이용하여 측정하였다. 시험 첫날은 platform 없이 수조 안에서 실험동물을 90초간 자유롭게 수영을 시킴으로써 maze에 대한 적응을 시켰고, 이후 2일째부터 5일째 되는 날까지 매일 입수하는 사분면을 달리하여 인지적응 훈련을 수행하였다(training trial). 동물을 90초 동안 platform의 위치를 찾도록 하고, platform에 도달하면 15초 동안 platform에 머물도록 하여 해당 위치를 기억하도록 하였



Fig. 2. Position of quadrant and platform in the water tank.

다. 90초안에 platform의 위치를 찾지 못하는 동물은 platform 위에 15초간 유지시켜 platform의 위치를 인식할 수 있도록 하였다(test trial section). 위와 같은 방법으로 인지적응 훈련을 1일 2회씩 30초 간격으로 4일 동안 총 8회 실시하였다.

Probe test: Reference memory test 8번째 실험이 끝난 직후 spatial memory retention을 측정하기 위하여 probe test를 실시하였다(probe trial section). 이 실험은 reference memory test를 통해 기억된 platform 위치를 찾아가도록 하는 시험으로써 동물이 이동 중 우연히 platform에 도달하는 것을 방지하여 platform의 위치에 대한 학습 및 기억력을 좀 더 신뢰성 있게 측정할 수 있는 방법이다. Probe test는 원형수조의 platform을 제거한 후 30초 동안 동물이 platform이 있었던 사분면에 머무는 수영 시간을 측정하였다. 실험이 진행되는 동안 수미로에서 나온 실험 동물은 물기를 제거한 후 사육케이지에 옮겨 놓았으며 모든 실험군은 군당 10마리의 실험동물을 사용하였다.

동물실험윤리

본 연구는 충북대학교 실험동물연구지원센터에서 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제4397호, 일부개정 2008년 2월 29일 법률제8852호)을 근거하여 충북대학교 동물실험윤리위원회에 의해 승인받아 수행되었다(승인번호: CBNU-292-11-01).

검체의 채취

동물을 diethyl ether(Sigma, New York, NY, USA)로 마취 유도 후 복강을 열어 복대동맥에서 혈액을 채취하고, 심장을 통하여 생리식염수로 관류하였다.

두개골을 열어서 뇌막을 제거한 후 뇌를 적출하고 무게를 측정하였다. 적출한 뇌는 액체질소에 보관하고 -80°C의 초저온냉동고(NU6617, NUAire, New York, NY, USA)에 넣어 급속 동결시켜 ChAT 활성과 malondialdehyde(MDA)의 농도를 측정하기 위해 보관하였다.

뇌 조직 내 ChAT 활성 분석

부검 시 얻어진 뇌를 상용화된 ChAT activity kit(Cat. No: E91929Ra, Life Science Inc, Wuhan, China)를 사용하여 ELISA(Bio-Rad, New York, NY, USA)로 측정하였다(16).

뇌 조직 내 MDA 농도 분석

부검 시 얻어진 뇌를 MDA 농도 분석용 kit(Cat. No: 0801192, ZeptoMetrix, New York, NY, USA)를 사용하여 ELISA(Bio-Rad)로 측정하였다(17).

통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였고 그룹 간

의 유의성 검정은 ANOVA를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차를 알아내기 위하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

수동회피시험

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물 모델을 이용하여 시험물질이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인한 결과는 Table 2에 제시된 바와 같다.

NC군의 step through latency(231.72±30.88 sec)에 비해 PC군(67.05±20.43 sec)이 유의적으로 감소하였다. 이는 학습시험(training trial) 시의 전기 충격을 기억하지 못한 것으로 판단된다. WG군(113.18±31.73 sec)을 제외한 BG군(250.90±15.60 sec)과 RG군(212.23±25.58 sec)은 PC군에 비해 유의적으로 latency time이 길어진 결과를 나타냈다. 수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법(18)으로 해마에서의 조건화된 기억과 변연계와 연관 있는 기억에 관한 영향을 측정하기 위해 주로 사용된다(19). Seo 등(20)은 scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 동물모델에서 인삼이 함유되어 있는 한약 복합물을 투여한 후, 대조군에 비해서 latency time의 유의한 증가 효과가 나타났음을 보고하였다. 이와 같이 BG, RG 군이 PC군에 비해서 latency time이 길어졌다는 것은 콜린성 신경계에 학습과 기억력을 회복시켰다는 것을 의미한다. 상기의 결과를 보면 scopolamine 투여를 통하여 기억력에 유의적인 손상을 입은 것이 확인되었다. 단기 기억력의 정도를

측정하는 수동회피시험에서 BG 투여 군의 경우 7주간의 투여로 기억력 손상을 유의적으로 감소시킨 결과는 콜린성 신경계 작용을 통한 학습 및 기억력 회복에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

수중미로시험

Reference memory test: 본 연구에서는 시험물질이 학습과 기억력에 어떤 영향을 미치는 지 scopolamine 투여 후 reference memory test를 실시하였다(Table 3).

첫째 날 trial에서는 NC군(58.68±10.01 sec)을 제외한 모든 실험 군에서 유의적으로 높은 escape latency가 나타났다. 훈련 2일째 trial에서는 BG군(68.64±5.01 sec)과 RG군(66.62±5.60 sec)이 PC군에 비해 유의적으로 낮은 결과를 나타냈으며, PC군(82.01±3.56 sec)과 WG군(76.04±5.46 sec)은 NC군(48.58±8.93 sec)에 비해서 유의적으로 높은 결과가 나타났다. 훈련 3일째 trial에서도 훈련 2일째 trial에서의 실험 결과와 같은 경향을 보였다. 넷째 날 trial에서는 모든 실험 군에서의 escape latency가 감소됨이 확인되었으며, BG군(38.41±7.20 sec)과 RG군(39.50±8.82 sec)은 PC군에 비해서 유의하게 낮은 결과를 나타냈다. BG군과 RG군은 시간이 경과될수록 PC군을 제외한 실험 군들은 escape latency가 유의적으로 감소되었으며, NC군의 수준으로 escape latency가 회복됨이 확인되었다. 마지막 날인 4일째의 결과 기준으로는 PC군에 비해서 escape latency가 WG군(76%), BG군(63%), RG군(65%) 수준으로 낮아짐이 확인되었다. Kim 등(21)의 scopolamine을 이용한 기억력 감퇴 동물모델 연구에서도 인삼의 추출물이 escape latency의 유의적인 감소에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이와 같이 reference memory test에서의 escape latency 감소는 scopolamine에 의한 기억 손상이 회복됨을 의미한다. 본 연구에서는 scopolamine을 처리한 PC군에 비해 시험물질을 처리한 군들에서 기억 손상이 회복되는 것으로 확인되었다. 특히 BG군과 RG군은 scopolamine에 의한 기억 손상이 유의적으로 개선되어 NC군의 escape latency 수준으로 낮아짐이 확인되었다. 상기 결과로서 수중미로시험에서의 BG군과 RG군의 escape latency 감소는 scopolamine에 의한 기억 손상이 회복됨을 의미하며, 고위 기억력인 공간기억력과 관련된 학습의 개선에 효과가 있는 것으로

Table 2. Effects of test materials (WG, RG and BG) on scopolamine-induced memory deficits in the retention trial of multiple-trial passive avoidance test (unit: sec)

	Groups ¹⁾				
	NC	PC	WG	RG	BG
Step-through latency	231.72±30.88 ^{2)a3)}	67.05±20.43 ^c	113.18±31.73 ^b	212.23±25.58 ^a	250.90±15.60 ^a

¹⁾Groups are the same as in Table 1.
²⁾Data are expressed as mean±SE (n=10).
³⁾Values with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effects of test materials (WG, RG and BG) on latency time during the spatial reference memory triads of the Morris water maze test (unit: sec)

Groups ¹⁾	1 day	2 days	3 days	4 days
NC	58.68±10.01 ^{2)b3)}	48.58±8.93 ^c	44.37±9.59 ^c	34.70±7.87 ^c
PC	85.70±1.97 ^a	82.01±3.56 ^a	77.33±4.19 ^a	74.72±3.51 ^a
WG	83.03±3.55 ^a	76.04±5.46 ^{ab}	70.70±5.99 ^{ab}	46.23±7.77 ^b
RG	77.04±5.84 ^{ab}	66.62±5.60 ^b	62.62±5.06 ^b	39.50±8.82 ^{bc}
BG	78.70±3.59 ^{ab}	68.64±5.01 ^b	60.30±7.94 ^b	38.41±7.20 ^{bc}

¹⁾Groups are the same as in Table 1.
²⁾Data are expressed as mean±SE (n=10).
³⁾Values within the same column with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effects of test materials (WG, RG and BG) on swimming time during the probe trial session of the Morris water maze test (unit: sec)

	Groups ¹⁾				
	NC	PC	WG	RG	BG
Time spent in the platform-quadrant	11.72±1.05 ^{2)a3)}	5.55±0.94 ^c	8.20±1.38 ^{ab}	10.81±1.63 ^a	11.01±2.09 ^a

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Data are expressed as mean±SE (n=10).

³⁾Values with different superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

사료된다.

Probe test: 공간 학습 및 기억력의 정도를 알아보는 시험으로 probe test를 실시한 결과는 Table 4에 제시된 바와 같다.

모든 실험 군들에서 NC군(11.72±1.05 sec)에 비해서 모두 낮은 결과를 나타냈으며, 특히 PC군(5.55±0.94 sec)은 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다. 반면에 BG군과 RG군은 PC군에 비해 유의적으로 증가하는 결과를 보였다. 해당 4분 원에 머무는 시간은 NC군에 비해 WG군(49%), RG군(91%), BG군(108%) 수준으로 회복됨을 확인하였다. 상기 결과로 scopolamine 복용 투여를 통하여 공간 지각력 및 기억력에 유의적인 손상을 입은 것이 확인되었으며, Morris 수중미로 학습 마지막 날인 훈련 4일째 플랫폼 제거 후의 기억검사 시행 결과 BG군과 RG군에서 기억력 손상이 유의적으로 개선됨이 확인되었다. Zhao 등(22)이 probe test를 노화 동물 모델에서 확인한 결과에서 ginsenoside를 투여한 실험군과 대조군을 비교했을 때, 4분 원에 머무는 시간이 유의적으로 증가된 결과를 나타냈다. 또한 Yamaguchi 등(23)의 연구에 의하면 scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 동물모델을 이용하여 ginsenoside Rg₁이 choline acetyltransferase activity에 대한 개선효과와 관련이 있음을 보고한 바 있다. 특히 BG군과 RG군은 reference memory test의 결과와 마찬가지로 학습 및 기억 능력이 시간이 NC군의 수준으로 회복됨이 확인되어 본 시험물질이 뇌에서 시냅스의 콜린성 신경계의 기능을 높여주었음을 시사한다.

뇌 조직 내 ChAT 활성 저해효과

Scopolamine을 투여한 기억력 감퇴 동물모델에서 시험물질의 뇌 조직 내 ChAT 활성 저해효과는 Table 5에 제시된 바와 같다.

시험 종료 후 PC군의 ChAT 활성은 NC군에 비해 약 20% 정도 감소하는 현상을 보였다. 반면, PC군(0.66±0.08 nmol/mL)과 시험물질 투여군(WG군, RG군, BG군)들을 비교하였을 때 WG군(0.81±0.07 nmol/mL)은 23%, RG군(0.94±0.08 nmol/mL)은 42%, BG군(1.13±0.14 nmol/mL)은 71%의 유의성 있는 활성 증가를 보였다.

Lee 등(24)이 scopolamine을 복용 투여하여 기억력을 감퇴시킨 후, ChAT 활성을 측정된 동물 실험 결과 대조군에

Table 5. Effect of test materials (WG, BG and RG) on choline acetyltransferase (ChAT) activity (unit: nmol/mL)

	Groups ¹⁾				
	NC	PC	WG	RG	BG
ChAT activity	0.82±0.10 ^{2)ab3)}	0.66±0.08 ^b	0.81±0.07 ^{ab}	0.94±0.08 ^{ab}	1.13±0.14 ^a

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Data are expressed as mean±SE (n=10).

³⁾Values with different superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

비해 흑삼과 홍삼을 처리한 군에서 ChAT 활성 수준이 증가하는 것으로 나타났다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. 이는 홍삼이 ACh의 synthesis는 증가시키는 동시에 ACh degradation은 저해시키고(25), 흑삼은 시냅스에서 ACh synthesis를 자극함으로써 많은 양의 ACh를 합성할 수 있다는 연구 결과에 기인하는 것으로 보인다(24). 인삼의 국내의 연구들을 살펴보면 growth factor의 자극을 촉진하고(26) CNS(central nerve system)에서 choline 분비와 같은 metabolism을 증가시키는 것으로 알려져 있다(27). 또한 이런 신경계에 대한 인삼의 작용은 동물실험에서 기억력과 학습능력을 증진시킬 뿐만 아니라(28), Chu와 Chen의 연구 결과에서도 실험동물에서 ginsenoside가 뇌신경 보호 작용이 있음을 보고하였다(29). Sloley 등(30)은 인삼추출물이 scopolamine을 처리한 흰쥐의 synapsome에서의 choline uptake가 증가되었다고 보고하였고, Zhang 등(31)과 Salim 등(32)은 Rb₁과 Rg₁가 실험쥐의 뇌에서 Ach을 합성하는 choline acetyltransferase를 증가시켰다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 흑삼이 뇌 조직 내 ChAT 활성을 저해하는데 가장 효과적으로 작용한 것으로 사료된다.

뇌 조직 내 MDA 농도 분석

MDA는 가장 널리 쓰이는 지질과산화 손상 지표로 뇌의 기능저하에서 산화적 스트레스가 병리학적 기전 중 하나로 작용하기 때문에 측정하였고(33), 그 결과는 Table 6에 제시된 바와 같다.

시험 종료 후 뇌 조직 내 MDA 농도 측정 결과 NC군(1.46±0.16 nmol/mL)에 비해 PC군과 시험물질(백삼, 홍삼 및 흑삼) 투여군 모두에서 증가하였다. 그 가운데 PC군(2.48±

Table 6. Effects of test materials (WG, BG and RG) on brain malondialdehyde (MDA) (unit: nmol/mL)

	Groups ¹⁾				
	NC	PC	WG	RG	BG
MDA	1.46±0.16 ^{2)b3)}	2.48±0.28 ^a	2.12±0.31 ^a	1.68±0.21 ^b	1.55±0.26 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Data are expressed as mean±SE (n=10).

³⁾Values with different superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

0.28 nmol/mL)은 NC군에 비해 유의적인 증가를 보인 반면, 시험물질(백삼, 홍삼 및 흑삼) 투여군 모두 PC군의 MDA 농도가 각각 15%(2.12±0.31 nmol/mL), 33%(1.68±0.21 nmol/mL) 및 33%(1.55±0.26 nmol/mL)씩 감소하였다.

이와 같이 WG군, RG군 및 BG군의 뇌 조직 내 MDA 농도가 positive군에 비해 감소된 현상은 인삼의 성분인 Rb₁, Rg₁, Rg₂ 등의 주요 사포닌이 항산화 효과를 나타낸다는 보고(34,35)와 Rg₃의 anti-cytotoxic activity와 노화 및 허혈성 신경손상에 대한 신경보호 효과에 기인한 것으로 보인다(36)는 결과로 해석이 된다. 또한 ginsenoside Rg₃가 hydroxy radical에 대한 항산화 효과를 나타낸다는 최근 보고가 있으며(37,38), 일반적으로 흑삼에는 홍삼에 비해서 ginsenoside Rg₃의 함량이 10배 이상 증가되었다는 보고도 있다(39). 따라서 흑삼이 홍삼과 인삼에 비해 강한 항산화 활성으로 가장 효과적으로 뇌 조직 내 MDA 농도를 저하시킨 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 백삼이나 홍삼의 기억력 개선 효과 연구를 기초로 흑삼의 기억력 개선효과 여부를 판단하고자 scopolamine으로 유도된 시험동물에게 7주간 시료 물질(백삼, WG; 홍삼, RG; 흑삼, BG) 추출액을 투여한 후, 행동학적인 평가 및 뇌 조직 내 malondialdehyde 농도, ChAT 활성 변화를 비교 분석하여 기억력 및 학습능력 손상에 대한 개선효과를 알아보려고 하였다. 수동회피시험에서 BG군과 RG군의 latency time이 scopolamine 투여한 PC군(positive control)에 비해서 유의적으로 길어지는 결과를 나타냈다. 수중미로시험에서도 BG군과 RG군의 scopolamine에 의한 기억 손상이 유의적으로 개선되어 NC군의 escape latency 수준 정도로 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 probe test에서도 BG군과 RG군에서 장기 기억력 손상이 유의적으로 개선됨이 확인되었다. BG군과 RG군의 뇌조직 ChAT 효소 활성은 PC군에 비해 각각 42%, 71% 수준의 유의성 있는 활성 증가를 보였다. 지질 과산화도 malondialdehyde 측정 결과에서 PC군 대비 RG군과 BG군에서 각각 37%, 33% 수준의 유의성 있는 감소를 보였다. 이상의 결과를 요약하면 시험물질 가운데 흑삼의 반복 경구투여는 scopolamine으로 유도된 흰쥐에서 기억력 감퇴를 개선하는 데 가장 효과적인 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Oh SK. 2005. *Neurotransmitters and brain disease*. Shinil Books Company, Seoul, Korea. p 345-364.
2. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. 1999. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer' disease. *Neurology* 52: 691-699.
3. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook

- NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262: 2551-2556.
4. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lipas AS. 1982. The cholinergic hyphothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414.
5. Colye JT, Price DL, DeLong MR. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.
6. Shudo K, Kagechike H, Yamazaki N, Igarashi M, Tateda C. 2004. A synthetic retinoid am80 (tamibarotene) rescues the memory deficit caused by scopolamine in a passive avoidance paradigm. *Biol Pharm Bull* 27: 1887-1899.
7. Tanabe F, Miyasaka N, Kubota T, Aso T. 2004. Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spartial memory. *J Med Dent Sci* 51: 89-98.
8. Davies P, Maloney AJ. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403.
9. Davis KL, Thal LJ, Gamzu ER, Davis CS, Woolson RF, Gracon SI, Drachman DA, Schneider LS, Whitehouse PJ, Hoover TM. 1992. A double-blind placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 327: 1253-1259.
10. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. 1998. A 24-week, double-blind, placebo-cotrolled trial of donepezil in patients with Alzheimer' disease. *Neurology* 50: 136-145.
11. Rosler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gauthier S, Agid Y, Dal-Bianco P. 1999. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer' disease, international randomized controlled trial. *BMJ* 318: 633-638.
12. Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C. 2000. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54: 2269-2276.
13. Lawrence CH, Wang BW, Lee TF 2006. Effects of ginseng saponins on β -amyloid-induced amnesia in rats. *J Ethnopharmacol* 103: 103-108.
14. LeDoux JE. 1993. Emotional memory system in the brain. *Behav Brain Res* 20: 69-79.
15. Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
16. Lee MR, Yun BS, Park SY, Lym SY, Kim SN, Han BH, Sung CK. 2010. Anti-amnesic effect of Chong-Myung-Tang on scopolamine-induced memory impairments in mice. *J Ethnopharmacol* 132: 70-74.
17. Villa-Caballero L, Nava-Ocampo AA, Frati-Munari AC, Ponce-Monter H. 2000. Oxidative stress should it be measured in the diabetic patient? *Gac med Mex* 136: 249-256.
18. Van der Zee EA, Biemans BA, Gekema MP, Daan S. 2004. Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor-immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 78: 508-519.
19. Lozenzini CA, Bal E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. 1996. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research* 730: 32-39.
20. Seo JH, Woo SY, Kim YT, Kim MY, Park YM, Jin ZH, Bu YM, Kim HC. 2007. Enhancing effect of multiherb extracts HT008-1 on memory and cognitive function. *Kor J*

- Herbology* 22: 51-58.
21. Kim EJ, Jung IH, Le TKV, Jeong JJ, Kim NJ, Kim DH. 2013. Ginsenosides Rg5 and Rh3 protect scopolamine-induced memory deficits in mice. *J Ethnopharmacol* 146: 294-299.
 22. Zhao H, Li Q, Pei X, Zhang Z, Yang R, Wang J, Li Y. 2009. Long-term ginsenoside administration prevents memory impairment in aged C57BL/6J mice by up-regulating the synaptic-related proteins in hippocampus. *Behav Brain Res* 201: 311-317.
 23. Yamaguchi Y, Higashi M, Kobayashi H. 1997. Effects of ginsenosides on maze performance and brain choline acetyltransferase activity in scopolamine-treated young rats and aged rats. *Eur J Pharmacol* 329: 37-41.
 24. Lee ML, Yun BS, Liu L, Zhang DL, Wang Z, Wang CL, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Sung CK. 2010. Effect of black ginseng on memory improvement in the amnesic mice induced by scopolamine. *J Ginseng Res* 34: 51-58.
 25. Lee ML, Sun BS, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Yang SA, Ly SY, Sung CK. 2008. Effects of white ginseng and red ginseng extract on learning performance and acetylcholinesterase activity inhibition. *J Ginseng Res* 4: 341-346.
 26. Saito H, Suba K, Schwab M, Thonen H. 1977. Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside Rb1 in organ cultures of chick dorsal root ganglia. *Jpn J Pharmacol* 27: 445-451.
 27. Benishin CG. 1992. Actions of ginsenoside Rb1 on cholin uptake in central cholinergic nerve ending. *Neurochem Int* 21: 1-5.
 28. Choi X, Saji H, Iida Y, Magata Y, Yokoyama A. 1996. Ginseng pretreatment protects against transient global cerebral ischemia in the rat: measurement of local cerebral glucose utilization by deoxyglucose autoradiography. *Biol Pharm Bull* 19: 644-646.
 29. Chu GX, Chen X. 1989. Protective effect of ginsenosides on acute cerebral ischemia-reperfusion injury of rats. *China J Pharmacol Toxicol* 3: 18-23.
 30. Sloley BD, Pang PK, Huang BH, Ba F, Li FL, Benishin CG. 1999. American ginseng extract reduces scopolamine induced amnesia in spatial learning task. *J Psychiatry Neurosci* 24: 442-452.
 31. Zang JT, Qu ZW, Liu Y, Deng HL. 1990. Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1. *Clin Med J* 103: 932-938.
 32. Salim KN, McEwen BS, Chao HM. 1997. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and tr kA mRNA expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 47: 177-182.
 33. Bassett CN, Montine TJ. 2003. Lipoproteins and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 7: 446-451.
 34. Yokozawa T, Satoh A, Cho EJ. 2004. Ginsenoside Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice. *J Pharm Pharmacol* 56: 107-113.
 35. Chun H, David DK. 2001. Free radical scavenging capacity as related to antioxidant activity and ginsenoside composition of Asian and North American ginseng extracts. *JAOCS* 78: 249-255.
 36. Tian J, Fu F, Geng M, Jang Y, Yang J, Jiang W, Wang C, Liu K. 2005. Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 374: 92-97.
 37. Liu ZQ, Luo XY, Liu GZ, Chen YP, Wang ZC, Sun YX. 2003. In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *J Agric Food Chem* 51: 2555-2558.
 38. Kang KS, Kim HY, Beak SH, Yoo HH, Park JH, Yokozawa T. 2007. Study on the hydroxyl radical scavenging activity changes of ginseng and ginsenoside-Rb2 by heat processing. *Biol Pharm Bull* 30: 724-728.
 39. Lee SY, Kim DH, Woo WH. 2011. Antioxidant activity of black *Panax ginseng*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 115-121.