

더덕 물 추출물과 에탄올 추출물의 인지능 개선 활성 비교

원진배* · 이지우* · 엄민례* · 정윤식* · 고현정*** · 이현용**** · 박동식***** ·
정희철***** · 정재운***** · 마충제****#

*강원대학교 생물의소재공학과, **강원대학교 생명공학연구소, ***강원대학교 약학대학,
****서원대학교 차학과(식품공학과), *****농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과, *****(주)뉴트리
(Received March 4, 2014; Revised September 15, 2014; Accepted September 17, 2014)

Effect of Water and Ethanol Extracts *Codonopsis lanceolata* on Spatial Learning and Memory in Mice

Jin Bae Weon*, Jiwoo Lee*, Min Rye Eom*, Youn Sik Jung*, Hyun-Jeong Ko***, Hyeon Yong Lee****, Dong-Sik Park*****, Hee-Chul Chung*****, Jae Youn Chung***** and Choong Je Ma****#

*Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Research Institute of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

***Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

****Department of Teatics, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

*****Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, Suwon 441-853, Korea

*****Newtree CO., LTD. 11F Tech Center, SKnTechno Park, 190-1, Sungnam 462-120, Korea

Abstract — Alzheimer's disease (AD), most common form of dementia is characterized that memory deficit and loss of cognitive function. This study was evaluated cognitive enhancing effect of water and ethanol extracts of *Codonopsis lanceolata* and compared using Morris water maze and passive avoidance test. The water and 70% ethanol extracts (100, 300 and 500 mg/kg) were administered to mice. The neuroprotective effect on glutamate-induced cell death in HT22 cells was additionally investigated using MTT assay. Results showed 70% ethanol extract of *Codonopsis lanceolata* enhanced cognitive function than water extract, as shown by decrease in escape latency time in Morris water maze test. In passive avoidance test, 70% ethanol extract also increased the latency time compared to the water extract. Furthermore, 70% ethanol extract significantly protected neuronal cell against glutamate cytotoxicity and showed higher than neuroprotective effect of water extract. These results indicate that 70% ethanol extract more improve spatial cognitive ability and protected neuronal cells than water extract.

Keywords □ *Codonopsis lanceolata*, cognitive enhancing effect, neuroprotective effect

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과(Campanulaceae) 더덕속에 속하는 여러해살이 덩굴식물로, 더덕 속은 한국, 일본, 중국을 포함한 동아시아와 인도에 약 40종이 분포하며 사삼(沙蔘)이라고도 한다.¹⁾ <향약집성방>에서는 더덕은 맛이 쓰고 독이 없으며, 성질은 차다고 기록되어 있으며, 예로부터 위·허파·비장·신장을 튼튼하게 해주는 효과가 있으며, 두통이나 현기

증 치료, 강장, 해열에도 효과가 있다고 한다. 더덕의 주요 생리 활성 성분은 대부분 triterpene saponin의 형태로 존재하는 saponin과 phenylpropanoid이다.^{2,3)} 최근 연구에 따르면 더덕은 DPPH 및 ABTS radical 소거능 그리고 FRAP에 의한 환원력을 포함한 항산화 효과, 항장 활성, 피부개선 효과, 그리고 면역 세포 활성화와 관련하여 비장세포 증식능과 cytokine 분비 활성화 등이 보고되었다.^{4,7)}

최근 생명 과학의 발달로 인해 노인 인구의 증가함에 따라 퇴행성 뇌질환인 치매에 대한 관심이 증가하였다. 치매의 가장 대표적인 유형은 알츠하이머 병으로, 65세 이상 치매환자의 70%가 알츠하이머 병이다. 알츠하이머 병은 기억력 및 판단력의 감퇴와 같은 뇌 기능 저하와 언어 능력 저하 등의 임상적인 특징

#Corresponding Author

Choong Je Ma

Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel.: 033-250-6565 Fax.: 033-253-6560

E-mail: cjma@kangwon.ac.kr

을 보인다.^{8,9)} 조직병리학적 특징으로 신경 세포 주변에 노인성 신경반(neuritic plaque)과 tau 단백질로 구성된 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등이 축적 된다.^{10,11)} 알츠하이머 병의 발병 기전은 복잡하고 한가지의 특징적인 원인이 밝혀지지 않고 있으며 연구가 계속되고 있다. 현재 보고된 발병 기전은 β -amyloid 침착, 신경전달물질인 acetylcholine(ACh) 합성 감소와 같은 콜린성 시스템 기능 저하, 산화적 스트레스에 의한 뇌신경 세포 사멸, 단백질 합성 저해, 유전자 발현 이상 등이 있다.¹²⁻¹⁵⁾ 현재 알츠하이머 병의 치료제는 콜린성 가설(cholinergic hypothesis)에 바탕으로, acetylcholinesterase(AChE)를 억제하여 기억과 학습에 중요한 신경전달물질인 ACh의 농도를 상승시키는 acetylcholinesterase inhibitor 계열의 약물로 donepezil HCl, rivastigmine, galantamine 등이 있다.^{16,17)} 하지만 현재 사용되고 있는 치료제는 일시적인 증상 완화와 병의 진행을 지연 시키는 효과만 있을 뿐 근본적인 알츠하이머 병의 치료제를 아니며, 간과 관련된 부작용 및 구토, 설사와 같은 위장관 장애를 일으키기 때문에 새로운 치료제의 개발이 필요하다.¹⁸⁾

예로부터 천연물은 다양한 질병 치료에 사용되어 왔으며, 부작용의 위험성이 적다. 천연물의 경우, 다양한 생리활성 성분을 가지고 있어 발병 기전이 복잡한 알츠하이머 병과 치료제로 적합할 것으로 판단된다.¹⁹⁾ 천연물 소재 중 당귀와 현삼 추출물은 알츠하이머 치료제로 사용되기 위해 임상 실험 및 추가적인 연구가 진행되고 있다.^{20,21)}

예전 연구에서 증숙 발효 더덕을 이용한 인지능 개선 활성 및 뇌신경 세포 보호 활성을 측정하였으며, 일반 더덕 추출물보다 활성이 증가한 것을 확인하였다.²²⁾ 본 연구에서는 더덕 물 추출물과 ethanol 추출물의 인지능 개선 활성과 뇌신경 세포 보호 활성을 비교 실험을 통해 더덕의 활성을 효율적인 사용을 위한 자료를 제시하고자 한다. 인지능 개선 활성을 측정하기 위해 수중 미로 실험과 수동 회피 실험을 실시하였으며, 부교감 신경 차단제인 scopolamine을 이용하여 기억력을 손상시켰다. 뇌신경 세포 보호 활성은 mouse 해마 유래 세포인 HT22 cell line를 통해 glutamate에 의한 세포 사멸에 대한 보호 활성을 측정하였다.

실험방법

시약 및 시료

Scopolamine, carboxymethyl cellulose, glutamate, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trox), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL Co.(Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다.

더덕 추출물 제조

본 연구에 사용된 더덕은 2012년 8월에 강원도 횡성 지역에서 채취한 것을 사용하였다. 흙이나 이물질 제거를 위해 더덕을 세정한 후, 음건 조건하에서 20~30°C 유지하며, 1~2일 건조하였다.

건조된 더덕은 100 g씩 8~10배수 (v/w)의 증류수와 70% ethanol을 사용하여 수직 환류 냉각 추출법에 의해 각각 100°C와 80°C에서 24시간 추출하였다. 추출액은 감압 필터를 이용하여 여과 후 회전식 감압농축기(EYELA N-1000, Japan)를 사용하여 여과한 추출액을 농축하였다. 농축된 더덕 추출물을 동결건조기(ILSIN, Korea)를 통해 3일간 -70°C에서 건조 후 분말상태로 준비하여 실험에 사용하였다.

실험 동물

ICR mouse(4주령, 수컷)을 대한 바이오링크(충북 음성군, 한국)에서 구입하여 행동 실험에 사용하였다. Mouse는 사육실에서 일주일 동안 온도는 22±2°C, 습도는 50±10%로 유지하였고, 명암은 12시간을(09:00~21:00) 주기로 조절하며 적응시켰다. 적응기간 동안 사료와 물을 제한 없이 자유 공급하였다. 실험군은 각 군당 7마리씩 구성하여, 대조군, scopolamine 단독 투여군, scopolamine과 donepezil(positive control) 투여군, scopolamine과 농도 별 물 추출물 투여군, scopolamine과 농도 별 70% ethanol 더덕 추출물 투여군으로 나누었다.

약물 제조 및 투여

더덕 물 추출물, 70% ethanol 추출물 그리고 Positive control인 donepezil은 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)에 녹여 사용하였으며, scopolamine은 생리식염수에 녹여 사용하였다. 수중 미로 실험과 수동 회피 실험 실시 120분 전에 100, 300과 500 mg/kg의 더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물 그리고 1 mg/kg의 donepezil을 경구 투여하였다. 대조군은 같은 량의 0.5% CMC만을 투여하였다. 1 mg/kg의 scopolamine은 동물 실험 30분 전에 대조군을 제외한 실험군에 피하투여하여, 치매를 유도하였다. 대조군은 같은 량의 생리식염수만을 투여하였다.

수중 미로 실험(Morris water maze test)

수중 미로 실험은 공간 기억력 측정을 위해 가장 보편적인 동물 실험으로 치매치료제 스크리닝에 사용된다. 본 연구에서는 Morris가 제시한 방법을 응용하였다.²³⁾ 원형 pool(직경 90 cm, 높이 40 cm) 안에 물 (20±1°C)을 채우고 가상의 4구간으로 나누었다. 한 구간의 중간에 platform을 수면 아래 1 cm에 위치하도록 물 높이를 조절하고, 흰 우유를 섞어 흰색 platform(직경 10 cm, 높이 26 cm)이 보이지 않게 하였다. 수영 시작점은 매일 위

치를 달리하였으며, platform의 위치는 실험 기간 동안 고정하였다. 실험 첫날은 적응 실험을 실시하여, platform 없이 60초 동안 수영을 하도록 하였다. 측정 실험은 2일째부터 진행하였으며, mouse가 platform에 도달하면 10초 동안 platform에 머물게 하여 위치를 기억하게 하였으며, 120초 동안 platform에 도달하지 못하면 측정을 멈추고 platform에 올려놓은 후 10초 동안 위치를 기억시킨 후 다음 실험을 진행하였다. 수영 시작점에서 platform에 도달하는 시간(escape latency)을 기록하여 공간 기억 개선 능력 평가하였으며, 모든 mouse의 행동과 기록은 Smart (ver. 2.5.21) video-tracking system에 의해 분석되었다. 6일째 probe test을 진행하기 위해 platform을 제거하였으며, 60초 동안 mouse가 platform이 위치했던 구간에서의 머무름 시간을 측정(s)하여 기록하였다.

수동회피 실험(passive avoidance test)

수동 회피 실험은 본능적으로 어두운 곳을 선호하는 mouse의 특성을 이용한 실험으로 학습 및 기억 능력 증진 효과를 평가를 위한 일반적인 방법 중 하나이다.²⁴⁾ 수동 회피 실험은 GEMINITM Avoidance System(San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)를 통해 진행되었다. 두 개의 아크릴 상자가 있고 상자 사이에는 mouse가 이동할 수 있는 문이 설치되어 있다. 상자 바닥에는 스테인리스 막대가 깔려있어 전기충격을 가할 수 있다. 실험 시작 전, 한 쪽 상자에 60초 동안 적응하게 한 후, 조명을 통해 불빛을 비추고 소음을 일으키고 문이 열리면서 mouse가 반대편 상자로 이동하게 한다. 24시간 후, sample과 scopolamine을 투여 한 후, mouse을 같은 위치의 상자에 넣은 후 20초 후에 다시 불빛을 비추고 소음을 일으킨다. mouse가 반대편 상자로 들어가면 2초 뒤 전기충격(0.1 mA/10 g body)을 준다. 24시간 후, 같은 실험을 진행하고 mouse가 반대편 상자로 이동하는 시간을 step through latency으로 측정한다. Step through latency는 최대 180초까지 측정하였으며, 그 후 움직임이 없으면 실험을 멈추었다.

뇌신경 세포 보호 활성 측정

더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 뇌신경세포 보호 활성을 측정하기 위해 MTT assay를 시행하였다. HT22 cell line은 서울대학교로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. HT22 cells은 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 5% CO₂와 37°C 온도 조건으로 배양하였다. 배양된 HT22 cells은 48-well plate에 6.7×10⁴ cells/300 µl를 분주하고 24 시간 배양한 후, 100과 500 µg/ml의 각 더덕 추출물, 50 µM의 Trolox(positive control)와 2 mM의 glutamate를 첨가하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 DMSO를 처리하여 MTT를 용해한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HPLC 분석

HPLC-DAD 분석법을 이용해 더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. 6개의 페놀성 화합물, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeine의 함량을 측정 비교하였다. HPLC system은 Agilent 1260 series(Agilent technologies., California, USA)을 이용하였으며, column은 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250×4.60 mm i.d., 5 µm)를 이용하였다. 이동상은 10% acetonitrile with 0.1% formic acid(A)과 0.1% formic acid in 40% acetonitrile and 40% methanol(B)을 사용하였으며, 분리능을 높이기 위해 gradient system(0~15 min, 95% A; 15~23 min, 60% A; 23~33 min, 60% A; 33~42 min, 0% A; 42~45 min, 95% A; 45~50 min, 95% A)을 이용하였다. 유속은 1 ml/min로 하였고, column 온도는 35°C를 유지한 상태로 분석하였다. 각 페놀성 화합물의 peak를 확인하기 위한 UV 검출기의 wavelength은 280 nm을 설정하였다.

6개 페놀성 화합물의 함량은 표준물질을 사용하여 6개의 농도(×1, ×1/5, ×1/10, ×1/20, ×1/40, ×1/80)로 단계별로 희석시킨 후 HPLC 분석을 3회 실시하여 검량선을 작성하였으며, correlation coefficient(R²)의 값이 0.99 이상인 경우 지표 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

통계처리

통계처리는 SPSS 통계(IBM SPSS statistics 20)을 이용하였으며, 모든 실험의 결과는 평균값±표준편차로 나타내었으며, 각 처리 군들의 유의성은 P<0.001의 수준까지 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

수중 미로 실험(Morris water maze test)에서 더덕 추출물의 효과

공간 기억력 및 학습 개선 효과를 측정하기 위해 수중 미로 실험을 진행하였다. Mouse의 기억력 손상을 유도하기 위해 scopolamine을 투여하였다. Scopolamine의 경우, 신경전달물질인 Ach과 muscarinic receptor와 결합을 억제하여 ACh의 농도를 낮춰 기억력 손상을 유발시킨다.²⁵⁾ 측정 실험 4일 동안 대조군은 platform을 찾아가는 매일 escape latency가 감소하였으나, scopolamine에 의해 치매가 유도된 실험군의 경우, Day 3을 제외한 실험 기간 동안 정해진 시간 동안 platform을 찾아가지 못하였다. 100 mg/kg과 300 mg/kg의 더덕 물 추출물은 실험 4일째 escape latency를 줄였고 500 mg/kg의 농도에서 실험 2일째부터 escape latency를 줄여 4일째(101.05±7.74초) 유의적으로 감소시켰다. 70% ethanol 더덕 추출물은 100 mg/kg과 300 mg/kg의 농도에서 실험 3일째부터 escape latency를 줄였으며, 500

mg/kg의 농도는 실험 2일째부터 escape latency를 줄였으며, 4 일째(95.76 ± 8.99 초) 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. (Fig. 1A). Probe test 결과, scopolamine을 처리한 실험군 (11.13 ± 4.75 초)에 비해 500 mg/kg의 70% ethanol 더덕 추출물

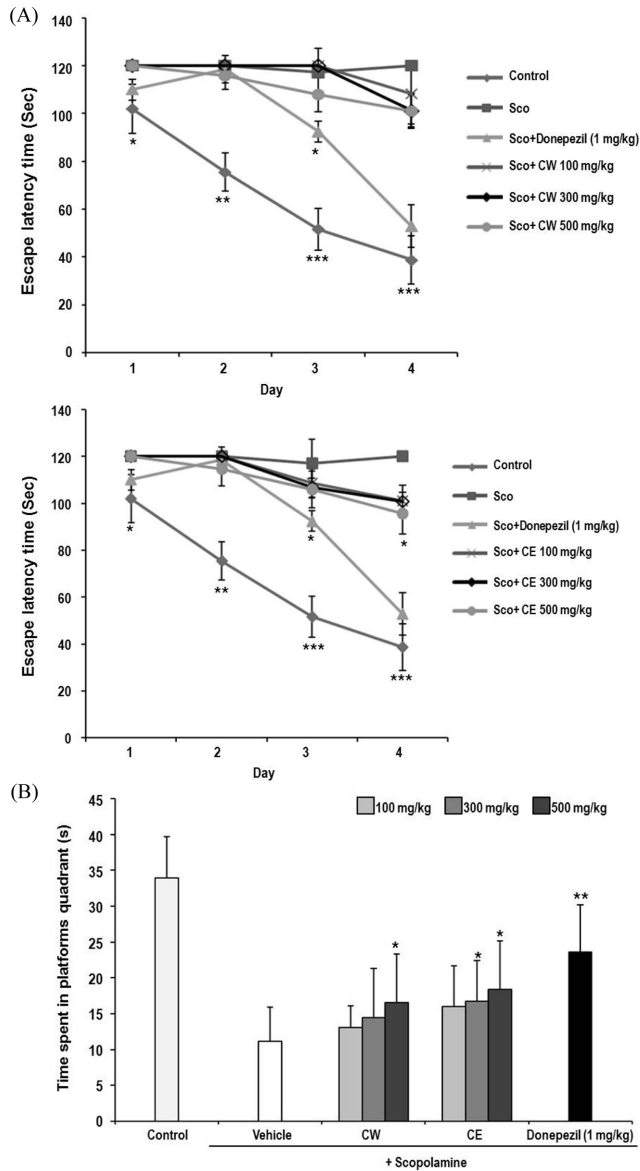


Fig. 1 – The effect of *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE) (100, 300 and 500 mg/kg) on escape latencies in the Morris water maze test during 4 days (A). The effect of *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE) in the probe trial (B). The data represent mean \pm SD ($n=7$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ significant in comparison to scopolamine-treated group (vehicle). Control: control group, Sco: only scopolamine treated group, Sco+Donepezil: scopolamine and donepezil treated group. Sco+CW: scopolamine and *C. lanceolata* water extract treated group, Sco+CE: scopolamine and *C. lanceolata* ethanol extract treated group.

(18.39 ± 6.76 초)의 platform 구간 머무름 시간이 유의적으로 증가시켰으며, 더덕 물 추출물(16.55 ± 6.78 초)보다 높았다(Fig. 1B).

수중 미로 실험에서 scopolamine은 실험 기간 동안 escape latency가 줄지 않았으며, 더덕 70% ethanol 추출물은 scopolamine에 의해 유도된 기억력 손상을 개선하였다. Probe test에서도 더덕 70% ethanol 추출물은 scopolamine을 투여한 실험군보다 platform 위치 구간의 머무름 시간이 증가됨을 확인되었다. 위의 결과로, 70% ethanol 더덕 추출물이 물 추출물 보다 공간 기억력 및 학습 능력에 개선 효과가 높은 것으로 나타났다.

수동 회피 실험(Passive avoidance test)에서 더덕 추출물의 효과

더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 기억력 증진 효과를 측정하기 위해 수동 회피 실험을 실시하였다. 수동 회피 실험에서도 mouse의 기억력 손상을 유도하기 위해 scopolamine을 투여하였다. Scopolamine을 처리한 실험군(35.0 ± 8.3 초)은 대조군의(118.6 ± 9.4 초) step-through latency 비해 유의적으로 감소하였으며, 이를 통해 Scopolamine이 mouse의 기억력 손상을 유발시킨 것으로 판단된다. 70% ethanol 더덕 추출물은 100 mg/kg과 300 mg/kg에서 각각 44.5 ± 9.2 초와 49.7 ± 8.4 초를 나타내었으며 500 mg/kg(52.4 ± 9.5 초)의 농도에서 scopolamine을 처리한 실험군보다 유의적으로 step-through latency를 증가시켰다. 더덕 물 추출물 처리군(500 mg/kg: 42.6 ± 6.45 초)의 경우, step-through latency가 70% ethanol 더덕 추출물 보다 낮은 결과를 나타내었다(Fig. 2).

수동 회피 실험에서 더덕 70% ethanol 추출물은 scopolamine을 투여한 실험군의 감소한 step-through latency를 유의적으로

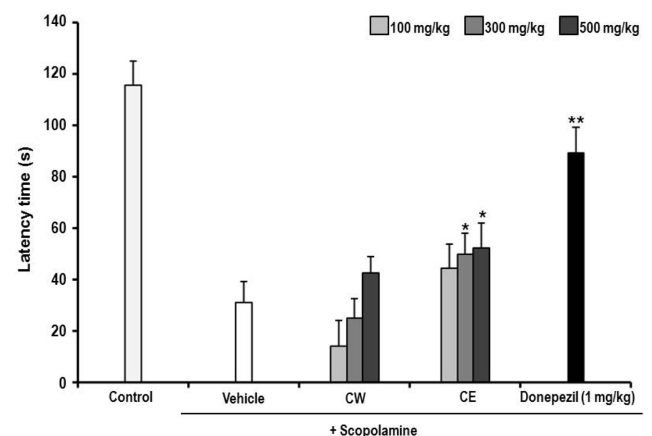


Fig. 2 – The effect of *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE) (100, 300 and 500 mg/kg) on scopolamine-induced memory impairment mice in passive avoidance test. The data represent mean latency time (s) \pm SD ($n=7$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ significant in comparison to scopolamine-treated group (vehicle).

증가하였다. 수동 회피 실험의 결과를 통해, 더덕 70% ethanol 추출물의 기억력 증진 효과를 확인할 수 있었다.

동물 행동 실험을 통해 더덕 70% ethanol 추출물의 기억력 개선 효과를 확인 하였으며, 물 추출물의 활성보다 높은 효과를 나타내었다. 또한 더덕의 활성은 콜린성 신경계에서의 acetylcholine의 농도와 관련이 있는 것으로 사료된다.

더덕 추출물의 뇌신경 세포 보호 활성

중추 신경계에서 아미노산은 일반적인 신경 전달 물질이다. 아미노산 중 glutamate는 흥분성 신경 전달 물질로서, 학습과 기억 형성에 중요한 역할을 하는 뉴런의 성장과 이동을 조절한다. 고농도의 glutamate는 cystine/glutamate transport system Xc-을 통하여 세포막의 cystine을 억제시켜 세포 내 glutathione의 양을 감소 시킨다.²⁶⁾ 또한, 세포 내 칼슘이온(Ca²⁺)과 reactive oxygen species(ROS) 생성을 증가시켜 산화적 스트레스를 일으킨다.²⁷⁾

Glutamate에 의한 세포 사멸에 대한 더덕 추출물의 뇌신경 세포 보호 활성을 측정하였다. Glutamate를 처리한 cell은 59.85±2.17%의 세포 생존율을 나타내어 HT22 cells이 사멸된 것으로 나타났다. 더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물은 10, 100 500 µg/ml의 농도를 처리하였으며, 그 중 70% ethanol 추출물은 77.22±8.61%의 세포 생존율을 나타내어 유의적으로 glutamate에 의해 사멸되는 세포 수를 줄였다. 더덕 물 추출물은 500 µg/ml의 농도에서 69.45±4.62%의 생존율을 나타내어 70% ethanol 추출물이 더 높은 뇌신경 세포 보호 활성을 나타내었다(Fig. 3).

뇌신경 세포 보호 활성을 측정한 결과, Glutamate에 유도된 산화적 스트레스에 의한 HT22 cells의 세포 사멸에 대해 70% ethanol 더덕 추출물은 세포 보호 활성을 보였으며, 더덕 물 추출물보다 높은 활성을 나타냈다. Glutamate의 세포 사멸 기전과

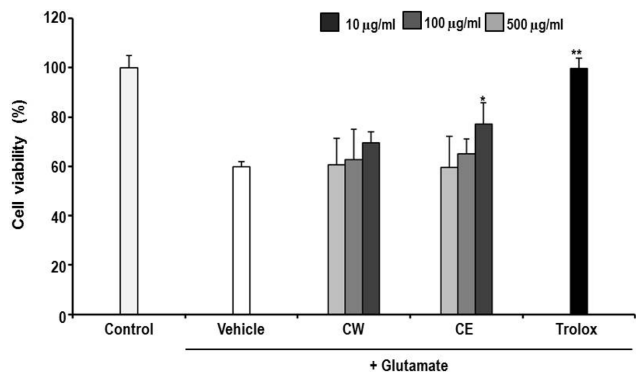


Fig. 3 – Effect of *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE) (10, 100 and 500 µg/ml) on glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells. The data represents the mean±SD. **p*<0.05 and ***p*<0.01 significant in comparison to glutamate-treated cells (vehicle).

관련하여 더덕 추출물은 항산화 활성을 통해 산화적 스트레스를 억제하여 뇌신경 세포를 보호하는 것으로 판단된다.

더덕 추출물의 페놀성 화합물 함량 측정

더덕 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 페놀성 화합물 함량 측정을 위해 HPLC를 사용하였다(Fig. 4). 총 6개의 페놀성 화합물, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeine 함량을 측정 비교하였다(Fig. 5). 더덕 물 추출물은 4-coumaric acid가 511 µg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid 그리고 trans-ferulic acid는 각각 489 µg/g, 132 µg/g

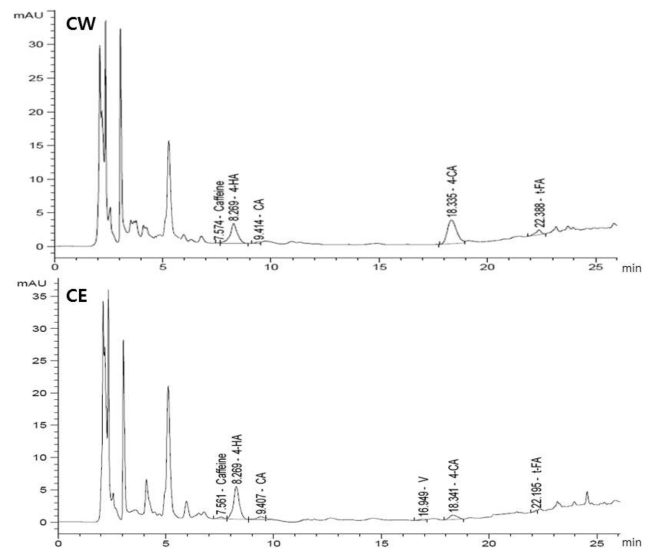


Fig. 4 – HPLC chromatogram of phenolic compounds in *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE) (Caffeine: Caffeine, 4-HA: 4-hydroxybenzoic acid, CA: Caffeic acid, V: Vanillin, 4-CA: 4-Coumaric acid, t-FA: Trans-ferulic acid).

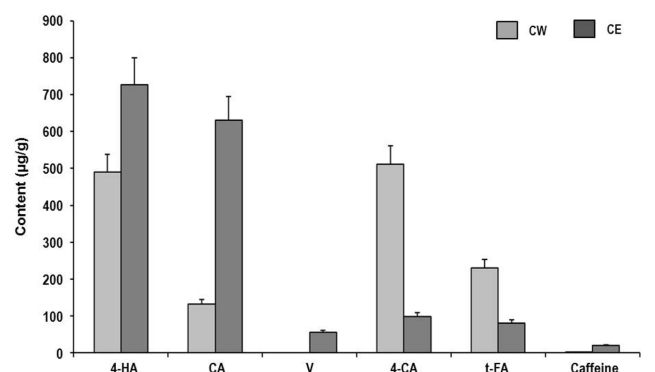


Fig. 5 – Contents of phenolic compounds in *C. lanceolata* water extract (CW) and *C. lanceolata* ethanol extract (CE). (Caffeine: Caffeine, 4-HA: 4-hydroxybenzoic acid, CA: Caffeic acid, V: Vanillin, 4-CA: 4-Coumaric acid, t-FA: Trans-ferulic acid).

g, 231 µg/g의 함량을 나타내었다. 70% ethanol 추출물은 4-hydroxybenzoic acid(728 µg/g)가 가장 높은 함량을 나타내었고, caffeic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeine은 각각 631 µg/g, 56 µg/g, 99 µg/g, 82 µg/g 그리고 19 µg/g의 함량을 나타내었다.

70% ethanol 추출물이 물 추출물보다 4-hydroxybenzoic acid와 caffeic acid의 함량이 물 추출물보다 각각 48.88%와 378.03% 증가하였으며, vanillic acid와 caffeine이 추가적으로 나타났다. 화합물의 용해도는 용매의 극성에 따라 차이를 나타내며, 두 추출물의 화합물의 함량은 용매의 용해도의 차이에 따라 변화를 나타낸 것으로 사료된다.

최근 연구에서 caffeic acid는 rat에 투여하여 수증 미로 실험에서 인지능 개선 활성을 나타내었으며, AchE의 활성을 억제하였으며, 항산화 활성과 관련된 glutathione-S-transferase enzyme과 glutathione의 량을 증가시켰다. 생약이나 한방제제등의 추출 조건이나 다른 영향으로 인한 화합물의 함량 변화는 활성에 영향을 준다.^{28,29} 물 추출물보다 ethanol 추출물에서 크게 증가한 caffeic acid의 량이 ethanol 추출물의 활성과 관련이 있는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 추출 용매에 따른 더덕의 인지능 개선 활성과 뇌신경 세포 보호 활성을 측정하고 비교하여, 더덕의 활성을 효율적으로 사용하기 위한 자료를 제시하기 위해 진행하였다. 이미 추출 용매에 따른 천연물의 활성을 비교하는 연구는 많이 보고 되었으며, 현재도 계속 진행 중에 있다.^{30,31} 추출 용매의 경우, 천연물을 이용하여 신약 및 건강 기능 식품을 개발하는 과정에서 가장 중요한 과정 중에 하나이다. 일반적으로 사용되는 추출 용매는 물과 70% ethanol이며, 본 연구에서도 두 가지 용매를 이용하여 추출을 진행하였다.

결론적으로 더덕 70% ethanol 추출물은 물 추출물보다 더덕의 인지능 개선 활성 및 뇌신경 세포 보호 활성을 높게 나타냈다. 추출 용매에 따라 더덕의 활성의 변화는 더덕 화합물의 함량에 의해 나타난 것으로 판단된다. 최근 연구에 따르면 더덕 추출물에 대한 독성이 나타나지 않아 기능성 식품 및 원료로서의 이용 가능성이 확인되었다.³²

추후 다른 추출 용매와 조건을 적용하여 더덕의 인지능 개선 활성 및 뇌신경 세포 보호 활성을 효율적으로 이용하기 위한 연구를 진행할 계획이다.

감사의 말씀

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- 1) Kim, C. H. and Chung, M. H. : Pharmacognostical Studies on *Codonopsis lanceolata*. *Kor. J. Pharmacog.* **6**, 43 (1975).
- 2) Ushijima, M., Komoto, N., Sugizono, Y., Mizuno, I., Sumihiro, M., Ichikawa, M., Hayama, M., Kawahara, N., Nakane, T., Shirota, O., Sekita, S. and Kuroyanagi, M. : Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 308 (2008).
- 3) Li, J. P., Liang, Z. M. and Yuan, Z. : Triterpenoid saponins and anti-inflammatory activity of *Codonopsis lanceolata*. *Pharmazie.* **62**, 463 (2007).
- 4) Park, S. J., Park, D. S., Lee, S. B., He, X., Ahn, J. H., Yoon, W. B. and Lee, H. Y. : Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1898 (2010).
- 5) Kim, J. S., Choi, W. S., Chung, J. Y., Chung, H. C. and Lee, H. Y. : Enhancement of cosmeceutical activity from *Codonopsis lanceolata* extracts by stepwise steaming process. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **21**, 204 (2013).
- 6) Shim, S.-B. and Chun, Y.-J. : The study on skin safety and efficacy of *Codonopsis lanceolata* root fermentation extract. *J. Kor. Acad. Industr. Coop. Soc.* **13**, 5623 (2012).
- 7) Ryu, H.-S. : Effect of *Codonopsis lanceolatae* extracts on mouse IL-2, IFN-, IL-10 cytokine production by peritoneal macrophage and the ratio of IFN-, IL-10 cytokine. *Kor. J. Food Nutr.* **22**, 69 (2009).
- 8) Crapper, D. R. and DeBoni, U. : Brain aging and Alzheimer's disease. *Can. Psychiatr. Assoc. J.* **23**, 229 (1978).
- 9) Brookmeyer, R., Gray, S. and Kawas, C. : Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public. Health* **88**, 1337 (1998).
- 10) Brion, J. P. : Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* **40**, 130 (1998).
- 11) Goedert, M., Spillantini, M. G. and Crowther, R. A. : Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol.* **1**, 279 (1991).
- 12) Citron, M. : Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat. Neurosci.* **5**, 1055 (2002).
- 13) Portelius, E., Zetterberg, H., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Andreasson, N., Wallin, A., Westman-Brinkmalm, A. and Blennow, K. : An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* **409**, 229 (2006).
- 14) Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. : Oxidative stress, glutamate,

- and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689 (1993).
- 15) Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, D. and Lipa, A. S. : The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408 (1982).
- 16) McGleenon, B. M., Dynan, K. B. and Passmore, A. P. : Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**, 471 (1999).
- 17) Ballard, C. G. : Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur. Neurol.* **47**, 64 (2002).
- 18) 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. *Behav. Brain Res.* **57**, 143 (1993).
- 19) Dastmalchi, K., Damien, D. H. J., Vuorela, H. and Hiltunen, R. : Plants as potential sources of drug development against Alzheimer's disease. *Int. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.* **1**, 83 (2007).
- 20) Park, S. J., Jung, J. M., Lee, H. E., Lee, Y. W., Kim, D. H., Kim, J. M., Hong, J. G., Lee, C. H., Jung, I. H., Cho, Y. B., Jang, D. S. and Ryu, J. H. : The memory ameliorating effects of INM-176, an ethanolic extract of *Angelica gigas*, against scopolamine- or A β (1-42)-induced cognitive dysfunction in mice. *J. Ethnopharmacol.* **143**, 611 (2012).
- 21) Jeong, E. J., Ma, C. J., Lee, K. Y., Kim, S. H., Sung, S. H. and Kim, Y. C. : KD-501, a standardized extract of *Scrophularia buergeriana* has both cognitive-enhancing and antioxidant activities in mice given scopolamine. *J. Ethnopharmacol.* **121**, 98 (2008).
- 22) Weon, J. B., Yun, B.-R., Lee, J., Eom, M. R., Lee, H. Y., Park, D. S., Chung, H. C., Chung, J. Y. and Ma, C. J. : Cognitive enhancing activity of the steamed and fermented extracts of *Codonopsis lanceolata* Radix. *Yakhak Hoeji* **57**, 41 (2013).
- 23) Morris, R. : Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in rats. *J. Neurosci. Methods* **11**, 47 (1984).
- 24) Shahidi, S., Motamedi, F., Bakeshloo, S. A. and Taleghani, B. K. : The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behav. Brain Res.* **152**, 81 (2004).
- 25) Izquierdo, I. : Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 175 (1989).
- 26) Fukui, M., Song, J. H., Choi, J., Choi, H. J. and Zhu, B. T. : Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur. J. Pharmacol.* **617**, 1 (2009).
- 27) Randall, R. D. and Thayer, S. A. : Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **12**, 1882 (1992).
- 28) Lee, H.-J., Do, J.-R., Kwon, J.-H. and Kim, H.-K. : Physiological properties of *Corni fructus* extracts based on their extraction condition. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 271 (2012).
- 29) Yang, H. J., Weon, J. B., Lee, B. and Ma, C. J. : The alteration of components in the fermented Hwangryunhaedok-tang and its neuroprotective activity. *Pharmacogn. Mag.* **7**, 207 (2011).
- 30) Ku, K.-H., Choi, E. J. and Park, W. S. : Functional activity of water and ethanol extracts from red pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1357 (2008).
- 31) Kim, N. Y., Kim, H. J., Lee, J. H., Lee, E. K., Kang, O. H., Kwon, D. Y., So, H.-S., Lee, K. N. and Chong, M. S. : Comparison of the anti-inflammatory effects of water fermented and ethanol fermented extracts from Rhei Radix et Rhizoma. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **25**, 227 (2011).
- 32) Kim, N. Y., Chung, J. Y. and Lee, H. Y. : Enhancement of Immune Activity of the Extracts from *Codonopsis lanceolata* by Stepwise Steaming Process and High Pressure Process. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **22**, 134 (2014).