

## 遠志가 만성적 뇌혈류저하 흰쥐의 $\beta$ -Amyloid 축적과 기억장애에 미치는 영향

손영하<sup>1#</sup>, 김성재<sup>1</sup>, 정민찬<sup>1</sup>, 조동국<sup>1</sup>, 조우성<sup>1</sup>, 신정원<sup>1</sup>, 박동일<sup>2</sup>, 손낙원<sup>1\*</sup>

1 : 경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공, 2 : 동의대학교 한의과대학 내과학교실

### Effects of Polygalae Radix on $\beta$ -Amyloid Accumulation and Memory Impairment Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats

Young-Ha Son<sup>1#</sup>, Sung-Jae Kim<sup>1</sup>, Min-Chan Chung<sup>1</sup>, Dong-Guk Cho<sup>1</sup>,  
Woo-Sung Cho<sup>1</sup>, Jung-Won Shin<sup>1</sup>, Dong-Il Park<sup>2</sup>, Nak-Won Sohn<sup>1\*</sup>

1 : Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,  
2 : Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was investigated the effects of the root of *Polygala tenuifolia* (POL) on learning and memory impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats.

**Methods** : Chronic cerebral hypoperfusion was produced by permanent bilateral common carotid artery occlusion (pBCAO). POL was administered orally once a day (130 mg/kg of water-extract) for 28 days starting at 4 weeks after the pBCAO. The acquisition of learning and the retention of memory were tested on 9th week after the pBCAO using the Morris water maze. In addition, effects of POL on  $A\beta$  generation and expressions of APP and BACE1 were observed in the hippocampus of rats.

**Results** : POL significantly prolonged the swimming time spent in target quadrant and significantly reduced the swimming time spent in the quadrant far from the target. POL significantly increased the percentage of swim in the target quadrant in the retention test, while POL was not effective on the escape latencies in the acquisition training trials. POL significantly reduced the levels of  $A\beta_{(1-40)}$  and  $A\beta_{(1-42)}$  in the cerebral cortex and the level of  $A\beta_{(1-42)}$  in the hippocampus produced by chronic cerebral hypoperfusion. POL also significantly attenuated the up-regulation of APP and BACE1 expression in the hippocampus produced by chronic cerebral hypoperfusion.

**Conclusions** : The results show that POL alleviated memory deficit and up-regulation of  $A\beta$  and BACE1 expressions in the hippocampus. This result suggests that POL may exert ameliorating effect on memory deficit through inhibition of  $\beta$ -secretase activity and  $A\beta$  generation.

**Key words** : Polygalae radix, Cerebral hypoperfusion,  $\beta$ -amyloid, Memory impairment, APP, BACE1, Morris water maze

#### 서론

遠志 (Polygalae Radix)는 원지과 (Polygalaceae)에 속한 다년생 초본인 원지 (*Polygala tenuifolia* Willd.)의 뿌리를

건조한 것으로 寧心安神, 益智, 祛痰開竅의 효능으로 心神不安, 驚悸, 不眠, 健忘, 精神錯亂, 神志恍惚 등을 치료하는데 응용되며<sup>1)</sup>, 중추신경계 질환과 인지기능 장애에 가장 많이 사

\*Corresponding author : Nak-Won Sohn, Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-201-2747 · E-mail : sohnw@khu.ac.kr

#First author : Young-Ha Son, Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-201-2747 · E-mail : sonyh@khu.ac.kr

· Received : 13 October 2014 · Revised : 3 November 2014 · Accepted : 4 November 2014

용되는 한약물 중 하나이다<sup>2)</sup>. 遠志는 nuclear factor- $\kappa$ B를 억제하는 기전에 의해 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 interleukin-1을 억제하는 항염증 효능이 있고<sup>3,4)</sup>, N-methyl-D-aspartate (NMDA)와  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ )에 의한 신경세포 손상을 억제하며<sup>5,6)</sup>, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP)에 의한 도파민성 신경세포의 손상을 보호하는 효능이 있다고 하였다<sup>7)</sup>. 또한 *in vivo* 연구에서, A $\beta$ <sub>(25-25)</sub>의 뇌실 주입에 의한 학습과 기억 장애<sup>8)</sup> 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체 길항제인 scopolamine에 투여에 의한 기억 장애를 개선하는 효능이 보고되었다<sup>9,10)</sup>. 이러한 遠志의 효능과 작용기전에 대한 연구들은 주로 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)과 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)의 신경퇴행성 뇌질환에 대한 작용을 기본으로 하여 수행되었으며<sup>11)</sup>, 인지장애를 수반하는 원인 질병 중 하나인 혈관성 치매 (Vascular dementia, VaD)에 대한 연구들은 찾아보기 어렵다.

혈관성 치매는 뇌혈관 질환에 의해 뇌조직이 손상되어 치매가 유발되는 상태로, 뇌졸중 이후 다발성 뇌경색으로 인지장애가 유발되므로 다경색 치매 (multiinfarct dementia)라고도 불렀다<sup>12)</sup>. 그러나 다발성 뇌경색뿐만 아니라 인지기능과 관련된 뇌 부위의 단일 뇌경색, 다발성 열공, 피질하 소혈관 질환, 여러 형태의 뇌출혈 등도 치매를 초래할 수 있다는 사실이 알려지면서 다양한 뇌혈관 질환에 의해 초래되는 치매를 모두 포함하는 개념으로 확장되었다<sup>13)</sup>. 최근에는 명확한 치매뿐만 아니라 준임상적 (subclinical) 경미한 인지기능 저하까지를 포함하여 비정상적인 뇌혈류 저하에 의한 인지장애를 혈관성 인지장애 (vascular cognitive impairment, VCI)로 정의하고 있다<sup>14)</sup>.

그러므로 본 연구에서는, 급성적인 뇌손상을 유발할 정도로 뇌혈류를 저하시키지 않으면서 수 주 이내에 뇌혈류가 정상으로 회복되지도 않는 만성적인 뇌혈류 저하 상태를 유발하는 양측 총경동맥의 영구폐쇄 (permanent bilateral common carotid artery occlusion, pBCAO) 방법으로 인지장애를 유발하고<sup>15)</sup>, 4주 후부터 遠志의 물추출물을 4주간 경구투여한 다음 Morris water maze를 사용하여 학습과 기억의 행동측정을 실시하였다. 또한 인지장애 유발에 밀접한 관련이 있는 A $\beta$  생성과 amyloid precursor protein (APP) 및  $\beta$ -site APP-converting enzyme 1 (BACE1) 발현에 대한 영향을 관찰한바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Seoul, Korea)에서 구입한 280-300 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 경희대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험에 사용한 흰쥐는 온도 (21-23 °C), 습도 (40-60%)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 제조 및 투여

본 실험에 사용한 遠志 (the root of *Polygala tenuifolia* Willd., Polygalaceae; POL)는 (주)허브메디에서 구입하였다. 遠志 200 g에 2,500 ml의 물을 가하여 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하여 39.0 g의 추출물을 얻었다. 수율은 19.5% 이었으며, 사람 체중비례 투여량의 10배인 130 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하여 1일 1회 4주 동안 (총 28일간) 경구투여 하였다.

### 3. 실험군의 구분

실험동물을 무작위로 4개 군으로 구분하였다. 대조군 (Control)의 실험동물에는 양측 총경동맥의 영구 폐쇄 (permanent bilateral common carotid artery occlusion, pBCAO)를 실시하였고, Sham군 (Sham)은 대조군과 같이 pBCAO를 실시하기 위한 준비수술은 하였으나 pBCAO는 실시하지 않은 군으로 하였다. 遠志추출물 투여군 (POL)은 대조군과 같이 pBCAO를 실시하고, 4주 후부터 4주 동안 (pBCAO 실시 후 5-8주, 총 28일간) 遠志추출물을 경구투여한 실험동물로 구성하였다. 정상군은 pBCAO 및 약물투여 등 아무런 처치를 않은 군으로 실험 지표들의 기준으로 삼았으며 실험결과를 제시하지는 않았다. 실험동물은 각 군 당 12마리씩, 총 48마리를 사용하였다.

### 4. 양측 총경동맥의 영구 폐쇄

만성적인 뇌혈류 저하에 의한 혈관성 치매 상태를 유발하기 위해 Farkas 등의 방법<sup>15)</sup>에 따라 pBCAO를 실시하였다. 실험동물을 10 mg/kg의 tiletamine과 zolazepam (50:50; Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France) 복강주사로 마취하였으며, 수술 동안 Electronic Temperature Controller (CMA150, CMA, Sweden)를 사용하여 정상체온 (37±0.5 °C)을 유지하였고, 추가적인 마취가 필요할 시 1.0% isoflurane (with 70% N<sub>2</sub>O + 30% O<sub>2</sub> gas)의 흡입마취를 실시하였다. 전경부 피부를 절개하고 주위 혈관 및 신경들의 손상없이 총경동맥을 분리하여 5-0 굵기의 수술실로 고리를 만든 다음 자연적으로 풀리지 않도록 2차례 이상 완전하게 결찰하였다. 이후 전경부 근육과 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였으며, 마취에서 깨어난 후 신경학적 이상 행동을 보이는 실험동물은 실험에서 제외하였다.

### 5. Morris 수중미로에 의한 학습 훈련

Morris 수중미로 실험은 pBCAO 실시 후 9주째에 4일간 실시하였으며, 첫 3일간은 학습 훈련을, 4일째에는 공간기억력 측정을 실시하였다. Morris 수중미로 실험장치는 원형 수조와 도피대 및 computerized video-tracking system (Panlab, Cornella, Spain)으로 구성되었다. 수조는 직경 190 cm, 높이 40 cm인 원통형 플라스틱으로 만들어졌으며, 도피대는 직경 15 cm, 높이 27 cm의 원통형으로 백색 아크릴로 만들었다. Video tracker는 수조 위 2.4 m에 설치된 CCD카메라와 컴퓨터로 구성되었으며, 실험동물의 행동 추적 및 분석은 SMART software (ver. 2.5; Panlab, Cornella,

Spain)를 사용하였다. 수조에는 온도가  $23 \pm 1$  °C 되는 물을 도피대가 1.0 cm 깊이로 잠기도록 28.0 cm 높이로 채웠으며, 1 kg의 탈지분유를 물에 풀어 도피대가 보이지 않도록 하였다. 수조의 주위에 각종 모형의 공간단서 (visual cue)들을 설치하였으며, 실험기간 동안 실험대, 컴퓨터, 의자 등 실험실 내 환경 및 실험자의 위치 또한 일정하게 유지하였다. 수중미로는 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)의 사분면으로 나누어 구분하였으며, 이중 남서(SW) 사분면의 중앙부에 도피대를 설치하였다(Fig. 1).

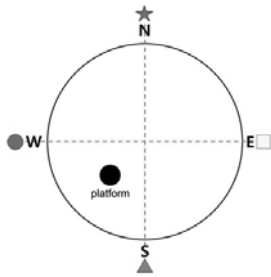


Fig. 1. Schematic diagram of platform position and quadrant in the swimming pool.

수중미로 학습훈련은 실험동물 당 1일 8회 3일간 동일한 시간대에 실시하였으며, 매 수영 때마다 수조의 정중앙에서부터 실험동물의 머리를 북(N)-동(E)-서(W)-남(S)-북(N)-동(E)-서(W)-남(S) 방향으로 향하게 한 상태로 수영을 시작하게 하였다. 실험동물이 수조 속에서 자유롭게 수영하면서 스스로 숨겨진 도피대를 찾아 올라가도록 하였으며, 스스로 도피대를 찾아낸 실험동물은 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였고 도피대에 도달한 시간을 기록하였다. 60초 이내에 도피대를 스스로 찾아내지 못한 실험동물은 실험자가 조심스럽게 도피대 쪽으로 유도한 다음 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였으며, 도피대에 도달한 시간은 60초로 기록하였다. Morris 수중미로 학습훈련의 결과는 1일 8회 시행의 평균값을 구하여 자료로 사용하였다.

### 6. Morris 수중미로에 의한 공간기억력 측정

Morris 수중미로 실험 4일째에 공간기억력 유지 검사를 실시하였다. 각 군의 실험동물들을 도피대가 제거된 동일한 수조에서 1회 60초간 자유롭게 수영하면서 도피대를 찾도록 하였으며, 그 수영 경로를 video tracker를 통해 궤적을 추적하여 컴퓨터 분석시스템에 저장하였다. 컴퓨터 분석시스템 상에서 60초 동안 각 사분면에서의 수영시간 (time spent in quadrant), 도피대 위치에서의 수영시간 비율 (% swim in target) 및 도피대가 위치한 사분면에서의 수영시간 비율 (% swim in target quadrant)을 분석하여 자료로 사용하였다. 이러한 분석과 계산에도 SMART software가 사용되었다.

### 7. 뇌조직의 처리

Morris 수중미로 실험이 끝난 후 각 군의 실험동물을 무작위로 6마리씩 나누어 6마리는 뇌조직의 ELISA assay와

Western blotting 실험용으로 6마리는 조직염색용으로 사용하였다. ELISA assay와 Western blotting 실험용 실험동물은 단두로 희생시키고 즉시 뇌를 적출한 다음 얼음 위에서 대뇌피질과 해마를 분리하여 dry ice-isopentane 용액으로 급속 동결시키고, 무게를 측정하여 기록한 후 측정 전까지 -80 °C에 보관하였다. 오른쪽 대뇌반구 부분은 ELISA, 왼쪽 대뇌반구 부분은 Western blotting에 각각 사용하였다. 조직염색용 실험동물은 Zoletil로 깊게 마취한 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 동안 post-fixation하고, sucrose 용액에 담겨 침전시킨 다음 뇌조직을 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30  $\mu$ m 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

### 8. $A\beta_{(1-40)}$ 과 $A\beta_{(1-42)}$ 의 ELISA 측정

분리된 대뇌피질과 해마 조직을 각각 약 5배의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.5% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣어 균질화하고 얼음 위에 3시간 이상 두어 차게 한 상태에서 상층액을 원심분리하여 측정 사용하였다.  $A\beta_{(1-40)}$ 의 측정은 Mouse/Rat Amyloid- $\beta_{(1-40)}$  High Special Assay kit (#27720, IBL, Japan),  $A\beta_{(1-42)}$ 의 측정은 Human/Rat  $\beta$ -Amyloid (1-42) High-Sensitive Assay kit (#292-64501, Wako, Japan)를 사용하였으며, 각 회사가 제공하는 측정방법 설명서에 따라 시행하였고, 각 표본마다 2회 반복 측정하였다.

### 9. Western blotting

분리된 대뇌피질과 해마 조직을 각각 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣어 균질화하고 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50  $\mu$ g의 단백질을 포함한 표본을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, Western blotting을 시행하였다. 1차항체는 mouse anti-APP antibody (MAB34, Millipore, USA)와 rabbit anti-BACE-1 antibody (ab2077, Abcam, UK) 및 mouse anti- $\beta$ -actin antibody (MAB1501, Millipore, USA)를 사용하였다.

### 10. 뇌조직의 염색

#### 1) Congo red 염색

$A\beta$  침착을 관찰하기 위해, 조직표본을 PBS에 2회 씻은 후 젤라틴 코팅된 슬라이드에 붙여 24시간 동안 실온에서 말린 다음 Congo red solution (0.5% in 50% ethanol)에서 20 분간 염색하고 흐르는 물에서 수세하였다. 발색 조절을 위해 alkaline alcohol solution (1% in 50% ethanol)을 사용하였으며, 이후 수세하고 탈수, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

## 2) A $\beta$ , APP 및 BACE-1의 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 후, mouse anti-A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> (1:200, MAB8768, Millipore), mouse anti-APP (1:200, MAB348, Millipore, USA) 및 rabbit anti-BACE-1 (1:200, ab2077, Abcam, UK)을 1차항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 °C에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다. APP와 BACE-1의 이중면역형광염색을 위해서는 각각의 1차항체에 반응시키고, 2차항체로 Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA)와 Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA)를 사용하였다.

## 11. 뇌조직의 관찰

각각 염색된 뇌조직을 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 영상을 저장하고, ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여 해마의 CA1과 치아이랑 (dentate gyrus, DG) 부위에서 면역염색 발현의 강도를 측정하였다. 각 실험동물당 4장의 조직표본, 각 조직표본 당 4개의 시야에서 측정하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다. 이중면역형광염색된 APP와 BACE-1은 공초점현미경 (LSM 510 META laser-scanning microscope, Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 관찰하였다.

## 12. 통계처리

본 논문에 제시된 자료들은 Mean±Standard error로 표시되었으며, 자료의 두 군 사이 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test를, 전체는 one-way ANOVA를 사용하여 *p*<0.05 이상의 유의수준으로 검정하였다.

# 결 과

## 1. 도피대 회피시간의 변화

1일 8회 3일간의 수중미로 학습 훈련에서 도피대를 찾아 오르기까지의 평균 회피시간 (escape latency)을 측정한 결과, Sham군은 1일차에 31.3±4.4 초, 2일차에 21.7±3.5 초, 3일차에 13.0±2.6 초로 점차 감소하였다. Control군은 1일차에 40.5±4.8 초, 2일차에 32.7±3.6 초, 3일차에 26.6±4.0 초로 점차 감소하였으나, Sham군에 비해 2일차에 *p*<0.05, 3일차에 *p*<0.01의 유의성 있는 회피시간의 연장을 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은 1일차에

36.9±5.1 초, 2일차에 24.2±4.6 초, 3일차에 17.9±2.8 초로 Control군에 비해 회피시간의 단축되기는 하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

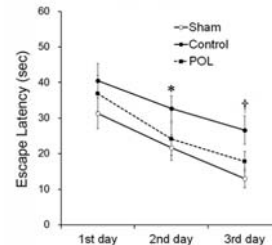


Fig. 2. Effect of Polygalae Radix (POL) on escape latency in the acquisition training trials. POL treatment shortened the average escape latency, but not significant statistically compared to the Control group. Data are represented by mean±SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (\*, *p*<0.05; †, *p*<0.01) or between Control and POL groups.

## 2. 수중미로 사분면별 수영시간의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영을 하는 동안 도피대 위치를 중심으로 각 사분면별 수영시간을 측정한 결과, Sham군은 SW사분면에서 37.2±1.5 초, SE사분면에서 8.3±1.7 초, NW사분면에서 11.5±3.0 초 및 NE사분면에서 3.0±1.2 초를 수영하였으며, Control군은 각각 26.6±1.7 초, 15.0±1.7 초, 11.3±1.7 초 및 7.2±1.3 초로 Sham군에 비해 SW사분면에서의 수영시간이 유의성 (*p*<0.001) 있게 감소하였으며, SE사분면과 NE사분면에서의 수영시간은 유의성 (*p*<0.05) 있게 증가하였다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은 각각 32.3±1.7 초, 14.2±1.8 초, 10.1±2.0 초 및 3.4±0.7 초로 Control군에 비해 SW사분면에서의 수영시간이 유의성 (*p*<0.05) 있게 증가하였으며, NE사분면에서의 수영시간은 유의성 (*p*<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 3).

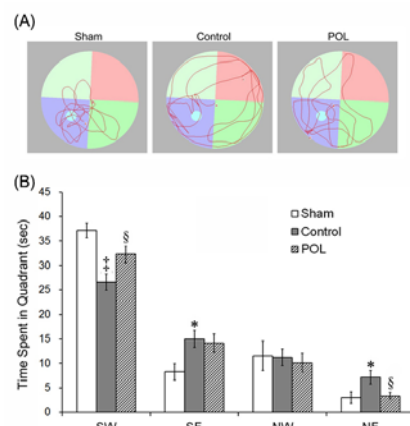


Fig. 3. (A) Representative swimming tracks in the retention test of the Sham, Control, and POL groups. (B) Effect of Polygalae Radix (POL) on the time spent in discrete quadrants. POL treatment significantly prolonged the swimming time spent in the SW quadrant, while the time spent in the NE quadrant was significantly shortened compared to the Control group. Data are represented by mean±SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (\*, *p*<0.05; †, *p*<0.001) or between Control and POL groups (§, *p*<0.05).

### 3. 도피대 위치 및 도피대 사분면에서 수영시간 비율의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영하는 동안 도피대 위치에서 수영한 시간비율을 측정된 결과, Sham군은  $4.2 \pm 0.7$  %였고, Control군은  $2.2 \pm 0.4$  %로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였으며, 遠志를 투여한 POL군은  $3.7 \pm 0.6$  %로 증가하였으나 Control군에 비해 유의성은 없었다 (Fig. 4). 도피대가 위치한 사분면에서 수영한 시간비율은 Sham군은  $62.0 \pm 3.7$  %였고 Control군은  $44.3 \pm 2.8$  %로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $53.8 \pm 2.9$  %로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 4).

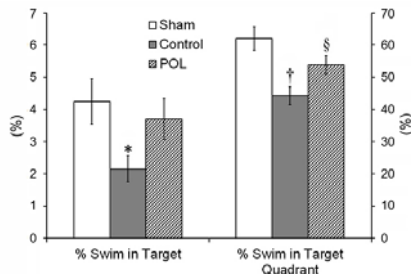


Fig. 4. Effects of Polygalae Radix (POL) on the % swim in the target and in the target quadrant. POL treatment significantly prolonged the % swim in the target quadrant compared to the Control group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ) or between Control and POL groups (§,  $p < 0.05$ ).

### 4. 뇌조직의 $A\beta_{(1-40)}$ 및 $A\beta_{(1-42)}$ 발현 농도의 변화

대뇌피질과 해마 조직에서  $A\beta_{(1-40)}$  발현 농도를 측정된 결과, 대뇌피질에서 Sham군은  $394.8 \pm 41.4$  pmol/g tissue 이었고 Control군은  $617.2 \pm 27.9$  pmol/g tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $512.9 \pm 38.2$  pmol/g tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게  $A\beta_{(1-40)}$  발현 농도가 억제되었다. 해마 조직에서 Sham군은  $566.7 \pm 59.5$  pmol/g tissue 이었고 Control군은  $818.4 \pm 39.4$  pmol/g tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $730.1 \pm 55.3$  pmol/g tissue로 Control군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5A).

$A\beta_{(1-42)}$  발현 농도는 대뇌피질에서 Sham군은  $17.7 \pm 0.6$  pmol/g tissue 이었고 Control군은  $46.3 \pm 5.2$  pmol/g tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $31.4 \pm 3.8$  pmol/g tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게  $A\beta_{(1-42)}$  발현 농도가 억제되었다. 해마 조직에서 Sham군은  $19.2 \pm 1.4$  pmol/g tissue 이었고 Control군은  $51.6 \pm 4.2$  pmol/g tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $38.9 \pm 3.7$  pmol/g tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게  $A\beta_{(1-42)}$  발현 농도가 억제되었다(Fig. 5B).

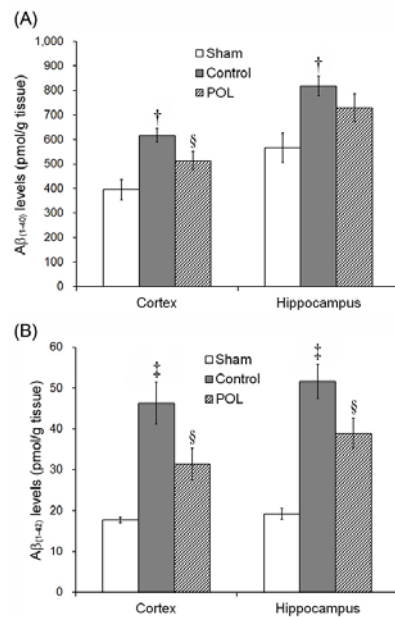


Fig. 5. Effect of Polygalae Radix (POL) on  $A\beta_{(1-40)}$  levels (A) and  $A\beta_{(1-42)}$  levels (B) in the cerebral cortex and the hippocampus. POL treatment significantly attenuated the increase of  $A\beta_{(1-40)}$  and  $A\beta_{(1-42)}$  levels generation in the cerebral cortex compared to the Control group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†,  $p < 0.01$ ; ‡,  $p < 0.001$ ) or between Control and POL groups (§,  $p < 0.05$ ).

### 5. 해마 CA1에서 $A\beta$ 발현의 변화

해마 CA1에서  $A\beta$  발현을 면역조직화학염색의 발현 강도 측정으로 관찰한 결과, Sham군은  $89.3 \pm 2.8$  이었고 Control군은  $122.1 \pm 8.0$ 으로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은  $93.0 \pm 7.3$ 으로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게  $A\beta$  발현이 억제된 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

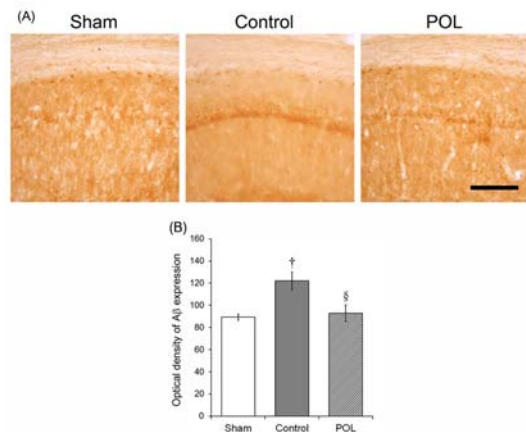


Fig. 6. (A) Representative photographs of the  $A\beta$  expression in the CA1 hippocampus of the Sham, Control, and POL groups. Scale bar is 200  $\mu$ m. (B) Effect of Polygalae Radix (POL) on the  $A\beta$  expression in the CA1 of hippocampus. POL treatment significantly attenuated the increase of  $A\beta$  expression in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†,  $p < 0.01$ ) or between Control and POL groups (§,  $p < 0.05$ ).



## 6. 해마 조직 Congo red 염색 강도의 변화

해마 조직에서 A $\beta$  축적을 Congo red에 대한 염색의 강도 측정으로 관찰한 결과, CA1에서 Sham군은 95.9 $\pm$ 1.6 이었고 Control군은 133.7 $\pm$ 3.2로 Sham군에 비해 유의성 ( $p<0.001$ ) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 遠志를 투여한 POL군은 103.9 $\pm$ 9.3으로 Control군에 비해 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 Congo red 염색 강도가 억제되었다. DG 구역에서 Sham군은 116.7 $\pm$ 3.5 이었고 Control군은 124.8 $\pm$ 3.9로 Sham군에 비해 변화가 없었으며, 遠志를 투여한 POL군은 113.5 $\pm$ 8.5로 역시 Control군에 비해 변화가 없었다(Fig. 7).

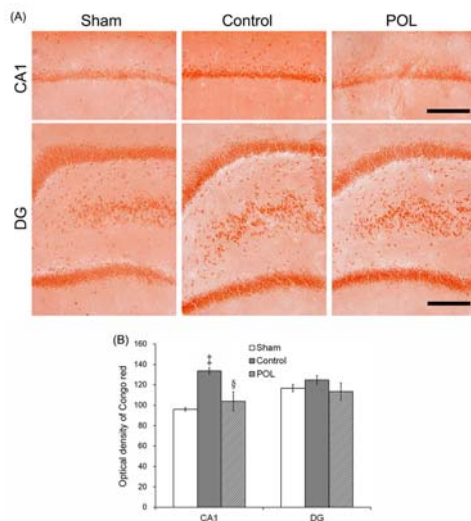


Fig. 7. (A) Representative photographs of the Congo red-stained hippocampus of the Sham, Control, and POL groups. Scale bars in CA1 and DG sections are 200  $\mu$ m. (B) Effect of Polygalae Radix (POL) on A $\beta$  accumulation in the hippocampus stained with Congo red. POL treatment significantly attenuated the increase of Congo red density in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups ( $\ddagger$ ,  $p<0.001$ ) or between Control and POL groups ( $\S$ ,  $p<0.05$ ).

## 7. 해마에서 APP 발현의 변화

해마 조직에서 APP 단백질 발현을 측정한 결과, Sham군의 100 %에 대해 Control군은 183.7 $\pm$ 7.4 %로 유의성 ( $p<0.001$ ) 있는 증가를 나타내었으며, 遠志를 투여한 POL군은 154.7 $\pm$ 7.1 %로 Control군에 비해 유의성 ( $p<0.05$ ) 있는 APP 발현의 억제가 관찰되었다 (Fig. 12). APP 발현을 면역조직화학염색의 발현 강도 측정으로 관찰한 결과, Sham군은 75.7 $\pm$ 6.9 이었고 Control군은 114.1 $\pm$ 21.3으로 Sham군에 비해 증가하였으나 유의성을 없었다. 遠志를 투여한 POL군은 100.7 $\pm$ 16.1로 Control군에 비해 감소하였으나 유의성은 없어 Sham군, Control군 및 POL군 사이에 유의한 변화가 없었다(Fig. 8, 9).

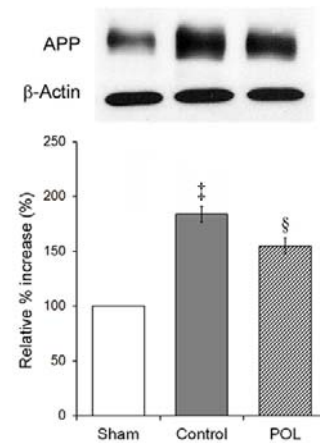


Fig. 8. Effect of Polygalae Radix (POL) on APP protein expression in the hippocampus. POL treatment significantly attenuated the increase of APP expression in the hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups ( $\ddagger$ ,  $p<0.001$ ) or between Control and POL groups ( $\S$ ,  $p<0.05$ ).

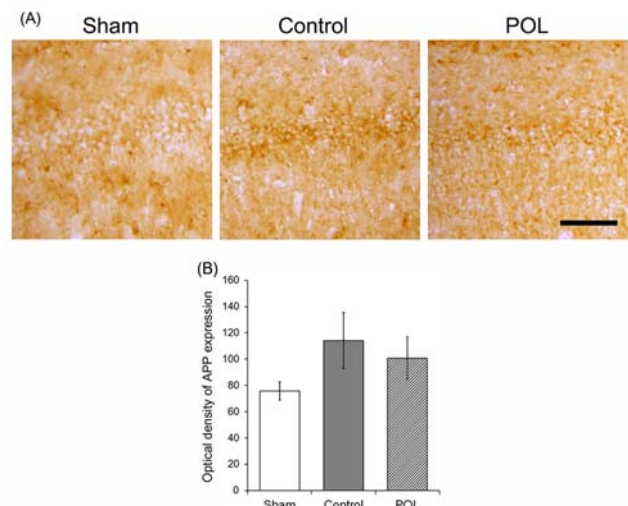


Fig. 9. (A) Representative photographs of the APP expression in the hippocampus of the Sham, Control, and POL groups. Scale bar is 200  $\mu$ m. (B) Effect of Polygalae Radix (POL) on APP expression in the CA1 of hippocampus. There was no differences statistically among Sham, Control, and POL groups. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups.

## 8. 해마에서 BACE1 발현의 변화

해마 조직에서 BACE1 단백질 발현을 측정한 결과, Sham군의 100 %에 대해 Control군은 179.0 $\pm$ 21.2 %로 유의성 ( $p<0.01$ ) 있는 증가를 나타내었으며, 遠志를 투여한 POL군은 127.9 $\pm$ 8.1 %로 Control군에 비해 유의성 ( $p<0.05$ ) 있는 BACE1 발현의 억제가 관찰되었다. BACE1 발현을 면역조직화학염색의 발현 강도 측정으로 관찰한 결과, CA1에서 Sham군은 68.0 $\pm$ 6.9 이었고 Control군은 115.9 $\pm$ 9.1로 Sham군에 비해 유의성 ( $p<0.01$ ) 있는 증가를 나타내었으며, 遠志를 투여한 POL군은 89.2 $\pm$ 6.3으로 Control군에 비해 유의성

( $p < 0.05$ ) 있게 BACE1 발현이 억제된 것으로 관찰되었다. DG 구역에서 Sham군은  $90.1 \pm 6.5$  이었고 Control군은  $118.3 \pm 9.3$ 으로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 나타내었으며, 遠志를 투여한 POL군은  $101.3 \pm 7.2$ 로 Control군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 10, 11). 또한 해마에서 BACE1 발현과 APP 발현을 이중면역형광염색으로 관찰한 바 BACE1 발현과 APP 발현이 CA1의 pyramidal cell layer에서 일치하는 것으로 관찰되었다(Fig. 12).

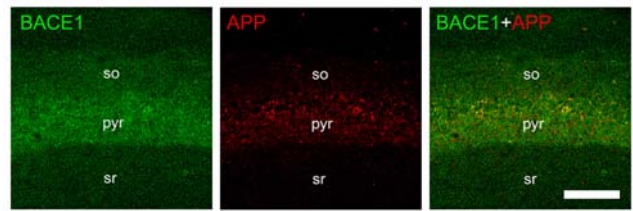


Fig. 12. Representative photographs of double-immunofluorescent labeling of BACE1 and APP in the hippocampus. The BACE1 expression was coincided with APP expression in the pyramidal cell layer of CA1 (so = stratum oriens; pyr = pyramidal cell layer; sr = stratum radiatum). Scale bar is 100  $\mu$ m.

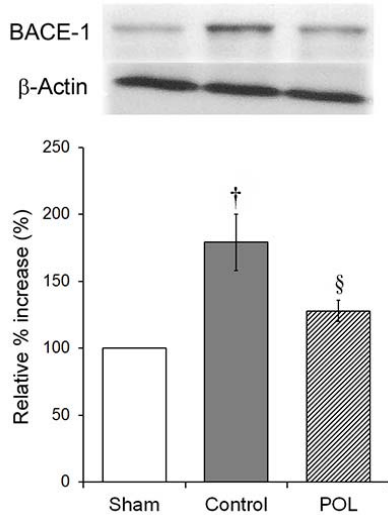


Fig. 10. Effect of Polygalae Radix (POL) on BACE1 protein expression in the hippocampus. POL treatment significantly attenuated the increase of BACE1 expression in the hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups ( $\dagger$ ,  $p < 0.01$ ) or between Control and POL groups ( $\S$ ,  $p < 0.05$ ).

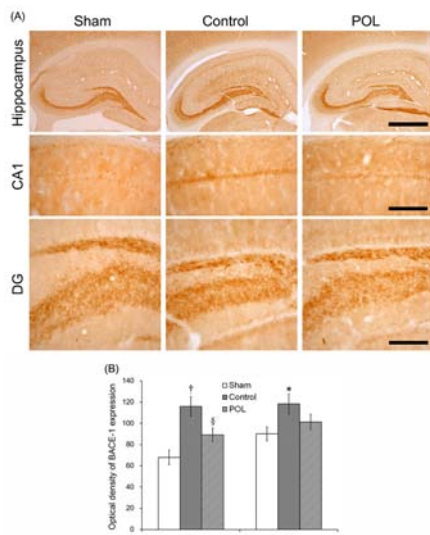


Fig. 11. (A) Representative photographs of BACE1 expression in the hippocampus of the Sham, Control, and POL groups. Scale bar in Hippocampus section is 1.0 mm, and scale bars in CA1 and DG sections are 200  $\mu$ m. (B) Effect of Polygalae Radix (POL) on BACE1 expression in the hippocampus. POL treatment significantly attenuated the increase of BACE1 expression in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (\*,  $p < 0.05$ ;  $\dagger$ ,  $p < 0.01$ ) or between Control and POL groups ( $\S$ ,  $p < 0.05$ ).

## 고찰

遠志는  $A\beta_{(25-35)}$ 의 뇌실 주입과 scopolamine 투여 등의 실험모형에서 학습 및 기억 장애를 개선하는 효능이 보고된바 있다<sup>8-10</sup>. 본 연구에서는 혈관성 치매에 대한 遠志의 효능을 관찰하고자 하였다. 혈관성 치매를 유발하기 위해 흰쥐에서 pBCAO 방법으로 만성적인 뇌혈류 저하를 유발하였다. 흰쥐에서 pBCAO 방법으로 만성적인 뇌혈류 저하를 유발하면 혈관성 치매와 유사한 점진적이며 장기간 지속적인 인지장애와 함께 신경세포 및 백색질 손상을 초래한다<sup>15</sup>. 그러므로 pBCAO는 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 뇌조직의 생리병리적 변화를 연구하는데 많이 이용되고 있으며, 혈관성 치매에 대한 치료 약물의 개발에도 유용하게 사용되고 있다<sup>16</sup>.

흰쥐에 대한 pBCAO는 대뇌피질에서 정상 뇌혈류의 약 35-45% 수준으로 저하시키고, 해마에서도 약 60% 수준으로 감소시킨다고 하였다<sup>17,18</sup>. 이러한 뇌혈류의 저하는 pBCAO 약 1주일 후부터 점차적인 개선이 이루어지지만 약 4주 이후에도 뇌혈류가 정상에 비해 유의하게 저하된 상태를 유지한다<sup>18</sup>. 그러므로 pBCAO 이후 인지장애가 나타나는 양상은 pBCAO 직후 갑작스러운 뇌혈류량의 저하로 인해 일시적이고 심한 인지장애가 급성적으로 나타나고, 약 4주 이후부터 명확한 학습 및 기억 장애가 나타난다고 하였다<sup>19,20</sup>. 또한 pBCAO는 운동 기능의 장애는 유발하지 않으며<sup>21</sup>, Morris water maze에서 도피대로의 회피시간을 연장시키고, 8-arm radial maze에서 실패율을 증가시킨다고 하였다<sup>22</sup>. 이러한 보고들에 근거하여 본 연구에서는 흰쥐에 pBCAO를 유발시키고 4주가 지난 다음부터 4주간 遠志를 투여하고 5주째 (pBCAO 이후 9주째)에 Morris water maze를 이용한 학습 및 기억 행동을 측정하였다. 그 결과, 1일 8회 3일간의 학습 훈련에서 도피대를 찾아 오르기까지의 회피시간이 pBCAO의 대조군에 비해 遠志 투여군이 단축되기는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과는, 본 실험에서 遠志가 기억행동 측정 및 해마 조직의 BACE1 단백질 발현 증가에 대해 일정한 효능을 발휘하는 것을 감안하면, 학습훈련 기간이 충분하게 길지 못한 것에 의한 결과로 판단되며, 遠志의 학습능력 개선 효능을 확인하기 위해서는 약물투여 기간, 실험동물 개체 수, 학습 훈련 기간 등을 감안한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Morris water maze 실험 4일째 기억행동 측정에서 遠志 투여군은 대조군에 비해 도피대가 위치한 사분면에서의 수영 시간이 유의하게 증가하고, 도피대에서 먼 사분면에서의 수영 시간은 유의하게 감소하였다. 또한 도피대 위치 사분면에서의

수영 시간비를 역시 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 3일간의 훈련에 의해 학습된 도피대의 위치를 대조군에 비해 遠志투여군이 더 잘 기억하고 있다는 것을 보여주는 것이다. 遠志는  $A\beta_{(25-35)}$ 의 뇌실 주입과 Morris water maze를 사용한 연구를 통해 공간 기억력 개선 효능이 보고된 바 있고<sup>8)</sup>, 아세틸콜린수용체 길항제인 scopolamine 투여와 8-arm radial maze를 사용한 연구에서 遠志는 AChE 활성을 억제하고 단기기억을 개선하는 효능이 관찰되었으며<sup>9)</sup>, step-through passive avoidance test의 회피시간을 연장시키는 효능이 있다고 보고되었다<sup>10)</sup>. 또한 遠志의 주요 활성 성분인 tenuigenin, tenuifolin, sinapic acid, onjisaponin 등은 신경세포 손상을 억제하고 신경세포 분화와 신경섬유 성장을 촉진하며 dopamine과 norepinephrine을 증가시키고 AChE 활성을 억제한다고 하였다<sup>23)</sup>. 이러한 이전의 연구보고들과 함께 살펴보면 遠志가 다양한 조건에서 기억 장애를 개선하는 효능이 있음을 알 수 있다.

遠志와 tenuifolin, tenuigenin 등 遠志의 유효성분들이  $A\beta$ 에 의한 세포독성과 인지장애에 미치는 영향이 연구 보고된 바는 있지만<sup>6,8,24,25)</sup>, 遠志가  $A\beta$  생성에 미치는 영향을 *in vivo*에서 연구한 보고는 아직까지 없었다. 그러므로 본 연구에서는 만성적인 뇌혈류 저하 쥐의 뇌조직에서 遠志가  $A\beta$  생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

비정상적인  $A\beta$ 의 축적은 알츠하이머병의 주요 인자이고, 기억과 인지 장애를 초래하는데 밀접히 관련되어 있다<sup>26)</sup>.  $A\beta$ 가 신경세포 외부에 amyloid plaque를 형성하여 기억과 인지 기능에 관여하는 대뇌피질이나 해마의 신경세포를 감소시키기 때문이다<sup>27)</sup>.  $A\beta$ 는 APP의 단백질 가수분해 분할에 의해 생성된다. APP가  $\beta$ -secretase에 의해 분할되면 N-terminal-soluble APP ( $\beta$ -APP) 조각이 만들어지고, 이어서  $\gamma$ -secretase에 의해 C-terminal이 분할되어  $A\beta$ 가 만들어진다<sup>28)</sup>.  $A\beta$ 는 C-terminal의 길이에 따라  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  두 종류가 존재하며,  $A\beta$ 의 약 90%가  $A\beta_{(1-40)}$ 이고 약 10%가  $A\beta_{(1-42)}$ 이다<sup>29)</sup>. 둘 중  $A\beta_{(1-42)}$ 가 보다 더 쉽게 fibril을 형성하고 영기는 성질이 있어, 초기에 침착되어 amyloid plaque 형성을 유발하게 된다<sup>30,31)</sup>. 한편으로 뇌혈액은 저하된 뇌혈류로 인하여 생성된  $A\beta$ 의 제거에 장애가 발생하므로  $A\beta$  침착을 촉진하게 된다고 하였고<sup>32)</sup>, 또한 뇌혈액은  $\beta$ -secretase 발현과 활성을 증가시켜 APP로부터  $A\beta$  생성을 촉진한다고 하였다<sup>33,34)</sup>. 사실 임상적으로도 뇌혈관 질환으로 뇌혈류가 저하된 환자와 혈관성 인지장애 환자의 뇌조직에서  $A\beta$  농도와 amyloid plaque 형성이 증가되어 있다<sup>35)</sup>. 그러므로 만성적인 뇌혈류 저하는  $A\beta$ 의 생성 촉진과  $A\beta$ 의 제거 장애에 의해 뇌조직에  $A\beta$  침착과 amyloid plaque 형성을 촉진하게 된다.

본 연구에서 대뇌피질과 해마 조직에서  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  발현 농도를 ELISA로 측정한 결과, pBCAO의 대조군에 비해 遠志투여군은 대뇌피질에서는  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  발현 농도를 유의성 있게 억제하였으며, 해마 조직에서도  $A\beta_{(1-42)}$  발현 농도가 유의성 있게 억제되었다. 또한 해마 CA1에서  $A\beta$ 를 면역조직화학염색으로 관찰한 결과에서도 遠志는  $A\beta$  발현 강도를 유의하게 억제하였다. 이렇게 遠志가 뇌조직의  $A\beta$  농도를 억제한 것은, 실험동물의 양측 총경동맥이 영구적으로 폐쇄되어 있는 상태이므로, 遠志가 생성된  $A\beta$  제거를 개선하기 보다는  $A\beta$  생성을 억제하는 작용에 의해  $A\beta$  농도를 억제한 것

으로 추측된다.

한편으로, 생성된  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$ 는 모두 fibril을 형성하고 응집되어 불용해성의 amyloid plaque를 형성한다. 오랫동안 이 불용해성의 amyloid plaque가 병리적 기전을 유발한다고 알려져 있었다<sup>36)</sup>. 최근 연구에 의하면 용해성의 소중합응집체 (oligomeric aggregates)들 역시 신경세포의 사망과 인지장애를 유발하는 병리적 기전에 관여하고 있다는 것이 밝혀졌다<sup>37)</sup>. 이러한  $A\beta$ 의 fibril 형성과 응집을 관찰하는 방법으로 가장 많이 사용되는 것이 Congo red와 thioflavin T 염색이다<sup>38)</sup>. 본 연구에서는 해마 조직을 Congo red로 염색하여  $A\beta$  응집을 관찰한 결과, 遠志는 해마 CA1의 Congo red 염색 강도를 유의하게 억제하였다. 이러한 결과 역시 遠志가  $A\beta$  생성을 억제하였다는 것을 보여주는 결과이다.

遠志가 본 연구에서 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 기억 장애를 개선하고  $A\beta$  생성을 억제하는 작용을 보여주었으므로, 遠志가  $A\beta$  생성 기전에 미치는 영향을 관찰하기 위해 해마 조직에서 APP 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, Western blotting 측정에서는 pBCAO의 대조군은 Sham군에 비해 APP 발현이 유의하게 증가하고, 遠志투여군은 대조군에 비해 유의한 APP 발현 억제를 나타내었다. 그러나 면역조직화학염색의 결과는 Sham군, pBCAO의 대조군 및 遠志투여군 각 군 간에 유의한 차이가 없었다. 遠志가 APP의 Western blotting 측정에서는 유의한 결과를 나타내었지만 면역조직화학염색 결과에서는 유의한 결과를 나타내지 못한 것은 APP에 대한 정량적 변화가 크지 않으므로 조직의 영상 분석기법 상 그 변화가 반영되지 못한 것으로 판단된다. 이전의 연구에서는 pBCAO 이후 8주에 ELISA, Western blotting 및 RT-PCR로 측정한 APP의 단백질 및 mRNA 발현 모두가 유의한 변화가 없었다고 보고된 바 있다<sup>39)</sup>. 이러한 연구보고와 APP는  $A\beta$  생성의 전구물질이지만 그 자체로는 신경독성 (neurotoxicity)을 가지고 있지 않으며, 오히려 APP는 신경세포의 생존을 강화하고, 신경돌기의 생성과 시냅스 형성을 촉진하는 작용을 가지고 있는 것을 고려한다면<sup>40)</sup>, APP 발현에 대한 遠志의 영향을 확정하기에는 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

BACE1은 APP를 분할하는  $\beta$ -secretase의 일종이며,  $\beta$ -secretase의 활성은 BACE1 단백질 발현과 일치한다<sup>41)</sup>. 알츠하이머병변이 유발된 뇌조직에는 BACE1 발현이 증가되어 있고, 과도한 BACE1 발현은 알츠하이머병변을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>. 또한 뇌혈류 저하에 의한 저산소 상태는 BACE1 발현을 증가시키고, 그 결과  $A\beta$  생성이 촉진된다고 하였다<sup>43)</sup>. 그러므로 遠志가 해마 조직에서 BACE1 발현에 미치는 영향을 Western blotting과 면역조직화학염색으로 관찰하였다. 그 결과, pBCAO의 대조군은 해마 조직에서 BACE1 발현이 유의하게 증가되었고, 遠志투여군은 해마 조직의 BACE1 단백질 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, 면역조직화학염색에서도 해마의 CA1에서 BACE1 발현의 유의한 억제를 나타내었다. 또한 BACE1과 APP의 이중면역형광염색에서 BACE1의 발현이 APP가 과발현된 해마 CA1의 pyramidal cell layer에서 일치하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 遠志가 APP 발현에 미치는 영향은 명확하지 않으나 기억 형성과 관련된 해마의 CA1에서 遠志가 BACE1 발현을 억제하고  $A\beta$  생성을 억제한 것을 보여주는 것이다.



본 연구의 결과들을 총괄하면, 遠志는 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 기억장애를 개선하고,  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  생성을 억제하였으며, 해마 CA1에서 BACE1 과발현을 억제하였다. 이는 遠志가 해마 조직에서  $\beta$ -secretase 활성을 억제하는 기전에 의해  $A\beta$  생성을 억제하였으며, 그 결과 기억장애를 개선하는 효능을 나타낸 것으로 설명할 수 있다.

## 결론

遠志가 인지장애에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에서 양측 총경동맥을 영구 폐쇄하는 방법으로 만성적인 뇌혈류 저하를 유발하고 4주 후부터 遠志추출물을 4주간 경구투여한 다음 Morris water maze를 사용하여 학습 훈련과 기억 행동을 측정하였다. 또한 뇌조직에서  $A\beta$  생성에 미치는 영향을  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  발현,  $A\beta$  침착, APP 및 BACE1 발현을 ELISA, Western blotting 및 면역조직화학염색을 통해 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 遠志는 기억유지 측정에서 도피대 위치 사분면에서의 수영 시간을 유의성 있게 증가시키고, 도피대에서 먼 사분면에서의 수영 시간을 유의하게 단축시켰으며, 기억유지 측정에서 도피대 위치 사분면에서의 수영 시간 비율을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다. 그러나 遠志는 3일간의 학습훈련에서 도피대로의 회피시간을 유의하게 단축시키지 못하였다.
2. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 대뇌피질의  $A\beta_{(1-40)}$ 과  $A\beta_{(1-42)}$  과발현을 유의하게 억제하였으며, 해마 조직의  $A\beta_{(1-42)}$  과발현을 유의하게 억제하였다. 또한 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 CA1의  $A\beta$  발현 증가와 응집을 유의하게 억제하였다.
3. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 조직의 APP 과발현을 억제하였다.
4. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 조직의 BACE1 과발현을 유의하게 억제하였다.

이러한 결과들은 遠志가 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 기억장애를 개선하고  $A\beta$  생성과 BACE1 과발현을 억제하는 작용이 있음을 보여주는 것으로, 遠志는 해마 조직의  $\beta$ -secretase 활성을 억제하는 기전에 의해  $A\beta$  생성을 억제하고, 그 결과 기억장애를 개선하는 효능을 나타낸 것으로 설명할 수 있다. 그러므로 遠志는 만성적인 뇌혈류 저하로 유발되는 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 중추신경계질환에 효과적인 약물이 될 수 있음을 보여준다.

## References

1. Kim HC. Herbal Pharmacology. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 379-81.

2. Jesky R, Hailong C. Are herbal compounds the next frontier for alleviating learning and memory impairments? An integrative look at memory, dementia and the promising therapeutics of traditional chinese medicines. *Phytother Res.* 2011 ; 25(8) : 1105-18.

3. Cheong MH, Lee SR, Yoo HS, Jeong JW, Kim GY, Kim WJ, Jung IC, Choi YH. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 137(3) : 1402-8.

4. Kim HM, Lee EH, Na HJ, Lee SB, Shin TY, Lyu YS, Kim NS, Nomura S. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion from mouse astrocytes. *J Ethnopharmacol.* 1998 ; 61(3) : 201-8.

5. Lee HJ, Ban JY, Koh SB, Seong NS, Song KS, Bae KW, Seong YH. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. *Am J Chin Med.* 2004 ; 32(4) : 599-610.

6. Naito R, Tohda C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in A $\beta_{(25-35)}$ -treated cortical neurons. *Biol Pharm Bull.* 2006 ; 29(9) : 1892-6.

7. Choi JG, Kim HG, Kim MC, Yang WM, Huh Y, Kim SY, Oh MS. Polygalae radix inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 134(2) : 414-21.

8. Park EK, Shim ES, Jung HS, Sohn NW, Sohn YJ. Effects of Chongmyung-tang, Polygalae Radix and Acori Graminei Rhizoma on  $A\beta$  Toxicity and Memory Dysfunction in Mice. *Korean J Orient Int Med.* 2008 ; 29(3) : 608-20.

9. Sun XL, Ito H, Masuoka T, Kamei C, Hatano T. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30(9) : 1727-31.

10. Park CH, Choi SH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, Suh YH. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. *J Neurosci Res.* 2002 ; 70(3) : 484-92.

11. da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CA, Barreiro EJ, Viegas C Jr. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011 ; 10(2) : 251-70.

12. Pinkston JB, Alekseeva N, González Toledo E. Stroke and dementia. *Neurol Res.* 2009 ; 31(8) : 824-31.

13. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013 ; 80(4) : 844–66.
14. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, Powers WJ, DeCarli C, Merino JG, Kalra RN, Vinters HV, Holtzman DM, Rosenberg GA, Wallin A, Dichgans M, Marler JR, Leblanc GG. National institute of neurological disorders and stroke–canadian stroke network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke*. 2006 ; 37(9) : 2220–41.
15. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion–related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007 ; 54(1) : 162–80.
16. Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*. 2002 ; 203–204 : 263–6.
17. Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*. 1997 ; 79(4) : 1039–50.
18. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long–term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 ; 30(4) : 266–72.
19. Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late–emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*. 1996 ; 708(1–2) : 50–8.
20. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, Pappas BA. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport*. 1998 ; 9(1) : 161–6.
21. de Bortoli VC, Tangrossi Junior H, de Aguiar Correa FM, Almeida Sde S, de Oliveira AM. Inhibitory avoidance memory retention in the elevated T–maze is impaired after perivascular manipulation of the common carotid arteries. *Life Sci*. 2005 ; 76(18) : 2103–14.
22. Farkas E, Luiten PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2001 ; 64(6) : 575–611.
23. Lin Z1, Gu J, Xiu J, Mi T, Dong J, Tiwari JK. Traditional chinese medicine for senile dementia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012 ; 2012 : 692621–34. (doi: 10.1155/2012/692621)
24. Lv J, Jia H, Jiang Y, Ruan Y, Liu Z, Yue W, Beyreuther K, Tu P, Zhang D. Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid–beta secretion *in vitro*. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 ; 196(4) : 419–25.
25. Jia H, Jiang Y, Ruan Y, Zhang Y, Ma X, Zhang J, Beyreuther K, Tu P, Zhang D. Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta–protein in cultured cells. *Neurosci Lett*. 2004 ; 367(1) : 123–8.
26. Sisodia SS. Alzheimer' s disease: perspectives for the new millennium. *J Clin Invest*. 1999 ; 104(9) : 1169–70.
27. Hook V, Schechter I, Demuth HU, Hook G. Alternative pathways for production of beta–amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol Chem*. 2008 ; 389(8) : 993–1006.
28. Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of b–amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90(5) : 2092–6.
29. Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, Lieberburg I, Schenk DB. Secretion of b–amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the b–amyloid peptide. *Nature*. 1993 ; 361(6409) : 260–3.
30. Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one–dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*. 1993 ; 73(6) : 1055–8.
31. Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna–Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DMA, Tabaton M, Gambetti P. Presence of soluble amyloid bpeptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nat Med*. 1996 ; 2(1) : 93–5.
32. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV. LRP/amyloid beta–peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*. 2004 ; 43(3) : 333–44.
33. Wen Y, Onyewuchi O, Yang S, Liu R, Simpkins JW. Increased beta–secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res*. 2004 ; 1009(1–2) : 1–8.
34. Zhiyou C, Yong Y, Shanquan S, Jun Z, Liangguo H, Ling Y, Jieying L. Upregulation of BACE1 and beta–amyloid protein mediated by chronic cerebral hypoperfusion contributes to cognitive impairment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2009 ; 34(7) : 1226–35.
35. Lewis H, Beher D, Cookson N, Oakley A, Piggott

- M, Morris CM, Jaros E, Perry R, Ince P, Kenny RA, Ballard CG, Shearman MS, Kalaria RN. Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006 ; 32(2) : 103-18.
36. Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.* 2003 ; 26 : 267-98.
37. Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid  $\beta$ -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res.* 2008 ; 192(1) : 106-13.
38. Jameson LP, Smith NW, Dzyuba SV. Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid ( $\alpha\beta$ ) self-assembly. *ACS Chem Neurosci.* 2012 ; 3(11) : 807-19.
39. Zhiyou C, Yong Y, Shanquan S, Jun Z, Liangguo H, Ling Y, Jieying L. Upregulation of BACE1 and beta-amyloid protein mediated by chronic cerebral hypoperfusion contributes to cognitive impairment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2009 ; 34(7) : 1226-35.
40. Mattson MP. Cellular actions of b-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 1997 ; 77(4) : 1081-132.
41. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999 ; 286(5440) : 735-41.
42. Sun X, Tong Y, Qing H, Chen CH, Song W. Increased BACE1 maturation contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J.* 2006 ; 20(9) : 1361-8.
43. Sun X, He G, Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F, Staufenbiel M, Huang LE, Song W. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 ; 103(49) : 18727-32.