

생약복합물이 흰쥐의 체내에서 항산화 및 인지개선활성에 미치는 영향

†강진순

한국국제대학교 식품영양학과

Effect of Medicinal Herb Composites on Antioxidative and Cognition-Enhancing Activities in Rats

†Jin-Soon Kang

Dept. of Food & Nutrition, International University of Korea, Gyeongnam 660-759, Korea

Abstract

The purpose of this experiment was designed to investigate the effects of medicinal herbs (MH) extracts on dementia induced by trimethyltin chloride (TMT) in rats. Six-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups; normal group (group 1), control group (group 2), MH extracts group (250, 500 mg/kg) (group 3, group 4) and positive control group (tacrine group, group 5). In the control group to induce dementia, a 2.5 mg/kg of TMT intraperitoneal injection was used for 14 days (1 per day) in the rats. In the MH extracts group 250 mg/kg and 500 mg/kg of MH extracts were medicated in an oral inoculation for 20 days (1 per day). After 30 minutes, a 2.5 mg/kg of TMT intraperitoneal injection, which causes dementia, was used for 14 days (1 per day). In the positive control group (Tacrine group) 10 mg/kg of Tacrine, the dementia treatment, was medicated in an oral inoculation. After 30 minutes, 1 mg/kg of TMT intraperitoneal injection, which causes dementia, was used for 14 days (1 per day). The present author observed the passive avoidance performance test, and memory ability test (Y maze test), the values of MDA, acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain and antioxidant enzyme in serum. MH extracts significantly improved memory of AD model rats in the Y-maze test, and also significantly improved memory of AD model rats in the passive avoidance test. MH extracts significantly reduced AChE activity, and significantly increased the SOD level, but not catalase and MDA. From the results above, MH extracts is thought to be effective in the improvement of antioxidant enzymes and memory ability.

Key words: MH extracts, acetylcholinesterase, antioxidant enzyme, passive avoidance test

서론

최근 평균수명의 증가로 인한 고령화 현상이 뚜렷해지면서 노인성 질환 연구의 중요성이 강조되고 있다. 특히 노인성 질환 중 가장 큰 문제가 되는 것은 치매(dementia)이다. 치매는 뇌의 퇴행성 변화, 뇌혈관 장애, 뇌의 염증성장애, 대사성 질환, 내분비질환, 외상 및 중독 등에 의해 일어나는 인지능의 장애를 특징으로 하는 뇌증후군이다. 과거에는 노화에 따르는 생리적인 현상으로 보았으나, 현재에는 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 장애

를 일으키는 신경계의 질환으로 인식하고 있다. 이 중에서도 뇌의 퇴행성 변화에 의한 노인성 치매라고도 하는 Alzheimer's disease(AD)와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매(Vascular disease: VD), 그리고 양자가 혼재된 혼합형 치매로 구분되는데, 가장 문제가 되는 것은 Alzheimer's disease이다(Evans 등 1989). 치매는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 감소(Francis 등 1999, Kang 등 1999)와 신경세포사멸 등을 원인으로 보고 있으며(Silverberg 등 2004), 치매의 주 증상인 기억력 장애는 기억과 학습에 있어서 중요한 역할을 수행하는 cholinergic system의 심각한 손상에 의한 것으로 알려졌다(Park 등 1996).

† Corresponding author: Jin-Soon Kang, Dept. of Food & Nutrition, International University of Korea, Gyeongnam 660-759, Korea. Tel: +82-55-751-8314, Fax: +82-55-751-8329, E-mail: jskang-8075@hanmail.net

인체 내 전기적 신호를 전달하는 신경전달물질인 ACh의 향상이 AD에서 인지기능 개선에 도움이 된다고 알려지면서 cholinergic agonist나 acetylcholinesterase(AChE) inhibitor들을 통한 시냅스 사이트에서의 ACh 수준 증가에 대한 연구가 진행되고 있으며, 무스카린 수용체 저해제인 trimethyltin(TMT)이나 scopolamine과 같은 항콜린성 약품들에 의한 학습 및 기억력 등에 의한 인지적 결함을 가진 동물모델을 이용한 연구도 진행되고 있다(Chung 등 2001; Papandreou 등 2009). 이와 같이 현재까지 개발된 기억력 개선 약물들에는 무스카린성 ACh 수용체에 대한 효능제, ACh 생성촉진제, AChE 저해제 등 여러 가지 작용기전에 따라 ACh성 신경세포의 기능을 강화시켜 줄 수 있는 많은 약물들이 개발되어 왔으나, 효과가 일시적이고 미약하며, 심각한 부작용 및 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다(Fayuk & Yakel 2004). 치매가 만성 노인성 질환이라는 질병 특징에 따라 복용이 쉬워야 하고, 장기간 복용동안 부작용 없이 치료 가능해야 하며, 천연에서 손쉽게 얻을 수 있고, 음식물로도 섭취할 수 있다는 등의 여러 가지 장점으로 인하여 최근 천연 생약재를 이용하여 부작용이 적고, 효능이 좋은 기억력 개선 및 치매 치료제 연구가 활발히 진행되고 있다(Jung 등 2004, Kim 등 2002). 또한 노화 시에 보이는 인지기능의 손상은 노화과정에서 수반되는 지질과산화물의 축적이나 산화적 스트레스에 의해 일어나며, 이것은 생체기능을 감소할 뿐만 아니라, 알츠하이머, 파킨슨병과 같은 신경퇴행질환의 발병과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고(Kim 등 2002; Marttila 등 1988; Zelman 등 1988)되고 있으므로, 천연의 식물 소재인 생약재의 성분이 체내에서의 Free radical을 방어하는 항산화 시스템에 영향을 미칠 것이라고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 지난 수년간 muscarinic acetylcholine receptor(M1 type), glutamate(NMDA; glycine binding site) receptor 및 AChE 등 치매와 직접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 저해효과(Kim 등 2001; Kim 등 2002)를 120여종의 식물추출물(주로 약용식물)을 대상으로 하여 폭넓게 검색한 결과를 토대로 활성이 높은 생약재를 선별하여 최적조성물을 조제한 다음, 뇌세포 퇴화에 의해 발생하는 인지기능 개선 효과를 보여주는 한 약재인 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg), 산약(*Dioscorea batatas* Thunberg), 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 황기(*Astragalus membranaceus*), 강황(*Curcuma aromatica*), 죽엽(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*), 석창포(*Acorus gramineus*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 등 8종의 생약재에서 추출한 생약복합물을 이용하여 치매유도 동물모델에서 항산화 효과를 확인하고, AD의 예방 및 치료에 보다 더 효과적으로 기여할 수 있는 약물의 개발을 위한 기초연구단계로서 생약복합물이 AD 유발 동물모델의 인지기능과 항산화효소 활성에 미치는 영향을 관찰하여 항치매 효과를 검증하고자 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약재

1) 실험동물

Sprague Dawley 계통의 생후 7주, 평균무게 180±10 g의 수컷 흰쥐를 샘타코((주)샘타코 바이오코리아, Korea)에서 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 실내온도 20±5℃, 습도 55~60%를 유지하였으며, 명암주기는 12시간 주기(07:00~19:00)로 일정하게 하고, 고형사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 생약재 중 당귀(국산), 하수오(국산), 황기(국산), 산약(국산), 죽엽(국산), 강황(중국산), 석창포(중국산) 및 감초(중국산)는 진주시 소재 약재상에서 구입하여 사용하였으며, 보관은 실온 및 냉장(10℃) 보관하여 사용하였다.

3) 검액 제조(생약복합물의 조성 및 추출)

생약재를 전통의약서와 현대과학에서 인지기능 활성이 구

Table 1. Inhibition of M₁ binding site, glycine binding site and AChE by extracts of medicinal herbs *in vitro*

Functions	Medicinal herbs	Activity
M ₁ binding site inhibition	<i>Coptis japonica</i>	+++
	<i>Phellodendron amurense</i>	++
	<i>Polyporus umbellatus</i>	++
	<i>Poncirus trifoliata</i>	++
	<i>Oldenlandia diffusa</i>	++
Glycine binding site inhibition	<i>Polyporus umbellatus</i>	+++
	<i>Dioscorea batatas</i>	+++
	<i>Artemisia capillaris</i>	+++
	<i>Amomum xanthioides</i>	+++
	<i>Phellinus linteus</i>	++
	<i>Astragalus membranaceus</i>	++
	<i>Hontuynia cordata</i>	++
AChE inhibition	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	++
	<i>Coptis japonica</i>	++
	<i>Gardeniae jasminoides</i>	+++
	<i>Polygonum multiflorum</i>	+++
	<i>Phyllostachys nigra</i>	+++
	<i>Eriobotrya japonica</i>	+++
	<i>Rheum undulatum</i>	+++
<i>Cnidium officinale</i>	+++	

명된 연구논문(Kim 등 2001; Kim 등 2002)을 기초(Table 1)로 최적 생약복합물을 구성하였다. 최적 생약복합물은 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg) 50 g, 산약(*Dioscorea batatas* Thunberg) 100 g, 당귀(*Angelica gigas* Nakai) 100 g, 황기(*As-tragalus membranaceus*) 50 g, 강황(*Curcuma aromatica*) 50 g, 죽엽(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*) 50 g, 석창포(*Acorus gramineus*) 50 g, 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 100 g의 조성으로 생약재 총 550 g에 10배수의 증류수를 첨가하여 열수추출을 하였으며, 열수추출은 Digital Heating Mantle(MS-DM608, Misung Co., Seoul, Korea)을 사용하였다. 이때 추출시간은 5시간, 추출온도는 95°C로 동일한 온도에서 추출하였다. 추출물은 Whatman filter paper No.1에 거르고, rotary vacuum evaporator(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 다음 동결건조기(FD-8508, Ilshin Bio Base, Dongducheon, Korea)로 완전히 건조하여 조성물 농도 100 µg/mL로 본 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 군 분류(실험군의 구성, 투여물질 및 용량)

1주일 적응기간 종료 후, 실험군은 5군(n=6)으로 나누어 정상군, 치매유발군, 약재 중농도 투여군, 약재 고농도 투여군, 치매치료제 투여군으로 5개 군으로 나누어 20일간 사육하였다. 1군: 정상군(normal group)은 정상상태의 흰쥐에 아무런 처치 없이 사육하였다. 2군: 치매유발제 투여군(TMT 투여군)은 정상상태의 흰쥐에 치매유발을 위해 Trimethyltin chloride (TMT, Sigma, 146498, St. Louis, MO, USA) 2.5 mg/kg을 0.9% 생리식염수에 용해 및 희석하여 사육시작 5일 후부터 14일간 1일 1회 복강 내 주사(intraperitoneal injection) 하였다. 3군: 약재 중농도 투여군(experimental sample group)은 약재 중농도(250 mg/kg)를 실험사육 기간 20일 동안 매일 경구 투여하였다. 그리고 사육시작 5일 후부터 생약복합물 투여 후 30분경과 후에 TMT를 생리식염수에 희석하여 14일간(1일 1회) 복강 내(i.p) 주사하여 치매를 유발하였다. 4군: 약재 고농도 투여군(experimental sample group)은 약재 고농도(500 mg/kg)를 실험사육 기간 20일 동안 매일 경구 투여하였다. 그리고 사육시작 5일 후부터 생약복합물 투여 후 30분경과 후에 TMT를

Table 2. Classification of experimental groups (n=6)

Groups	Injection doses
1	Normal group
2	Saline 0.1 mL + TMT 2.5 mg/kg
3	MH extracts 250 mg/kg + TMT 2.5 mg/kg
4	MH extracts 500 mg/kg + TMT 2.5 mg/kg
5	Tacrine 10 mg/kg + TMT 2.5 mg/kg

생리식염수에 희석하여 14일간(1일 1회) 복강 내(i.p) 주사하여 치매를 유발하였다. 5군: 치매치료제 투여군으로 치매치료제인 tacrine(9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride, Sigma, A3773, St. Louis, MO, USA) 10 mg/kg을 생리식염수에 녹여 경구 투여하고, 30분 후에 치매유발제인 TMT를 생리식염수에 희석하여 14일간(1일 1회) 복강 내(i.p) 주사하였다 (Table 2).

2) 실험동물의 처리

실험사육 최종일에는 7시간 절식시킨 후 ethyl ether를 사용하여 마취시키고, 해부하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며, 4°C에서 30분 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리(FLETA-5, Hanil science Inc. Korea)하여 혈청을 취해 -70°C에 보관하였다. 뇌 균질물은 무게를 측정 한 후 10 volume의 0°C Tris-buffer(pH 8.0)에 넣고 Glass-Col Homogenizer 균질화 한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리(FLETA-5, Hanil science Inc. Korea)하고 상층액을 취하여 효소활성측정을 위해 사용되었다.

3) 측정항목

(1) Transaminase 활성 측정

20일간 사육한 흰쥐의 간독성을 평가하기 위해 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성을 측정하였다. 혈청 GOT와 GPT 활성은 측정용 kit 시약(FUJI DRI-CHEM SLIDE)을 사용하여 혈액자동분석기(FUJI DRI-CHEM FDC3500I, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 이와 더불어 흰쥐의 체중과 뇌무게를 측정하였다.

(2) 신장독성 측정

20일간 사육한 흰쥐의 신장독성을 평가하기 위해 혈청 크레아티닌(Creatinine) 농도와 혈중 요소 질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 농도 측정은 측정용 kit 시약(FUJI DRI-CHEM SLIDE)을 사용하여 혈액자동분석기(FUJI DRI-CHEM FDC3500I, Tokyo, Japan)에서 측정하였다.

(3) 혈액 내 지질성분 측정

혈청의 지질성분은 측정용 kit 시약(FUJI DRI-CHEM SLIDE)을 사용하여 혈액자동분석기(FUJI DRI-CHEM FDC3500I, Tokyo, Japan)에서 측정하였다.

(4) 혈청 중의 항산화 활성

① Superoxide dismutase(SOD) 활성

혈청 SOD 활성은 SOD assay kit(A001, Nanjing Bio Co., Nanjing, China)를 사용하여 측정하였다. 준비된 혈청 5 μ L에 Reagent I 시약 1 mL, Reagent II, III, IV를 각각 0.1 mL를 넣고 믹싱한 후 37°C에서 40분간 가온시킨다. 발색시약 2 mL를 넣어 믹싱한 후 상온에서 10분간 방치시킨다. 그 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Catalase(CAT) 활성

혈청 CAT 활성은 CAT assay kit(A007-1, Nanjing Bio Co., Nanjing, China)를 사용하여 측정하였다. 준비된 혈청 20 μ L에 Reagent I 과 II를 혼합한 시약 3 mL를 cuvette에 즉시 넣고, 240 nm에서 흡광도를 1차 측정 후 1분 후 2차 측정하였다. 결과값은 측정치의 log 함수로 표시하였다.

(5) 뇌 조직 중의 malondialdehyde(MDA) 함량측정

Phosphate buffered saline을 이용하여 추출한 흰쥐의 뇌조직 균질액 160 μ L에 1% phosphoric acid 960 μ L를 혼합한 후 0.67% thiobabitruic acid 320 μ L를 넣고, 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 5,000 rpm에서 10분간 원심분리(FLETA-5, Hanil science Inc. Korea)하고, 532 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 mg protein 당 μ mmole의 농도를 표시하였다(Choi 등 2009).

(6) 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정

Y-maze와 Passive avoidance 실험 종료 후 흰쥐의 뇌를 적출하여 10 volume의 lysis buffer를 넣고 Glass-col homogemizer로 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리(FLETA-5, Hanil science Inc. Korea)하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen Co., Carlsmbad, Ca., USA)를 이용하여 측정하였다. 효소 5 μ L에 50 mM sodium phosphate buffer 65 μ L를 넣고, 37°C에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman's reation mixture 70 μ L를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 흰쥐 뇌 조직 중의 AChE 활성은 정상군 대비 mg protein 당 % 활성으로 나타내었다(Kim 등 2007).

4) Y-maze 실험

사육기간 종료 다음날 Y-maze 실험을 실시하였다 Y-미로 시험은 단기 기억형태의 순간 공간인지를 평가하는 방법으로 Water maze test에서와 같은 방법으로 scopolamine을 투여한 쥐에 대해 Y-maze test를 실시하였다. Y-maze test에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며, 가지의 길이는

42 cm, 넓이는 8 cm, 높이는 21 cm이고, 세 팔이 접하는 각도는 120°로 하였다. 모든 실험 장치는 검정색 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 arm에 흰쥐를 조심스럽게 놓고 8분 동안 쥐가 들어간 arm의 이동경로를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 arm에 차례로 들어간 경우 1점(actual alternation)씩 부여하였고, 연속으로 들어가지 않으면 점수를 부여하지 않았다. 교차 행동력(spontaneous alternation)은 위의 측정된 점수를 총 교차한 횟수에서 2를 빼 수로 나누어 확률로 환산한 값으로 나타내었다(Kim 등 2007).

5) 수동회피실험

Y-maze 실험 다음날 Passive avoidance 학습 시험(training trial)을 실시하였다. Passive avoidance 실험기구는 조명이 있는 밝은 챔버와 어두운 챔버, 2개의 구역으로 구분되어 있으며, 바닥은 철망으로 이루어져 있다. 각각의 흰쥐는 조명이 있는 챔버에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후 조명을 켜고, 2분 동안 적응시킨 후 마우스가 어두운 챔버로 이동하자마자 전기충격을 0.5 mA, 1초 동안 가한다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 마우스들을 대상으로 기억 시험(test trial)을 실시하였다 조명을 켜 챔버에 흰쥐를 놓고 흰쥐의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 600초 이내로 지정하고 실행하였다(Kim 등 2007).

3. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 PASW Statistics 18.0을 통해 처리하였다. 항목에 따라 실험군 별로 평균치와 표준편차로 표기(mean±S.D.)하였고, 실험군 간의 차이를 비교하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정(post hoc)은 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 분석 시 유의수준은 5%로 설정하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생약복합물의 TMT 유도성 인지결함에 대한 보호 효과

1) 체중과 뇌무게

20일간 사육한 실험동물의 체중 및 뇌 무게를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 체중은 다른 군에 비하여 정상군(1군)과 치매치료군인 5군이 비교적 낮았으며, 치매유발군인 2군과 생약복합물 투여군(3, 4군)은 다소 높았다($p<0.05$). 또한 생약복합물 투여군(3, 4군) 간에는 유의적인 차이가 없어 생약복합물을 투여한 농도 차이에 의한 체중의 증감은 없었다. 그리

Table 3. Body weight and brain weight of rats

Groups ¹⁾	Body weight (g)	Brain weight (g)
1	310.0±4.07 ^{2)ab}	1.45±0.17 ^{NS3)4)}
2	326.3±4.24 ^b	1.65±0.03
3	323.7±4.01 ^b	1.55±0.10
4	321.0±6.71 ^b	1.73±0.04
5	315.3±3.91 ^{ab}	1.72±0.05

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ NS: Not significant at $p<0.05$

⁴⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

고 뇌의 무게는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다($p>0.05$).

2) Transaminase, creatinine 및 BUN의 활성

20일간 사육한 실험동물의 간장독성 평가를 위하여 혈청의 GOT, GPT 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. GOT 농도는 정상군인 1군에 비해 치매유발군인 2군, 생약복합물을 투여한 군(3, 4군)이 감소하였으며, 치매치료군인 5군이 가장 낮았다($p<0.05$). GPT 농도는 정상군인 1군, 치매유발군인 2군, 약제투여군(3, 4군) 간에는 유의적인 차이가 없었으나, tacrine을 투여한 5군이 다른 군에 비하여 현저히 증가하여 GOT 농도와 상반된 결과를 나타내었다. 따라서 생약복합물을 투여한 쥐에서 GOT, GPT농도가 정상군의 쥐에 비해 감소하였거나, 같은 수준인 것으로 보아 약제추출물 투여로 인한 간장독성은 없었다. 한편, 신장독성 평가를 위하여 혈청의 creatinine과 BUN 활성을 측정된 결과(Table 4), 혈청 Creatinine 농도는 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. BUN 농도는 정상군(1군)에 비해 생약복합물을 투여한 군(3, 4군), tacrin을 투여한 5군이 유의적으로 낮았으며, TMT를 투여한 2군이 가장 높았다($p<0.05$).

Table 4. Transaminase activity, creatinine and BUN levels of the serum in each groups

Groups ¹⁾	GOT (U/L)	GPT (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
1	109.12± 6.19 ^{2)b}	28.17±0.79 ^a	0.50±0.002 ^{NS3)}	19.05±1.18 ^{ab4)}
2	100.33±10.0 ^{ab}	32.67±2.26 ^a	0.50±0.00	22.37±1.38 ^b
3	95.67±11.94 ^{ab}	28.33±2.06 ^a	0.52±0.02	18.98±1.18 ^{ab}
4	89.67± 6.72 ^{ab}	30.50±1.53 ^a	0.53±0.02	19.55±0.75 ^{ab}
5	76.0 ± 3.71 ^a	40.50±3.52 ^b	0.50±0.00	17.87±1.33 ^a

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ NS: Not significant at $p<0.05$

⁴⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

생약복합물을 투여한 군(3, 4군), tacrine을 투여한 5군은 정상 범위 안의 수치(8~20 mg/dL)를 나타냈기 때문에 tacrine 투여와 약제추출물 투여로 인한 신장독성은 없었다.

일반적으로 한약재를 비롯한 약물의 장기투여는 간장과 신장에 대한 부담을 가질 수 있으며, tacrin, donepezil, galantamine, rivastigmine 등 일련의 아세틸콜린분해효소 억제제(cholinesterase inhibitors, ChEI)들이 알츠하이머병 치료제로 개발되었다. 파킨슨병 치료제로 개발되었던 NMDA 수용체 길항제인 memantine이 알츠하이머병 치료제로 인정받아 사용되고 있으나, 그 효과가 초기에 증상이 가벼운 경우에는 효과가 있는 것으로 보이다가 중등도 이상이 되면 효과가 없거나, 간독성 등의 문제로 장기간 복용이 어려운 경우가 생긴다. Tacrin의 경우, 이미 간독성에 대한 보고가 있으며(Watkins 등 1994), 드물지만 donepezil 역시 간독성에 관한 보고도 있다(Dierckx & Vandewoude 2008). 그리고 TMT는 유기주석 화합물의 일종으로 주석화합물 조제과정 중 생성되는 중간 화합물로 강력한 독성을 나타내는 것으로 보고(Feldman 등 1993) 되고 있다. 실제로 본 실험에서도 tacrin의 경우, 간독성 지표인 혈액 내 GPT가 유의적인 상승($p<0.05$)을 보였고, TMT를 투여한 군에서 신장독성 지표인 BUN에서 상승을 보였다. 그러나 각 지표에서 생약복합물을 투여한 3, 4군에서는 정상군인 1군과 유의적인 차이($p<0.05$)가 없음을 알 수 있었다($p<0.05$).

3) 혈액지질성분

혈액 중의 지질 함량에 대한 분석 결과는 Table 5와 같다. 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 유의적인 차이가 없었다. 중성지방은 전군에서 정상군(1군)에 비해 치매유발군인 2군이 낮았고, 생약복합물 투여군(3, 4군), 치매치료군(5군)은 가장 낮았다($p<0.05$). 이들 군 간에는 유의적인 차이는 없었다. 이것은 Choi 등(2005)의 당귀분말이 scopolamine을 투여하여 기억·학습 장애 유발한 mouse의 혈청에 미치는 연구에

Table 5. Lipid composition of the serum in each group

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)
1	45.83±4.05 ^{2)bc3)}	95.83±3.32 ^{NS4)}	42.50±1.45 ^{NS}
2	38.00±2.32 ^{ab}	94.20±4.63	41.33±2.51
3	33.17±1.96 ^a	82.67±3.19	37.50±2.60
4	32.33±2.86 ^a	86.33±4.75	40.67±2.68
5	30.50±2.81 ^a	84.50±4.00	38.00±2.99

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

⁴⁾ NS: Not significant at $p<0.05$

서도 5% 참당귀 분말 투여군에서 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 함량에는 유의적인 차이가 없었으나, 중성지방의 함량이 유의적으로 증가하였다는 결과와 유사하였다. 생약복합물은 식물성이어서 콜레스테롤의 함량에는 영향을 미치지 않으나, 중성지방 함량을 다소 감소시키는 것으로 나타났다.

2. 생약복합물의 TMT 유도성 인지결함에 대한 항산화 효과

1) 혈청 중의 항산화 활성

혈액 중의 항산화 활성에 대한 분석 결과는 Table 6과 같다. SOD 활성은 정상군(1군), TMT 투여군(2군) 및 tacrine 투여군(5군) 간에는 유의적인 차이가 없었으며, 그것들에 비해 생약복합물 투여군(3, 4군)이 다소 높아 유의적인 차이를 나타내었다($p<0.05$). 생약복합물 투여군(3, 4군) 간에는 유의적인 차이는 없었지만, 3군에 비해 생약복합물을 더 첨가한 4군의 SOD 활성이 다소 높았다. 이것은 천연의 식물 소재인 생약재의 성분이 항산화 작용을 하는 것으로 생각되며, 생약복합물의 농도가 높은 것이 더 크게 작용하는 것으로 사료된다. 실제로 천연의 식물 소재는 미량의 유효물질을 포함하여 비타민 C, 토코페롤, 카로테노이드, 플라보노이드 및 페놀산 등 식물체의 모든 부위에 존재하는 페놀성 화합물이 주요 활성 물질이며(Lee 등 2012), 이들 성분은 대부분 항산화 활성을 가지고 있음이 확인되고 있다. 그러나 Table 6에서 catalase 활성은 전군에서 유의적인 차이가 없었다. 이는 free radical 제거 시 SOD의 활성이 증가되어 O_2^- 를 효과적으로 제거함으로써 H_2O_2 가 상대적으로 덜 생산되어 catalase의 활성에 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 이에 대한 연구로는 天王補心丹 加 薑黃(천왕보심단 가 강황) 추출물이 AD 유발 동물 모델의 기억력과 항산화능에 미치는 영향을 조사한 연구(Byun SN 2010)에서 AD 유발군에 비해 tacrin 투여군과 저, 중, 고용

Table 6. SOD and catalase levels of the serum in each group

Groups ¹⁾	SOD (unit/mL)	Catalase (unit/g protein)
1	384.94±58.55 ^{2)bc3)}	4.65±0.03 ^{NS4)}
2	381.85±53.65 ^a	4.89±0.02
3	391.74±33.92 ^{ab}	4.84±0.09
4	405.04±45.81 ^{ab}	5.06±0.07
5	385.61±47.10 ^a	4.83±0.07

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

⁴⁾ NS: Not significant at $p<0.05$

량의 SOD 활성이 용량 의존적으로 증가하였으나, 유의성은 없었고, 또한 CAT 활성 또한 AD 유발군과 투여군 간의 유의적인 차이도 없었다고 보고한 바 있다. 최근에는 AD 발병의 여러 가설들 중 활성산소설이 주목을 받고 있는데, AD 발병의 전단계라고 추정되는 경도인지장애(Mild Cognitive Impairment, MCI) 환자의 혈장, 소변, 뇌척수액에서 lipid peroxidation marker 인 8,12-iso-iPF2 α -VI가 상승한다는 보고(Praticò 등 2002)나 α -tocopherol(Sano 등 1997), vitamin C(Zandi 등 2004), ginkgo biloba(DeFeudis & Drieu 2000), selegilin(Sano 등 1997) 등의 항산화제를 복용한 경우, AD의 발생위험이 낮아질 것이라는 보고들이 있다. 활성산소종은 적당량이 있으면 인체 내 방어 시스템인 항산화 효소에 의해 세균이나 이물질로부터 방어되지만, 그 발생량이 과도하면 정상세포까지 영향을 받게 되어, 세포 및 조직 노화와 이로 인한 만성질환 유발의 원인이 된다(Kang JS 2010). 특히 뇌는 인체 내 여러 기관에 비해 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 상대적으로 적은 관계로 유해활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대한 방어가 매우 취약하고, 활성산소에 의한 세포막손상과 신경세포의 사멸유도로 인하여 파킨슨병, 알츠하이머병 등과 같은 퇴행성 신경질환과 관련이 깊은 것으로 최근 여러 연구를 통해 보고되고 있다(Marttila 등 1988; Zelman 등 1988).

2) 뇌조직의 MDA 활성

본 실험에서는 20일간 사육한 흰쥐의 뇌조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 측정하였다(Table 7). 뇌조직에서의 MDA level은 뇌조직의 산화를 평가하는 좋은 지표인데, 활성산소에 의해 뇌조직의 산화가 발생하면, 과산화 지질이 다량 생성되고, 이러한 과산화지질의 최종 분해 산물이 MDA이기 때문이다. MDA 함량은 정상군인 1군과 치

매치료군인 5군이 치매유발군인 2군과 생약복합물 투여군(3, 4군)에 비해 유의적으로 높았으며($p<0.05$) 2, 3, 4군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 생약복합물 투여군인 3, 4군이 물만 급이한 1군에 비하여 유의적으로 낮은 것은 생약추출물속에 존재하는 여러 식물들이 뇌조직의 지질과산화물질을 감소하는 것으로 생각되나, 치매유발군인 2군과는 유의적인 차이가 없었다. 이에 관한 연구로는 quercetin(5, 10 및 20 mg/kg)을 21일 동안 급이한 마우스에 TMT로 치매를 유발한 흰쥐의 뇌조직에서 MDA의 활성이 quercetin을 5 혹은 10 mg/kg을 급이하였을 때는 TMT군과 유의적인 차이가 없었으나, 20 mg/kg을 급이하였을 때는 TMT군 대비 MDA 생성을 약 17%가 억제하였다는 보고(Choi GN 2011), AD 유발 동물에게 天王補心丹 加 薑黃(천왕보심단 가 강황) 추출물을 투여한 3개 군에서 薑黃(강황)의 용량 의존적으로 MDA의 수치가 낮아졌다는 보고(Lee 등 2012), 홍곡(red yeast rice)이라고 불리는 red mold rice 투여가 뇌해마 조직과 피질의 MDA 형성을 억제한다는 보고(Lee 등 2007) 등으로 보아, 지질의 과산화 억제 효과는 투여물질의 함량과 약제의 농도에 의한 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

3. 뇌 조직 중의 Acetylcholinesterase 활성

Y-maze와 passive avoidance 실험 종료 후 흰쥐의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정한 결과는 Table 7과 같다. AChE는 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로 중추신경계의 콜린성 시스템과 매우 관련성이 높다. ACh는 acetyl CoA와 choline acetyltransferase(ChAT)의 효소작용으로 합성되며, AChE의 작용으로 acetate와 choline으로 분해된다. 분해된 choline은 high affinity choline transporter에 의해 다시 presynaps로 상승되어 ACh 합성반응에 관여하게 된다. 실험동물 및 임상연구에서 콜린성 신경계의 붕괴는 초기 알츠하이머 질환의 주요 원인으로 알려졌다(Park 등 1996). Table 7에서와 같이 AChE 활성은 TMT로 치매를 유발한 2군이 가장 높았으며, 치매치료군(5군)은 정상군(1군)의 수준으로 가장 낮게 나타났다($p<0.05$). 그리고 생약복합물을 투여한 3군, 4군에서는 유의적 차이는 없으나, TMT로 치매를 유발한 2군보다는 유의적으로($p<0.05$) 감소하였고, 치매치료군인 5군보다는 다소 높게 나타났다. 이것으로 보아 치매 치료제인 tacrine은 TMT에 의한 AChE 활성을 유의적으로 저해한 것을 알 수 있었고, 생약복합물도 농도 간 유의적인 차이는 없으나, 치매치료제인 tacrine보다 다소 낮은 수준으로 AChE 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 이것은 마우스에 TMT로 치매를 유발한 흰쥐의 뇌조직에서 탱자 추출물의 농도를 증가할수록 AChE의 활성이 유의적으로 감소하였다는 보고(Kim 등 2009)와 유사한 경향이었으며, 본 실험에서도 생약복합물을 투여한 3군, 4군에서는 유의적

Table 7. MDA levels of the serum and AChE activity of the brain in each group

Groups ¹⁾	MDA (nmole/mg protein)	AChE (%/mg protein)
1	1.19±0.15 ^{2)a3)}	101.78±5.50 ^a
2	0.92±0.19 ^b	121.45±2.12 ^b
3	0.98±0.16 ^b	114.89±4.28 ^{ab}
4	0.91±0.08 ^b	110.61±5.09 ^{ab}
5	1.08±0.15 ^a	103.20±2.97 ^a

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

차이는 없으나, 중등도의 농도인 3군에 비해 고농도를 투여한 4군이 비교적 높게 나타난 것으로 보아, 생약복합물의 농도를 좀 더 높이면 치매 치료제인 tacrine의 수준으로 AChE 활성을 저해할 수 있을 것으로 생각된다. 이 결과를 통하여 볼 때, 생약혼합물은 tacrine, donepezil과 같은 AChE inhibitor 치매 치료제와 같이 신경접합부에 있는 ACh을 분해하는 AChE 활성을 억제하여 ACh의 활성을 촉진하므로 기억과 학습 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다(Giacobini E 2004). 한편, TMT는 항콜린성 제제로 시냅스에서 acetylcholine의 농도변화 없이 활성을 감소시키는 약물로 기억손상을 일으켜 노인성 중추신경 장애와 관련된 연구에 많이 활용되는 약물로 알려져 있으며(Papandreou 등 2009), TMT 투여는 AChE 활성을 증가시켜 시냅스 사이의 신경전달물질인 ACh의 분해를 촉진하여 뇌조직의 ACh 함량을 감소시키나, 생약복합물은 시냅스 말단의 AChE 활성을 저해하여 ACh 활성을 촉진시키고, 관련효소인 choline acetyltransferase를 활성화하여 뇌조직의 ACh 함량을 다소 증가시킨 것으로 사료된다.

4. Y-maze 실험을 통한 기억력 및 학습능력 개선 효과

본 연구에서는 뇌의 해마 부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 치매와 유사한 증상을 나타내는 TMT를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 흰쥐모델을 대상으로 Y-maze를 실시하였으며, 그 결과는 Table 8과 같다. 8분 동안 흰쥐가 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수는 전군에서 유의적인 차이는 없었다. 한편, 교차행동력은 TMT 투여군인 2군이 가장 낮았으며, 치매치료제인 tacrine을 투여한 5군이 가장 높아 5군(tacrine 투여)은 TMT 투여군인 2군에 비해 약 125% 현저한 기억력 증가를 보였다($p<0.05$). 이에 반해 생약복합물 투여한 2, 3군은 정상군과 유의적인 차이가 없었으나 TMT 투여군인 2군에 비해 각각 117.32%와 120.38% 수준으로 기억력 증가를 보였다. 총 횟수는 전군에서 차이가 없어 흰쥐의

Table 8. Protective effect of MH extracts against spontaneous alteration behavior in TMT-induced amnesic rats

Groups ¹⁾	Total entry (No)	Alteration behavior (%)
1	24.67±1.61 ^{2)NS3)}	63.70±5.76 ^{ab4)}
2	21.05±1.38	51.22±3.70 ^b
3	23.50±1.45	61.95±3.62 ^{ab}
4	24.17±0.88	64.33±2.75 ^{ab}
5	25.50±0.99	68.05±2.85 ^{ab}

¹⁾ Treatments of animals are shown in Table 2.

²⁾ All values are mean±S.D.

³⁾ NS: Not significant at $p<0.05$

⁴⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$.

기본적인 운동능력에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 이와 같은 결과는 TMT 복강주사에 의한 인지 결함으로부터 유도된 행동장애임을 뒷받침해주고 있다. 이에 관한 연구로는 TMT로 치매를 유발한 마우스에 급이한 quercetin의 농도를 증가할수록 교차행동력이 유의적으로 증가하였다는 보고(Choi GN 2011), scopolamine으로 치매를 유발한 마우스에 당귀 추출물의 급이로 인지기능과 학습수행 능력이 뚜렷한 증진효과를 나타내 마우스의 교차행동력을 대조군에 가깝게 회복시켜 주는 경향을 보여 주었다는 보고(Oh 등 2004), 또한 scopolamine으로 기억력 손상을 입힌 실험 동물에 Y-maze test를 한 결과, 정상 대조군에 비해 AD 유발군에서 spontaneous alternation 수치가 감소하고, 白蔘(백삼)과 紅蔘(홍삼) 추출물, tacrin을 투여한 군에서 대조군과 비슷한 정도의 개선효과를 보였다는 보고(Lee 등 2008) 등이 있다. 그러나 2주간의 tacrine 및 天王補心丹 加 薑黃(천왕보심단 가강황) 추출물 투여를 종료한 후 실시한 Y-maze 시험에서는 저용량 薑黃(강황) 추가군에서 상승이 있었으나, 모든 군에서 유의성 있는 변화를 보이지 않아 기억력 개선 효과는 관찰하지 못했다는 상반된 보고(Byun SN 2010)도 있다.

5. 수동회피실험을 이용한 기억력 및 학습능력 개선 효과

수동회피실험은 장기기억능력을 시험하기 위한 방법으로 서 투여 종료 후에 행해진 수동회피실험 첫날(acquisition trial)과 비교해 둘째 날(retention trial) 수동회피실험에서의 결과는 Fig. 1과 같다. 치매유발군(2군)은 전군에서 유의성 있는 차이를 보이며 감소하였다. 그에 비해 생약복합물 중, 고용량 투여군(3, 4군) 및 tacrine 투여군은 증가하였으며, 특히 고용량(4군)에서 유의성 있는 증가를 나타내어($p<0.05$) 정상군에 가깝게 회복시켜 주는 경향을 보여 주었다. 즉, 치매유발군(2군)이 정상군(1군)에 비해 step-through latency가 33%로 떨어진 데 비해 치매치료제로서 임상에서 널리 사용되고 있는 tacrin

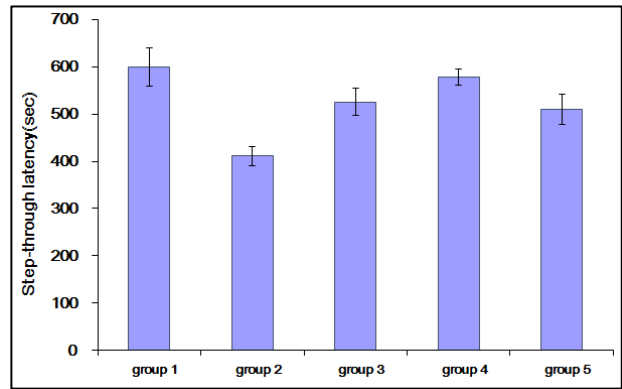


Fig. 1. Protective effect of MH extracts on TMT-induced dementia in the passive avoidance test. Each behavior test was conducted 2 days after TMT injection. For further explanation see the legend to Table 1. Data are presented as mean±S.D. (n=6). Values with different superscripts on the bar graph are significantly different at $p<0.05$.

(5군)의 경우 정상군의 83%까지 회복되는 결과를 보였다. 중용량 생약복합물 투여군(3군)의 경우, tacrine과 비슷한 정도의 회복을 보였으며, 고용량 생약복합물 투여군(4군)은 정상군의 95%와 같은 정도로 회복을 보였다. 이러한 결과는 mulberry (Shih 등 2009) 추출물을 투여한 AD 모델 생쥐에서 AD 유발군에 비해 수동회피시간이 50% 증가한 것에 비해 고용량 생약복합물의 투여가 월등히 우수한 효과가 있음을 보여주는 것이며, AD 유발 생쥐의 학습, 기억능력에 curcumin이 미치는 효과를 step-through passive avoidance test를 통해 평가한 연구에서 보여준 89.5%의 회복(Pan 등 2008)에 비해서도 높은 결과이다. 또한 AD 유발 생쥐의 天王補心丹 加 薑黃(천왕보심단 가강황) 추출물의 저용량, 고용량 薑黃(강황) 추가군의 경우 tacrine과 비슷한 정도의 회복을 보였으며, 중용량 薑黃(강황) 추가군은 정상군과 같은 정도로 99%의 회복을 보였다는 연구(Byun SN 2010)와 red mold rice(홍곡)를 투여한 후 수동회피실험을 한 연구에서는 step-through latency가 정상대조군이나 양성대조군에 비해 높은 수치를 기록(Lee 등 2007)하여, 본 실험의 결과와 유사한 수준의 기억능력의 회복 및 개선을 확인하였다.

요 약

인지기능 활성을 가진 생약복합물을 선정하여 최적조성을 조절한 다음, 생약복합물의 첨가비율을 달리하여 치매유도 동물모델에서 항산화 효과와 인지기능 개선을 확인한 결과는 다음과 같다.

1. 20일간 사육한 흰쥐 혈청의 GOT, GPT, creatinine 및

BUN 활성을 측정된 결과, 생약복합물을 투여한 군(3, 4군)이 정상군(1군)에 비해 GOT 농도는 감소하였고, GPT 농도와 Creatinine 농도는 유의적인 차이는 없었다. BUN 농도는 정상군(1군)에 비해 생약복합물을 투여한 군(3, 4군)이 유의적으로 감소하였다.

2. 혈액 중의 총 콜레스테롤과 HDL-cholesterol은 유의적인 차이가 없었으나, 중성지방은 전군에서 정상군(1군)에 비해 치매 유발군인 2군이 낮았고, 생약복합물 투여군(3, 4군), 치매치료군(5군)은 가장 낮았으며, 이들 군 간에는 유의적인 차이는 없었다.

3. 혈액 SOD 활성은 정상군(1군), TMT 투여군(2군) 및 tacrine 투여군(5군) 간에는 유의적인 차이가 없었으나, 생약복합물 투여군(3, 4군)이 다소 높아 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). MDA 함량은 정상군인 1군과 치매치료군인 5군이 치매유발군인 2군과 생약복합물 투여군(3, 4군)에 비해 유의적으로 높았으며, 2, 3, 4군 간에는 유의적인 차이가 없었다.

4. AChE 활성은 TMT로 치매를 유발한 2군이 가장 높았으며, 치매치료군(5군)은 정상군(1군)의 수준으로 가장 낮게 나타났다. 그리고 생약복합물을 투여한 3군, 4군에서는 유의적 차이는 없으나, TMT로 치매를 유발한 2군보다는 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 치매치료군인 5군보다는 다소 높게 나타났다.

5. 단기 기억능력을 시험하기 위한 Y-maze를 실시한 결과는 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수는 전군에서 유의적인 차이는 없었다. 교차행동력은 TMT 투여군인 2군이 가장 낮았으며, 치매치료제인 tacrine을 투여한 5군이 가장 높아 5군(tacrine 투여)은 TMT 투여군인 2군에 비해 약 125% 현저한 기억력 증가를 보였다. 이에 반해 생약복합물 투여한 2, 3군은 정상군과 유의적인 차이가 없었으나, TMT 투여군인 2군에 비해 각각 117.32%와 120.38% 수준으로 기억력 증가를 보였다. 장기 기억능력을 시험하기 위한 수동회피실험의 결과, TMT 투여군(2군)은 전군에서 가장 낮았으나, 생약복합물 중, 고용량 투여군(3, 4군) 및 tacrine 투여군은 증가하였고, 특히 고용량(4군)에서 유의성 있는 증가를 나타내어($p < 0.05$) 정상군에 가깝게 회복시켜 주는 경향을 보여 주었다.

이상의 결과를 통하여 생약복합물은 치매 유발 동물모델의 항산화능의 저하를 억제하고, AChE 활성을 억제하여 ACh의 활성을 촉진하므로 장·단기 기억능력의 회복 및 개선효과를 확인할 수 있었다. 그러나 향후 생약복합물의 농도에 따른 첨가군을 확대하여 인지기능 개선에 가장 효과적인 최적농도를 도출하는 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

References

Byun SN. 2010. Effects of mixed extracts of *Chemwhangbosimdan* and *Curcuma longa* L. on memory and antioxidant

- enzyme activities in intracerebroventricular amyloid β -injected Alzheimer's disease model rat. PhD Thesis, Kyung Hee Univ. Seoul. Korea
- Cho YJ, Hou WN. 2005. Effect of dietary *Bong-ip*, *Gam-chei*, *Sol-ip* and *Dang-gi* on serum composition in rats. *Korean J Food Culture* 20:123-129
- Choi GN. 2011. Anti-amnesic effects of quercetin, and physiological effect of green tea and garlic. MS Thesis, Gyeongnam national Univ. GyeongNam. Korea
- Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Kim JK, Jun WJ, Kim HK, Kim EK, Kim MO, Choi HY, Hwang HJ, Kim YJ, Shin DH. 2009. Ameliorative effect of 1,2-benzene dicarboxylic acid dinonyl ester against amyloid beta peptide-induced neurotoxicity. *Amyloid* 16:15-24
- Chung YK, Heo HJ, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK, Shin DH. 2001. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Oiganum majorana* L on the acetylcholinesterase. *Mol Cells* 11:137-143
- Defeudis FV, Drieu K. 2000. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: Basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets* 1:25-58
- Dierckx RI, Vandewoude MF. 2008. Donepezil-related toxic hepatitis. *Acta Clin Belg* 63:339-342
- 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* 262:551-556
- Fayuk D, Yakel JL. 2004. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor channel function by acetylcholinesterase inhibitors in rat hippocampal CA1 interneurons. *Mol Pharmacol* 66: 658-666
- Feldman RG, White RF, Eriator II. 1993. Trimethyltin encephalopathy. *Arch Neurol* 50:1320-1324
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J Neurosurg Psychiatry* 66:137-147
- Giacobini E. 2004. Cholinesterase inhibitor: New role and therapeutic alternatives. *Pharmacological* 50:433-440
- Jung SH, Chang KS, Ko GH. 2004. Physiological effects of curcumin extracted by supercritical fluid from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Korean J Food Sci Technol* 36:317-320
- Kang JS. 2010. The effects of vitamin C on the activity of liver enzymes and hepatic damage in rats treated with radiation

- and aflatoxin B₁. *Korean J Food & Nutr* 23:30-38
- Kang SY, Kim SH, Jung KK, Kim TG, Han HM, Huh IH. 1999. The effect of docosahexaenoic acid on the memory loss induced by ibotenic acid or scopolamine in rats. *J Toxicol Public Health* 15:133-140
- Kim JH, Ryu JD, Lee HG, Park JH, Moon GS, Choi HS, Song YO. 2002. Effect of *Kimchi* on production of free radicals and anti-oxidative enzyme activities in the brain of SAM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31:117-123
- Kim JK, Bae H, Kim MJ, Choi SJ, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Lim ST, Kim EK, Kim HK, Kim BY, Shin DH. 2009. Inhibitory effect of *Poncirus trifoliata* on acetylcholinesterase and attenuating activity against trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:1105-1112
- Kim JS, Kim YS, Kim SK, Heor JH, Lee BH, Choi BW, Ryu GS, Park EK, Zee OP, Ryu SY. 2002. Inhibitory effects of some herbal extracts on the acetylcholinesterase (AChE) *in vitro*. *Korean J Pharmacogn* 33:211-218
- Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, Jun WJ, Choi HY, Kim YJ, Shin DH. 2007. Ferulic acid supplementation prevent trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1063-1068
- Kim YS, Kim JS, Kim SK, Heor JH, Lee BE, Ryu SY. 2001. Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR-M1). *Kor J Pharmacogn* 32:219-225
- Lee Chun-Lin, Kuo Tzong-Fu, Wang Jyh-Jye, Pan Tzu-Ming. 2007. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid β -infused rat by repressing amyloid b accumulation. *J Neurol Res* 85: 3171-3182
- Lee MR, 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* 32:341-346
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Korean J Food Sci Technol* 44:540-544
- Marttila RJ, Lorenz H, Rinne UK. 1988. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 88:321-325
- Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. 2004. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive for anticholinesterase function activity. *Hytomedicine* 11:544-548
- Pan R, Qiu S, Lu DX, Dong J. 2008. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chin Med J (Engl)* 121:832-839
- Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, Cordopatis P, Klimis-Zacas D, Margarity M, Lamari FN. 2009. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behav Brain Res* 198:352-358
- Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH. 1996. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med* 62:405-409
- Praticò D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. 2002. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:972-976
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. 1997. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336:1216-1222
- Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC. 2009. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 21:598-605
- Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Carvalho J, McGuire D. 2004. Novel ventriculo-peritoneal shunt in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *Expert Rev Neurother* 4:97-107
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MI, Gracon SI, Lewis KW. 1994. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* 271:992-998
- Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JCS; for the Cache County Study Group. 2004. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: The Cache County Study. *Arch Neurol* 61:82-88
- Zelman FA, Thienhaus OJ, Bosmann HB. 1988. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: Possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res* 476:160-165