

## Improvement Effect of *Stachys sieboldii* MIQ. According to Mixing Ratio of Calcium on Memory Impairment in Scopolamine-induced Dementia Rats

Da-Jeong Choe<sup>1</sup>, Hee-Young Ahn<sup>1</sup>, Young-Wan Kim<sup>1</sup>, Tae-Hoon Kim<sup>1</sup>, Man-do Kim<sup>2</sup> and Young-Su Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>2</sup>GSP Co., Ltd. Gangse-gu, Busan 46703, Korea

Received May 27, 2016 / Revised June 23, 2016 / Accepted 4 July, 2016

The aim of this study was to investigate the anti-amnesic effect of *Stachys sieboldii* MIQ. according to the mixing ratio of calcium on scopolamine-induced learning and memory impairment, *in vivo*. At the end of the adaptation period, SD rats were divided into a normal group (N), a control group (C: scopolamine), a positive control group (PC: scopolamine + tacrine), and a sample group (S: scopolamine + *Stachys sieboldii* MIQ., 1CS: scopolamine + low calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ., 5CS: scopolamine + high calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ.), and were tested with learning and memory tests. The C and CS groups were found to have a decreased scopolamine-induced memory deficit in the Y-maze and water maze tests. Brain tissue analysis showed that the CS group decreased acetylcholinesterase (AChE) activity and increased acetylcholine (ACh) content, both of which are indicative of neuronal cell activity. From a light microscopy study, the nucleus of neurons in the hippocampus of the brain was more shrunken or condensed in the C group compared to the CS group. In the CS group, the damage to the neurons in the hippocampus of the brain was suppressed. These results suggest that *Stachys sieboldii* MIQ. according to the mixing ratio of calcium provides a significant anti-amnesic effect against scopolamine-induced cholinergic system deficits and cognitive impairment.

**Key words** : Acetylcholine, acetylcholinesterase, dementia, scopolamine, *Stachys sieboldii* MIQ.

### 서 론

우리나라는 지난 30여 년간 급격한 경제발전에 따른 생활수준 개선, 의학 발달, 국민보건 향상의 결과로 질병발생과 사망률이 감소되어 평균수명이 연장되고 있으며, 전 세계적으로 노인 인구가 지속적으로 증가함에 따라 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 뇌신경계 질환의 발병률이 급격히 증가하고 있다 [14, 22].

알츠하이머병은 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌 질환으로 서서히 발병하여 기억력을 포함한 인지능의 악화가 점진적으로 진행되는 병을 말한다[26]. 알츠하이머병 환자의 뇌는 여러 종류의 신경이 손상되는데, 그 중에서 콜린성신경의 손상이 가장 심각한 것으로 알려져 있으며, 이는 기억력, 인지력, 학습능력 및 판단능력 저하와 같은 결과를 가져오는 것으로 알려져 있다[2, 4]. 무스카린 콜린성수용체의 길항제인

scopolamine은 아세틸콜린에스테라제의 활성을 증가시켜 신경접합부에 있는 아세틸콜린을 분해하여 단기간 동안 기억력을 감소시킨다. 그로 인해 동물실험에서 기억력 감퇴 및 인지능력 저하에 대한 연구 분야에 널리 사용되고 있으며[5], 사람을 상대로 한 임상실험결과에서도 기억력, 학습능력 및 인지능력의 저하를 확인할 수 있었다[10]. 현재까지 아세틸콜린에스테라제 억제제로서 tacrine, donepezil 등이 알츠하이머병의 치료제로 개발되어 왔으나 간 독성과 같은 약물의 복용에 따른 부작용[6]을 간과할 수 없기 때문에 천연물질로부터 유래된 건강기능식품이 대두되고 있다.

본 연구에 사용된 초석잠(*Stachys sieboldii* MIQ.)은 labiate과로 중국의 전통적인 건강채소로서 Chinese artichoke, Japanese artichoke, crosne, knotroot로 불리며 중국, 일본 및 러시아 등에서 주로 재배되고 있다[13]. 1년생 본초로서 여름에는 잎이 무성하고 겨울에는 뿌리가 지하에서 3-6 cm 정도로 자라는데 누에모양을 하고 있어 동충하초와 모양뿐만 아니라 약효도 비슷하여 식물의 동충하초로 불리고 있다. 중국의 중약편에 의하면 초석잠은 예로부터 뇌경색, 기억력증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채로서 널리 이용되어 왔다. 연구에 의하면 초석잠에 함유되어 있는 페닐에타노이드, 콜린 등과 같은 성분들은 뇌경색과 노인성치매 그리고 기억력을 올리는 데 효과가 있으며[28], 또한 항산화효능 활성[28], hyaluronidase 억제 활성[23] 등이 있음이 알려져 있다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한편, 칼슘은 한국인의 식생활에서 가장 부족하기 쉬운 영양소로 연령대가 올라갈수록 권장섭취량에 대한 섭취비율이 낮아져 65세 이상 노인에서는 60% 수준으로 매우 낮은 것으로 조사되었다[20]. 칼슘의 섭취가 부족하면 뼈 건강 문제뿐만 아니라 순환기계 질환, 동맥경화, 고혈압 및 각종 성인병과도 깊은 연관이 있는 것으로 연구되고 있다[27]. 신경전달 분야에서 대부분의 관심은 신경전달 물질에 국한되어 있지만, 신경전달 과정에 있어서 칼슘은 고리형 AMP (cyclic adenosine monophosphate, c-AMP) 등과 함께 2차 전령의 하나로서 작용하고 있다는 사실을 감안하면 신경전달에서의 칼슘의 중요성이 적다고 볼 수 없어 1990년대 중반부터 많은 주목을 받고 있다. 또한, 임상적 측면에서도 칼슘이 퇴행성 치매 등의 영역과 관련이 있다는 연구결과가 발표된 바 있다[9, 25].

따라서 본 연구에서는 기억력 감퇴 예방 및 개선제의 기능성 소재로서, 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠이 scopolamine 치매유도 흰쥐에 대한 기억손상에 미치는 영향을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 식이조성

본 실험에 사용한 초석잠 분말은 지리산홍화인(함양, 경남)에서 2015년 9월 구입하였고 멸치(칼슘) 분말은 ㈜GSP(부산)로부터 제공받아 사용하였다. 식이는 Table 1과 같은 조성으로

Table 1. Composition of experimental diets (%)

	N	C	PC	S	1CS	5CS
Sucrose	45	45	45	45	45	45
Casein	20	20	20	20	20	20
α-Corn starch	15	15	15	10	10	10
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5	5	5
Mineral mix1)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix2)	1	1	1	1	1	1
L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Stachys sieboldii</i> MIQ.	-	-	-	5	4.5	2.5
Ca	-	-	-	-	0.5	2.5
Total (%)	100	100	100	100	100	100

N : Normal

C : Control, scopolamine 5 mg/kg.

PC : Positive control, scopolamine 5 mg/kg + tacrine 2 mg/kg

S : Scopolamine 5 mg/kg + *Stachys sieboldii* MIQ.

1CS : Scopolamine 5 mg/kg + low calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ.

5CS : Scopolamine 5 mg/kg + high calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ.

1) AIN 93 M-MX mineral mix, MP biomedical, Illkirch, France.

2) AIN 93 VX vitamin mix, MP biomedical, Illkirch, France.

제조하였고, 기억손상을 유발하기 위해 인지시험 24시간 전에 정상군(N)을 제외한 대조군(C), 양성대조군(PC), 시료군(S, 1CS, 5CS)에 scopolamine hydrobromide (Sigma-Aldrich Co., USA)를 5 mg/kg 용량으로 복강 투여하였다. 양성대조군(PC)은 알츠하이머병 치료제로 시판되고 있는 tacrine을 2 mg/kg 용량으로 투여하였다.

#### 실험동물 및 사육조건

실험동물은 5주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 ㈜대한바이오링크(충북 음성, 한국)로부터 구입하여 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(9:00~21:00)이 자동 설정된 동물사육실에서 사육하였다. 일주일간 시판 고형 사료를 급여하면서 사육실 환경에 적응시켰다. 적응기간 후, 각 군에서 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 정상군(N), 대조군(C: scopolamine투여), 양성대조군(PC: scopolamine + tacrine투여), 시료군(S: scopolamine + *Stachys sieboldii* MIQ.투여, 1CS: scopolamine + low calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ.투여, 5CS: scopolamine + high calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ.투여)으로 총 6군으로 나누어 Fig. 1과 같이 실험을 진행 하였다. 실험동물은 각 군마다 7마리씩 나누고 식이와 물은 자유급여 시켰으며, 사육기간 중 식이 섭취량은 매일, 체중은 7일을 주기로 일정한 시간에 측정하였다. 이 실험은 동아대학교 동물윤리위원회의 승인(DIACUC-승인-15-13)을 받아 시행하였다.

#### 동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물 실험은 3주간 각 군별로 조제 시료를 급여하면서 사육하였고, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 생화학적 분석에 제공

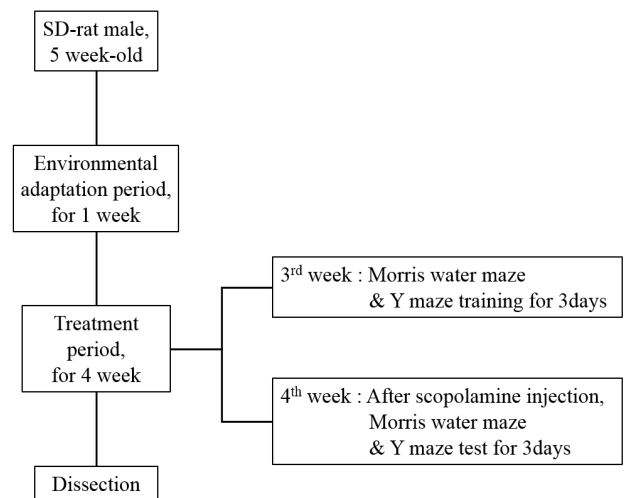


Fig. 1. Experimental design of animals.

하였다. 실험동물의 뇌 조직은 적출하고 10배의 homogenization buffer (12.5 mM sodium phosphate buffer pH7.0, 400 mM sodium chloride)로 균질화하여 1,000×g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액 일부를 효소원으로 사용하였다.

### 수중미로 실험

수중미로 실험은 Morris의 방법[21]에 따라 디자인하였다. 수중미로특정 장치는 공간학습 및 기억력을 측정하는 장비로서 지름이 140 cm, 높이가 45 cm인 원형수조 안에 물을 약 70% 채우고 우유를 넣어 안이 들여다보이지 않도록 하였다. 지름이 15 cm, 높이가 35 cm인 원형 플랫폼을 수면 아래 1.5cm 가 되도록 물 높이를 조절하였으며, 물은 온도는 23~27°C가 되도록 하였다. 원형수조는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고 이중 북동 사분원의 중심부에 원형 플랫폼을 놓고, 나머지 중 하나를 출발위치로 사용하였다.

-Training trial: 흰쥐를 수조에 넣어서 플랫폼에 도달하는 시간을 90초로 하였다. Rat가 90초 내에 플랫폼을 찾지 못하면 꺼내어 플랫폼에 올려놓고 15초 동안 방치한 후, 30초 뒤에 흰쥐를 수조에 넣고 플랫폼에 도달하는 시간을 기록하였다. Rat가 15초 내에 플랫폼에 도달하게 되면 training trial이 완료된 것으로 간주하였다.

-Test trial: training이 완료된 흰쥐들을 정상군(N), 대조군(C), 양성대조군(PC), 시료군(S, 1CS, 5CS)으로 나누어 각 군에 대하여 escape time을 측정하였다. 1일 2회씩 3일 동안 측정하였으며, 측정방법은 training trial방법과 동일하며 최대 측정 시간은 90초로 하였다.

### Y자 미로 실험

실험에 사용된 Y자 미로는 불투명 아크릴 재질로 3개의 arm으로 구성되어 있으며, 각 arm의 길이, 높이, 너비는 58, 25, 15 cm이다. 각 arm을 A, B, C로 정한 후 중심에 흰쥐를 조심스럽게 놓고 10분 동안 흰쥐가 들어간 arm의 이동경로를 기록하였으며, 1일 2회씩 3일 동안 측정하였다. 3개의 서로 다른 arm에 차례로 들어간 경우 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 이용하여 다음의 식을 통해 계산하였다[18].

$$\text{Alternation behavior (\%)} = \frac{\text{Actual alternation}}{\text{Maximum alternation}^*} \times 100$$

$$^* \text{Maximum alternation} = \text{Total number of arm entry} - 2$$

### 뇌조직의 아세틸콜린(acetylcholine) 함량 측정

아세틸콜린 함량 측정은 Hestrin의 방법[12]에 의하여 alkaline hydroxylamine을 가진  $\sigma$ -acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다. 뇌 균질액 50  $\mu$ l를 1% hydroxylamine 50  $\mu$ l를

첨가하여 혼합한 후 FeCl<sub>3</sub> (10% in 0.1 N HCl) 500  $\mu$ l를 첨가한 다음 흡광도(540 nm)를 측정하여 아세틸콜린 함량을 측정하였다.

### 뇌조직의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 활성 측정

아세틸콜린에스테라제 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법[8]을 변형하여 분석하였다. 0.1M phosphate buffer (pH 8.0) 2.6 ml, 10 mM Ellman's 용액 (10 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, 15 mM sodium bicarbonate) 100  $\mu$ l, 효소원 0.2 ml를 cuvette에 넣고 410 nm에서 흡광도를 측정한 후, 75 mM acetylcholine iodide (Sigma-Aldrich Co.) 20  $\mu$ l를 첨가하여 2분간 흡광도 변화를 측정하여 계산하였다.

### 뇌조직의 총 단백질 함량 측정

뇌조직의 총 단백질 Lowry의 방법[19]에 준하여 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 하여 측정하였다.

### Hippocampus의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 뇌를 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거한 상태에서 뇌조직의 hippocampus 부위를 취해 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4  $\mu$ m 두께로 절편을 hematoxylin and eosin (H&E) 염색한 후 광학현미경(Olympus BX41. Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였고 automatic digital slide scanner (3D Histech)을 이용하여 사진 촬영하였다 [3].

### 통계처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균과 표준오차(mean  $\pm$  SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다 [7].

## 결과 및 고찰

### Y자 미로 실험

Y자 미로 실험은 동물인지 실험에 사용되는 가장 간단한 미로이며, 다양한 자극을 통해 기억력 및 공간인지를 평가할 수 있는 방법이다[18]. Scopolamine을 투여하여 기억력과 학습능력을 손상시킨 흰쥐 모델을 대상으로 Y자 미로 실험을 실시하였고 그 결과를 Fig. 2A에 나타내었다. 10분 동안 흰쥐의 행동을 관찰한 결과, N군(100%)과 비교해 볼 때, C군의 기억력 및 공간인지력이 현저히 저하된 현상이 관찰되었다.

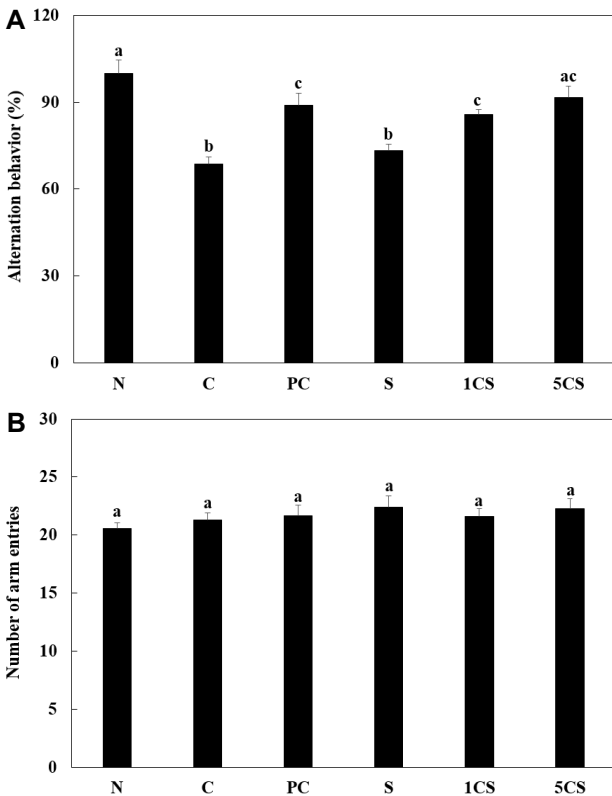


Fig. 2. Effect of the calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ. on scopolamine-induced dementia rats in Y maze test. (A) alternation behavior, (B) number of arm entries. Values are mean  $\pm$  S.E., n=7. Abbreviations are the same as in Table 1. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

S군은 C군에 비해 수치가 증가하기 하였으나 유의적인 차이가 없었다. 그러나 CS군은 칼슘농도 의존적으로 기억력 및 공간인지력을 개선시켰을 뿐만 아니라 칼슘농도가 높은 5CS군은 양성대조군인 PC군보다 높은 수치를 나타내어 높은 수준으로 기억력 및 공간인지력이 개선된 결과를 보였다.

한편, 운동능력이 변경 행동력(alternation behavior)에 미친 영향을 알아보기 위해 10분 동안 Rat가 Y자 미로의 각 arm을 통과한 총 횟수를 Fig. 2B에 나타내었다. 그 결과, arm을 통과한 총 횟수는 각 군이 약 20~22회 사이로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이를 미루어 볼 때, Kim 등[16]의 연구결과와 마찬가지로 scopolamine은 rat의 기본적인 운동능력에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 보이며, 결론적으로 S군과 CS군 모두 기억력 및 공간인지력 저하로부터 유발된 행동장애에 대한 개선효과가 있을 것으로 사료된다.

**수중미로 실험**

Scopolamine을 투여하여 기억력과 학습능력을 손상시킨 흰쥐 모델을 대상으로 초석잠 및 칼슘배합 초석잠의 효과를 확인하기 위해 해마 의존적 공간학습 능력을 평가하는 Morris

Table 2. Effect of the calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ. on scopolamine-induced dementia rats in Morris water maze test (sec)

	1Day	2Day	3Day
N	10.00 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	8.00 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	6.57 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
C	30.29 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>	26.57 $\pm$ 2.52 <sup>b</sup>	21.71 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>
PC	10.86 $\pm$ 0.74 <sup>ad</sup>	8.14 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	7.29 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
S	22.57 $\pm$ 1.17 <sup>c</sup>	19.14 $\pm$ 2.09 <sup>c</sup>	13.29 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup>
1CS	14.00 $\pm$ 0.87 <sup>d</sup>	12.00 $\pm$ 1.20 <sup>ac</sup>	9.14 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
5CS	12.00 $\pm$ 1.05 <sup>ad</sup>	10.14 $\pm$ 1.01 <sup>ac</sup>	8.71 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E., n=7.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

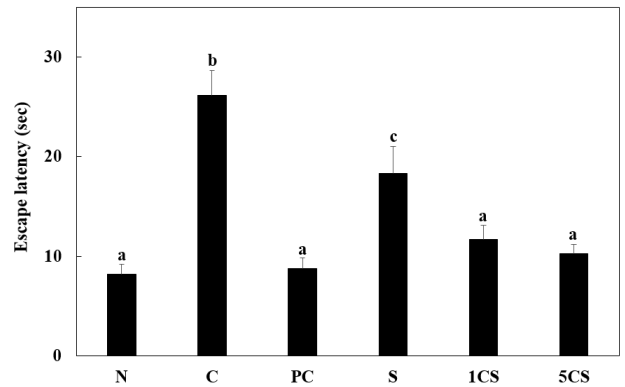


Fig. 3. Effect of the calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ. on scopolamine-induced dementia rats in Morris water maze test. Values are mean  $\pm$  S.E., n=7. Abbreviations are the same as in Table 1. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

water maze test를 시행하였고[21], 이를 Table 2와 Fig. 3에 나타내었다. Morris water maze test에서 escape latency의 감소는 장기기억과 관련된 학습능력을 나타내는 것으로, 하루 2번씩 3일간 인지훈련을 실행한 결과 C군은 수중미로 상의 platform의 위치를 찾아가는 escape latency가 감소하지 않아 scopolamine 투여를 통한 기억력과 학습능력 손상이 정상적으로 유도된 것을 확인할 수 있었다[15]. 반면, S군은 학습훈련 기간이 지날수록 C군과 비교할 때, escape latency가 점점 감소하여 유의적인 차이를 보였다. 특히, CS군은 N군과 유의적으로 유사한 수준의 개선효과를 나타내었으나, 5CS군과 1CS군 간의 유의적인 차이는 보이지 않아 칼슘 농도에 따른 개선효과는 관찰되지 않았다.

Kim 등[15]의 연구에서 flavonoids의 하나인 oroxylin-A가 scopolamine 치매유도 흰쥐에서 본 연구와 같이, 훈련기간 및 인지실험기간 동안 수중미로상의 platform의 위치를 인지하고 반복되는 훈련을 통해 escape latency가 점점 감소하였다. 이로써, 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠의 섭취가 공간지각능력에 대한 장기기억력 개선에 이로온 효과를 미친 것을 사료

된다.

**뇌조직의 아세틸콜린(acetylcholine) 함량**

아세틸콜린(ACh)은 acetyl CoA와 choline acetyltransferase (ChAT)의 효소 작용으로 합성되며, 아세틸콜린에스테라제의 작용으로 acetate와 choline으로 분해된다. ACh은 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로 중추신경계의 콜린성 시스템과 매우 관련성이 높다. 콜린성 시스템은 뇌의 신경전달물질계에서도 가장 중요한 시스템 중 하나로 기억, 학습 그리고 분화에 있어 중요한 역할을 수행한다. 그래서 알츠하이머 환자에게서 나타나는 학습능력 및 기억력 감퇴가 콜린성 신경 손상에 의한 것이라는 여러 연구 결과가 발표되고 있으며, ACh 함량의 감소는 인지능력 저하와 관련 있는 것으로 알려져 왔다[5].

칼슘 배합 비율에 따른 초석잠이 ACh 생성에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. C군의 ACh 함량은 N군에 비해 약 31.5% 감소하였고, 이는 기억력 및 학습능력의 손상을 유발하는 scopolamine의 투여에 의한 것으로 확인할 수 있다[1, 11]. S군과 CS군의 ACh 함량은 C군에 비해 높은 수치를 나타내었으며, CS군은 S군과 비교하고 약 10% 높은 ACh 함량을 보였다. 5CS군이 0.43±0.01 μmol/mg protein으로 가장 높은 수치를 보였으나 1CS군과 유의적인 차이는 보이지 않았다. 앞서 알츠하이머 질병에서 ACh 함량이 감소한다는 보고를 고려하였을 때, 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠의 섭취가 알츠하이머 환자에게 효과가 있을 것으로 사료된다.

**뇌조직의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 활성**

아세틸콜린에스테라제(AChE) 활성의 증가는 아세틸콜린 함량의 감소와 마찬가지로 인지능력저하와 관련이 있으며, AChE는 아세틸콜린을 acetate와 choline으로 분해함으로써

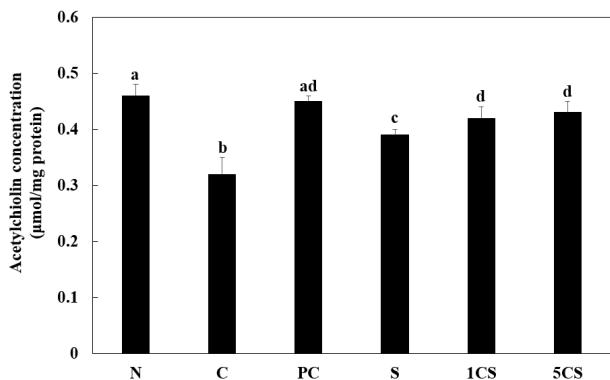


Fig. 4. Effect of the calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ. on acetylchol-in concentration in brain of scopolamine-induced dementia rats. Values are mean ± S.E., n=7. Abbreviations are the same as in Table 1. Values with different letters are significantly different at p<0.05.

콜린작용성전달(cholinergic transmission)을 저해하고 알츠하이머의 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[5]. 또한, AChE 활성이 증가되면 아세틸콜린의 함량이 감소하여 체내 신경전달이 저하되어 기억력 및 학습능력이 떨어지므로 알츠하이머 환자의 치료에 있어 AChE 억제하여 체내 아세틸콜린의 함량을 증가시키는 방법을 이용하고 있다[24].

칼슘 배합 비율에 따른 초석잠이 scopolamine 치매유도 흰쥐의 AChE 활성에 미치는 효과를 Fig. 5에 나타내었다. C군의 AChE는 N군에 비해 약 2.6배 높은 활성을 나타내었는데, 이는 앞선 아세틸콜린 함량의 결과를 참고하였을 때 scopolamine의 투여에 의해 AChE 활성이 증가하여 아세틸콜린의 함량을 감소시킨 것으로 사료된다[1, 11]. 한편, S군은 C군보다 낮은 AChE 활성을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않아 초석잠 자체의 AChE 활성 저해 효과는 확인하지 못했다. 하지만 CS군은 C군보다 현저히 감소하여 tacrine을 투여한 양성대조군 PC군과 유사한 활성을 보였다. 5CS군은 아세틸콜린 함량처럼 약 1.58±0.15 unit/mg protein/min로 가장 낮은 활성을 보였으나 1CS군과 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이와 같은 결과를 토대로, 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠이 PC군에 사용된 tacrine과 같은 AChE inhibitor 치매 치료제와 같이 AChE 활성을 저하시켜 아세틸콜린의 함량을 증가시키므로 기억력 및 학습능력 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

**Hippocampus의 병리조직학적 관찰**

뇌 조직은 실험동물을 해부한 직후 적출하여 H&E 염색을 통해 광학 현미경으로 해마(hippocampus)을 관찰하여 Fig. 6에 나타내었고 응축된 신경세포는 화살표를 이용해 표시하였다. Scopolamine은 무스카린 콜린성수용체 길항제로서 작용하기 때문에 흰쥐에 투여하면 뇌신경뿐만 아니라 해마의 신경세포들을 손상 및 위축시킨다고 알려져 있다[5]. C군에서는 뚜렷하게 등근 핵을 가지고 일정한 구조를 유지하고 있는 N군

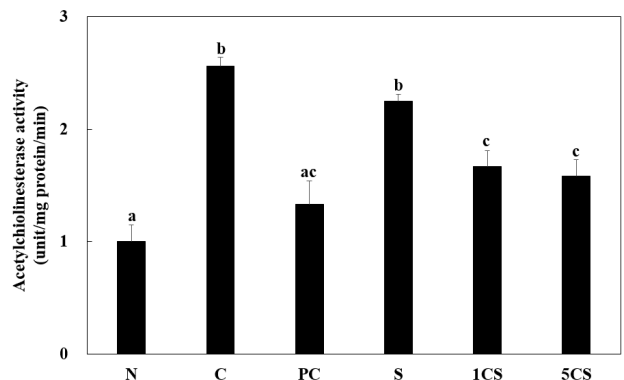


Fig. 5. Effect of the calcium-mixed *Stachys sieboldii* MIQ. on acetylchol-inesterase activity in brain of scopolamine-induced dementia rats. Values are mean ± S.E., n=7. Abbreviations are the same as in Table 1. Values with different letters are significantly different at p<0.05.

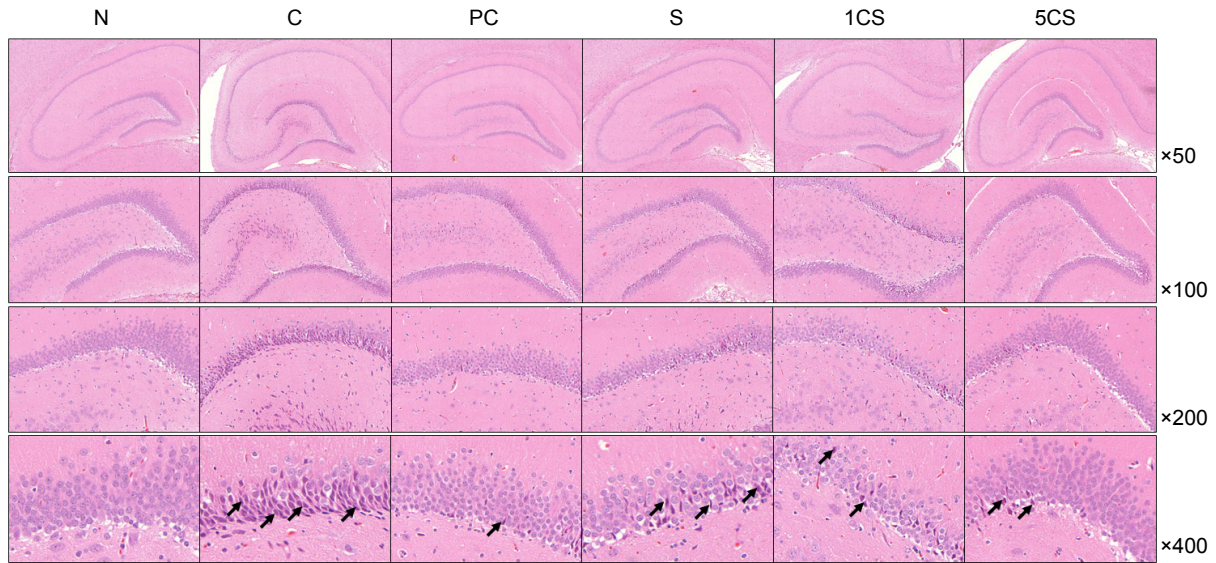


Fig. 6. Histopathologic changes in hippocampus of brain on scopolamine-induced dementia rats. The brain sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E stain). Abbreviations are the same as in Table 1.

에 비하여 해마의 신경세포가 매우 응축되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. Kim 등[17]의 연구에서도 scopolamine의 투여가 해마 신경세포의 병리조직학적 결과에 미치는 영향이 본 연구와 유사하게 나타났다. S군과 CS군에서는 C군에 비하여 손상이나 응축 정도가 감소하였고, CS군은 S군보다 응축된 신경세포 수가 현저하게 감소하여 손상 정도가 미약한 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 scopolamine 치매유도 흰쥐에 투여된 칼슘 배합 비율에 따른 초석잡이 해마의 신경세포 손상을 해마의 신경세포 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2015년 산업통상자원부와 한국산업기술평화지원의 지역특화산업육성사업(과제번호:R0004415)으로 수행된 연구결과입니다.

### References

- Bae, D. H., Kim, J. H., Na, J. R., Kim, Y. J., Lee, J. Y. and Kim, S. O. 2014. Anti-amnesic effect of *Eriobotrya japonica* leaf extract on scopolamine-induced memory impairment in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 799-806.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B. and Lippa, A. S. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.
- Cha, J. Y., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2004. Prevention of orotic acid-induced fatty liver in rats by capsaicin. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 597-602.
- Colye, J. T., Price, D. L. and DeLong, M. R. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**, 1184-1190.
- Davies, P. and Maloney, A. J. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403.
- Doody, R. S. 1999. Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology* **45**, 23-32.
- Duncan, D. B. 1959. Multiple rage and multiple F test. *Biometrics* **13**, 11-42.
- Ellman, G. I., Courtney, J. O., Andres, V. and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Freeman, T. W., Clothier, J. L., Pazzaglia, P., Lesem, M. D. and Swann, A. C. 1992. A double blind comparison of valproate and lithium in the treatment of acute mania. *Am. J. Psychiat.* **149**, 108-111.
- Ghoneim, M. M. and Mewaldt, S. P. 1977. Studies on human memory: the interaction of diazepam, scopolamine, and physostigmine. *Psychopharmacology* **52**, 1-6.
- Heo, J. S., Kim, J. B., Cho, S. Y., Sohn, K. H. and Choi, J. W. 2014. Low-salt *Todarodes pacificus* Jeotgal improves the learning and memory impairments in scopolamine-induced dementia rats. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 195-203.
- Hestrin, S. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **180**, 249-261.
- International Society for Horticultural Science. 1990. *Elsevier's Dictionary of Horticultural and Agricultural Plant Production*, pp 72, 20rd (eds.), Elsevier Science Publication. Netherlands.
- Kidd, P. M. 2008. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: Current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern. Med. Rev.* **13**, 85-115.
- Kim, D. H., Jeon, S. J., Son, K. H., Jung, J. W., Lee, S. J., Yoon, B. H., Cho, Y. W., Cheong, J. H., Ko, K. H. and Ryu,

- J. H. 2007. The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **87**, 536-546.
16. Kim, H. J., Jeong, J. H., Jo, Y. N., Jin, D. E., Jin, S. I., Kim, M. J. and Heo, H. J. 2013. Effect of Daebo (*Castanea crenata*) inner skin extract on TMT-induced learning and memory injury. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 661-665.
17. Kim, J. H., Choo, H. N., Park, E. H., Jeong, J. K., Kim, K. O. and Kim, J. S. 2013. Effect of *Gastrodia elata* extracts on scopolamine-induced memory impairment in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 595-599.
18. Kim, M. G., Choi, S. J., Lim, S. T., Kim, H. K., Heo, H. J., Kim, E. K., Jun, W. J., Cho, H. Y., Kim, Y. J. and Shin, D. H. 2007. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1063-1068.
19. Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
20. Ministry of Health and Welfare. Korea Health Statistics 2011. Korea national health and nutrition examination survey. Korea Centers for Disease Control and Prevent.
21. Morris, R. 1984. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci Meth.* **11**, 47-60.
22. Snow, R. E. and Arnold, S. E. 1996. Psychosis in neurodegenerative disease. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* **1**, 282-293.
23. Takeda, Y., Fujita, T., Satoh, T. and Kakegawa, H. 1985. On the glycoside constituents of *Stachys sieboldii* MIQ. and their effects on hyaluronidase activity. *Yakugaku Zasshi* **105**, 955-959.
24. Talesa, V. N. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.* **122**, 1961-1969.
25. Tollefson, G. D. 1990. Short-term effects of the calcium channel blocker nimodipine (bay-e-9736) in the treatment of primary degenerative dementia. *Biol. Psychiat.* **27**, 1133-1142.
26. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T. and DeLong, M. R., 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. of Neurol.* **10**, 122-126.
27. Yacowitz, H., Fleischman, A. I., Amsden, R. T. and Bierenbaum, M. L. 1967. Effects of dietary calcium upon lipid metabolism in rats fed saturated or unsaturated fat. *J. Nutr.* **92**, 389-392.
28. Yamahara, J., Kitani, T., Kobayashi, H. and Kawahara, Y. 1990. Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents. *Yakugaku Zasshi* **110**, 932-935.

## 초록 : 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠의 scopolamine 치매유도 흰쥐에 대한 기억손상 개선 효과

최다정<sup>1</sup> · 안희영<sup>1</sup> · 김영완<sup>1</sup> · 김태훈<sup>1</sup> · 김만도<sup>2</sup> · 조영수<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>2</sup>㈜지에스피)

본 연구는 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠이 scopolamine 치매유도 흰쥐의 기억손상 개선효과에 대하여 연구하였다. 칼슘 배합 비율별(S, 1CS, 5CS군)로 군을 나누어 Y자 미로와 수중미로를 통한 행동실험을 실시한 결과, Y자 미로 실험에서 5CS군이 N군과 비교하였을 때 유사한 수치를 보이며 공간 인지능을 개선시켰고, 수중미로 실험 또한 CS군의 escape latency가 감소하여 N군과 유사한 수치를 보여 기억력 및 학습능력 개선에 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 아세틸콜린 함량과 아세틸콜린에스테라제의 활성을 측정된 결과, CS군은 아세틸콜린에스테라제의 활성을 저해함으로써 뇌 조직 내 신경전달물질인 아세틸콜린의 함량을 증가시켜 뇌 신경세포 활성화 효과를 통해 인지능력 개선 효과를 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 해마를 병리조직학적으로 관찰한 결과, 앞선 결과와 유사하게 손상 정도가 심하여 많은 수의 응축된 신경세포가 관찰된 C군에 비하여 CS군은 응축된 신경세포 수가 현저하게 감소하여 신경세포 손상을 억제한 것으로 보인다. 따라서 칼슘 배합 비율에 따른 초석잠은 scopolamine 치매유도 흰쥐모델에서 기억력, 학습능력 및 인지능력 개선에 효과적으로 작용하는 천연물 유래 기능성 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.