

Scopolamine 유발 기억력 손상 마우스 모델에서 목향(木香)의 기억력 개선 및 항산화 효과

박나은, 한다영, 김상호, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과교실

Aucklandiae Radix Ameliorates Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Na-eun Park, Da-young Han, Sang-ho Kim, Dae-kyoo Chung

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University

Received: May 26, 2017
Revised: June 10, 2017
Accepted: June 12, 2017

Objectives: The objective of this study is to investigate the anti-amnesic effects of AR, Aucklandiae Radix, ground powder on scopolamine (Sco)-induced memory impairment in mice (C57BL/6) through its favorable acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) activity, Choline acetyltransferase (ChAT) mRNA expression, and antioxidant effect.

Methods: Six groups, a total of 20 intact or 100 Sco treated mice, were selected based on their body weights and were used in this study. Half of the mice in each group were used for the passive avoidance task test and the measurements of hippocampus ACh content, AChE activity and ChAT mRNA expression. The remaining half of the mice in each group were used for the Morris water maze test and cerebral antioxidant defense system measurement.

Results: Marked decreases in step-through latency times in the passive avoidance task test and increases in escape latency times in the Morris water maze test were observed with decreases in the hippocampus ACh content and ChAT mRNA expression, and increases in the hippocampal AChE activities, as a result of Sco intraperitoneal treatment, in the present study. In addition, destruction of the cerebral cortex antioxidant defense systems was observed in Sco control mice as compared with intact vehicle control mice. However, 28 days of continuous oral pre-treatment with AR ground powder at doses of 400, 200 and 100 mg/kg markedly and dose-dependently inhibited the Sco treatment-related amnesia.

Conclusions: The results prove that oral administration of AR ground powder reduces Sco-induced memory impairment. This is because it can preserve ACh, related to ChAT mRNA expression, cause AChE inhibition, and activate the cerebral antioxidant defense system.

Key Words: Aucklandiae Radix, Tacrine, Scopolamine, ACh, AChE, ChAT mRNA, Cerebral antioxidant defense system, Memory impairment.

Correspondence to
Dae-kyoo Chung
Department of Oriental
Neuropsychiatry, College of Korean
Medicine, Daegu Hanny University,
Sang-dong, Suseong-gu, Daegu,
Korea.
Tel: +82-53-770-2243
Fax: +82-53-770-2169
E-mail: secret-101@hanmail.net

I. 서론

현대사회가 점점 고령화 되어갈수록 노인성 질환에 대한 사회적 관심이 높아지고 있다. 그 중 치매는 주로 노년기에 많이 생기며 65세 이상에서의 유병률이 2.2~8.8%에 이르는 질환으로 심장병과 암, 그리고 뇌졸중에 이어 4대 주요 사인으로 불리는 기질성 장애이다¹⁾. 치매를 유발하는 가장 흔한 질환은 알츠하이머병으로 대뇌피질세포의 점진적인 소실로 인하여 기억장애를 포함한 전반적인 인지기능장애가 발생하고 행동심리증상이 나타나며 진행되면 결국은 모든 일상생활 수행능력을 상실하는 병이다²⁾.

알츠하이머병과 관계가 깊은 신경전달물질은 아세틸콜린으로 콜린성 신경전달 기능을 강화하는 것이 현재 알츠하이머병 치료제의 기전이다. 현재 임상에서 널리 활용되는 것은 아세틸콜린에스테라아제 억제제로 Tacrine, Donepezil, Rivastigmin, Glantamine 등이 있다²⁾. 그 중 Tacrine은 소수성으로 혈관뇌장벽을 쉽게 통과한다는 장점이 있으나 반감기가 짧아 1일 4회 복용해야 하며 투약 후 30% 정도에서 잠재적으로 간독성을 일으켜 인체 투약에 적합하지 않다³⁾. 또한 이러한 약물들은 알츠하이머병의 진행을 더디게 할뿐 완치할 수는 없으므로 현재 부작용이 없는 알츠하이머 치료 약물개발에 대한 연구가 매우 필요한 실정이다.

알츠하이머병은 한의학의 치매의 범주에 속하는데 한의 학에서는 정지가 손상되고 기기가 울결되어 오래되거나 간의 울결이 오래되어 비토(脾土)를 극(克)하게 되면 담탁(痰濁)이 내생하여 위로 정신을 몽롱하게 하면 치매가 된다고 하였다¹⁾. 이에 따라 기기의 승강을 돕고 울체를 풀어주는 이기제가 치매 치료에 활용할 수 있으리라 생각된다.

목향(木香) (Aucklandiae Radix, 이하 AR)은 대표적인 이기제로서 국화과에 속한 다년생 초초인 운목향의 뿌리이며 성(性)은 온(溫)하고 미(味)는 신고(辛苦)하다. 또한 행기 지통(行氣止痛), 건비소식(健脾消食) 효능이 있어 복통, 이질, 설사, 식체에 주로 사용하여 왔다. 목향(木香)의 신미(辛味)는 산(散)하고 고미(苦味)는 강(降)하며 온통(溫通)하고 방향성은 조(燥)하며 승강(升降)작용이 있어 장(腸)과 위(胃)의 기체를 통행시킨다⁴⁾. 현대의 연구에서는 목향(木香)에서 추출된 물질이 혈관을 확장시키고 염증을 억제하며 항암효과가 있다는 보고가 있으며^{5,6)}, 간보호 효과 및 면역조절 효과가 있다는 연구 결과도 있다^{7,8)}.

한편 목향(木香)은 성향산(星香散), 성향정기산(星香正氣散) 등의 주요 구성약물로서 증풍 및 뇌손상에도 이용되어 왔으며⁹⁾ 이와 관련된 연구로는 Chang 등¹⁰⁾이 목향 뿌리의 다양한 용매 분획물을 이용하여 항산화 효과를 보고한 것과 Ryu 등⁹⁾이 정상 산소 환경에서 대뇌피질의 신경세포에 대한 보호 작용을 보고한 연구 등이 있다. 하지만 알츠하이머 병의 기억력 개선에 관련된 목향(木香)의 실험 연구는 찾을 수 없었으며, 특히 항건망과 항산화 효과에 대한 약물의 투여 용량과 관련한 연구는 시행되지 않았다. 이에 본 실험에서는 목향(木香)의 기억력 개선효과와 항산화 효과를 약물의 투여 용량과 관련하여 알아보았다.

이에 저자는 목향(木香)을 기계적으로 미세 분쇄한 분말 400, 200, 100 mg/kg을 Scopolamine (Sco)으로 기억력 손상이 유도된 마우스에게 투여하고 체중, Acetylcholine (ACh) 함량 및 Acetylcholinesterase (AChE)활성, Choline acetyltransferase (ChAT) mRNA 발현, 항산화 활성 등을 측정하였으며, 수동회피실험 및 모리스 수중미로 실험을 통해 기억력 개선에 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 관리

총 120마리의 몸무게 18~21 g인 건강한 6주령 수컷 마우스 [C57BL/6]가 7일 동안의 순화 후에 사용되었으며 주식회사 오리엔트바이오(OrientBio, Seungnam, Korea)에서 공급받았다.

마우스들은 온도 20~25°C, 습도 50~55%의 polycarbonate 우리에 5마리씩 분배되었고 명암주기는 12시간이었으며 사료(Samyang, Seoul, Korea)와 물은 항시 접근 가능했다. 동물 실험은 실험용 동물의 사용과 복지에 관한 국가 규정에 맞춰 행해졌으며 ○○대학교 내부의 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았다(Approval No DHU2016-037).

2. 실험군 분류

총 20마리의 무처치군과 100마리의 Scopolamine (Sco) 처치군은 6 그룹으로 나뉘어졌으며 1주일간의 순화 후 몸무게를 기준으로(Mean body weights: 21.95±1.25 g, ranged in 19.40~25.40 g) 선택되었다. 각각의 그룹에서 절반의 동물들은 수동회피 실험(Passive avoidance test)과

해마부위의 ACh 함량, AChE 활성, ChAT mRNA 발현 관찰에 사용되었고, 나머지 절반은 모리스 수중미로 실험 (Morris water-maze test)과 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템을 측정하는데 사용되었다(Table 1, Fig. 1).

3. 실험물질의 준비 및 투여

1) 실험물질의 준비: AR, Tacrine

AR은 현미경으로 형태 검사 후 옴니허브(Omniherb, Yeungcheon, Korea; Product region - China)에서 구매했으며 AR 분말은 전자 그라인더(Sungchang Machine Co., Seungnam, Korea)를 사용하여 준비하였다. 총 80 g의 수율 100% AR 분말이 획득되었다. 이 구매에 자료가 되는 바우처 표본과 AR 분말의 표본 일부는 ○○대학교의 방제과학 글로벌 연구 센터의 식물 표본집에 맡겨졌다 (Code ARgp2016Ku01).

투명한 고체형태의 tacrine hydrochloride는 Sigma-

Aldrich사(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)에서 제공받아 대조군으로 사용되었다.

2) 실험물질의 투여

AR 분말과 Tacrine은 사용되기 전까지 빛과 습도로부터 보호하기 위해서 -20°C 로 각각 냉장보관 되었다. 두 약물 들은 증류수에 모두 잘 떠있거나 용해되었다. 세 가지 다른 용량의 400, 200, 100 mg/kg AR 분말은 증류수에서 즉시 부유했고, 위관 영양법을 사용하여 10 ml/kg의 용량으로 경구투여 되었다. Tacrine 또한 증류수에 잘 용해되었으며 10 mg/kg의 용량으로 경구투여 되었다. 정상 대조군과 Sco 대조군의 마우스들에게는 시약 대신에 같은 양의 증류수가 투여되었다.

4. Scopolamine으로 유발된 기억 손상

기억 손상은 Scopolamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)로 유발되었고 약물투여 시

Table 1. Experimental Design for This Study

Groups	Inducer	Group Identification	Treatment
Effects of AR on the rat model of Sco			
Control	Saline, vehicle	Intact vehicle control	Distilled water 10 ml/kg/day, oral gavage
Control	Sco	Sco control	Distilled water 10 ml/kg/day, oral gavage
Reference	Sco	Tacrine	Tacrine 10 mg/kg/day, oral gavage
Active	Sco	AR 400	The highest dosages of AR 400 mg/kg/day, oral gavage
Active	Sco	AR 200	The middle dosages of AR 200 mg/kg/day, oral gavage
Active	Sco	AR 100	The lowest dosages of AR 100 mg/kg/day, oral gavage

AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine, AChE: Acetylcholinesterase, ChAT: Choline acetyltransferase.

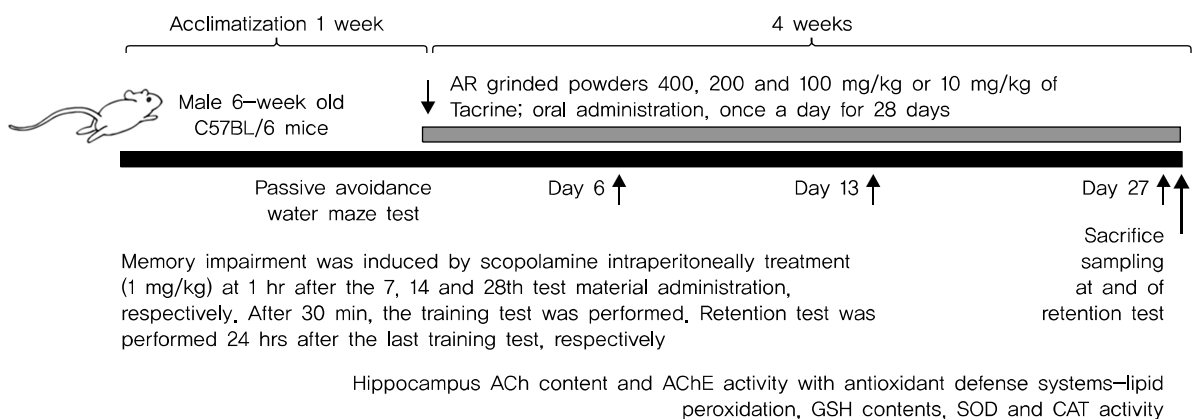


Fig. 1. Experimental design used in this study.

AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine, AChE: Acetylcholinesterase, CAT: Catalase, ChAT: Choline acetyltransferase, GSH: Glutathione, SOD: Superoxide dismutase.

작 7, 14, 28일 제날 약물투여 1시간 후에 이전의 연구들에 따라¹¹⁻¹³⁾ 각각 복강 주사되었다. Sco는 멸균 생리식염수에 용해되어서 10 ml/kg 용량으로 복강 주사되었고 정상 대조군의 마우스들은 동일한 용량의 멸균 생리식염수가 Sco 대신에 복강 주사되었다.

5. 체중측정

몸무게의 변화는 최초 약물투여 하루 전과 최초로 tacrine이나 AR 분말을 투여한 후 1, 6, 13, 20, 27, 28일째 되는 날 자동전자저울(Precisa Instrument, Dietikon, Switzerland)으로 측정하였다. 개체별 차이를 줄이기 위해서 28일의 실험 기간 동안의 체중 증가는 최종희생일, 즉 28번째 약물 투여로부터 24시간이 지난후의 몸무게에서 첫 번째 약물 투여 날의 몸무게를 뺀 값으로 계산하였다.

6. 수동회피 실험(Passive avoidance task test)

수동회피 실험에는 빛/소음 시스템과 전기 격자 바닥이 각각 설치된 두 개의 분리된 박스가 사용되었다. 이는 Hung 등¹⁴⁾과 Nam과 Lee¹⁵⁾의 연구에서 사용된 방법이며 Sco 처치 30분 후에 다음과 같은 절차로 훈련 시험이 진행되었다: 각각의 마우스들을 시험 박스의 빛/소음 시설에 배치한다. 15초 후 빛과 소음이 빛/소음 시설에 적용되고 마우스가 인접해있는 석쇠 바닥의 박스로 달아날 때 까지 지속된다. 마우스가 이 석쇠 바닥의 박스로 이동하고 나면, 두 상자 사이에 있는 단두대형 문은 즉시 자동으로 닫히게 되고, 3.0 mA의 전기 충격이 3초간 격자 바닥에 전달된다. 전기 쇼크 상자에 120초 이내에 들어가지 못한 마우스들은 다음 실험에서 배제되었다.

기억력 검사(retention test)는 훈련 검사(training test) 시행 24시간 후에 같은 방법으로 수행되었다. 상자간의 이동시간은 체류잡복기(step-through latency time)으로 기록되었고, 300초를 최대 상한선으로 제한하였다. 수동회피 실험은 최초 투여일로부터 29일 후, Sco 처치 후 24시간 후에 시행되었다.

7. 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)

모리스 수중미로 실험은 모리스¹⁶⁾에 의해 고안되고 Hung 등¹⁴⁾과 Nam과 Lee¹⁵⁾에 의해 변형된 방법으로 시행

되었다. 이 테스트는 원형 수조(지름 100 cm, 높이 37 cm)에서 시행되었으며 수조안에는 22°C의 물이 27 cm 가량 채워졌다. 마우스들의 타겟인 탈출 플랫폼은 지름 10 cm의 크기로 수조의 4분면 중 하나에 물표면에 약간 잠기게 설치했다. Sco 처치 후 30분 후에 training test는 다음과 같은 방법으로 시행되었다: 각각의 마우스는 물 속에 위치되었고 탈출 플랫폼을 찾게 된다. 전체 과정은 video tracking system (Smart junior, PanLab., Barcelona, Spain)을 통해 관찰되었다. 마우스가 성공적으로 플랫폼 위에 올라서면, 10초간 플랫폼 위에서 머물도록 한다. 하지만, 만약 마우스가 150초 내에 플랫폼을 찾지 못하면, 플랫폼 위로 옮겨져서 10초 동안 머물게 된다. 기억력 검사(retention test)는 훈련 검사(training test) 시행 24시간 후에 위에 기술된 것과 같은 조건으로 시행한다. 마우스들이 물 속에서부터 플랫폼에 도달하기까지 걸리는 시간은 탈출 잠복기(escape latency time)로 측정되었으며 300초를 최대 제한시간으로 하였다. 모리스 수중미로 실험은 첫 시험 물질 투여 후 29일 후, 각각의 Sco 처치 24시간 후 측정되었다. 이 실험은 수동회피 실험에 사용된 동물들과는 구별하여 시행하였다.

8. 아세틸콜린(ACh) 및 아세틸콜린 에스테라제(AChE) 활성도 분석

수동회피 실험 후 마우스들은 최종희생 되었으며 해마부위를 제거하고 얼음 위에 해부하여 분석 때까지 -150°C로 냉동하여 보관하였다(Ultradeep freezer, Sanyo, Tokyo, Japan).

분리된 해마는 Del Rio 등¹⁷⁾이 기술한 대로 무게 측정 후 차가운 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4 조건에서 균질화하여, 15분간 12,000 g로 원심분리 하였다. 해마 조직에서의 ACh 수치와 AChE 활성도를 알아보기 위해 Amplex Red ACh/AChE assay kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 사용하였고, 2 U/ml horseradish peroxidase와 0.2 U/ml choline oxidase를 포함한 400 μ M AmplexRed reagent를 working solution으로 준비하였다. CBe가 조직의 ACh 수치와 AChE 활동성에 미치는 영향을 측정하기 위해서, 100 U/ml AChE 과 100 μ M ACh가 각각 ACh 수치와 AChE 활동성 측정을 위해 첨가되었다. 100 μ l의 working solution이 microplate well 샘플에 첨가되었을 때 반응이 시작되었다. 각각의 샘플들에서 방출된 형광 발광

은 VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 감지하였으며 560 nm의 여자파장 (excitation wavelength)과 590 nm의 방출파장(emission wavelength)이 사용되었다. 배경의 형광 발광은 negative 컨트롤에서 측출한 값을 빼서 제외하였다.

9. 양적 RT-PCR을 이용한 ChAT mRNA 발현

RNA는 Trizol 시약을 사용하여 수동회피 실험이 끝난 후 즉시 희생된 마우스들의 해마 조직으로부터 추출하였으며, 이 등¹³⁾의 이전 실험에 기술된 방법을 따랐다. RNA 농도와 품질은 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정되었고 오염된 DNA를 제거하기 위해서 샘플들은 재조합형 DNase I (DNA-free; Ambion, Austin, TX, USA)로 처리하였다. RNA는 제조사의 매뉴얼에 따라 reagent High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 역전사 하였다. cDNA strand first는 총 RNA로부터 합성되었고 primer혼합체와 cDNA는 다음의 primer들을 이용하여 PCR로 증폭되었다(Bioneer, Daejeon, Korea) : ChAT, 5'-CTTGGATGGTCCAGG- CAC-3' and 5'-GTCATACCAACGATTCGCTCC-3'; β -actin, 5'-TGGTGGGTATG- GGT CAGAAG-3' and 5'-CATGGCT GGGGTTGAAGG-3'.

PCR 증폭의 조건은 58°C에서 30분, 94°C에서 2분, 94°C에서 15초간 35 cycle, 60°C에서 30초, 68°C에서 1분 그리고 72°C에서 5분이었다. ChAT의 발현 수치는 β -actin RNA를 내부 대조군으로 사용하여 정상군과 비교한 수치를 백분율로 계산하였다.

10. 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템

28일째 마우스들은 모리스 수중미로 실험을 끝낸 후 즉시 희생되었다. 대뇌 피질이 제거되었고 대뇌의 항산화 방어 시스템을 알아보기 위해서 Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) contents, Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) 효소의 활성이 각각 측정되었다. 분리된 대뇌 피질의 무게를 측정된 후, 10 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl 그리고 0.1 M MEDTA (pH 7.4)로 구성된 완충액과 혼합하였고 이후 15분간 12,000 g에서 원심분리 하였다¹⁸⁾. 뇌지질 과산화의 농도는 UV/VIS 분광 광도계(OPTIZEN POP, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 1 g당 nM of

MDA으로 흡광도 525 nm에서 Thiobarbituric acid (TBA) test를 사용하여 측정하였다¹⁹⁾. 총 단백질의 양은 bovine serum albumin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 내부 기준으로 이용한 방식²⁰⁾을 따랐으며, GSH 함량의 측정은 준비된 혼합물과 25% trichloroacetic acid 0.1 ml (Merck, San Francisco, CA, USA)를 섞어 4,200 rpm으로 4°C에서 40분 동안 원심분리 하였다.

GSH 함유량은 2-nitrobenzoic acid (Sigma Aldrich, St. Louise, MO, USA)를 nM/mg 단백질로 사용하여 흡광도 412 nm에서 측정하였다²¹⁾. H₂O₂의 분해는 CAT의 존재하에 240 nm에서 시행하였고²²⁾, CAT 활성도는 1 nM의 H₂O₂를 분당 25°C, pH 7.8의 조건에서 분해하는데 필요한 효소의 양으로 정의 하였다. 결과는 U/mg 단백질로 표현되었다. SOD 활성도의 측정은 Sun 등²³⁾의 논문을 따라 시행했으며 SOD 추정치는 nitroterazolium blue와 반응하여 formazan 염료를 형성하는 xanthine과 xanthine oxidase에서 생성되는 superoxide radicals의 형성에 기초하였다. 그 후 SOD 활성은 이 반응을 억제하는 정도인 560 nm에서 측정하였고 U/mg 단백질로 표현했다. SOD 효소 활성도의 한 단위는 nitroblue tetrazolium의 초기 흡수도를 1분에 50%로 줄어들게 만드는 효소의 양과 동일하다.

11. 통계분석

본 실험에서 모든 데이터는 평균±표준편차(SD)로 표현되었으며 다른 용량의 그룹에 대해서는 다중 비교 테스트가 시행되었다. 분산의 동질성은 Levene 테스트²⁴⁾를 사용하여 조사하였다. Levene 테스트에서 분산의 동질성에서 유의성이 없으면, 데이터는 그룹들 간의 유의성을 측정하기 위해 one way ANOVA test 후 least-significant differences (LSD) multi-comparison test로 검증하였다. Levene 테스트에서 분산의 동질성에 유의한 편향이 있을 경우를 대비하여, 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 시행하였다. Kruskal-Wallis H test에서 유의한 차이가 있을 경우, Mann-Whitney U (MW) test를 시행하여 군과 군 사이의 유의성을 검증하였다. 통계 분석은 SPSS for Windows (Release 14.0K, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 사용하여 시행하였다. 추가로 정상군과 Sco 대조군 간의 백분율 변화는 Sco의 복강 내 투여로 유발된 기억 상실의 심각도를 관찰하기 위해 [(Data derived from Sco control -

Data derived from intact vehicle control mice)/Data of intact vehicle control mice)×100]로 계산되었다.

Sco 대조군과 약물 투여 군의 마우스들을 비교한 백분율의 변화는 테스트 약물의 효율성에 대한 이해를 돕기 위해 [(Data derived from test material treated mice–Data derived from Sco control mice)÷Data of Sco control mice)×100]로 Kang 등²⁵⁾이 고안한 방법으로 계산되었다.

III. 결과

1. 몸무게의 변화

정상군과 대비했을 때 Sco를 주사한 군에서 28일간의 실험기간 동안 의미있는 몸무게의 차이는 없었다. 또한 AR 분말이나 tacrine 10 mg/kg을 투여한 마우스들에게도 Sco 대조군의 마우스들과 비교했을 때 유의한 차이가 없었다 (Table 2, Fig. 2).

정상군과 대비해서 Sco 대조군은 28일 동안 -2.97%의 몸무게 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg군과 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg군에서 Sco 대조군과 비교했을 때 각각 2.29, -1.40, 1.91, 1.27%의 변화를 보였다.

2. 수동회피 실험의 결과

Sco 대조군에서는 정상군과 대비했을 때 유의성 있는 체류잠복기의 감소가 관찰되었다(p<0.01). Tacrine 10 mg/kg 투여군과 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 Sco 대조군과 대비했을 때 각각 유의성 있는 체류잠복기의

증가가 관찰되었다. AR 분말 200 mg/kg 투여군은 수동회피 실험에서 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사한 효과를 보였다(Fig. 3).

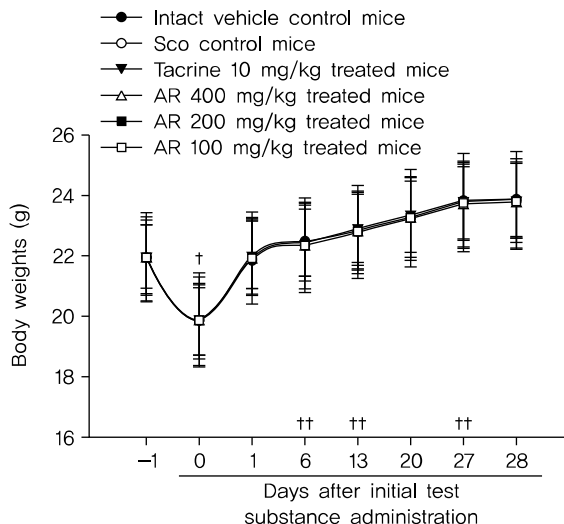


Fig. 2. Body weight changes in normal mice and Sco-induced amnesia mice. There were no significant changes on the body weight and gains during 28 days of experimental periods in all Sco treated mice as compared with intact vehicle control mice and also no meaningful changes on the body weight gains were detected in all three different dosages of AR and tacrine 10 mg/kg treated mice as compared with Sco control mice, respectively. Values are expressed as Mean±S.D. of twenty mice. The day -1 means a day before first administration of test materials. The day 0 means at initial test material administration. †All animals were not allowed to eat overnight before first test material administration. ††Sco was treated intraperitoneally at 1 hr after the 7, 14 and 28th test material administration. AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine.

Table 2. Changes on the Body Weight Gains in Intact Mice and Scopolamine-induced Amnesia Mice

Groups	Times		Weight gains [B - A]
	Body weights at		
	First administration* [A]	Sacrifice [B]	
Controls			
Intact vehicle	19.84±1.47	23.89±1.24	4.05±0.63
Scopolamine	19.86±1.24	23.78±1.34	3.93±0.55
Tacrine 10 mg/kg	19.84±1.12	23.86±1.21	4.02±0.39
AR treated			
400 mg/kg	19.85±1.25	23.72±1.50	3.87±0.52
200 mg/kg	19.84±1.23	23.84±1.25	4.00±0.41
100 mg/kg	19.90±1.57	23.87±1.60	3.98±0.49

Values are expressed as Mean ± S.D. of twenty mice, g.

AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders. Sacrifice means at 28 days after first test material treatment, 24 hrs after last 3rd scopolamine treatment.

*All animals were not allowed to eat overnight before initial test material treatment.

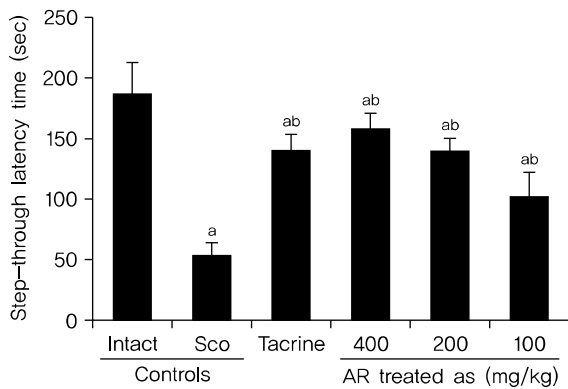


Fig. 3. Changes on the step-through latency times of passive avoidance task test in intact vehicle control and Sco-induced amnesia mice. In Sco control mice, there were significant decreases of the step-through latency times as compared with intact vehicle control mice. However, there were meaningful increases of step-through latency times in tacrine 10 mg/kg, AR 400, 200 and 100 mg/kg treated mice as compared with Sco control mice, respectively. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. ^a $p < 0.01$ as compared with intact vehicle control by LSD test. ^b $p < 0.01$ as compared with Sco control by LSD test. AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine.

체류잠복기는 Sco 대조군의 마우스들에서 정상대조군에 비해 -71.02%의 변화를 보였고 tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 그룹에서는 각각 Sco 대조군과 비교했을 때 158.23, 192.05, 156.75, 87.06%의 변화를 보였다.

3. 모리스 수중미로 실험의 결과

정상군과 대비하였을 때 Sco 대조군의 마우스들에서는 탈출잠복기가 유의하게($p < 0.01$) 증가되어 나타났다. tacrine 10 mg/kg 군을 포함한 모든 처치군에서는 Sco 대조군과 비교하여 유의한($p < 0.01$) 탈출잠복기의 감소가 관찰되었다. AR 분말 200 mg/kg 투여군은 이번 실험에서 tacrine 10 mg/kg 군과 유사한 효과를 보였다(Fig. 4).

Sco 대조군 마우스들에게서 탈출잠복기는 정상군과 대비했을 때 215.11%의 변화를 보였고, tacrine 10 mg/kg 그룹과 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여 그룹은 Sco 대조군의 마우스들과 비교했을 때 각각 -56.43, -65.87, -54.60, -39.57%의 변화를 보였다.

4. 해마조직 내의 ACh 함량의 변화

정상군과 비교하였을 때 Sco 대조군의 마우스들에게서

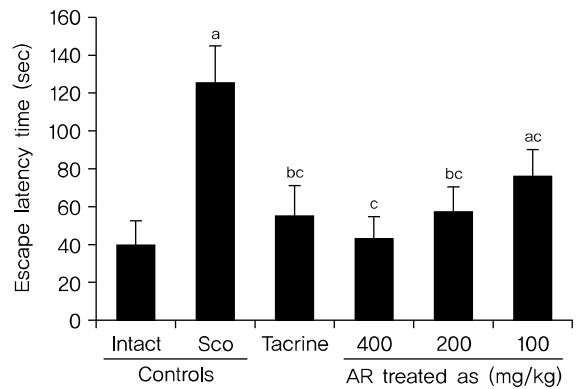


Fig. 4. Changes on the escape latency times of morris water maze test in intact vehicle control and Sco-induced amnesia mice. In Sco control mice, there were significant increases of the escape latency times as compared with intact vehicle control mice. However, there were meaningful decreases of escape latency times in tacrine 10 mg/kg, AR 400, 200 and 100 mg/kg treated mice as compared with Sco control mice, respectively. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. ^a $p < 0.01$ and ^b $p < 0.05$ as compared with intact vehicle control by LSD test. ^c $p < 0.01$ as compared with Sco control by LSD test. AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine.

는 유의성 있는($p < 0.01$) 해마의 ACh 함량 저하가 나타났다. Sco 대조군과 비교하였을 때 AR 분말의 투여군은 세 군 모두 해마 ACh 함량이 용량 의존적으로 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였다. Tacrine 10 mg/kg 투여군 또한 해마조직 내의 ACh가 유의하게 증가하였고($p < 0.01$) 이는 AR 분말 200 mg/kg 투여군과 유사한 정도였다(Fig. 5).

Sco 대조군 마우스들의 해마 내 ACh 용량은 정상군과 대비하였을 때 -56.21%의 변화를 보였고, tacrine 10 mg/kg 투여군과 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 Sco 대조군과 비교했을 때 각각 59.38, 78.79, 56.47, 48.44%의 변화율을 보였다.

5. 해마조직 내의 AChE 활성도의 변화

Sco 대조군의 마우스들에서는 해마조직 내의 AChE 활성도가 정상군과 비교해서 유의하게($p < 0.01$) 증가되어 나타났다. AR 분말 처치군에서는 세 군 모두 Sco 대조군과 비교했을 때 해마 내 AChE 활성도가 용량 의존적으로 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다. 게다가 이번 실험에서 tacrine 10 mg/kg 투여군은 Sco 대조군의 마우스들과 비교했을 때 해마 내 AChE 활성도의 유의성 있는 감소가 나타났는데, 이 수치는 AR 분말 200 mg/kg 투여군과 유사했다(Fig. 6).

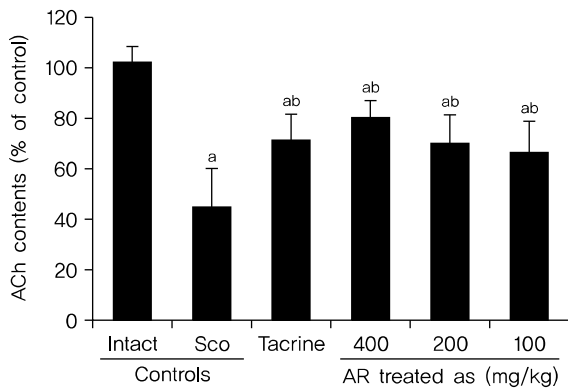


Fig. 5. Changes on the hippocampus ACh contents in intact vehicle control and Sco-induced amnesia mice. In Sco control mice, significant decreases of hippocampus ACh contents were observed as compared with intact vehicle control mice. However, meaningful and dose-dependent increases of the hippocampus ACh contents were observed in all three different dosages of AR treated mice as compared with Sco control mice, respectively. In addition, tacrine 10 mg/kg treated mice also showed significant increases of the ACh contents in hippocampus tissues as compared with Sco control mice, similar to those of AR 200 mg/kg in the present study. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. ^ap<0.01 as compared with intact vehicle control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with Sco control by LSD test. AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine.

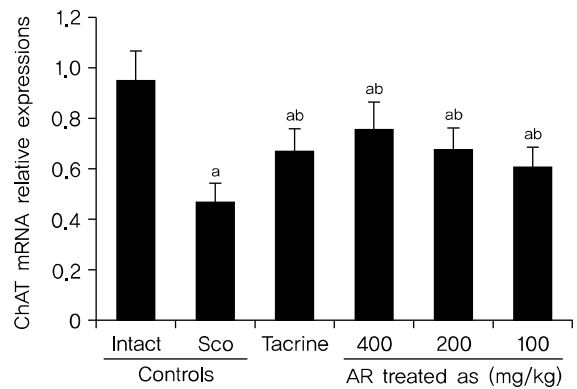


Fig. 7. Changes on the hippocampus ChAT mRNA expressions in intact vehicle control and Sco-induced amnesia mice. In Sco control mice, significant decreases of hippocampus ChAT mRNA expressions (ChAT/ β -actin mRNA) were showed as compared with intact vehicle control mice. However, meaningful and dose-dependent increases of the hippocampus ChAT mRNA expressions were observed in all three different dosages of AR treated mice as compared with Sco control mice, respectively. In addition, tacrine 10 mg/kg treated mice also showed significant increases of the hippocampus ChAT mRNA expressions at RT-PCT analysis as compared with Sco control mice, similar to those of AR 200 mg/kg in the current result. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. ^ap<0.01 as compared with intact vehicle control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with Sco control by LSD test.

AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine, ChAT: Choline acetyltransferase.

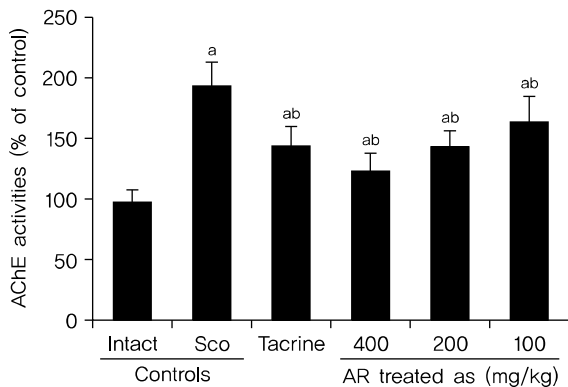


Fig. 6. Changes on the hippocampus AChE activities in intact vehicle control and Sco-induced amnesia mice. In Sco control mice, significant increases of hippocampus AChE activities were observed as compared with intact vehicle control mice. However, we could observe meaningful decreases of the hippocampus AChE activities dose-dependently in all three different dosages of AR treated mice as compared with Sco control mice, respectively. In addition, tacrine 10 mg/kg treated mice also showed significant decreases of the AChE activities in hippocampus tissues as compared with Sco control mice, similar to those of AR 200 mg/kg in this result. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. ^ap<0.01 as compared with intact vehicle control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with Sco control by LSD test.

AR: Aucklandiae Radix (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, Sco: Scopolamine, AChE: Acetylcholinesterase.

Sco 대조군의 해마조직 내의 AChE 활성도는 정상군과 비교했을 때 100.31%의 변화율을 보였고, tacrine 10 mg/kg 투여군과 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 Sco 대조군과 비교했을 때 각각 -25.79, -36.87, -26.20, -15.59%의 변화율을 보였다.

6. 해마조직 내의 ChAT mRNA 발현의 변화

정상군과 비교했을 때 Sco 대조군의 마우스들에게서는 해마조직 내의 ChAT mRNA 발현(ChAT/ β -actin mRNA)이 유의하게($p<0.01$) 감소되어 나타났다. Sco 대조군과 비교했을 때 AR 분말 처치군에서는 세 군 모두 용량 의존적으로 해마 내 ChAT mRNA의 발현이 유의하게($p<0.01$) 증가되어 나타났다. 게다가 tacrine 10 mg/kg 처치군은 Sco 대조군과 비교했을 때 RT-PCT 분석에서 해마 내 ChAT mRNA 발현의 유의한($p<0.01$) 증가가 관찰되었는데 이는 AR 분말 200 mg/kg 투여군과 유사한 수치였다(Fig. 7).

Sco 대조군에서의 해마 조직 내 ChAT mRNA 발현은 정상 대조군과 비교했을 때 -50.32%의 변화율을 보였다.

Sco 대조군과 비교했을 때 tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 각각 41.31, 59.75, 42.80, 28.18%의 변화율을 보였다.

7. 대뇌의 항산화 방어시스템에서의 변화

대뇌 항산화 방어시스템의 관찰을 위해 MDA와 GSH 총량, 대뇌 피질에서의 CAT와 SOD 효소의 활동을 평가하였다.

1) 대뇌 MDA 지수의 변화

정상 대조군과 비교했을 때 Sco 대조군의 마우스들에게서는 대뇌 지질 과산화(cerebral lipid peroxidation), 즉 MDA 지수가 유의하게 증가되어 나타났다($p < 0.01$). 이 MDA 지수의 증가는 AR 분말 투여 세 군에서 모두 각각 용량 의존적으로 유의하게($p < 0.01$) 감소되어 나타났다. 게다가, tacrine 10 mg/kg 투여군은 Sco 대조군과 비교했을 때 대뇌 지질 과산화가 유의하게($p < 0.01$) 감소되어 나타났는데 이는 AR 분말 200 mg/kg 투여군에서 나타난 수치와 유사했다(Table 3).

Sco 대조군에서의 MDA 지수 변화는 정상 대조군과 비교했을 때 170.97%였고 Sco 대조군과 비교했을 때 tacrine 10 mg/kg 투여군과, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 각각 -36.19, -50.34, -36.00, -25.90%의 변화를 보였다.

2) 대뇌 GSH 함량의 변화

대뇌 내분비 항산화물질인 GSH 함량은 정상 대조군과

비교했을 때 Sco 대조군의 마우스들에게서 유의하게($p < 0.01$) 감소되어 나타났다. GSH 함량의 감소는 28일간의 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 경구 투여군에서 용량 의존적으로 유의하게($p < 0.01$) 방지되었다. 게다가 대뇌 GSH 함량은 tacrine 10 mg/kg 투여군의 마우스들에게서 유의하게($p < 0.01$) 그리고 극적으로 증가되어 나타났는데 이는 AR 분말 200 mg/kg 과 유사한 수치였다(Table 3).

Sco 대조군 마우스들에서의 대뇌 GSH 함량은 정상군과 대비했을 때 -73.90%의 변화율을 보였고, Sco 대조군과 비교했을 때 tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 처치군은 각각 97.93, 140.09, 98.52, 63.15%의 변화율을 보였다.

3) 대뇌의 CAT 활성의 변화

내분비 항산화 효소인 CAT의 활동성은 정상군과 대비했을 때 Sco 대조군에서 유의하게($p < 0.01$) 감소되어 나타났다. 이러한 대뇌 CAT 활동성의 감소는 28일간의 AR 분말 경구 투여에 의해서 용량 의존적으로 유의하게($p < 0.01$) 방지되었다. 게다가 대뇌 CAT 활동성은 tacrine 10 mg/kg 투여군에서 Sco 대조군과 비교했을 때 유의하게($p < 0.01$) 증가되어 나타났는데, 이는 AR 분말 200 mg/kg 투여군과 유사한 정도였다(Table 3).

Sco 대조군에서 대뇌 CAT 활동성은 정상군과 대비했을 때 -82.91%의 변화를 보였고, Sco 대조군과 비교했을 때 tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 각각 240.74, 333.65, 248.71, 113.70%의 변화율을 보였다.

Table 3. Cerebral Cortex Antioxidant Defense Systems in Intact Vehicle Control and Scopolamine-induced Amnesia Mice

Groups	Items (Unit)			
	MDA (nM/mg protein)	GSH (nM/mg protein)	CAT (nM/min/mg protein)	SOD (nM/min/mg protein)
Controls				
Intact vehicle	1.81±0.56	8.52±1.11	44.21±11.52	21.85±4.88
Scopolamine	4.89±0.70 ^c	2.23±0.71 ^a	7.56±1.77 ^c	5.69±2.17 ^a
Tacrine 10 mg/kg	3.12±0.93 ^{c,e}	4.40±0.66 ^{a,b}	25.74±10.31 ^{c,e}	15.02±3.00 ^{a,b}
AR treated				
400 mg/kg	2.43±0.47 ^{c,e}	5.34±1.24 ^{a,b}	32.76±11.40 ^{d,e}	17.11±3.01 ^{a,b}
200 mg/kg	3.13±0.38 ^{c,e}	4.42±0.80 ^{a,b}	26.35±10.00 ^{c,e}	14.96±3.84 ^{a,b}
100 mg/kg	3.62±0.40 ^{c,e}	3.63±0.85 ^{a,b}	16.15±6.27 ^{c,e}	9.91±1.94 ^{a,b}

Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice, g

^a $p < 0.01$: compared with intact vehicle control group by LSD test. ^b $p < 0.01$: compared with scopolamine control group by LSD test. ^c $p < 0.01$: compared with intact vehicle control group by MW test. ^d $p < 0.05$: compared with intact vehicle control group by MW test. ^e $p < 0.01$: compared with scopolamine control group by MW test.

AR: *Aucklandia Radix* (Dried root parts of *Aucklandia lappa* Decne.) grinded powders, MDA: Malondialdehyde, GSH: Glutathione, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase.

4) 대뇌 SOD 활동성의 변화

대뇌 내분비 항산화 효소인 SOD의 활동성은 정상군과 대비했을 때 Sco 대조군에서 유의하게($p < 0.01$) 감소되어 나타났다. Tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco 대조군과 비교했을 때 SOD의 활동성이 각각 유의하게($p < 0.01$) 증가되어 나타났다. AR 분말 200 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사한 정도의 SOD 활성도를 보였다(Table 3).

Sco 대조군의 마우스들은 정상군과 비교시 SOD 활성도 -73.94%의 변화율을 보였고, tacrine 10 mg/kg, AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 Sco 대조군과 비교했을 때 각각 163.78, 200.53, 162.83, 74.07%의 변화율을 보였다.

IV. 고찰

알츠하이머병은 광범위한 대뇌피질의 퇴행성 변화에 의해서 초래되는 질환으로 기억력 장애 이외에 정신이상 및 이상행동이 수반된다. 이 중 기억력 장애, 즉 치매의 증상은 대뇌의 아세틸콜린의 감소와 관련이 있다²⁶. 아세틸콜린은 CAT라는 효소에 의해 생산되고 AChE라는 효소에 의해 분해되는 물질인데 AChE inhibitor를 이용하여 아세틸콜린의 분해과정을 억제하면 아세틸콜린의 양이 증가되고 알츠하이머 환자의 기억력장애 증상이 호전될 수 있어 가장 흔한 치료법으로 사용된다²⁷. 하지만 현재 사용되고 있는 AChE inhibitor들은 흔한 부작용으로 오심, 설사, 구토, 식욕부진, 진전, 서맥 및 근경축이 있으며 그 중 tacrine은 간독성과 연관이 있다²⁸. 그래서 부작용이 적은 신약개발을 위한 천연물 유래 성분의 AChE inhibitor를 찾기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다¹².

한의학적으로 “치매(痴呆)”라는 명칭은 명대(明代) 장경약(張景岳)의 <경약전서(景岳全書)>²⁹에 처음 등장하며 그 병인으로 정서상의 문제를 들었고 병리로는 심(心)에 역기(逆氣)가 있거나 간담이경(肝膽二經)의 기불청(氣不清)이 매병(呆病)을 일으키는 것으로 보았다^{1,29}. 임상적으로 한의학에서는 매병(呆病), 건망(健忘), 전광(癡狂)을 근거로 하여 치매(痴呆)를 변증시치 하고 있으며 치매의 병인으로는 연로체허(年老體虛), 정지실조(情志失調), 음식실조(飲食失調), 중독외상(中毒外傷) 등이 있다. 특히 정지실조(情志失調)에

관련해서는 억울하고 노한 것이 자신도 모르게 쌓여 풀리지 않거나, 혹 비밀스러운 일로 말하기 곤란하거나, 혹 일이 원하는 대로 되지 않아 할 말이 없고, 오랫동안 생각하여 근심이 쌓이고, 많은 의혹으로 쉽게 의심하고, 크게 놀라고 두려워하여 정지가 손상되고 기기가 울결되어 오래되면 그것이 반드시 치매(痴呆)가 되고 혹 간의 울결(鬱結)이 오래되면 비토(脾土)를 극하게 되니 담탁(痰濁)이 안으로 쌓이어 위로 뇌신(腦神)을 몽롱하게 하거나 기혈운행이 순조롭지 못하여 뇌규(腦竅)를 막게 되면 치매가 발생한다고 하였고 이는 이기제의 치매에의 사용에 근거를 마련하였다¹.

한약제재의 학습과 기억력 개선에 대한 효능을 입증하려는 연구들은 왕 등³⁰의 산사(山査)에 대한 연구, 김 등³¹의 천마(天麻)에 대한 연구, 김 등³²의 영신초(靈神草), 원지(遠志), 석창포(石菖蒲) 혼합제제에 대한 연구 등 단일제제 및 혼합제제에 있어 다양하게 연구되어 왔다. 그 중 치매 모델에 단일약제로서 이기제를 사용한 이전 연구는 scopolamine을 투여하여 치매를 유발한 백서(白鼠)에 향부자(香附子)를 투여한 연구가 있는데³³, 대조군인 tacrine과 대비하여 효능을 보이긴 했지만 대조군에 비해 효과가 적었고, 단일 용량으로만 실험하여 투여 용량과 관련한 용량존속적인 결과는 알 수 없었다. 그래서 본 실험은 이기제의 투여 용량과 관련한 기억력 개선과 항산화 효과를 알아보기 위해 고안되었고 실험에 사용할 약제로는 목향(木香)을 선택하였다.

목향(木香)(Aucklandia lappa Decne.)은 한의학 약재 중 대표적인 이기제로서 한국 약전에 공식적으로 기록되어 있는 유명한 전통 약물이며³⁴ 복통, 이질, 설사, 식체에 주로 사용되어 왔다⁴. 헬리코박터 파일로리균(Anti Helicobacter pylori) 효과와 구취, 충치, 치주 질환에 대한 치료적 효능도 증명되었다. 이 외에도 목향(木香)이 간보호 효과, 항기생충 효과, 항궤양 효과 및 항암 효과와 면역조절 효과가 있음이 보고되었다¹⁰.

한편 목향(木香)은 성향정기산(星香正氣散), 목향순기산(木香順氣散), 소음인소합향원(少陰人蘇合香元) 등의 약물에 구성 약재 중 하나로서 이러한 약물들은 학습 및 기억장애에 효과가 있으며³⁵, 항스트레스 효과 및 뇌혈관 질환에 효과^{36,37}가 있음이 입증되었다. 하지만 목향(木香)이 대표적인 이기제로서 기기가 울결되거나 기혈순환이 유창하지 못하여 발생하는 치매에 대한 효능을 밝히는 연구는 없었다. 특히 목향(木香) 단독으로 행해진 치매 모델에 대한 기억력

개선효과 관련 실험 연구는 찾을 수 없었으며, 특히 기억력 개선과 항산화 효과에 대한 약물의 투여 용량과 관련한 연구는 시행되지 않았다. 이에 본 실험에서는 scopolamine 유발 건망증 마우스 모델에서 목향(木香)의 기억력 개선효과와 항산화 효과를 약물의 투여 용량과 관련하여 알아보았다.

본 실험에서는 기억력 손상은 scopolamine의 복강주사로 유발되었는데 scopolamine은 비선택적 무스카린성 아세틸콜린 수용체이고, 주로 M1AChR과 M2AChR에 작용하여 설치류와 인간에게서 학습능력 및 단기기억력을 손상시킨다^{12,19}. scopolamine에 의한 신경세포 손상에 특히 취약한 곳은 해마와 전두엽 피질이다³⁸. 이러한 특성으로 인해 scopolamine으로 유발된 기억력 손상 마우스 모델이 항건망 효과를 나타내는 약물의 개발 연구에 많이 사용되고 있다¹³. 또한 대조군으로는 이전의 연구^{12,39}에서 기억력 개선과 대뇌의 항산화작용에 뚜렷한 효과를 나타낸 tacrine 10 mg/kg 투여군을 사용했다.

마우스의 복강 내에 scopolamine을 주사한 Sco 대조군에서는 정상군에 비해 수동회피 실험(Passive avoidance task test)에서 체류잠복기(step-through times)가 현저히 감소되어 나타났고, 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)에서는 탈출잠복기(escape latency time)가 현저하게 증가되어 나타났다. 또한, 마우스들의 최종 희생 시에 해마 조직 내의 ACh 함량과 ChAT mRNA 발현의 감소, AChE 활동성의 증가가 보였다. 추가로 대뇌피질의 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소, SOD와 CAT 활동성의 감소도 나타났다. 이것은 scopolamine이 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템을 고갈시키고 AChE의 활성성을 증가시켜 기억력 감퇴를 유발하였기 때문인데, 이 기억력 감퇴는 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg을 28일간 경구투여한 결과 용량 의존적으로 유의성있게 감소되었다. 이는 AR 분말이 ACh를 보존하고, ChAT mRNA의 발현을 증가시키며, AChE를 억제하고 대뇌의 항산화 방어 시스템을 보호하여 Sco 주사로 유발된 기억력 손상을 개선시켰음을 나타낸다. 이 실험에서 AR 200 mg/kg은 대체적으로 tacrine 10 mg/kg과 비슷한 효과를 보였다.

Sco 대조군은 정상군과 비교했을 때 몸무게에서 유의한 변화는 나타나지 않았다. 이번 연구에서 28일간의 scopolamine의 주사는 체중증가에 영향을 미치지 않았고 이것은 AR 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군과 tacrine 10 mg/kg

투여군에서도 마찬가지였다. 실험에 사용된 모든 C57BL/6 마우스들에게 28일간의 실험기간 동안 유의한 체중감소는 나타나지 않았으며 독성 반응도 나타나지 않았다.

수동회피 실험(Passive avoidance task test)은 일반적으로 기억의 기명(learning acquisition), 보유(retention), 재생(retrieval)의 세 가지 단계에서의 치료를 평가하는데 사용된다¹². Sco 대조군은 기명력 검사(retention test)에서 체류잠복기(step-through times)가 현저하게 감소하여 나타났는데, 이는 중추 콜린성 신경 시스템이 학습과 기억의 습득에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 하지만 AR 분말 투여군(400, 200 and 100 mg/kg)에서는 scopolamine 주사로 인해 짧아진 체류잠복기(step-through times)를 용량 의존적으로 증가시켰으며, 이것은 콜린성 신경 시스템의 중재와 관련된 기억력 손상에 대한 AR의 기억력 개선 효과를 보여준다. 본 실험에서 AR 분말 200 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg와 비슷한 효과를, 400 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군보다 우수한 효과를 나타냈다.

모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)은 선택 인지 행동 테스트 중 하나인데¹⁶, 공간 학습, 기억과 같은 중추 콜린성 시스템의 변화를 관찰하는데 사용된다. 물이 채워진 수조를 탈출하는데 걸리는 시간을 탈출잠복기(escape latency time)라고 하는데, 인지장애를 가진 동물들에게서 크게 증가한다⁴⁰. 기억의 각 단계에 작용하는 AR 분말의 효과를 확인하기 위한 실험에서 Sco 대조군은 정상군보다 더 긴 탈출잠복기(escape latency time)를 보였다. 세 가지 용량의 AR 분말 투여군(400, 200 and 100 mg/kg)에서는 용량 의존적으로 탈출잠복기(escape latency time)가 유의하게 감소되었으며, AR 200 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군과 비슷한 효과를, 400 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군보다 우수한 효과를 보였다. 이 결과는 AR 분말이 Sco 주사로 유발된 기억력 손상에서 기억력을 개선할 수 있음을 나타낸다.

콜린성 뉴런의 진행성 소실은 알츠하이머 질환의 특징적 증상인 기억상실과 연관되어 있는데 CNS 내의 AChE을 억제하면 적어도 아직 작동하고 있는 뉴런에서 콜린성 신경전달을 개선할 수 있다고 알려져 있다²⁸. 이번 실험에서 AR 분말은 해마조직 내의 ChAT mRNA의 활성을 높여 ACh 보호작용을 보였으며, AChE 활동을 억제하는 효과가 있었는데, 용량 의존적으로 유의한 효능을 나타냈다. 이는 AR 분

말이 해마 조직내의 AChE를 억제하고 ChAT mRNA의 활성을 높여 ACh를 보호하게되어 Sco로 유발된 기억력 장애에 효과가 있음을 시사한다.

활성산소는 산소라디칼(oxygen free radical)과 이로부터 유래한 다양한 산소 화합물들을 통칭하는 말이다. 이 활성산소는 세포막과 세포핵을 공격하여 MDA와 DNA의 손상을 일으키고 압, 치매, 죽상경화증과 노화를 일으키는 주된 원인이 된다⁴¹⁾. 또한, 산화스트레스는 알츠하이머병에서 인지결핍에 중요한 역할을 하는데 SOD, MDA, 최종당화산물, peroxyxynitrite, hemeoxygenase-1과 같은 산화스트레스를 나타내는 생체 표지들이 알츠하이머병에서 보이는 신경염영김과 노인반에서 높아진 것들을 보면 알 수 있다^{42,43)}.

GSH는 대표적인 항산화 물질로서 낮은 활성산소를 유지하여 조직손상을 방지하며 산화를 억제하여 특정세포농도와 조직을 보호한다⁴⁴⁾. SOD는 뇌의 방어 시스템에 기여하는 항산화 효소 중 하나이며¹⁸⁾ CAT는 H₂O₂를 H₂O로 전환하는 촉매 역할을 한다⁴⁵⁾. 따라서 GSH가 증가하면 지질과 산화와 활성산소를 억제할 수 있으며, SOD와 CAT활성도가 높아지면 손상된 뇌 조직 내에서 허혈에 의한 뇌 손상을 이차적으로 보호할 수 있다¹⁸⁾.

이번 실험에서 AR 분말의 투여군은 Sco 대조군에 비해 대뇌피질 조직 내의 SOD, CAT, GSH와 같은 항산화 물질들을 유의하게 용량 의존적으로 증가시켰으며, MDA의 생성을 유의하게 감소시켰다. 특히 AR 분말 200 mg/kg 투여군의 경우 tacrine 10 mg/kg 투여군과 비슷한 효과를, 400 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군보다 더 우수한 효과를 보였다. 결론적으로 AR 분말은 이번 연구 조건에서 산화방어시스템을 증가시켜 Sco 처치 마우스들의 기억 손상을 완화시켰다.

이상의 결과에서 AR 분말은 항산화 방어 시스템을 활성화 시키고, AChE 활성을 억제하고 ChAT mRNA 발현을 증가시킴으로 ACh 함량의 감소를 억제하여 Sco 주사로 인한 기억력 손상을 개선시켰으며 특히 AR 분말 200 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군과 비슷한 효과를 나타냈고 AR 분말 400 mg/kg 투여군은 tacrine 대조군보다 우수한 효과를 보였다는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 목향(木香)이 기억력 손상에 효능이 있으며, 추후 연구를 통해 인간의 기억력 개선을 위한 약물 후보가 될 수 있으리라 생각된다. 특히 한약재제가 기억력 개선에 유의한 효능을 보인 기

존의 실험 논문들에서 대조군인 tacrine보다 뛰어난 효능을 보이는 약재들은 거의 없었다는 점에서 목향(木香)에 대한 이번 실험이 의의가 있다고 할 수 있겠다.

하지만 목향(木香)의 어떤 특정성분이 유효한 효과를 내는지 알지 못했던 점, 목향(木香) 분말 자체를 실험에 이용함으로써 tacrine 대조군에 비해 용량이 많아 복용하기 어려운 점 등은 본 연구의 제한점이다. 앞으로 AR 분말의 생물학적 활성 성분들을 스크리닝하여 특정 성분의 상세한 기전에 대한 연구와 유효성분만을 추출하는 방법에 대한 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

Scopolamine의 복강주사로 유발된 건망증 마우스 모델에 목향 분말을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 목향 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군이 Sco 대조군과 비교하여 수동 회피 검사에서 체류잠복기가 용량 의존적으로 유의성 있게 증가하였다.
2. 목향 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군이 Sco 대조군과 비교하여 모리스 수중 미로 실험에서 탈출잠복기가 용량 의존적으로 유의성 있게 감소하였다.
3. 목향 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군이 Sco 대조군과 비교하여 최종 희생 시 해마 부위 조직 내의 ACh 함량 및 AChE 활성이 용량 의존적으로 유의성 있게 감소하였다.
4. 목향 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군이 Sco 대조군과 비교하여 최종 희생 시 해마 부위 조직 내의 ChAT mRNA 발현이 용량 의존적으로 유의성 있게 증가하였다.
5. 목향 분말 400, 200, 100 mg/kg 투여군이 Sco 대조군과 비교하여 대뇌피질 내 MDA의 감소가 확인되었고 GSH 함량, SOD 및 CAT 활성이 증가되었다.

REFERENCES

1. The Textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of Oriental Medical Schools in Nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. 3th ed. Seoul:Jipmoon-Dang. 2016:319-20, 322.
2. Korean Neurological Association. Textbook of Neurology. 2th ed. Seoul:Beomun Education. 2015:446-51.
3. Shin HS. Inhibitory Effects of Tacrine Derivatives in Activity of Prostanoids Biosynthesis Prostaglandin Biosynthesis:

- A Potential Use for Degenerative Brain Disease Treatment. *Yakhak Hoeji*. 2005;49(1):103-8.
4. The Textbook Compilation Committee of Herbalogy of Oriental Medical Schools in Nation. *Herbalogy*. Seoul: Younglim Publisher. 2011:395-6.
 5. Oh GS, Pae HO, Chung HT, Kwon JW, Lee JH, Kwon TO, Kwon SY, Chon BH, Yun YG. Dehydrocostus lactone enhances tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of Human leukemia HL-60 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2004;26:163-75.
 6. Shoji N, Umeyama A, Saito N, Takemoto T, Kajiwara A, Ohizumi Y. Vasoactive substances from *Saussurea lappa*. *J Nat Prod*. 1986;49:1112-3.
 7. Chen HC, Chou CK, Lee SD, Wang JC, Yeh SF. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res*. 1995;27:99-109.
 8. Taniguchi M, Kataoka T, Suzuki H, Uramoto M, Ando M, Arao K, Magae J, Nishimura T, Otake N, Nagai K. Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995;59:2064-7.
 9. Ryu DK, Jeong SH, Shin GC, Lee WC, Moon IS. The Effect of Aucklandiae Radix-Moschus's for Delayed Neuronal Death in Hypoxia. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2003;24(2): 348-57.
 10. Chang KM, Choi SI, Kim GH. Anti-oxidant Activity of *Saussurea lappa* C.B. Clarke Roots. *Prev Nutr Food Sci*. 2012;17(4):306-9.
 11. Bartus RT, Dean 3rd RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatricmemory dysfunction. *Science*. 1982;217:408-14.
 12. Chuong NN, Trung BH, Luan TC, Hung TM, Dang NH, Dat NT. Anti-amnesic effect of alkaloid fraction from *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurosci Lett*. 2014;575: 42-6.
 13. Lee S, Kim J, Seo SG, Choi BR, Han JS, Lee KW, Kim J. Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice. *Pharmacol Res*. 2014;85:23-32.
 14. Hung TM, Na M, Dat NT, Ngoc TM, Youn U, Kim HJ, Min BS, Lee J, Bae K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J Ethnopharmacol*. 2008;119:74-80.
 15. Nam Y, Lee D. Ameliorating effects of constituents from *Cortex Acanthopanax Radicis* on memory impairment in mice induced by scopolamine. *J Tradit Chin Med*. 2014;34:57-62.
 16. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.
 17. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15:316-28.
 18. Zhan C, Yang J. Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Res*. 2006;53:303-9.
 19. Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985;80: 33-42.
 20. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
 21. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
 22. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, pp 673-86, 1974.
 23. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34:497-500.
 24. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1981;6:145-51.
 25. Kang SJ, Lee JE, Lee EK, Jung DH, Song CH, Park SJ, Choi SH, Han CH, Ku SK, Lee YJ. Fermentation with *Aquilariae Lignum* enhances the anti-diabetic activity of green tea in type II diabetic db/db mouse. *Nutrients*. 2014;6:3536-71.
 26. Davies P, Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2: 1403.
 27. Giacobini E, Becker R. Present progress and future development in the therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1989; 317: 1121-54.
 28. Yim DY. *Lippincott's Illustrated Review: Pharmacology*. Seoul: Sinil Books. 2009:102-3.
 29. Jang GB(張介賓). *張氏景岳全書*. Seoul: Hansung Publisher. 1978:610-1.
 30. Wang SB, Ahn EM, Jung JW. The Fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates Learning and Memory Impairments Induced by Scopolamine. *Kor. J. Herbalogy*. 2009;24(4):165-71.
 31. Kim WC, Jeong JK, Kim JS, Kim KO. The Verify of memory Improvement by *Gastrodia Elata* Blume. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 2013;24(1):27-44.
 32. Kim SH, Chung DK. Nootropic and Anti-amnesic Effect of PPA on scopolamine-induced Cognitive Impairment in Mice. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 2011;22(4):185-99.
 33. Yun SH, Jung IC, Lee SR. Effects of *Cyperus rotundus* (CPRT) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice. *J of*

- Oriental Neuropsychiatry. 2003;14(1):59-74.
34. Yoon TS, Sung YY, Jang JY, Yang WK, Ji YU, Kim HK. Anti-obesity activity of extract from *Saussurea lappa*. Korean J Medicinal Crop Sci. 2010;18:151-6.
 35. Park JH, Kim JW, Whang WW. The Effect of Sunghyang-jungkisan on the Learning and memory of Nitric Oxide Synthase Inhibitor-treated rats in the Morris Water Maze. J of Oriental Neuropsychiatry. 1999;10(2):105-13.
 36. Kwen SJ, Chung DK, Kim YS. A Study on Effect of Soeuminsohabhyangwon on the Brain Serotonin contents of Stressed Mice. J of Oriental Neuropsychiatry. 1998;9(2):87-95.
 37. Whang WW, Kim JH. An Experimental Study on the Anti-stress Effect by Mokhyangsoongisan. J of Korean Oriental Medical Society. 1993;14(2):168-79.
 38. Abe E. Reversal effect of DM-9384 on scopolamine-induced acetylcholine depletion in certain regions of the mouse brain. Psychopharmacology. 1991;105:310-6.
 39. Taraschenko OD, Barnes WG, Herrick-Davis K, Yokoyama Y, Boyd DL, Hough LB. Actions of tacrine and galanthamine on histamine-N-methyltransferase. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2005;27:161-5.
 40. Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. Stroke. 2001;32:2648-57.
 41. Hyong IH, Moon SE, Bae SS. Review of Reactive Oxygen. Journal of the Korean Society of Physical Medicine. 2006;1(1):139-46.
 42. Ghumatkar PJ, Patil SP, Jain PD, Tambe RM, Sathaye S. Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2015;135:182-91.
 43. Kumar H, Kim BW, Song SY, Kim JS, Kim IS, Kwon YS, Koppula S, Choi DK. Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. Biosci Biotechnol Biochem. 2012;76:1518-22.
 44. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2006;103:59-65.
 45. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993;49:481-93.