

Scopolamine 유발 건망증 마우스 모델에서 육미지황탕(六味地黃湯)의 기억력 개선 및 항산화 효과

서영민, 한다영, 김상호, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과교실

Anti-amnesic Effect and Antioxidant Defense Systems of Yukmijihwang-tang on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Young-Min Seo, Da-young Han, Sang-ho Kim, Dae-kyoo Chung

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

Received: October 16, 2018
Revised: November 29, 2018
Accepted: December 5, 2018

Objectives: The objective of this study was to observe the anti-amnesic effects of Yukmijihwang-tang (YMJHT), on the scopolamine (Sco)-induced memory impairment in C57BL/6 mice through its favorable acetylcholine (ACh). Also, to observe acetylcholinesterase (AChE) activity, Choline acetyltransferase (ChAT) mRNA expressions, and antioxidant effect.

Methods: Six groups, with a total of 20 normal and 100 Sco treated mice were selected based on their body weights after 1 week of acclimatization, were used in this study as follows. Half of the mice in each group were used for passive avoidance task tests and hippocampus ACh content, AChE activity and ChAT mRNA expression measurement, and the remaining half in each group used for Morris water maze test and measurement of cerebral antioxidant defense system.

Results: Amnesia due to AChE activations and destroyed cerebral cortex antioxidant defense systems were markedly and dose-dependently inhibited after 28 days of continuous oral pre-treatment with YMJHT 400, 200 and 100 mg/kg, respectively. The overall effects of YMJHT 400 mg/kg were similar to those of tacrine 10 mg/kg.

Conclusions: Based on the results, it was established that oral administration of YMJHT favorably alleviates Sco-induced memory impairment, through preservation of ACh, mediated by up-regulation of ChAT mRNA expressions and related AChE inhibition and augmentation of cerebral antioxidant defense system, at least in a condition of this experiment. The overall effects of YMJHT 400 mg/kg were similar to those of tacrine 10 mg/kg.

Key Words: Anti-Amnesia, Antioxidant, Yukmijihwang-Tang, Scopolamine, Tacrine.

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: chung@dhu.ac.kr

I. 서론

치매는 대표적인 노인성 질환의 하나이며, 알츠하이머병은 치매의 가장 흔한 원인 질환으로, 기억력 저하와 함께 다양한 신경 정신적 장애를 동반하며, 결국 움직일 수 없는 불능상태를 초래 한다¹⁾. 알츠하이머 환자에게서 뇌조직의 Acetylcholine (ACh) 감소는 치매의 중요한 병리적 소견이다²⁾. ACh는 AChE에 의해 분해가 되며, AChE의 작용이 지속되면 ACh의 감소로 인해 기억력 저하가 발생 한다³⁾. 현재까지 공식적으로 FDA로부터 허가를 받은 알츠하이머 치료제는 AChE를 억제하는 기전을 갖는 치료제가 대부분이다⁴⁾. Tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine 등이 대표적인 AChE 저해제이며, 그 중 Tacrine은 AChE 저해제로서 최초로 FDA 승인을 받은 약물이지만, ALT 수치를 상승시키는 등의 부작용으로⁵⁾ 사용이 금지되었다. 그 외의 AChE 저해제들도 구역, 구토, 식욕감소, 장운동의 이상증가 등 다양한 부작용으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 이러한 부작용에 대한 우려로 근래에는 한약재 유래의 부작용이 비교적 낮은 항치매 약물을 찾기 위한 노력이 시도되고 있는 실정이다^{6,7)}.

육미지황탕은 금궤요략(金匱要略)에서 기원하였으며, ‘허로요통(虛勞腰痛) 소변구급(小腹拘急) 소변불리(小便不利)의 증상에 사용되는 팔미지황환(八味地黃丸)의 변방으로 송대(宋代) 전을(錢乙)이 육계(肉桂)와 부자(附子)를 제외하여 처방이 확립되었다.

육미지황탕의 약리효과에 대해서는 여러 연구가 진행되고 있다. 그 중 기억력에 관한 연구를 살펴볼 때, ibotenic-acid로 유발된 건망증 마우스 모델에서의 기억력 개선효과⁸⁾ 등에 대하여 보고가 되어 있으나, scopolamine 유발 건망증 마우스 모델에서의 육미지황탕의 기억력 개선효과를 약물의 투여 용량과 관련하여 실행한 연구는 찾아볼 수 없다.

이에 저자는 육미지황탕의 기억력 개선 및 항산화 효과를 알아보기 위해 scopolamine (Sco)으로 건망증이 유도된 마우스에게 육미지황탕을 400, 200, 100 mg/kg의 용량으로 투여한 이후 체중, 항산화 활성, ACh 함량 및 AChE 활성, ChAT mRNA 발현 등을 측정하였고, 인지적 행동 검사로 수동회피 실험, 모리스 수중미로 실험을 시행하였다. 모든 실험은 Tacrine 투여군과 결과를 비교하였다. Tacrine은 비

록 그 부작용으로 인해 현재는 사용이 금지가 되었지만, AChE 저해제로서는 최초로 FDA 승인을 받은 약물로서의 의의를 가진다. 그 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 관리

본 실험에서는 6주령에 무게는 18~21 g인 건강한 수컷 [C57BL/6] 마우스 120마리를 주식회사 오리엔트바이오 (6-week old upon receipt; OrientBio, Seungnam, Korea; Body weight ranged in 18~21 g upon receipt)에서 공급을 받아 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였다.

마우스들은 다섯 마리씩 폴리카보네이트 우리에 나누어서 지내게 했으며 온도는 20~25°C, 습도는 50~55%로 유지하였다. 명암주기(light: dark cycle)는 12시간으로 조절하였고, 사료(standard rodent chow; Samyang, Seoul, Korea)와 물은 자유롭게 공급했다. 실험은 실험동물의 사용과 복지를 국립 규정에 맞게 시행하였으며, 대구한의대학교 (Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea) 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실시하였다[Approval No DHU2015-034].

2. 실험군 분류

여섯 그룹으로 나누어 실험을 진행하였고, 20마리의 정상군과 100마리의 scopolamine (Sco) 처치군은 1주일의 순화기간 후에 체중을 기준으로 하여(Mean body weights: 21.61±0.90 g, ranged in 20.10~23.80 g) 선별하였다. 이중 반수는 수동회피 실험(Passive avoidance test) 후 해마부위의 ACh 함량, AChE 활성 및 ChAT mRNA 발현 관찰에 사용을 하였고, 나머지는 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test) 후 대뇌 피질 항산화 방어 시스템의 측정에 활용하였다(Fig. 1).

실험군(Six groups, 20 mice in each group were used)

1. 정상군(경구 및 복강 투여 정상군)
2. Sco대조군(매체 경구 및 Sco 복강투여 대조군)
3. Tacrine (Tacrine 10 mg/kg 경구 투여 및 Sco 복강투여 대조군)
4. YMJHT 400 (육미지황탕 400 mg/kg 경구 투여 및

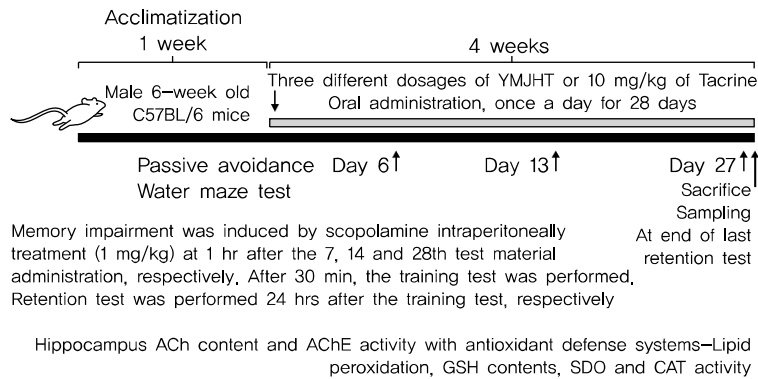


Fig. 1. Experimental Design Used in This Study.

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine, AChE: Acetylcholinesterase, ChAT: Choline acetyltransferase.

Sco 복강투여 실험군)

5. YMJHT 200 (육미지황탕 200 mg/kg 경구 투여 및

Sco 복강투여 실험군)

6. YMJHT 100 (육미지황탕 100 mg/kg 경구 투여 및

Sco 복강투여 실험군)

3. 실험물질의 준비 및 투여

1) 실험물질의 준비: 육미지황탕, Tacrine 및 Scopolamine

실험에 사용된 육미지황탕은 밝은 갈색 과립의 형태로 한국 인스팜(Korea INS Pharm., Hwasoon, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 이는 한국 우수약품제조 및 품질관리 기준(Korean Good Manufacturing Practice, KGMP)에 따라 생산되었고, 식품 의약품 안전처(Ministry of Food & Drug Safety; Seoul, Korea)의 감독을 받았다. 육미지황탕은 여섯가지의 약재로 구성되어 있으며 구성내용과 분량은 다음 표와 같다(Table 1).

대조군으로 사용된 tacrine hydrochloride은 고체의 형태로 Sigma-Aldrich사(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)에서 공급받았다. 기억 손상을 유도하기 위한 Scopolamine hydrobromide은 Sigma-Aldrich사(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)에서 공급을 받았다.

2) 실험물질의 투여

육미지황탕과 Tacrine은 각각 4°C, -20°C로 냉장 및 냉

동 보관을 하였고, 실험 기간 동안 빛과 습기에 노출되지 않도록 하였다. 각각의 약물은 잘 용해되었으며(up to 40 mg/ml solutions in YMJHT and up to 1 mg/ml solutions in tacrine), 육미지황탕은 멸균증류수에 용해하여 이전의 연구의 방법을 따라⁹⁾ 400, 200, 100 mg/kg의 각기 다른 세 가지의 용량으로 마우스의 체중을 기준으로 10 ml/kg의 양을 하루에 한번씩 28일 동안 경구투여 하였다. Tacrine은 이전의 실험들의 결과를 바탕으로 하여¹⁾ 10 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 정상군과 Sco처리 대조군은 같은 양의 증류수를 시약대신 같은 양으로 투여하였다(Table 1, Fig. 1).

기억손상을 유발하기 위하여 Scopolamine hydrobromide을 약물투여 시작 후 7, 14 및 28일에 약물투여 1시간 후에 각각 복강 주사하였다. 이는 이전의 연구에 따른 방법⁹⁾으로, 1 ml/kg의 용량으로 멸균생리식염수에 용해하여 사용하였다. 정상군에는 같은 양의 멸균생리식염수를 scopolamine 용액 대신에 복강 주사하였다.

4. 체중측정

모든 실험동물들의 체중을 최초 약물투여 하루 전, 육미지황탕 혹은 tacrine을 투여한지 1, 6, 13, 20, 27 그리고 28일째 자동전자저울(Precisa Instrument, Dietikon, Switzerland)을 이용하여 측정을 하였다. 실험시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 다음의 공식을 이용하여 투여 시작일 에서부터 최종희생일, 즉 28번째의 약물투여 후 24시간 후의 체중 변화량인 증체량을 산출하였

Table 1. Composition of YMJHT Used in This Study

Herbs	Scientific Names	Amounts (g)
Rehmanniae Radix Preparat	Rehmannia glutinosa Liboschitz var. purpurea Makino	2
Dioscoreae Rhizoma	Dioscorea batatas Decaisne	1
Corni Fructus	Cornus Officinalis Siebold et Zuccarini	1
Hoelen	Poria cocos Wolf	1
Moutan Cortex	Paonia suffruticosa Andrews	1
Alismatis Rhizoma	Alisma orientale Juzepczuk	1
Total	6 types	7

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea).

다

[(Body weight at the day of sacrifice, 24 hrs after last 28th test material administration)-(body weight at the day of first material administration)]

5. 수동회피 실험(Passive avoidance test)

수동회피 실험(Passive avoidance test)은 남¹⁰⁾ 등의 연구에서 사용된 방법에 따라 빛/소음시설과 전기를 흘려보낼 수 있는 스테인리스 망 바닥이 각각 설치된 두 개의 분리된 박스로 구성된 실험 장치에서 시행되었다.

바닥에 전기를 흘려줄 수 있는 망을 설치하였으며 두 박스 사이에는 칸막이 문을 설치 해두고 이는 외부에서 닫을 수 있도록 장치하였다.

실험은 이틀에 걸쳐서 시행을 하였고 첫날에는 Sco 처치 후 30분이 지나고 훈련 검사가 다음과 같이 진행되었다.

각각의 마우스를 빛/소음 시설이 설치된 박스에 배치해 둔다. 15초 후 빛과 소음이 공급되면 이를 싫어하는 마우스의 습성으로 마우스가 옆 박스로 이동을 하게 되는데 옆의 스테인리스 망 바닥이 있는 칸으로 마우스가 탈출할 때까지 빛/소음 공급은 계속된다.

마우스가 옆 칸으로 이동을 하면 자동으로 문이 닫히게 되어 두 공간은 즉시 분리가 된다. 이후 전기 쇼크(3.0 mA, 3 sec)가 grid 바닥을 통하여 전달이 되어 쥐들은 전기적 충격을 받게 된다. 120초 동안 옆 칸으로 이동하지 않은 쥐는 다음 실험에서 제외하였다.

기명력 검사는 훈련 검사 24시간 후에 위의 방법과 동일하게 이루어졌다. 쥐들을 빛과 소음이 있는 칸에 다시 넣었을 때 빛과 소음이 공급이 되더라도 전기적 충격의 기억으

로 옆 박스로 이동하는 것을 꺼리게 되는데, 그 기억으로 인하여 옆 박스로 이동하는데 걸리는 시간이 늘어나게 된다. 옆 칸으로 이동하는데 걸리는 시간을 체류잠복기(step-through times)로 기록을 하였고 300초를 최대시간으로 제한했다.

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

모리스 수중미로 실험 (Morris water-maze test)은 학습 및 기억력을 측정하는 실험중 하나이며 모리스의 방법¹¹⁾에 따라 실시하였고 남¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 조금 수정을 가하였다.

이 실험은 지름 100 cm 깊이 37 cm 원형의 수조에 수심이 27 cm 되도록 22°C의 물을 채워서 시행하였다. 탈출 도피대(지름 10 cm)는 수조의 사분면중 하나에 수면 아래에 침수시켜 설치했다. 모든 과정은 video tracking system (Smart junior, PanLab., Barcelona, Spain)으로 관찰하였다. Sco 처치 30분 후 training test는 다음과 같이 시행하였다. 각각의 쥐를 물 안에 위치시키고 숨겨진 탈출 도피대를 찾게 한다. 쥐가 성공적으로 도피대에 오게 되면 10초 동안 그곳에 머물도록 놔둔다. 쥐가 150초 이내에 탈출 도피대를 찾지 못하면 그 쥐를 도피대에 옮겨두고 10초 동안 머물게 한다.

기명력 검사(retention test)는 24시간 이후 같은 방법으로 이루어졌다. 쥐가 탈출 도피대를 찾아오는데 걸린 시간은 300초의 제한시간을 두고 탈출잠복기(escape latency time)로 측정되었다. 모리스 수중미로 실험은 초기시험물질 투여 29일째 Sco 처치 24시간 이후 실시하였다. 이 실험은 수동회피 실험의 동물과는 분리하여 시행하였다.

7. ACh 함량 및 AChE 활성 측정

수동회피 실험을 마친 후 마우스들을 조직 내의 ACh의 함량 및 AChE의 활성도를 측정하기 위해 전신마취 후 뇌조직을 적출하였다. 해마부위를 분리하여 분석이 끝날 때까지 -150°C로 냉동하였다(Ultradeep freezer, Sanyo, Tokyo, Japan).

분리된 해마는 무게를 측정하고 차가운 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)에서 균질화하여, 12,000g로 15분간 원심분리 하였다. 해마에서의 ACh 함량과 AChE 활성화를 알아내기 위

하여 Amplex Red ACh/AChE 시험키트(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 사용하였다. Working solution 으로 Amplex Red 400 μ M은 2 U/ml의 horseradish peroxidase와 0.2 U/ml choline oxidase를 포함하는 것으로 준비되었다. ACh의 양과 AChE의 활성을 측정하기 위해 100 U/ml의 AChE와 100 μ M의 ACh가 각각 첨가되었다. 반응은 100 μ l의 working solution이 micropalate wells의 샘플에 가해졌을 때 시작되었다. 개별 샘플에서 방출된 형광은 560 nm의 여기파장(excitation wavelength)과 590 nm의 발광파장(emission wavelength)으로 VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

8. ChAT mRNA 발현 측정

RNA는 수동 회피 시험 종료 후 마우스로부터 취한 해마 조직에서 이전 연구에 기재 한 방법에 따라⁹⁾ Trizol 시약을 사용하여 추출 하였다(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

RNA 농도 및 품질은 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정 하였다. DNA의 오염을 제거하기 위해 샘플은 recombinant DnaseI로 처리했다(DNA-free; Ambion, Austin, TX, USA). RNA는 기기의 메뉴얼에 따라 the reagent High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 역전사 하였다. cDNA strand first는 전체 RNA로부터 합성을 하였고 primer의 혼합체와 cDNA는 PCR을 이용하여 증폭하였다(Bioneer, Daejeon, Korea) (Table 2). PCR증폭은 58°C에서 30분, 94°C에서 2분, 94°C에서 15초간 35cycle, 60°C에서 30초, 68°C에서 1분 그리고 72°C에서 5분간 시행하였다. ChAT 발현의 수준은 β -actin RNA를 내부 대조군으로 정상군과 비교하여 백분율로 계산하였다.

9. 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템

28일째 모리스 수중미로 실험을 끝낸 마우스들은 즉시 최중희생 되었다. 대뇌 항산화 방어시스템을 관찰하기 위해서 대뇌피질에서의 MDA와 GSH contents, CAT, SOD 효소의 활성을 평가하였다. 분리된 대뇌피질은 무게를 측정하고 10 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.1 M MEDTA (pH 7.4)로 구성된 buffer와 혼합하여 15분간 12,000 g에서 원

Table 2. The Specific Sequence for Each Primer

Gene	PCR primer sequences
ChAT	Foward 5'-CTTGGATGGTCCAGG- CAC-3' Reverse 5'-GTCATACCAACGATTCGCTCC-3'
β -actin	Forward 5'-TGGTGGGTATG- GGTCAGAAG-3' Reverse 5'-CATGGCT GGGGTGAAGG-3'

ChAT: Choline acetyltransferase.

심분리 하였다. 뇌지질 과산화의 농도는 UV/VIS 분광 광도 계(OPTIZEN POP, Mecasys, Daejeon, Korea)를 사용하여 1 g당 nM of MDA으로 흡광도 525 nm에서 TBA(thio-barbituric acid) test를 사용하여 측정하였다¹²⁾. 총단백질의 양은 bovine serum albumin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 국제 규격에 맞게 측정하였다. GSH의 양을 측정하기 위해 준비된 혼합물을 25% trichloroacetic acid 0.1 ml (Merck, San Francisco, CA, USA)에 섞어 4°C에서 40분간 4,200 rpm으로 원심분리 하였다.

GSH 함량은 2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)를 사용하여 nM/mg protein으로 흡광도 412 nm에서 측정하였다¹³⁾. H₂O₂의 분해는 CAT의 처리 하에 240 nm에서 시행하였다¹⁴⁾. CAT 활성은 25°C 및 7.8의 pH에서 분당 1 nM의 H₂O₂의 분해에 필요한 효소의 양으로 정의 하였다. SOD 추정치¹⁵⁾는 포르마잔 염료를 형성하는 nitroterazolium blue와 반응하는 xanthine 및 xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide radical의 발생으로 측정하였다. SOD 활성은 이 반응의 저해의 정도에 따라 560 nm에서 측정하여, U/mg protein으로 표현하였다. SOD 효소 활성의 한 단위는 1분 동안 50%의 nitroblue tetrazolium처리에 의해 초기 흡광도를 50% 감소시키는 효소의 양과 동일하였다.

10. 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준 편차 (SD)로 나타내었다. 상이한 투여량 그룹에 대해서는 다중 비교 시험을 실시하였다. 분산의 동질성은 Levene 테스트¹⁶⁾를 사용하여 조사 하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 이후 least-significant difference (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였고, 비등분산일 경우 비모수 검증인 Kyuskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우, Mann-Whitney U (MW) test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for win-

dows (Release 14.0K, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 이용하여 평가하였다¹⁷⁾. 또한, 정상군과 Sco대조군 사이의 백분율의 변화는 Sco의 복강 내 치료에 의한 기억 상실의 심각도를 관찰 계산 하였다.

[(Data of Sco control-Data of normal mice)/Data of normal mice)×100]

Sco대조군과 테스트 약물을 투여한 쥐들의 백분율 변화는 [(Data of test material treated mice-Data of Sco control mice)/Data of Sco control mice)×100]의 방법으로 테스트 약물의 효과의 이해를 돕기 위해 강¹⁸⁾ 등의 방법을 따라 계산되었다.

III. 결과

1. 체중의 변화

28일 동안의 실험기간 동안 정상군과 비교하여 Sco대조군에서 체중에 유의하거나 의미 있는 변화는 없었다. 또한 3가지 용량의 육미지황탕을 투여한 군과 tacrine 투여군에서도 Sco대조군과 비교하여 체중 변화의 유의성 있는 차이는 없었다(Table 3, Fig. 2).

28일 동안의 실험기간동안 Sco대조군은 정상군과 비교해서 3.83%의 체중증가가 더 있었으며, Sco대조군과 비교했을 때 tacrine 투여군에서 -5.14%, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군에서 2.12%, 200 mg/kg 투여군의 경우 -3.46%, 100 mg/kg 투여군의 경우 5.92% 더 큰 체중의 변화가 있었

Table 3. Changes on the Body Weight Gains in Normal Mice and Scopolamine-Induced Amnesia Mice

Groups	Times	Body weights at		Weight gains [B-A]
		First administration* [A]	Sacrifice [B]	
Normal		19.50±0.86	23.81±1.11	4.31±0.83
Control				
Scopolamine		19.48±0.85	23.96±1.33	4.48±0.76
Tacrine 10 mg/kg		19.57±0.85	23.82±1.25	4.25±0.77
YMJHT treated				
400 mg/kg		19.45±1.01	24.02±1.24	4.57±0.69
200 mg/kg		19.51±1.05	23.83±1.27	4.32±0.65
100 mg/kg		19.46±1.14	24.20±1.39	4.74±1.10

Values are expressed as Mean±S.D. of twenty mice, g. YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea). *All animals were overnight fasted before initial test material treatment.

다.

2. 수동회피 실험(Passive avoidance test)의 결과

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군은 체류잠복기(step-through times)가 유의하게 감소(p<0.01)되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 체류잠복기가 유의성 있게(p<0.01) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 체류잠복기의 증가는 용량 의존적으로 측정되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 효과를 보였다(Fig. 3).

체류잠복기(step-through times)의 측정 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 그 시간이 77.77% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 261.80%의 체류잠복기의 증가가 있었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 256.58, 175.57, 79.96%의 비율로 체류잠복기가 증가되었다.

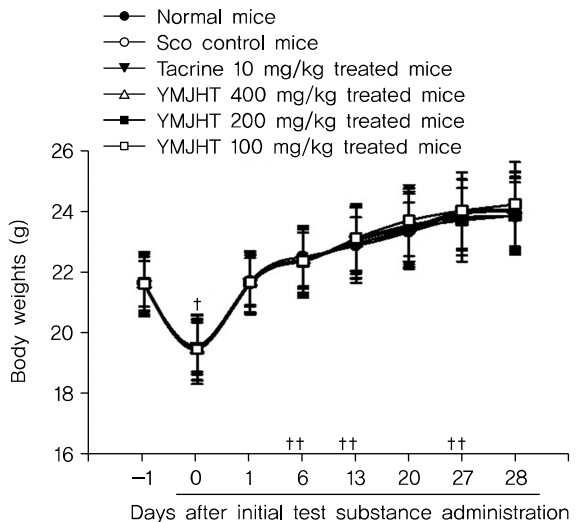


Fig. 2. Body Weight Changes in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice.

No significant or meaningful changes on the body weights were detected in all Sco treated mice as compared with normal mice, and also no noticeable changes on the body weights were detected in all three different dosages of YMJHT or tacrine 10 mg/kg treated mice as compared with Sco control mice. Values are expressed as Mean ± S.D. of twenty mice. YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, Sco: Scopolamine. The day -1 means 1 day before initial administration of test materials. The day 0 means at first test material administration. †All animals were overnight fasted before first test material administration. †† Sco was intraperitoneally treated at 1 hr after the 7, 14 and 28th test substance administration.

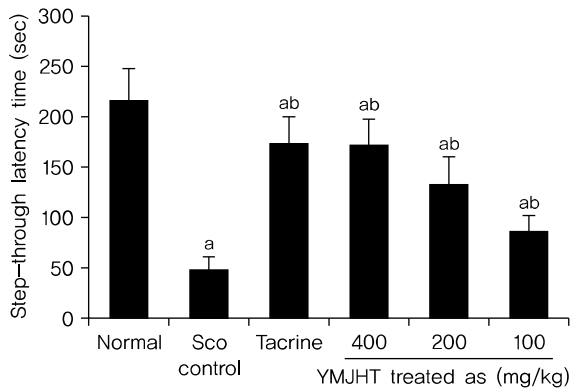


Fig. 3. Changes on the Step-through Latency Times of Passive Avoidance Task Test in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice. Note that significant decreases of the step-through latency times were detected in Sco control mice as compared with normal mice. However, significant increases of step-through latency times were detected in tacrine 10 mg/kg, YMJHT 400, 200 and 100 mg/kg treated mice as compared with Sco control mice, respectively. YMJHT 400 mg/kg showed favorable effects on the passive avoidance task test as comparable to those of tacrine 10 mg/kg, in this experiment. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), Sco: Scopolamine. ^ap<0.01 as compared with Normal Mice by LSD test, ^bp<0.01 as compared with Sco control by LSD test.

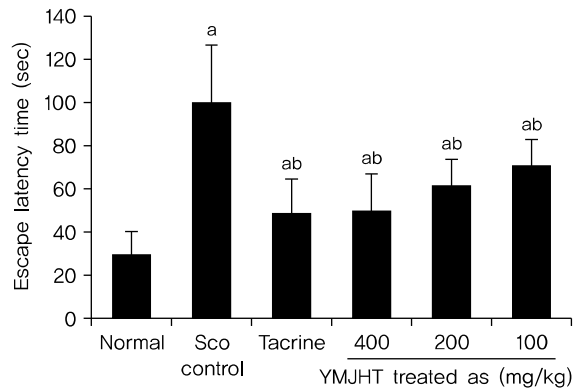


Fig. 4. Changes on the Escape Latency Times of Morris Water Maze Test in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice. Note that significant increases of the escape latency times were detected in Sco control mice as compared with normal mice. However, significant decreases of escape latency times were detected in all test substance administered mice including tacrine 10 mg/kg as compared with Sco control mice, respectively. YMJHT 400 mg/kg showed favorable effects on the Morris water maze test as comparable to those of tacrine 10 mg/kg, in the current experiment. Values are expressed as Mean±S.D. of 10 mice. YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), Sco: Scopolamine. ^ap <0.01 as compared with Normal mice by MW test, ^bp <0.01 as compared with Sco control by MW test.

3. 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)의 결과

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군은 탈출잠복기 (escape latency time)가 유의하게 증가(p<0.01)되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 탈출잠복기(escape latency time)가 유의하게 감소(p<0.01)되었다. 육미지황탕 투여군에서 탈출잠복기의 감소는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 효과를 보였다(Fig. 4).

탈출잠복기(escape latency time)의 측정 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 그 시간이 236.03% 증가하였다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 51.30%의 탈출잠복기의 감소가 있었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 50.10, 38.78, 29.26%의 비율로 탈출잠복기가 감소되었다.

4. 해마조직 내에서의 ACh 함량의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 해마조직 내의 ACh 함량은 유의하게 감소(p<0.01)되었다. Tacrine

투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 해마조직 내의 ACh 함량이 유의성 있게(p<0.01) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 해마조직 내의 ACh 함량의 증가는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다(Fig. 5).

해마조직 내의 ACh 함량 측정 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 함량이 32.96% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 34.92%의 ACh 함량 증가가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 33.84, 25.57, 18.84%의 비율로 해마조직 내의 ACh 함량이 증가하였다.

5. 해마조직 내에서의 AChE 활성도의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 해마의 AChE 활성도는 유의하게(p<0.01) 증가되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 해마의 AChE 활성도가 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다. 육미지황탕 투여군에서 해마의 AChE 활성도의 감소는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 효과를 보였다

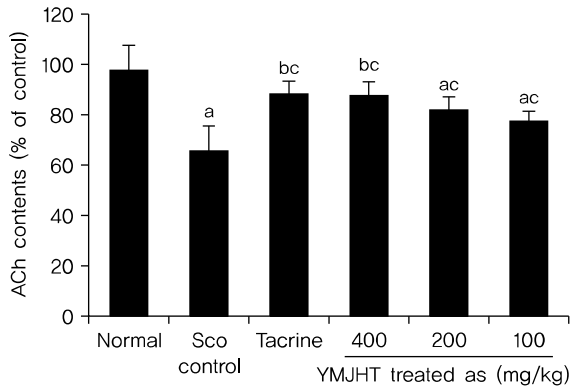


Fig. 5. Changes on the Hippocampus ACh Contents in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice.

Significant and dose-dependent increases of the hippocampus ACh contents were demonstrated in all three different dosages of YMJHT treated mice as compared with Sco control mice.

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

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), Sco: Scopolamine; ACh: Acetylcholine.

^ap<0.01 and ^bp<0.05 as compared with normal mice by MW test, ^cp<0.01 as compared with Sco control by MW test.

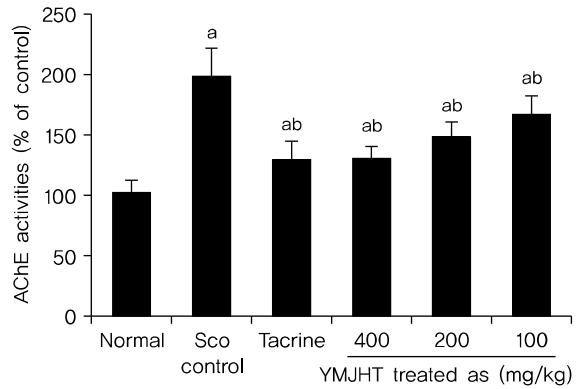


Fig. 6. Changes on the Hippocampus AChE Activities in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice.

Significant and dose-dependent decreases of the hippocampus AChE activities were demonstrated in all three different dosages of YMJHT treated mice as compared with Sco control mice, respectively.

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

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), Sco: Scopolamine, AChE: Acetylcholinesterase.

^ap<0.01 as compared with normal mice by MW test, ^bp<0.01 as compared with Sco control by MW test.

(Fig. 6).

해마의 AChE 활성도를 측정된 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 활성도가 94.10% 증가하였다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 34.80%의 AChE 활성도 감소가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 34.35, 25.43, 15.50%의 비율로 AChE 활성도가 감소하였다.

6. 해마조직 내에서의 ChAT mRNA 발현의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 해마조직 내의 ChAT mRNA 발현이 유의하게(p<0.01) 감소되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 해마조직 내의 ChAT mRNA 발현이 유의하게(p<0.01) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 해마조직 내의 ChAT mRNA 발현의 증가는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다(Fig. 7).

ChAT mRNA 발현을 측정된 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 38.61% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 36.16%의 ChAT mRNA 발현 증가가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 34.40, 28.96, 18.24%의 비율로 해마조직

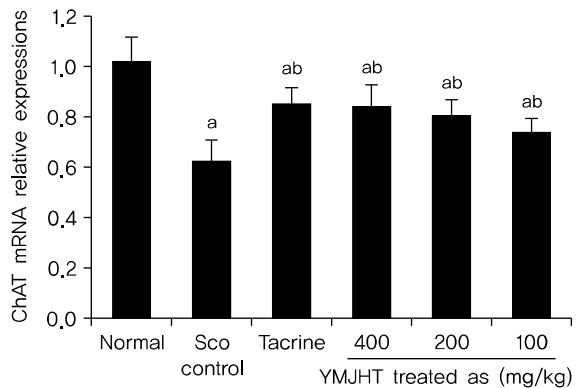


Fig. 7. Changes on the Hippocampus ChAT mRNA Expressions in Normal Mice and Sco-induced Amnesia Mice.

Significant and dose-dependent increases of the hippocampus ChAT mRNA expressions were demonstrated in all three different dosages of YMJHT treated mice as compared with Sco control mice, respectively.

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

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), Sco: Scopolamine, ChAT: Choline acetyltransferase.

^ap<0.01 as compared with normal mice by LSD test, ^bp<0.01 as compared with Sco control by LSD test.

내에서의 ChAT mRNA 발현이 증가하였다.

7. 대뇌의 항산화 방어시스템에서의 결과

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

1) 대뇌 MDA 지수의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 대뇌의 지질 과산화, MDA 레벨이 유의하게($p < 0.01$) 증가되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 MDA 레벨이 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다. 육미지황탕 투여군에서 대뇌 MDA 레벨의 감소는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다 (Table 4).

MDA 지수 측정 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 112.24% 증가하였다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 35.60%의 MDA 레벨의 감소가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 33.52, 24.13, 18.24%의 비율로 MDA 지수가 감소하였다.

2) 대뇌의 GSH 함유량의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 대뇌의 GSH가 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 대뇌의 GSH가 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 대뇌의 GSH 함유량의 증가는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다 (Table 4).

대뇌의 GSH 함유량을 측정한 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 66.71% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 90.74% 대뇌의 GSH 함유량의 증가

가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 89.34, 65.78, 56.98%의 비율로 대뇌의 GSH 함유량이 증가하였다.

3) 대뇌의 CAT 활성의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 대뇌에서의 항산화 효소 CAT 활성이 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 대뇌에서의 CAT 활성이 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 대뇌에서의 CAT 활성의 증가는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 Tacrine 투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다 (Table 4).

대뇌에서의 CAT 활성을 측정한 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 70.85% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 104.69%의 대뇌에서의 CAT 활성 증가가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 103.47, 81.04, 41.22%의 비율로 대뇌에서의 CAT 활성이 증가하였다.

4) 대뇌의 SOD 활성의 변화

정상군과 비교를 하였을 때, Sco대조군에서의 대뇌의 SOD 활성이 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다. Tacrine 투여군과 육미지황탕 투여군은 Sco대조군과 비교하였을 때 대뇌의 SOD 활성이 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 육미지황탕 투여군에서 대뇌 SOD 활성의 증가는 용량 의존적으로 측정이 되었고, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine

Table 4. Cerebral Cortex Antioxidant Defense Systems in Normal Mice and Scopolamine-induced Amnesia Mice

Items (Unit) Groups	MDA (nM/mg protein)	GSH (nM/mg protein)	CAT (nM/min/mg protein)	SOD (nM/min/mg protein)
Normal	2.01±0.46	9.13±1.27	31.75±11.704	20.47±2.68
Control Scopolamine	4.26±0.55 ^a	2.85±0.77 ^a	9.26±2.30 ^c	5.81±2.09 ^a
Tacrine				
10 mg/kg	2.75±0.26 ^{ab}	5.44±1.39 ^{ab}	18.95±2.73 ^{cd}	15.22±2.54 ^{ab}
YMJHT treated				
400 mg/kg	2.83±0.40 ^{ab}	5.40±1.30 ^{ab}	18.83±2.44 ^{cd}	15.27±1.91 ^{ab}
200 mg/kg	3.24±0.38 ^{ab}	4.73±0.68 ^{ab}	16.76±2.79 ^{cd}	11.60±2.05 ^{ab}
100 mg/kg	3.47±0.54 ^{ab}	4.48±1.05 ^{ab}	13.07±3.20 ^{cd}	8.72±1.54 ^{ab}

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

YMJHT: Yukmijihwang-tang extracts, which were purchase from Korea INS Pharm. (Hwasoon, Korea), MDA: Malondialdehyde, GSH: Glutathione, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase.

^a $p < 0.01$ as compared with normal mice by LSD test, ^b $p < 0.01$ as compared with scopolamine control by LSD test, ^c $p < 0.01$ as compared with normal mice by MW test, ^d $p < 0.01$ as compared with scopolamine control by MW test.

투여군과 비교하였을 때 유사한 결과를 보였다(Table 4).

대뇌 SOD 활성을 측정된 결과 Sco대조군은 정상군과 비교하여 71.60% 줄어들었다. Sco대조군과 비교하여 tacrine 투여군에서는 161.76%의 대뇌의 SOD 활성의 증가가 측정되었고, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 각각 162.76, 99.54, 50.04%의 비율로 대뇌의 SOD 활성이 증가하였다.

IV. 고찰

생활수준의 향상, 위생상태의 개선, 의학의 발달, 사회복지제도의 개선 등으로 인간의 수명은 크게 연장되었고, 노인 인구는 크게 증가하였다. 노년기의 여러 질병들은 점점 증가되고 있고 그 중 치매는 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 치매는 기억력 장애와 함께 사회적, 직업적 활동의 손상 및 일상생활 기능의 저하를 초래할 정도의 하나 이상의 인지기능장애가 동시에 나타나는 질환이다¹⁹⁾.

뇌 조직 내 콜린계의 활성 감소는 기억력 저하의 중요한 원인 중의 하나로, 뇌 조직 신경세포에서 choline과 acetyl CoA는 choline acetyl-transferase (ChAT)에 의해 ACh로 합성이 된다. 알츠하이머병 환자에게 가장 현저하게 나타나는 생화학적인 변화 중 하나는 뇌의 해마 및 대뇌피질에서 ACh의 감소이다. ACh는 AChE에 의해 acetate와 choline으로 분해되는데, 이 과정에서 지속적인 AChE의 작용으로 ACh의 양이 감소되면 기억력 저하가 일어난다³⁾. AChE 억제제는 중앙 콜린성 시냅스에서 ACh의 가용성을 증가시키는 기전으로 알츠하이머병의 치료에 활용되고 있다²⁰⁾. Tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine 등이 AChE 억제제로 개발되어 사용되고 있으며¹⁾, tacrine은 미국식품의약국(FDA)에 의해 최초로 승인되었던 대표적인 알츠하이머병 치료제이다²¹⁾. AChE 억제제로 작용하여 대뇌피질 및 해마에서 ACh의 분해를 차단하여 콜린성 신경전달을 증가시키며 항산화 효과가 있음이 보고되었다⁴⁾. 하지만, 30% 환자에서 ALT 수치의 상승의 부작용이 발견되어⁵⁾ 현재는 사용이 금지되었다. 그 외의 AChE 저해제들도 구역, 구토, 식욕감소, 장운동의 이상증가 등 다양한 부작용으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 이러한 부작용에 대한 우려로 근래에는 한약재 유래의 부작용이 비교적 낮은 항치매 약물을 찾기 위한 노력이 시도되고 있는 실정이다^{6,7)}.

한의학에서는 치매(痴呆)를 매병(呆病)이라하여 선진(先秦)이전까지만 해도 ‘진(癡)·광(狂)·간(癲)’과 같은 정신과 영역의 병변에 포함시켜 따로 논하지 않았고, 한 대(漢代)에 이르러 화타(華佗)가 처음 치매(痴呆)라고 명명(命名)하기 시작하였다. 명대(明代) <경악전서(景岳全書)>에 처음 병명이 기재되었다. <의림개착(醫林改錯)>에서는 ‘소아무기성자 뇌수미만(小兒無記性者腦髓未滿) 고년무기성자 뇌수점공(高年無記性者腦髓漸空..)’이라 하여 기억력과 같은 정신기능을 뇌수(腦髓)와 관련지어 설명을 하였다. <황제내경 소문 경맥편(黃帝內經·素問 經脈篇)>에서는 ‘인시생, 선성정, 정성이뇌수생(人始生, 先成精, 精成而腦髓生)’, <영추 해론(靈樞·海論)>에서는 ‘뇌위수지해, 신주골수... 수해유여 즉 경경다려 자과기도 수해부족 즉 뇌전이명 요산현훈목무소견 해태안와 (腦爲髓之海, 腎主骨髓...髓海有餘 則 經勁多力 自過其度 髓海不足 則 腦轉耳鳴 腰酸眩暈 目無所見 懈怠安臥)’라고 하여 몸의 활동과 총명함이 뇌髓와 관련이 있다고 하였고, 뇌髓의 근본이 되는 것이 精이라고 하여 기억과 관련하여 精의 중요성을 언급하고 있다. 기억력의 손상이 腎精의 부족으로 腦髓가 충족하지 못함으로써 발병될 수 있음을 밝히고 있다.

육미지황탕은 한국에서 전통적으로 신장과 관련된 증상 및 당뇨 등에 널리 쓰이며²²⁻²⁵⁾, 자음보신(滋陰補腎)하여 뇌수(腦髓)의 근본(根本)이 되는 정(精)을 보호하는 처방이다. 금궤요략(金匱要略)에서 기원하였으며, ‘허료요통 소복구급 소변불리(虛勞腰痛 小腹救急 小便不利)’의 증상에 사용되는 팔미지황환(八味地黃丸)의 변방으로 송대(宋代) 전을(錢乙)이 육계(肉桂)와 부자(附子)를 제외하여 처방이 확립되었다. 보음(補陰)하는 숙지황(熟地黃), 보비위 익폐신(補脾胃 益肺腎)하는 산약(山藥), 보익간신 삼정렴한(補益肝腎 澁精斂汗)하는 산수유(山茱萸), 이수삼습 건비보중 영심안신(利水滲濕 健脾補中 寧心安神)하는 백복령(白茯苓), 활혈행어(活血行瘀) 하는 목단피(牡丹皮), 이수삼습 설열(利水滲濕 泄熱)시키는 택사(澤瀉)로 구성되어 자음보신(滋陰補腎)시키는 효능이 있다. 육미지황탕의 약리작용에 대한 연구는 활발히 진행이 되고 있으며, 신허혈과 재관류에 대한 보호효과²³⁾, 정자생성력 증가²⁶⁾, 골 손상 억제²⁷⁾, 천식개선 효과²⁸⁾, 항당뇨 효과²²⁾, 테스토스테론 유도 양성 전립선 비대증에 대한 보호 효과²⁵⁾ 등의 실험적 연구가 보고되었다.

육미지황탕의 연구 중 기억력과 관련된 연구는 ibo-

tenic-acid로 유발된 건망증 마우스 모델에서의 기억력 개선효과⁸⁾ 등에 대하여 보고가 되어 있으며, scopolamine 유발 건망증 마우스 모델에서의 육미지황탕의 기억력 개선효과를 약물의 투여 용량과 관련하여 실행한 연구는 찾아볼 수 없다.

중추 콜린성 시스템의 신경전달물질인 ACh는 주의집중, 학습, 기억에 중요한 역할을 하는데, 항무스카린성 효과가 있는 scopolamine은 muscarinic acetylcholine receptor의 길항제로 작용한다. Scopolamine은 비선택적 무스카린성 아세틸 콜린 수용체로서 주로 M1AChR 및 M2AChR에 작용하여 설치류 및 인간에게서 학습 및 단기기억을 손상시킨다^{1,12)}. 인지에 도움이 되는 효과를 검증하기 위해서는 퇴화로 인하지 않은 콜린성 조절 장애의 기억손상모델을 사용하여 약물을 시험을 하는 것이 필수적이다. 해마와 전두엽 피질은 scopolamine에 의한 신경세포 손상에 특히 취약한 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 이런 특성으로 인하여 scopolamine 유발 건망증 마우스 모델은 항건망증 약물의 개발 연구에 많이 사용되고 있다⁹⁾.

본 연구에서는 육미지황탕의 기억력 감퇴에 대한 개선효과 및 작용기전을 scopolamine로 기억력에 장애를 일으킨 마우스 모델을 이용하여 평가하였다.

육미지황탕의 항건망 효과를 알아보기 위해서 이전의 연구¹⁾에서 기억력과 대뇌의 항산화효과가 뚜렷하게 나타난 것으로 알려진 tacrine 10 mg/kg을 대조군으로 사용하였다.

Tacrine 10 mg/kg, 육미지황탕 400, 200 그리고 100 mg/kg를 28일간 투여한 이후 체중, 수동회피 실험(Passive avoidance task test), 수중미로 실험(Morris water-maze test), 해마부위의 ACh 함량, AChE 활성 및 ChAT mRNA 발현 양상을 대뇌피질 항산화 방어시스템의 변화와 함께 각각 관찰하였다. 수동회피 실험(Passive avoidance task test)과 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)은 최초 약물 투여 이후 28일 후, Sco 처치 24시간 이후에 시행되었다. 추가로 대뇌피질의 MDA 양은 지질 과산화를 통해 관찰하였고 항산화 효과를 측정하기 위해 28일간의 지속적인 세 가지 용량의 육미지황탕과 tacrine 경구투여 후에 GSH contents, SOD 및 CAT 활동을 관찰하였다.

먼저 Sco대조군의 변화를 살펴보면, 마우스의 복강 내에 scopolamine을 투여 처치한 결과 정상군에 비하여 수동회피 실험(Passive avoidance task test)에서 밝은 방에서의

체류시간, 즉 체류잠복기(step-through times)의 현저한 감소가 확인되었고, 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)에서도 도피대를 찾아가는 탈출잠복기(escape latency time)의 현저한 증가가 관찰되었다. 또한, 최종 희생 시 해마 부위 조직 내에서의 ACh 함량과 ChAT mRNA발현의 감소가 AChE 활성의 증가와 함께 인정이 되었다. 게다가 대뇌피질의 MDA 양의 증가, GSH양의 감소, SOD와 CAT 활성도 감소 등이 관찰되었고, 이러한 결과를 볼 때 대뇌피질의 항산화 방어 시스템이 파괴된 것을 확인할 수 있었다. 즉, Sco에 의해 AChE 활성의 증가와 ChAT mRNA 발현의 감소에 의한 ACh의 함량 감소 및 이와 관련된 항산화 방어 시스템의 고갈에 의한 기억력 감퇴가 유발되었다. 이러한 Sco 처치로 인한 AChE 활성화와 대뇌피질의 항산화방어 시스템의 파괴는 28일간의 지속적인 육미지황탕 400, 200, 그리고 100 mg/kg의 경구투여로 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 현저히 억제되었다. 이것은 육미지황탕이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서 ACh를 보호하고 ChAT mRNA의 발현을 증가시키며, AChE 억제에 관여하고 대뇌의 항산화 방어 시스템을 보호하여 기억력 감퇴를 완화시켰다는 것을 의미한다. 이 실험에서 육미지황탕 400 mg/kg의 작용은 tacrine 10 mg/kg과 유사한 기억력 개선 효과를 나타냈다.

Sco대조군과 정상군과의 비교에서 체중의 변화에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 결과적으로 scopolamine의 28일 간의 투여는 체중증가에 큰 영향을 미치지 않았다. 게다가 육미지황탕 400, 200, 그리고 100 mg/kg의 투여 및 tacrine 10 mg/kg의 경구투여군 역시 정상군과 Sco대조군에 비해 체중의 의미있는 변화는 실험기간 동안 나타나지 않았다.

수동회피 실험(Passive avoidance task test)은 기억을 취득, 기억보존, 회상작용의 세 가지의 기억의 단계에서 치료를 평가하는데 일반적으로 사용 된다^{1,20)}. Sco대조군의 경우 기명력 검사(retention test)에서 체류잠복기(step-through times)의 현저한 감소를 보였는데 이는 중추 콜린성 신경 시스템이 기억의 습득과 학습에 중요한 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다. 하지만 육미지황탕 투여군에서는 Sco처치로 인해서 짧아진 체류잠복기(step-through times)가 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 늘어났으며, 이는 중추 콜린성 신경 시스템에 작용과 관련되는 것으로 보

이는 기억손상에 대한 육미지황탕의 항건망 효과를 시사한다. 본 실험에서는 육미지황탕 400 mg/kg의 경우 tacrine 10 mg/kg와 유사한 효과를 보였다.

모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)는 선택 인지 행동 테스트 중 하나인데¹¹⁾, 공간 학습 및 기억 등의 중추 콜린성 시스템의 변화를 측정하는데 사용된다. 물이 채워진 물탱크를 탈출하는데 걸리는 시간(escape latency time)은 인지장애를 가진 동물에게서 크게 증가한다³⁰⁾. 기억의 각각의 단계에 작용하는 육미지황탕의 효과를 확인하기 위한 실험에서 Sco대조군은 이전연구와 유사하게 모리스 수중미로 실험에서 정상군보다 더 긴 탈출잠복기(escape latency time)을 보였다. 세 가지 용량의 육미지황탕 투여군에서 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 탈출잠복기(escape latency time)가 감소되었으며, 육미지황탕 400 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과는 육미지황탕이 적어도 현재의 실험조건에서 Sco 유도 기억손상에서 장기 기억력을 복구할 수 있음을 시사한다.

중추 콜린성 시스템은 인지기능의 조절에 중요하다. ChAT는 중추 및 말초신경계에서 콜린성 뉴런 기능의 가장 특징적인 지표로, ChAT는 나이든 뇌에서 활동이 강하게 감소하며, ChAT의 비활동성의 정도에 따라 인지장애의 심각도가 높아진다³¹⁾. 콜린성 뉴런에서 ChAT에 의해 합성되는 신경전달물질인 ACh는 타이밍, 주의, 학습 및 기억 등의 여러 인지 과정에서 중추 및 말초제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 ACh가 시냅스 간극으로 방출되는 콜린성 신경 세포 병변은 학습과 기억의 장애를 일으킨다³²⁾. ACh의 존속기간은 ACh 방출 후 이를 가수분해하는 AChE의 활동에 따라 달라진다³³⁾. AChE의 억제제는 알츠하이머병, 다른형태의 치매, 외상성 뇌손상, 정신 착란 및 치료에 사용되는 방법이며, 잠재적으로는 정신분열병의 치료에도 유용할 수 있다³⁴⁾.

육미지황탕은 해마조직 내의 ChAT mRNA 의 활성의 상향조절을 통해 ACh 보호작용을 보였으며, AChE 활동억제 효과가 있었는데, 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 효과를 보였으며, 육미지황탕 400 mg/kg은 tacrine 10 mg/kg과 유사한 효과가 있었다. 결과적으로 육미지황탕이 해마조직내의 AChE 억제와 ChAT mRNA 활성의 상향조절을 통해서 ACh를 보호하여 Sco로 유발된 기억장애를 완화하는 효과가 있음을 시사한다.

활성산소는 외인성 물질에 의한 세포대사를 통해 세포내에서 생성된다. 나이가 들어감에 따라 활성산의 생산도 증가 된다³⁵⁾. 이것들은 뇌에서 생체분자와 반응하여 기억손상과 신경퇴행을 야기 한다³⁶⁾. 또한 산화스트레스는 알츠하이머병에서 인지결핍에 중요한 역할을 한다는 증거들이 밝혀지고 있다³⁷⁾. SOD, MDA, 최종당화산물, peroxyinitrite, heme oxygenase-1과 같은 산화스트레스 생체마커가 알츠하이머병에서 보이는 신경섬유 엉킴과 노인반에서 높아진 것들은 그 증거가 된다³⁸⁾.

뇌는 산화 불균형에 매우 취약하며 이는 높은 에너지 소모로 인한 산소 소모, 쉽게 과산화 되는 고도 불포화 지방산, 높은 활성산소축매체의 수준, 산화방지제 및 관련효소의 상대적 부족 등에 기인 한다³⁹⁾. 기저 전위 및 편도체는 학습 및 기억 형성에 관여하며 산화 스트레스에 가장 취약하다⁴⁰⁾. 그러므로 산화 불균형은 다양한 퇴행성 신경질환의 발병 이전에 보고된 바와 같이 산화 스트레스로 인한 분자의 손상을 야기 한다³⁷⁾. 활성산소 생성으로 인한 미토콘드리아 기능 장애는 노화 및 퇴행성 신경질환과 관련이 있다. 산화 스트레스와 미토콘드리아 기능 이상간의 상호작용은 알츠하이머병과 같은 신경 퇴행성 장애에서 중요하게 여겨진다⁴¹⁾. 또한 Sco는 지질 과산화의 증가를 유발하여 항산화방어시스템의 심각한 파괴를 야기하여 알츠하이머병과 같은 증상을 나타나게 한다⁴²⁾. 지질의 과산화로 인한 다양한 독성물질들이 주위의 세포들을 파괴하게 되며⁴³⁾, 산화스트레스 역시 뇌손상의 중요한 요소로 작용을 한다⁴⁴⁾.

GSH는 대표적인 항산화 물질이며, 낮은 활성산소를 유지하여 조직손상을 방지하며 산화를 억제하여 특정세포농도와 조직을 보호 한다⁴⁵⁾.

SOD는 뇌의 방어 시스템에 기여하는 항산화 효소중 하나이며, CAT는 H₂O₂를 H₂O로 전환하는 촉매 역할을 한다⁴⁶⁾. 따라서 지질과산화와 활성산소의 억제를 위해서는 GSH의 증가가 있어야 하며, SOD와 CAT활성은 손상된 뇌 조직 내에서 허혈에 의한 뇌 손상에 대한 보호의 측면에서 이차적으로 중요하다.

이번 연구에서 Sco대조군에서 대뇌피질 조직 내의 SOD, CAT 그리고 GSH 와 같은 활성 산소종 해독제 효소들의 유의한 감소가 보였다. 또한, Sco처리는 정상군 마우스에 비해 지질과산화를 나타내는 지표인 MDA의 생산을 유의하게 증가시켰다. 육미지황탕 처치는 유의성 있게 용량 의존적으로

대뇌의 지질과산화물을 억제하였고, SOD와 CAT활성 및 GSH 수준을 Sco대조군에 비해 높게 올려주었다. 육미지황탕 400 mg/kg의 경우 tacrine 10 mg/kg와 유사한 효과를 나타냈다. 이 결과들은 육미지황탕이 적어도 본 연구의 조건에서 산화방어시스템의 증가시켜 Sco처치 마우스의 기억 손상을 완화하고 항건망 효과를 나타내었다고 볼 수 있다.

이상의 결과에서, 육미지황탕은 항산화 방어 시스템을 활성화하고, AChE 활성 억제 및 ChAT mRNA 발현의 증가를 통한 ACh 함량 감소 억제, 기억력 개선효과가 있음을 확인할 수 있었다. 특히 육미지황탕 400 mg/kg 투여했을 경우 tacrine 10 mg/kg 투여와 유사한 기억력 개선 효과가 있었다. 하지만 육미지황탕은 숙지황(熟地黃), 산약(山藥), 산수유(山茱萸), 목단피(牡丹皮), 백복령(白茯苓) 및 택사(澤瀉)의 6종의 약재로 구성되어 있으며, 이 약재들은 각각 수많은 생리활성 물질을 함유하고 있어, 향후 개별 구성 약재 각각에 대한 효능 및 생리활성의 기전에 대하여 다양한 방법으로 연구를 수행해야 할 것으로 판단된다.

V. 결론

Scopolamine으로 유발된 건망증 마우스 모델에 육미지황탕을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 육미지황탕 400, 200 및 100 mg/kg 투여군에서 Sco대조군에 비해 수동 회피 검사에서 체류잠복기(step-through latency time)가 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하였다.

2. 육미지황탕 400, 200 및 100 mg/kg 투여군에서 Sco대조군에 비해 모리스 수중 미로 실험에서 탈출잠복기(escape latency time)가 용량 의존적으로 유의성 있게 감소되었다.

3. 육미지황탕 400, 200 및 100 mg/kg 투여군에서 Sco대조군에 비해 최종 희생 시 해마 부위 조직 내 ACh 함량 및 ChAT mRNA 발현의 증가가 AChE 활성의 감소와 함께 용량 의존적으로 유의성 있게 인정되었다.

4. 육미지황탕 400, 200 및 100 mg/kg 투여군에서 Sco대조군에 비해 대뇌피질 내 MDA의 감소가 확인되었고 GSH 함량, SOD 및 CAT 활성이 증가되었다.

이상으로부터, 육미지황탕은 AChE 활성 억제 및 ChAT mRNA 발현의 증가에 의한 ACh 함량 감소 억제를 통해 기억력 감퇴 억제 효과를 나타내었으며, 대뇌 항산화 방어 시

스템을 활성화하는 효과 또한 인정이 되었다. 그 효과는 육미지황탕의 400, 200 및 100 mg/kg 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 나타났다.

REFERENCES

1. 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.
2. Becker R, Giacobini E, Elble R, McIlhany M, Sherman K. Potential pharmacotherapy of Alzheimer disease. A comparison of various forms of physostigmine administration. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1988;116:19-32.
3. Choi WH, Um MY, Ahn JY, Kim SR, Kang MH and Ha TY. Acetylcholinesterase inhibitory activity and protective effect against cytotoxicity of perilla seed methanol extract. *J Korean Food Sci Technol*. 2004;36:1026-31.
4. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;581(3):283-9.
5. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994;271(13):992-8.
6. Xiao J, Li S, Sui Y, Wu Q, Li X, Xie B, Zhang M, Sun Z. *Lactobacillus casei*-01 facilitates the ameliorative effects of proanthocyanidins extracted from lotus seedpod on learning and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice. *PLoS One*. 2014;9(11):e112773.
7. Hasanein P, Mahtaj AK. Ameliorative effect of rosmarinic acid on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Neurosci Lett*. 2015;585:23-7.
8. Kang M, Kim JH, Cho C, Lee KY, Shin M, Hong M, Shim I, Bae H. Effects of Yukmijihwang-tang derivatives (YMJd) on ibotenic acid-induced amnesia in the rat. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(7):1431-5.
9. 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.
10. 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(1):57-62.
11. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.
12. Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cad-

- mium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;80:33-42.
13. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205.
 14. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis.* New York: Academic Press. 1974; 673-86.
 15. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
 16. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1981;6(2):145-51.
 17. Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24(3-4):294-6.
 18. 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(9):3536-71.
 19. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder.* 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association. 1994.
 20. LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* 1993;58:69-79.
 21. Park SM, Ki SH, Han NR, Cho IJ, Ku SK, Kim SC, Zhao RJ, Kim YW. Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(2):184-92.
 22. Song XY, Chen Q, Qi XY. Effects of liuweidihuang pill on erythrocyte aldose reductase activity in early diabetic nephropathy patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2004;24(12):1087-90.
 23. Kang DG, Sohn EJ, Moon MK, Mun YJ, Woo WH, Kim MK, Lee HS. Yukmijihwang-tang ameliorates ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;104(1-2):47-53.
 24. Ha H, Lee JK, Lee HY, Koh WS, Seo CS, Lee MY, Huang DS, Shin H. Safety evaluation of Yukmijihwang-tang: Assessment of acute and subchronic toxicity in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:672136.
 25. Shin IS, Lee MY, Ha HK, Seo CS, Shin HK. Inhibitory effect of Yukmijihwang-tang, a traditional herbal formula against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:48.
 26. Oh MS, Chang MS, Park W, Kim DR, Bae H, Huh Y, Park SK. Yukmijihwangtang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Reprod Toxicol.* 2007;24(3-4):365-70.
 27. Shim KS, Ma CJ, Kim DS, Ma JY. Yukmijihwang-tang inhibits receptor activator for nuclear Factor- κ B ligand-induced osteoclast differentiation. *J Med Food.* 2011;14(11):1439-47.
 28. Shen JJ, Lin CJ, Hiang JL, Hsieh KH, Kuo ml. The effect of liu-wei-di-huang wan on cytokine gene expression from human peripheral blood lymphocytes. *Am J Chin Med.* 2003;31(2):247-57.
 29. Abe E. Reversal effect of DM-9384 on scopolamine-induced acetylcholine depletion in certain regions of the mouse brain. *Psychopharmacology.* 1991;105(3):310-6.
 30. 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(11):2648-57.
 31. Zambrzycka A, Alberghina M, Strosznajder JB. Effects of aging and amyloid-beta peptides on choline acetyltransferase activity in rat brain. *Neurochem Res.* 2002;27:277-81.
 32. Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiol Aging.* 2005;26(6):939-46.
 33. Eichenbaum H. How does the brain organize memories? *Science.* 1997;277(5324):330-2.
 34. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* 2004;50(4):433-40.
 35. Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. Zingiber officinale mitigates brain damage and improves memory impairment in focal cerebral ischemic rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:429505.
 36. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys.* 2009;46(1):9-15.
 37. 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.
 38. 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(8):1518-22.
 39. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(8):759-67.
 40. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;893:154-75.
 41. Swerdlow RH. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:1630-9.

42. Lee JS, Kim HG, Lee HW, Han JM, Lee SK, Kim DW, Saravanakumar A, Son CG. Hippocampal memory enhancing activity of pine needle extract against scopolamine-induced amnesia in a mouse model. *Sci Rep.* 2015;5:9651.
43. Mansoorali KP, Prakash T, Kotresha D, Prabhu K, Rama Rao N. Cerebroprotective effect of *Eclipta alba* against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats. *Phytomedicine.* 2012;19(12):1108-16.
44. Raichle ME. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol.* 1983;13(1):2-10.
45. 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(1):59-65.
46. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481-93.