

Scopolamine 유발 기억력손상 흰 쥐에서 苓桂甘棗湯加龍骨牡蠣의 인지기능개선과 항산화 효과

김대억, 한다영, 김상호, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과교실

Anti-amnesic and Antioxidant Effect of Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo Aqueous Extracts on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Dae-eok Kim, Da-young Han, Sang-ho Kim, Dae-kyoo Chung

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

Received: July 26, 2018
Revised: August 31, 2018
Accepted: September 15, 2018

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

Objectives: The purpose of this in vivo study is to observe anti-amnesic effects of Yeongkyekamjotang-gayonggolmoryo (YGYM), a novel mixed herbal prescription, Osis Mastodi and Ostreae Testa added Yeongkyekamjo-tang, on scopolamine induced amnesia in C57BL/6 mice through acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) activity, Choline acetyltransferase (ChAT) mRNA expression, and anti-oxidant effects.

Methods: Six groups, total 20 intact or 100 Sco treated mice were used in this study after one week of acclimatization period. Half the animals were used for passive avoidance task tests and hippocampus ACh content, AChE activity, and ChAT mRNA expression were measured. The other half was subjected to an underwater maze test and then the cerebral cortex antioxidant defense system was measured.

Results: In the passive avoidance experiment, there was significant decrease in residence time in the bright room and in the underwater maze test, escape latency to escape from the esophagus significantly increased compared with the normal control group. At the final sacrifice, ACh content and ChAT mRNA expression decreased, AChE activity increased, and cerebral cortical MDA increased GSH content, SOD and CAT activity in Sco control mice, as compared to intact vehicle control mice. However, these Sco treatment-related memory loss through AChE activation destroyed the cerebral cortex antioxidant defense system, and was inhibited dose-dependently by 28 days consecutive oral pretreatments of YGYM extracts 500, 250, 125 mg/kg.

Conclusions: In the above results, YGYM extract that oral administration of YGYM extracts alleviates the antioxidant defense system, through preservation of ACh mediated by upregulation of ChAT mRNA expression, and increase of AChE inhibition and brain antioxidant defense systems.

Key Words: Yeongkyekamjotang, Yonggol, Moryo, Improvement of Memory, Antioxidant.

I. 서론

인지기능이란 상황을 보고, 듣고 파악하는 능력으로, 기억력, 연산능력, 판단력, 사고력 등을 말한다. 이러한 인지 기능이 문제가 생기는 대표적인 퇴행성 두뇌질환이 치매이다. 치매에 있어서 60% 정도를 차지할 정도로 가장 많은 형태의 질환인 알츠하이머병은 처음에는 최근 일을 기억하는 것에서 문제를 보이다가 언어기능과 판단력 등 점차적으로 다른 기능상실을 만들어 인지기능저하와 신경증상을 나타낸다¹⁾. 알츠하이머환자의 뇌에서 아세틸콜린(Acetylcholine)의 감소는 치매를 일으키는 중요한 요소로 알려져있다²⁾. 아세틸콜린(ACh)을 분해하는 아세틸콜린에스테라제(Acetylcholinesterase)가 계속하여 작용하면 아세틸콜린(ACh)이 감소되어 기억력감퇴와 치매를 야기하게 된다³⁾. 그래서 현재, 콜린성 가설(cholinergic hypothesis)을 바탕으로 아세틸콜린에스테라제(AChE) 억제제가 치료제로 사용되어지고 있다⁴⁾. 아세틸콜린에스테라제(AChE) 억제제인 타크린(Tacrine)은 FDA에 의해 알츠하이머병에 대한 첫 번째 치료제로 추천되고 있다⁵⁾.

하지만, 타크린은 환자의 혈청 ALT 수치를 30% 가량 증가시킨다고 보고되고 있어 임상적 사용에 있어 엄격하게 제한하고 있는 상황이며⁶⁾ 또 다른 억제제인 도네페질(donepezil)은 서맥, 구역감, 식욕부진, 복통, 조증 등의 부작용이 있다⁷⁾. 아세틸콜린에스테라제(AChE) 억제제는 몇 년 이상의 장기투여를 필요로 하기에, 부작용이 적은 새로운 치료제를 찾는 것이 필요하다. 이에 대한 대안으로 전통적으로 사용해온 한약재에서 인지기능개선효과를 지닌 약물을 찾고자하는 노력도 계속되고 있다⁸⁾.

영계감조탕(苓桂甘藶湯)은 <상한론(傷寒論)>에 처음으로 기재된 처방으로 복령(茯苓), 계지(桂枝), 감초(甘草) 그리고 대조(大棗)의 4종의 약초로 구성되어져 있으며, ‘발한후 기인 제하계자 옥작분돈’(發汗後 其人 臍下悸者 欲作奔豚)의 증상에 사용되는데⁹⁾ ‘분돈박우심흉, 단기식박자’(奔豚迫于心胸, 短氣息迫者)라고 기술되어 있으며 심하계(心下悸), 심번(心煩), 번조(煩燥), 불면(不眠) 등 신경성질환에 응용되어져 왔다¹⁰⁾. 갱년기장애, 심계항진과 우울증을 포함한 다양한 심리적인 장애들을 치료해온 전통적인 처방인 것이다¹¹⁾. 용골은 한약에서 주로 안정제와 진정제로 사용되어져왔으며¹¹⁾, Elephas 종과 같은 대형 포유동물의 골화된 뼈로써, 주로

탄산칼슘으로 구성되어있다. 또한 모려는 스트레스 치료를 위해 중국 일본 한국에서 사용되어져 왔는데¹²⁾ 골껍질의 분말로써, 칼슘, 탄산칼슘 그리고, CaSO₄ 등으로 구성되어져 있다. <약징(藥徵)>에서는 용골(龍骨) 주치 제하동야. 방치 변경 실정. (主治 臍下動也. 旁治 煩驚 失精.) 모려(牡蠣) 주치 흥복지동야. 방치 경광 번조. (主治 胸腹之動也. 旁治 驚狂 煩躁.)라고 기술되어 있으며, 신경성질환에 사용되어져 왔다.

한약처방의 인지기능개선에 대한 효능에 대해서는 지금까지 여러 연구가 진행되어져 왔다. 장원환가감방(LMK02) 수추출물의 단회독성과 Tg-APP swe/PS1dE9 알츠하이머병 생쥐 모델에서의 유효성 평가에 대한 연구¹³⁾, 한약복합물 HT008-1의 인지기능 및 기억력 향상효과 등¹⁴⁾에 대한 보고가 되어 있으나, 정신인지기능에 효과가 있어 신경성질환에 사용되어온 영계감조탕(苓桂甘藶湯)에 안신작용(安神作用)을 하는 용골(龍骨) 모려(牡蠣)를 더하여 인지기능개선과 항산화에 대한 효과를 실행한 연구는 찾아볼 수가 없었다.

그러므로 본 연구에서는 영계감조탕가용골모려(苓桂甘藶湯加龍骨牡蠣)의 인지기능개선과 항산화에 대해 살펴보기 위해, scopolamine 유발 기억력 손상 흰 쥐에게 영계감조탕가용골모려(苓桂甘藶湯加龍骨牡蠣) 투여한 이후, 항산화 활성정도, 아세틸콜린, 아세틸콜린에스테라제(AChE)의 활동, ChAT mRNA 발현, 항산화 효과, 수동회피검사, 수중미로실험을 통해 용골 모려를 추가한 영계감조탕(YGYM)의 인지기능개선효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 관리

실험동물은 6주령의 120마리의 수컷 마우스를 주식회사 오리엔트바이오(경기 성남시, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 무게는 18~21 g이었으며, 1주일간의 순화기간을 거쳐 6개군으로 나누어 사용하였다. 순화과정과 실험 전 과정동안 온도는 20~25°C로, 습도는 50~55%로 조절된 사육실에서, 명암주기(light : dark cycle)는 12시간을 단위로 주기적으로 바꾸었으며, 사료(standard rodent chow ; Samyang, Seoul, Korea)는 물과 함께 자유롭게 공급하였다. 실험동물에 대한 국립규정을 준수하여 실험을 시행하였으며, ‘대구한

의대학교 동물실험 윤리위원회'의 지침을 준수하여, 승인 하에 실험을 실시하였다(승인번호: DHU 2016-039). 6개의 군으로 나누어 실험을 하였으며, 정상군 20마리와 Sco대조군 100마리는 1주일동안 순화를 한 후에 몸무게를 기준으로(Mean body weights: 21.28 ± 0.84 g, ranged in 20.10~23.60 g) 선택하였다. 이중 절반의 실험동물은 수동회피시험 후 해마의 ACh 함량, AChE 활성도 및 mRNA ChAT 의 발현을 관찰하였으며, 나머지 절반은 수중미로시험 후 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템의 측정하였다(Table 1, Fig. 1).

실험군(6개군; 군당 20마리의 랫트 사용)

1. 정상 매체 대조군(경구 및 복강투여 정상 매체 대조군)
2. Sco 대조군(경구 및 Sco 복강투여 대조군)
3. Tacrine (Tacrine 10 mg/kg의 경구 및 Sco 복강투여 대조군)
4. YGYM 500 (YGYM 추출물 500 mg/kg 경구 및 Sco 복강투여 고용량 실험군)

5. YGYM 250 (YGYM 추출물 250 mg/kg 경구 및 Sco 복강투여 중간용량 실험군)

6. YGYM 125 (YGYM 추출물 125 mg/kg 경구 및 Sco 복강투여 저용량 실험군)

2. 실험물질 준비와 투여

1) 실험물질 준비

영계감조탕가용골모려(荳桂甘棗湯加龍骨牡蠣)는 어두운 갈색의 과립제로 회전식 진공 증발기(N-1110, Eyela, Tokyo, Japan)를 프로그래밍 가능한 동결건조기(FDB-5503, Operon, Kimpo, Korea)를 사용하여 준비되어졌다. 본 실험에서 사용한 YGYM은 백복령(白茯苓), 계지(桂皮), 감초(甘草), 대조(大棗), 용골(龍骨) 및 모려(牡蠣)로 구성되어 있는데(Table 2), 이들은 제천한방약초에서(Jecheon, Korea) 구입하여, 대구한의대학교 한방제형세계화 연구소에서 (Responsible scientist : Prof. Lee YJ, OMD) 열수추출하여 사용하였다. 총 570 g의 YGY M을 5L의 증류수로 60°C

Table 1. Experimental Design Used in This Study

Groups	Inducer	Group identification	Treatment
Effects of YGYM 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	YGYM 500	The highest dosages of YGYM 500 mg/kg/day, oral gavage
Active	Sco	YGYM 250	The middle dosages of YGYM 250 mg/kg/day, oral gavage
Active	Sco	YGYM 125	The lowest dosages of YGYM 125 mg/kg/day, oral gavage

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine, AChE: Acetylcholinesterase, ChAT: Choline acetyltransferase.

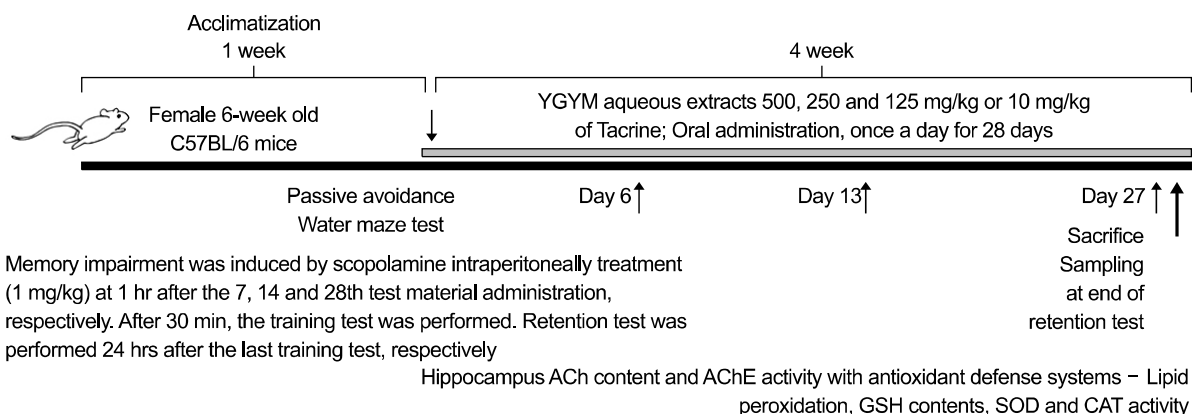


Fig. 1. Experimental Design Used in This Study.

Table 2. Composition of YGYM Used in This Study

Herbs	Scientific name	Korean name	Amounts (g)
Hoelen	<i>Poria cocos</i> Wolf	[白茯苓]	16
Cinnamon Bark	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	[桂皮]	8
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	[甘草]	6
Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder	[大棗]	11
<i>Fossilia Ossis Mastodi</i>	<i>Elephas</i> Species	[龍骨]	8
<i>Ostreae Testa</i>	<i>Ostrea gigas</i> Thunberg	[牡蠣]	8
Total	6 types		57

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, All individual crude drugs were purchases from local voucher (Jecheonhanbangyakcho, Jecheon, Korea) after confirm the morphology.

에서 3번, 4시간 동안 끓여, 등근 플라스크 증발기를 사용하여 증발시키고, 완전히 동결 건조시켰다. 이 과정에서 105.68 g (yield=18.54%)의 열수추출물 YGYM을 얻었으며, 대구한의대학교 한방체형세계화 연구소에 표본으로 기탁하였다 (Code YGYM201 6Ku01).

대조군으로 사용된 결정질 고체 tacrine hydrochloride 은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) 에서 구매해 사용하였다.

2) 실험물질 관리와 투여

YGYM추출물과 tacrine은 모두 사용중에 빛과 습기에 노출되지 않도록 하였으며, -20°C로 냉장보관을 하였다. 두 약물 모두 증류수에 잘 녹았다. 증류수에 녹인 500, 250, 125 mg/kg의 세 가지 다른 용량의 YGYM추출물을 10 ml/kg의 양으로 매일 한번씩 28일 기간동안 경구투여 하였다. Tacrine은 10 mg/kg을 경구투여 하였으며, 정상대조군과 Sco대조군은 동일량의 증류수를 시약 대신 투여하였다 (Table 2, Fig 1).

3) Sco- 기억손상 유도

이전의 Kim (1990)의 방법에 따라서, Sco hydrobromide 1 mg/kg의 용량으로 실험시작하고 난 다음 7일 후, 14일 후, 28일 후에 투여하여 기억력 손상을 유도하였는데, YGYM추출물 투여 1시간 후에 복강 주사하였다. Sco hydrobromide는 멸균식염수으로 용해해서 10 ml/kg으로

사용하였으며, 정상군에서 동일량의 멸균식염수가 사용되어졌다.

4) 몸무게 측정

몸무게의 변화는 초기 약물투여 1일 전, 그리고 YGYM추출물과 tacrine 첫 약물투여날과 투여 후 1, 6, 13, 20, 27, 28일에 자동 전자저울을(Precisa Instrument, Dietikon, Switzerland) 이용해 측정하였다. 몸무게 측정시, 개체차를 줄이기 위해, [(Body weight at the day of sacrifice, 24 hrs after last 28th test material administration) - (body weight at the day of first material administration)]의 방식을 이용하였다.

5) 수동회피실험(Passive avoidance test)

수동회피실험은 빛/소음 설비와 전기가 들어오는 구획된 바닥이 설치된 두가지 분리된 박스를 이용해 이루어졌다^{15,32)}. Sco처리 30분 후 실험을 하였는데, 각각 마우스들은 빛/소음설비가 있는 박스에 놓여지고, 15초 후에 빛과 소음은 가하지면, 마우스가 이웃의 구획된 바닥으로 이동을 하게되는데, 완전히 이동할때까지 계속 가해진다. 마우스가 옆칸으로 이동하면, 두공간을 구획하는 칸이 닫히게 되고 전기자극 (3.0 mA, 3 sec)이 구획된 바닥에 가해진다. 120초 동안 옆으로 이동하지 않은 쥐들은 다음 실험에서 제외되었다. training test 24시간 이후에 retention test가 같은식으로 시행되었다. 전기자극으로 인해 쥐들은 옆 칸으로 이동하는 것을 피하게 되는데, 옆박스로 이동하는 시간을 체류 대기 시간으로 기록했으며, 그 시간을 최대 300초로 하였다. 수동회피실험은 Sco처리 후 24시간, 초기물질 투여 후 29일에 이루어졌다.

6) 모리스 수중미로실험(Morris water-maze test)

수중 미로실험은 Morris방법¹⁶⁾에 따라서 시행되었다. 이 실험은 깊이 27 cm이고 22°C의 물이 채워진 지름 100 cm 높이 37 cm의 수조에서 이루어진다. 도피 플랫폼(지름 10 cm)는 수조 사면원 중의 한군데에 수면 바로 아래에 살짝 가라앉혀 설치하였다. Sco 처리 30분 후에 training test가 시행되었다. 각 마우스를 물에 빠뜨려서, 도피 플랫폼으로 탈출하는 것을 관찰하였으며, 이 과정을 비디오 추적시스템으로(Smart junior, PanLab., Barcelona, Spain) 촬영하였

다. 마우스가 성공적으로 도피 플랫폼에 도달하면, 10초간 쉬게 하였다. 하지만, 만약 150초 동안 도피 플랫폼을 찾지 못하면, 도피 플랫폼에 옮겨서 10초간 쉬게 하였다. re-tention test는 training test 24시간 이후에 이루어졌다. 마우스가 도피 플랫폼을 찾는데 걸리는 시간을 측정하였으며, 최대 제한시간을 300초로 한정해서 기록하였다. 모리스 수중미로실험은 초기 시험물질 투여 29일, Sco 처리 24시간 후에 시행하였다. 이 실험은 수동회피 실험을 한 마우스와는 구분하여 이루어졌다.

7) ACh 함량과 AChE 활성도 측정

수동회피 실험 후에 마우스들은 희생되어졌는데, 해마부위를 제거, 해부해서 분석까지 -150°C 에서 냉동보관되었다. 분리되어진 해마는 무게를 측정하고, 차가운 0.01M Tris-HCl (pH 7.4)에서 균질화하였다. 텔 리오등이 설명¹⁷⁾한대로, 15분 동안 원심분리하여 12,000 g으로 되었다. Amplex Red ACh/AChE assay kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 이용하여, 해마에서의 ACh 함량과 AChE 활성도를 측정하였다. stock 용액으로부터 2 U/ml의 horseradish peroxidase와 0.2U/ml choline oxidase를 포함하는 Amplex Red 400 μM 의 작업용액이 준비되었다. ACh 함량과 AChE 활성도 CBe의 영향을 측정하기 위해, 100 U/ml AChE and 100 μM ACh가 추가되었다. 100 μl 작업용액이 microplate wells에 가해졌을 때 반응은 일어났다. 이때 형광물질이 방출되었는데, VersaMax ELISA microplate 리더기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용해 560 nm의 여기파장과 590 nm의 발광파장을 측정하였다. 배경 형광물질은 음성 대조군으로부터 유도된 값을 감산해서 제거하였다.

8) ChAT mRNA 발현측정

RNA는 수동 회피실험 후 바로 마우스의 해마조직으로부터 트리졸 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. 이때 이전 연구방법을 따랐다¹⁸⁾. RNA 농도 및 질은 CFX96TM Real Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 측정하였다. 오염된 DNA를 없애기 위해 샘플은 recombinant DNase I로 처리했다(DNA-free; Ambion, Austin, TX, USA). 매뉴얼 지침에 의거해 reagent High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Bio-

systems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 RNA를 역전사하였다. 요약하면, cDNA 첫가닥은 전체 RNA로부터 합성되었으며, primer 혼합체와 cDNA 산물은 PCR을 사용해 증폭되었다(Bioneer, Daejeon, Korea).

ChAT : Foward 5'-CTTGATGGTCCAGG- CAC-3' and
Reverse 5'-GTCATACCAACGATTCGCTCC-3'
 β -actin : Foward 5'-TGGTGGGTATG- GGICAGAAG-3' and
Reverse 5'-CATGGCT GGGGTTGAAGG-3'

PCR이 증폭되는 조건은 58°C 에서 30분, 94°C 에서 2분, 15초 동안 94°C 에서 35cycle, 60°C 에서 30초, 68°C 에서 1분 그리고 72°C 에서 5분간이다. ChAT 발현수준은 β -actin RNA를 내부대조군으로 하여 정상군과 비교를 통해서 백분율로 계산했다.

9) 대뇌 피질의 항산화 방어 시스템

모리스수중미로실험이 끝난 28일 때 마우스들은 희생되었다. 대뇌피질이 제거되었고 MDA와 GSH 함량, CAT, SOD효소 활성도를 대뇌피질의 항산화 시스템을 보기위해 평가하였다. 분리된 대뇌피질 무게를 측정하였으며, 0.1M MEDTA (pH 7.4)와 10 mM sucrose, 그리고 10 mM Tris-HCl이 들어간 완충액으로 균질화하였으며, 그리고 Zhan and Yang (2006)이 묘사한대로, 15분간 12,000 g을 원심 분리하였다. 대뇌지질 과산화농도는 UV/VIS 분광 광도계로 nM of MDA/g으로써 흡광도 525 nm에서 thiobarbituric acid test를 이용해서 측정하였다¹⁹⁾. 전체 단백질량은 bovine serum albumin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 따라 국제 기준에 맞춰서, 이전방식을 이용해 측정했다²⁰⁾. GSH의 함량의 측정을 위해 준비된 균질물을 25% trichloroacetic acid 0.1 ml (Merck, San Francisco, CA, USA)와 혼합하여 40분 동안 4°C 의 온도에서 4,200 rpm의 속도로 원심분리하였다. GSH의 함량은 흡광도 412 nm에서 2-nitrobenzoic acid를 사용해서 nM/mg 단백질량에 따라 측정하였다²¹⁾. CAT 존재하에, H_2O_2 의 분해는 240 nm에서 시행되었다²²⁾.

CAT활성도는 25°C 및 7.8 pH에서 분당 1 nM의 H_2O_2 를 분해에 필요하는 효소의 양으로 정의된다. SOD측정치는 Sun에 의해 생성되는데²³⁾, SOD예측치는 xanthine 및 xan-

thine oxidase으로 인해 발생한 superoxide radical로 측정하였다. SOD활성도는 이 과정을 방해하는 정도에 따라 560 nm에서 측정되는데, U/mg 단백질량으로 표현하였다. SOD 효소 활성도의 단위는 초기 nitroblue tetrazolium 흡광도를 1분당 50% 감소시키는 효소의 양과 같다.

10) 통계분석

데이터는 모두 평균±표준 편차 (SD)로 표현되었다. 투여량이 다른 그룹들에게는 다중비교 시험이 이루어졌다. 분산의 균질성은 Levene test를 이용해 이루어졌다²⁴. 만약 Levene test에서 분산의 균질성이 현저한 편차가 없다면, 취득한 데이터를 ANOVA 테스트에 의해 분석하였는데, 등분산일 경우 one way ANOVA 테스트를 사용하여 최소한의 의미있는 차이(LSD) test로 검증하여 그룹들간의 유의성을 검증하였고, 비등분산인 경우에는 비모수 검증법 Kyuskal-Wallis H test를 사용하여 유의성 있다고 나온 경우, Mann-Whitney U (MW) test로 그룹들간의 유의성을 검증하였다. 통계분석은 SPSS for windows (Release 14.0K, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 사용해서 하였다²⁵. 게다가, Sco의 복강내 처리로 유도된 기억 상실의 심각도를 관찰하기 위해 정상군과 Sco처리 대조군간의 백분위 변화를 계산하였다. Sco 대조군과 테스트 약물을 투여한 마우스의 백분위 변화는 [(Data of test material treated mice-Data of Sco control mice)/Data of Sco control mice]×100의 방법을 이용해 실험 약물 효과의 이해를 돕기 위해 이전의 Kang의

방식에²⁶ 따라 계산되었다.

III. 결과

1. 몸무게의 변화

실험 기간 28일 동안 정상군과 비교하여 Sco 대조군에서 유의미한 체중에 대한 변화 및 증가는 없었다. 또한 Sco 대조군과 비교하여도 3가지 용량의 YGYM 추출물 또는 Tacrine 10 mg/kg를 투여한 군들에서도 몸무게의 의미있는 변화는 없었다(Table 3; Fig. 2). 몸무게는 28일간의 실험 기간 중에 Sco 대조군에서 정상군에 비해 -3.19%의 변화를 보여주었으나, Sco 대조군과 비교해 Tacrine 투여군에서는 -1.77%, YGYM추출물 500 mg/Kg 투여군에서는 2.66%, 250 mg/Kg투여군에는 6.34%, 125 mg/Kg 투여군에서는 3.04%의 변화가 있었다.

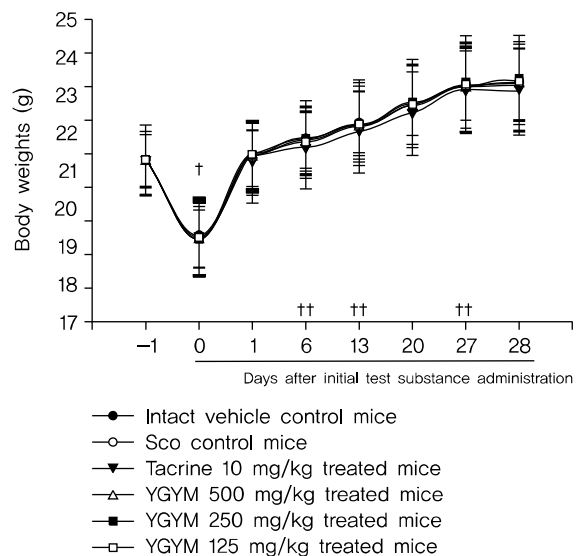


Table 3. Changes on the Body Weight Gains in Intact Vehicle Control and Scopolamine-induced Amnesia Mice

Times Groups	Body weights at		Weight gains [B-A]
	First administration * [A]	Sacrifice [B]	
Controls			
Intact vehicle	19.21±0.77	23.28±0.95	4.08±0.54
Scopolamine	19.28±1.02	3.22±1.18	3.95±0.63
Tacrine 10 mg/kg	19.20±0.99	23.07±1.14	3.88±0.63
YGYM treated			
500 mg/kg	19.26±0.80	23.31±1.02	4.05±0.74
250 mg/kg	19.19±0.95	23.39±1.18	4.20±0.67
125 mg/kg	19.24±0.99	23.31±1.26	4.07±0.86

Values are expressed as Mean±S.D. of twenty mice, g. YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts. Sacrifice means at 28 days after first test material treatment, 24 hrs after last 3 rd scopolamine treatment.

Fig. 2. Body Weight Changes in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

Significant or meaningful changes on the body weights weren't detected in the Sco treated mice as compared with intact vehicle control mice, throughout the whole 28 days, and noticeable changes on the body weights weren't detected in three different dosages of YGYM or tacrine 10 mg/kg treated mice compared to Sco control mice, respectively. Values are expressed as Mean S.D. of twenty mice. YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine. The day 0 is first day of test material administration. All animals were fasted overnight prior to the first test material administration (†). Sco was treated intraperitoneally 1 hour after dosing of the 7, 14 and 28th test substances (††).

2. 수동회피 실험(Passive avoidance test)의 결과

정상군과 비교해서 Sco대조군에서 체류잠복기의 감소가 의미 있는 수준에서 관찰되었다($p < 0.01$). 하지만 타크린 10 mg/kg 투여군과 모든 YGYM 추출물 투여군에서는 체류잠복기가 의미있는 수준으로 증가하였다($p < 0.01$). 이 실험에서 YGYM 추출물 500 mg/kg을 투여한 군에서는 타크린 투여군과 비교해서 좀 더 나은 효과를 나타내었다(Fig. 3).

Sco대조군에서 체류잠복기는 정상군과 비교해 -74.78% 변화하였는데, Sco대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 204.25%, 166.54%, 100.18%와 54.90%로 변화가 있었다.

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

Sco대조군에서는 정상군과 비교해 탈출잠복기의 의미있는 증가가 있었다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군을 포함해 모든 실험물질을 투여한 마우스에서 탈출 잠복기가 의미있는 수준으로 감소하였다($p < 0.01$ or $p < 0.05$). 타크린 10 mg/kg 투여군과 비교해서 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군은 모리스 수중미로실

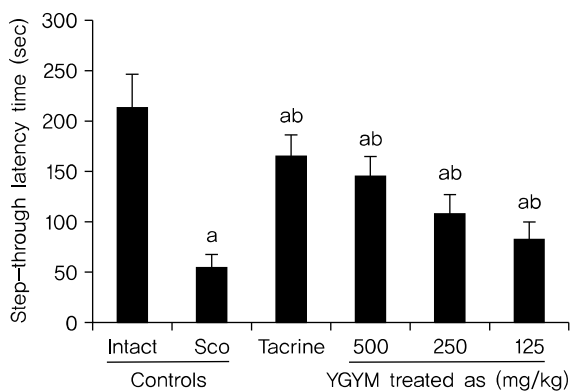


Fig. 3. Changes on the Step-through Latency Times for Passive Avoidance Task Test in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

A significant decrease in staged latency was detected in Sco control mice as compared to intact vehicle control mice. However, step-through latency times increased significantly in tacrine 10 mg/kg, YGYM extracts 500, 250 and 125 mg/kg treated mice as compared to Sco control mice, respectively. YGYM extracts 500 mg/kg showed a favorable effect on the passive avoidance task test as compared with those of tacrine 10 mg/kg, in this experiment.

Values are expressed as Mean \pm S.D. of 10 mice.

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine. a: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by LSD test, b: $p < 0.01$ as compared to Sco control by LSD test.

험에서 조금 나은 효과를 보였다(Fig. 4).

Sco대조군에서 탈출 잠복기는 정상군과 비교해서 211.51%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여한 군에서 -55.15%, -46.79%, -34.83%와 -27.88%로 변화가 있었다.

4. 해마조직 ACh 함량의 변화

정상군과 비교해 Sco대조군 해마조직의 ACh 함량은, 의미있는 감소치를 보였다($p < 0.01$).

하지만 Sco대조군과 비교해, YGYM 추출물에서 해마조직의 ACh 함량이 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 증가했다($p < 0.01$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 해마조직의 ACh 함량이 의미있게 증가했다($p < 0.01$) (Fig. 5).

Sco대조군에서의 해마조직의 ACh 함량은 정상군과 비교해서 -40.90%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 44.06%, 39.59%, 30.12%, 26.68%의 변화가 있었다.

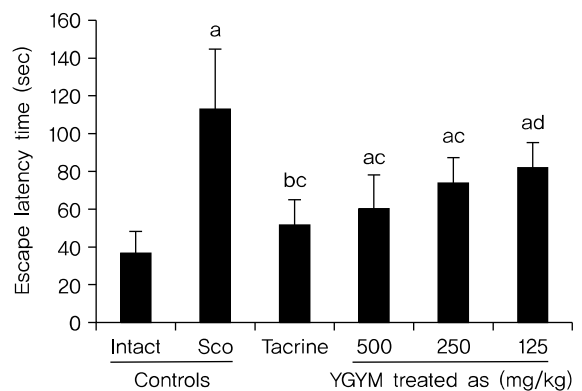


Fig. 4. Changes on Escape Latency Times of the Morris Water Maze Test in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

A significant increase in escape latency was detected in Sco control mice as compared to intact vehicle control mice. However, step-through latency times decreased significantly in all test substance administered mice including tacrine 10 mg/kg as compared to Sco control mice, respectively. YGYM extracts 500 mg/kg showed somewhat lower favorable effect on the Morris water maze test as compared with those of tacrine 10 mg/kg, in the current experiments.

Values are expressed as Mean \pm S.D. of 10 mice.

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine. a: $p < 0.01$ and b: $p < 0.05$ as compared to intact vehicle control by MWtest, c: $p < 0.01$ and d: $p < 0.05$ as compared to Sco control by MWtest.

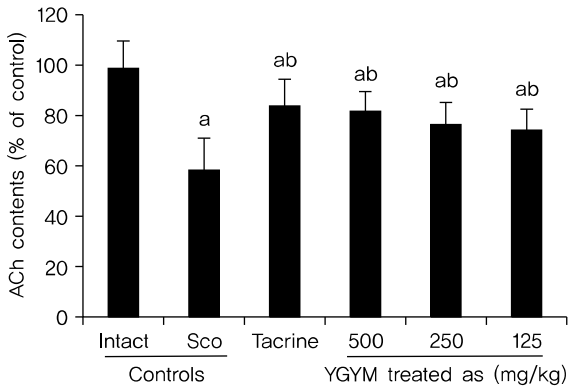


Fig. 5. Changes on the Hippocampus ACh Contents in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

In Sco control mice, significant decreases of hippocampus ACh contents were observed as compared with intact vehicle control mice. However, significant and dose-dependent increases in hippocampal ACh contents were demonstrated at all three different dosages of YGYM extracts treated mice as compared to 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, more favorably than those of YGYM extracts 500 mg/kg in the present study.

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

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine.

a: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by LSD test, b: $p < 0.01$ as compared to Sco control by LSD test.

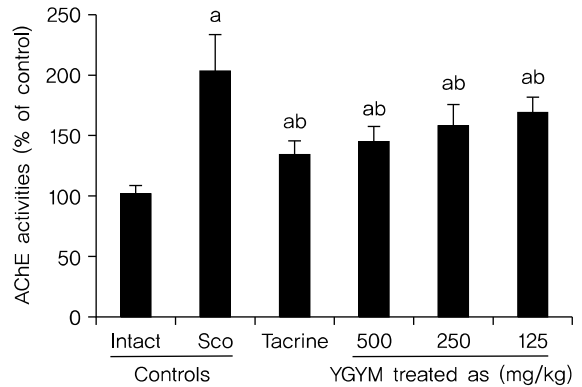


Fig. 6. Changes on the Hippocampal AChE Activities in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

In Sco control mice, significant increases of hippocampus AChE activities were observed as compared with intact vehicle control mice. However, significant and dose-dependent reductions of the hippocampal AChE activities were demonstrated in three different dosages of YGYM extracts treated mice as compared to 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, more favorably than those of YGYM extracts 500 mg/kg in this result.

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

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine, AChE: Acetylcholinesterase.

a: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by MW test, b: $p < 0.01$ as compared to Sco control by MW test.

5. 해마조직 AChE 활성도의 변화

정상군과 비교해, Sco대조군에서의 해마조직의 AChE 함량은, 의미있는 증가치를 보였다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, YGYM 추출물에서 해마조직의 AChE 함량이 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 감소했다($p < 0.01$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 해마조직의 AChE함량이 의미있게 감소했다($p < 0.01$)(Fig. 6).

Sco대조군에서의 해마조직의 AChE함량은 정상군과 비교해서 100.69%의 변화를 보였는데, Sco대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 -34.36%, -29.21%, -22.39%와 -17.33%의 변화가 있었다.

6. 해마조직 ChAT mRNA 발현의 변화

정상군과 비교해, Sco대조군에서의 해마조직의 ChAT mRNA는 의미있는 감소를 보였다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, YGYM 추출물에서 해마조직의 ChAT mRNA는 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 증가했다($p < 0.01$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 해마조직의 ChAT mRNA는 의미있게 증가했다($p < 0.01$) (Fig. 7).

Sco대조군에서의 해마조직의 ChAT mRNA는 정상군과 비교해서 -43.90%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 34.91%, 28.77%, 23.33%와 18.95%의 변화가 있었다.

7. 대뇌의 항산화 방어시스템에서의 결과

대뇌에서의 항산화 방어시스템을 관찰하기 위해, 대뇌의 MDA, GSH, CAT, SOD 효소 활성도를 평가하였다.

1) 대뇌의 MDA 수준의 변화

정상군과 비교해 Sco대조군에서의 대뇌의 지질 과산화, MDA 수준이 의미있는 증가치를 보였다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, YGYM 추출물에서 이런 MDA수준은 농도의존적으로 의미있는 수준으로 감소했다($p < 0.01$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 대뇌의 지질

과산화는 의미있게 감소했다($p < 0.01$) (Table 4).

Sco대조군에서의 대뇌의 MDA 수준은 정상군과 비교해서 132.36%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 -42.10%, -32.85%, -26.92%와 -17.90%의 변화가 있었다.

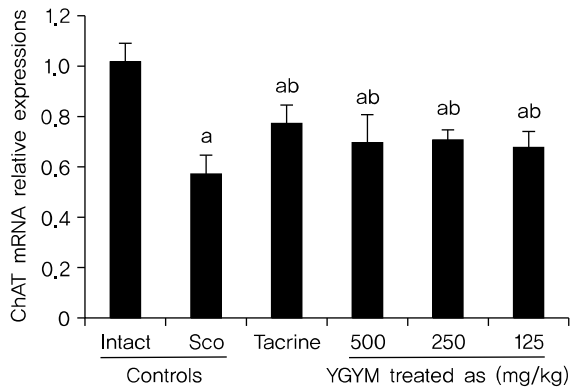


Fig. 7. Changes on the Hippocampal ChAT mRNA Expressions in Intact Vehicle Control and Sco-induced Amnesia Mice.

In Sco control mice, significant decreases of hippocampus ChAT mRNA expressions (ChAT/ β -actin mRNA) were observed as compared to intact vehicle control mice. However, significant and dose-dependent increases in hippocampal ChAT mRNA expressions were demonstrated in three different dosages of YGYM treated mice as compared to 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, more favorably than those of YGYM extracts 500 mg/kg in the current result.

Values are expressed as Mean \pm S.D. of 10 mice.

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts, Sco: Scopolamine, ChAT: Choline acetyltransferase.

a: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by LSD test, b: $p < 0.01$ as compared to Sco control by LSD test.

2) 대뇌의 GSH 함량의 변화

정상군과 비교해, Sco대조군에서의 대뇌의 내인성 항산화, GSH 함량은 의미있는 감소치를 보였다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, 28일의 실험기간동안 YGYM 추출물을 투여한 군에서 대뇌의 GSH 함량 감소는 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 억제되었다($p < 0.01$ or $p < 0.05$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 대뇌의 GSH 함량은 의미있는 수준으로 증가했다($p < 0.01$)(Table 4).

Sco대조군에서의 대뇌의 GSH 함량은 정상군과 비교해서 -63.69%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 72.76%, 42.60%, 35.17%와 27.17%의 변화가 있었다.

3) 대뇌의 CAT 활성도의 변화

정상군과 비교해, Sco대조군에서의 대뇌의 내인성 항산화 효소 CAT의 활성도는 의미있는 감소치를 보였다($p < 0.01$). 하지만 Sco대조군과 비교해, 28일의 실험기간동안 YGYM 추출물을 투여한 군에서 대뇌의 CAT 활성도 감소는 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 억제되었다($p < 0.01$).

또한, Sco대조군과 비교해, 타크린 10 mg/kg 투여군에서도 YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군보다 대뇌의 CAT 활성도는 의미있게 증가했다($p < 0.01$)(Table 4).

Sco대조군에서의 대뇌의 CAT 활성도는 정상군과 비교해

Table 4. Cerebral Cortex Antioxidant Defense Systems in Intact Vehicle Control and Scopolamine-induced Amnesia Mice

Items (Unit) Groups	Malondialdehyde (nM/mg protein)	Glutathione (nM/mg protein)	Catalase (nM/min/mg protein)	Superoxide dismutase (nM/min/mg protein)
Controls				
Intact vehicle	1.89 \pm 0.54	8.68 \pm 1.33	37.00 \pm 10.74	20.67 \pm 2.05
Scopolamine	4.38 \pm 0.51 ^a	3.15 \pm 0.66 ^a	7.55 \pm 2.41 ^d	5.93 \pm 1.75 ^a
Tacrine 10 mg/kg	2.54 \pm 0.38 ^{ab}	5.44 \pm 0.95 ^{ab}	19.28 \pm 2.09 ^{de}	14.07 \pm 2.73 ^{ab}
YGYM treated				
500 mg/kg	2.94 \pm 0.36 ^{ab}	4.49 \pm 0.71 ^{ab}	17.46 \pm 2.32 ^{de}	12.56 \pm 1.80 ^{ab}
250 mg/kg	3.20 \pm 0.35 ^{ab}	4.26 \pm 0.69 ^{ab}	15.25 \pm 2.78 ^{de}	10.69 \pm 1.98 ^{ab}
125 mg/kg	3.60 \pm 0.33 ^{ab}	4.01 \pm 0.56 ^{ac}	13.50 \pm 3.31 ^{de}	8.76 \pm 1.66 ^{ab}

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

YGYM: Yeongkyekamjotanggayonggolmoryo aqueous extracts.

a: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by LSD test, b: $p < 0.01$ and c: $p < 0.05$ as compared to scopolamine control by LSD test, d: $p < 0.01$ as compared to intact vehicle control by MW test, e: $p < 0.01$ as compared to scopolamine control by MW test.

서 -79.59%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 155.34%, 131.18%, 101.89%와 78.75%의 변화가 있었다.

4) 대뇌의 SOD 활성도의 변화

정상군과 비교해, Sco대조군에서의 대뇌의 내인성 항산화 효소, SOD의 활성도는 의미있는 감소치를 보였다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군과 비교해, YGYM 추출물을 투여한 군에서 대뇌의 SOD의 활성도는 의미있는 수준으로 증가했다($p < 0.01$).

타크린 10 mg/kg 투여군과 비교해, YGYM 추출물 500 mg/kg 투여군은 대뇌의 SOD의 활성도에 더 영향을 끼쳤다 (Table 4).

Sco대조군에서의 대뇌의 SOD의 활성도는 정상군과 비교해서 -71.33%의 변화를 보였는데, Sco 대조군과 비교하여 타크린 10 mg/kg 투여군과 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg을 투여한 군에서 137.44%, 111.91%, 80.39%와 47.78%의 변화가 있었다.

IV. 고찰

사회가 점점 고도화되어가면서 인간은 훨씬 더 많은 정보를 받아들이고, 처리하며, 기억해야한다. 이 과정에서 상황을 보고, 듣고 이해하는 능력인 인지능능이 작용하는데, 이러한 인지능능이 문제가 생기는 대표적인 퇴행성 두뇌질환이 치매이다. 치매는 처음에는 기억력의 저하에서 시작되는데, 점차적으로 진행성 기억인지장애를 겪게 되며, 결국에는 고도의 치매상태에 도달하게 된다. 또한 치매로 인한 사망률은 심혈관 질환, 악성종양, 뇌졸중 다음으로 4위를 차지하는 실정이며, 2000년 기준으로 국내 치매환자는 27만명 정도이며 2020년에는 62만명에 육박할 것으로 추정하고 있다²⁷⁾. 치매에 있어서 60%정도를 차지할 정도로 가장 많은 형태의 질환인 알츠하이머병은, 점차적으로 기능상실을 만들어, 인지능능저하와 신경증상을 동반하게 한다¹⁾.

뇌의 인지능능은 해마를 둘러싼 여러 부분들의 유기적인 작용에 영향을 받고 있는데, 여기에는 콜린성 신경전달시스템이 중요한 역할을 한다. 콜린성 신경계 후시냅스에 있는 무스카린성 수용체 길항제인 스코폴라민은 전시냅스에서

유리되는 신경전달물질인 아세틸콜린과 무스카린성 수용체의 결합을 방해하여, 정보전달을 막음으로써 학습력과 기억력을 손상시키기 때문에, 학습력과 기억력 대표되는 인지능 개선효과를 검증할 때, 흔히 사용되고 있다²⁸⁾.

이 때문에, 최근까지의 치매에 대한 치료는 주로 아세틸콜린성 가설을 바탕으로 신경전달물질에 관여에 초점을 맞춘 접근방식이었다²⁹⁾. 알츠하이머병 환자에게 가장 현저한 생화학적 변화중의 하나가 해마와 대뇌피질에서 ACh 함량의 감소이기에, 아세틸콜린 억제제의 사용은 콜린성 결핍을 개선하는데 도움이 되는 일반적인 방법인 것이다³⁰⁾. 이러한 역할을 하는 tacrine, donepezil, rivastigmine 등의 AChE 억제제는 미국 FDA에서 승인되어 치료제로 사용되어지고 있다¹⁾.

하지만 합성 AChE 억제제는 간질환등 다양한 부작용을 보인다^{5,6)}. 국내외적으로 많이 사용되는 기억력 개선 치료제들 대부분은 증상개선에 초점을 둔 항콜린성 약물, 혈액순환을 원활하게 하는 혈액순환개선제, 대사 작용을 비특이적으로 증가시키는 대사항진약물 등이 있지만, 그 효과가 일시적이고, 부교감신경을 자극하여 구역감과 구토, 기관지수축, 우울증, 불면증, 고혈압 등을 일으키는 부작용을 가지고 있다³¹⁾.

AChE 억제제는 대부분 알칼로이드류에 속하는 천연물에서 유래되는데^{1,32)}, 그래서 계속하여 부작용이 적은 천연 AChE 억제제를 찾으려고 하고 있다.

영계감조탕(荅桂甘棗湯)은 <상한론(傷寒論)>에 나오는 처방으로, 복령(茯苓), 계지(桂枝), 감초(甘草) 그리고 대조(大棗)의 4종의 약초로 구성되어 있으며, '발한후 기인 제하계자 육작분돈'(發汗後 其人 臍下悸者 欲作奔豚)의 증상에 사용되는데⁹⁾, 분돈박우심흉, 단기식박자(奔豚迫于心胸, 短氣息迫者)라고 방기(方機)에 기술되어 있고, 심하계, 심번, 불면, 번조(心下悸, 心煩, 不眠, 煩燥)등 신경성질환에 응용되어져 왔다¹⁰⁾. 영계감조탕(荅桂甘棗湯)을 구성하는 약재에 대해 약징(藥徵)을 살펴보면 『복령주치계급육순근척야.(茯苓主治悸及肉瞤筋惕也。)], 『계지주치충역야.(桂枝主治衝逆也。)], 『대조주치련인강급야.(大棗主治攣引強急也。)], 『감초주치급박야. 고치리급급통련급.(甘草主治急迫也。故治裏急痛攣急。)]로 기술되어 있으며, 영계감조탕(荅桂甘棗湯)의 필증(必證) 중 외증(外證)에 복진상 제하계(腹診上臍下悸)라고 명기되어있다³³⁾. 여기에 방기(方機)는 분돈박우

심흉, 단기식박자(奔豚迫于心胸, 短氣息迫者)로 심하계(心下悸), 심번(心煩), 불면(不眠), 번조(煩燥)라고 하여, 제하(膈下)에서 동계(動悸)가 느껴지고, 위로 치받아 오르게 되어, 흉중(胸中)이 갑갑해지는 등의 신경증상에 쓰인다¹⁰⁾.

YGYM은 이처럼 심계항진과 우울증, 갱년기장애 등 신경성질환에 사용되어온 영계감조탕(苓桂甘棗湯)^{9,34)}에 용골, 모려를 추가한 처방인데, 복령(16 g) 계지(8 g) 감초(6 g), 대추(11 g), 용골(8 g), 모려(8 g)로 구성되어 있다.

본 연구에서는 YGYM 열수 추출물(수율 18.54%)의 항기억상실 효과는 Sco에 의해 유도된 기억력손상 C57BL / 6 마우스에서 ChAT mRNA, ACh와 AChE 활성도, 항산화효과를 통해 평가하였다.

YGYM의 결과를 가역적인 AChE 억제제, 타크린 10 mg/kg 경구 투여군과 비교하였는데^{1,2)}, Sco 복강내 처리의 결과로 수동회피실험에서 체류잠복기가 감소하고, 모리스 수중미로실험에서 탈출 잠복기가 증가하는 것이 확인되었으며, 이는 해마의 ACh 함량, ChAT mRNA의 감소, AChE 활성도의 상승과 관련이 있었다. 또한 대뇌피질의 MDA 증가와 GSH, SOD, CAT 활성도 감소되었는데, 이 결과는 정상군과 비교하여, Sco 대조군에서 대뇌피질의 항산화 방어 시스템이 파괴되었음을 의미한다. 하지만 AChE 활성화와 대뇌피질의 항산화방어 시스템의 파괴로 인한 기억력 손상과 관련된 Sco 대조군은 28일간의 지속적인 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여로 농도 의존적으로 현저하게 억제되었다. 이는 YGYM이 scopolamine유도된 기억력 손상 모델에서 ACh를 보호하고 ChAT mRNA 발현을 증가시키며, AChE 억제와 관련되어, 대뇌의 항산화 방어시스템을 보호함으로써, 기억력 손상을 완화했다는 의미이다. 이 실험에서는 YGYM 500 mg/kg이 타크린 10 mg/kg보다 다소 낮은 기능을 했다.

정상군과 비교하여, Sco 대조군에서 몸무게의 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 28일 동안의 Sco 경구투여는 몸무게에 영향을 미치지 않았다. YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg, 타크린 10mg/kg 역시 정상군과 Sco 대조군과 비교해 몸무게의 변화는 없었다.

수동회피실험은 학습 취득, 기억 보존, 기억 검색과 같은 세 단계에서 치료를 평가하는데 사용된다^{1,35)}. Sco 대조군은 체류잠복기의 단축을 보였는데, 이는 콜린성 신경계가 기억력과 학습력에 중요한 역할을 하고 있다는 증거이다. Sco에

의해 짧아진 체류잠복기가 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여로 의미있는 수준에서 농도 의존적으로 늘어났다. 이는 콜린성 신경계에서의 작용과 관련된 것으로, Sco에 의해 유도된 기억력 손상을 YGYM 추출물이 개선했음을 의미한다. 하지만, 수동회피실험에서 YGYM 500 mg/kg은 타크린 10 mg/kg과 비교해 조금 나은 효과를 보였다.

모리스 수중미로 실험은 선택인지 행동실험으로, 공간학습과 기억력을 평가하며 콜린성 시스템의 변화를 파악하기 위해 사용된다^{1,17)}. 인지장애를 가진 경우 수조에 있는 탈출 플랫폼에 도달하는 시간과 거리가 많이 증가한다. 실험에서 Sco 대조군은 정상군과 비교해 탈출 잠복기가 길어지는 양상을 보였다^{1,19)}. YGYM 추출물의 세가지 다른 용량은 탈출 잠복기가 농도 의존적으로 감소하였다. 하지만 수중미로실험에서 YGYM 500 mg/kg은 타크린 10 mg/kg과 비교해 약간 낮은 효과를 보였다. 만약 동물들이 플랫폼에서 더 많은 시간동안 머무르고, 플랫폼에서 더 멀리 헤엄을 친다면, 이전의 경험에 의해 학습되어져서 공간기억력이 좋아지는 것을 의미한다^{1,19)}. 그렇기 때문에, 이러한 결과는 YGYM이 Sco에 의해 유도된 기억력손상에 있어서 장기기억력을 회복할 수 있다는 것을 나타낸다.

중추 콜린성 시스템은 인지기능 제어에 중요하다. 신경전달물질 ACh는 ChAT에 의해서 콜린성 신경에서 합성되어지는데³⁶⁾, 중추와 말초에서 타이밍, 주의력, 학습력, 기억력을 포함한 복합적인 인지과정에 관여한다³⁷⁾. 따라서, 시냅스간 극으로 분출되어 ACh가 감소되는 콜린성 신경은 학습과 기억장애를 야기한다³⁸⁾. ACh 활동기간은 방출 후 ACh를 가수분해하는 AChE 활동과 관계된다³⁹⁾. AChE의 억제는 알츠하이머병, 치매의 다른형태, 외상성 뇌손상, 정신착란에 사용되는 접근방법으로, 잠재적으로는 정신분열병의 치료에도 이용할 수 있다⁴⁰⁾.

ChAT는 중추와 말초신경계에서 콜린성 뉴런기능의 가장 중요한 특이 지표이다⁴¹⁾. ChAT의 활동은 노화된 뇌에서 강하게 줄어든다. 그리고 감퇴와 비활동성의 정도는 인지기능 손상의 심각도와 관련된다⁴²⁾. Sco는 M1AChR 및 M2AChR을 대상으로 하는 비선택적 mAChR 길항제이면서 설치류와 인간에게 있어 학습취득과 단기 기억을 떨어뜨린다⁴³⁾. YGYM 추출물의 효과를 향상시키는 기억메카니즘을 규명하기 위해, RT-PCR을 사용해서 ChAT mRNA의 발현으로 해마의 ACh 함량과 AChE 억제제 활동을 평가하였다. YGYM은 해

마체 내의 ChAT mRNA 발현의 상향제어를 통해서, ACh를 보호하였으며, AChE 활동을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다. 하지만 본 연구에서는 YGYM 500 mg/kg은 타크린 10 mg/kg과 비슷한 효과가 있었다. 이러한 결과는 해마체 내의 AChE 억제와 ChAT mRNA 활성화의 상향조절을 통해, ACh를 보호하여 YGYM이 Sco 유도 기억장애를 완화시키고 항기억손상 효과가 있음을 나타낸다.

자유 라디칼은 세포의 신진 대사에 의해 세포 및 외인성 물질에 의해 생성된다. 나이가 들어감에 따라 자유 라디칼의 생산은 증가한다⁴⁴⁾. 이 과정에는 신경변성, 기억손상을 만들기위해 두뇌의 분자와 반응한다⁴⁵⁾. 또한 산화 스트레스가 알츠하이머병에서 관찰되는 인지장애에서 중요한 역할을 하고 있다⁴⁶⁾. 이와같은 사실을 지지하는 증거중 하나는 알츠하이머 환자의 뇌에서 SOD, MDA, 종말 당화산물 peroxynitrite와 hemeoxy genase-1 신경원 섬유의 변화와 플라크 등의 산화스트레스의 생물학적 지표수준을 상승시킨다는 것이다⁴⁷⁾.

전뇌 지저부와 편도체는 학습과 기억 형성에 관여하는 부분이며, 가장 취약한 쪽은 산화 스트레스의 영향을 받기 쉬운 부분이다⁴⁸⁾. 따라서 산화 불균형은 다양한 퇴행성 신경 질환의 병인으로 보고된 것처럼 산화 스트레스로 인한 분자를 손상시킨다⁴⁶⁾. 활성 산소 증가로 인해 발생하는 미토콘드리아 기능장애는 노화와 퇴행성 신경질환에 관여한다. 또한 Sco는 지질 과산화의 증가와 항산화 방어시스템의 파괴를 초래하여 알츠하이머병 등의 증상을 유발한다⁴⁹⁾. 그리고 산화스트레스는 뇌 손상의 중요 유발인자이다^{45,50)}.

GSH는 대표적인 내인성 항산화 물질이며, 특정 세포 농도에서 낮은 ROS(활성화산소)를 유지하고, 조직손상을 방지하며 항산화 작용으로 조직을 보호 한다⁵¹⁾. SOD는 뇌에서 효소방어시스템에 기여하는 항산화 효소중의 하나이며⁵²⁾, CAT는 H₂O₂를 H₂O로 전환하는 효소촉매제이다. 따라서 GSH의 증가, SOD와 CAT활성도와 지질과산화, 활성산소의 억제는 손상된 뇌 조직에서 허혈로 유도된 뇌 손상에 대한 보호면에서 이차적으로 중요하다⁵³⁾.

이번 연구에서 Sco 대조군은 대뇌피질조직에서 SOD, CAT, GSH와 같은 활성 산소종 해독계 효소들을 감소시켰다. 또한 Sco 대조군은 정상군에 비해, 지질과산화 지표인 MDA의 생성을 증가시켰다. YGYM 추출물 투여군들은 농도 의존적으로 대뇌지질과산화를 억제하였으며, 또한 Sco대

조군에 비해, SOD와 CAT 활성도, GSH 수준을 증가시켰다. 하지만, YGYM 500 mg/kg은 타크린 10 mg/kg과 비슷한 효과가 있었다. 이러한 결과는 YGYM 추출물이 본 연구에서 산화방어시스템의 강화해서 Sco 유도 기억력손상을 완화하며 항기억손상 효과를 보인다고 할 수 있다.

이 연구에서 얻어진 결과는 YGYM 열수 추출물의 경구 투여가 대뇌의 항산화 방어 시스템을 강화하고, AChE 억제, ChAT mRNA 발현의 증가로, ACh 보존을 통해, Sco 유도 기억손상을 줄일 수 있음을 나타낸다. 하지만 YGYM은 白茯苓, 桂皮, 甘草, 大棗, 龍骨 및 牡蠣의 6종류의 약재들로 이루어져 있고, 수많은 생리활성물질들을 포함하고 있어, 개별약재의 효과와 지표물질에 대한 기능적 효과, 자세한 기전연구가 향후 이루어질 기대해본다.

V. 결론

Scopolamine으로 유도된 건망증 마우스 모델에 YGYM 추출물을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 몸무게 측정에서 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여군에서 Sco대조군과 비교해 의미있는 수준의 변화는 없었다.

2) 수동회피실험에서 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여군에서 Sco대조군과 비교해 체류잠복기가 의미있는 수준으로 증가하였다.

3) 모리스 수중미로실험에서 YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여군에서 Sco대조군과 비교해 탈출잠복기가 의미있는 수준으로 감소하였다.

4) YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여군에서 Sco 대조군과 비교해, 해마조직의 ACh 함량, ChAT mRNA는 농도 의존적으로 의미있게 증가했으며($p < 0.01$), 해마조직의 AChE 함량이 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 감소했다($p < 0.01$).

5) YGYM 추출물 500, 250, 125 mg/kg 투여군에서 Sco 대조군과 비교해, YGYM 추출물에서 MDA 수준은 농도의 존적으로 의미있는 수준으로 감소했고($p < 0.01$), 대뇌 GSH 함량은 의미있는 수준으로 감소했으며($p < 0.01$ or $p < 0.05$), CAT 활성도의 감소는 농도 의존적으로 의미있는 수준으로 억제되었고($p < 0.01$), 대뇌 SOD의 활성도는 의미있는 수준으로 증가했다($p < 0.01$).

이처럼 Sco로 인한 AChE의 활성이 증가하고, mRNA ChAT의 발현은 감소하는데, 이로 인해서, ACh의 함량은 감소하며, 연관된 항산화 방어 시스템이 붕괴되면서 나타나는 기억력 감퇴가 YGYM 추출물 500, 250 및 125 mg/kg 투여 후에 투여용량에 비례해서 유의성 있게 억제되었으나, YGYM 추출물 500 mg/kg은 tacrine 10 mg/kg 투여군 보다는 비교적 낮은 기억력 개선 효과를 나타냈다.

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. Taraschenko OD, Barnes WG, Herrick-Davis K, Yokoyama Y, Boyd DL, Hough LB. Actions of tacrine and galanthamine on histamine-N-methyl transferase. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005;27:161-5.
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. Nordberg A. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006;20(2):12-8.
5. 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;38:184-92.
6. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994;271:992-8.
7. Dunn NR, Pearce GL, Shakir SA. Adverse effects associated with the use of donepezil in general practice in England. *J Psychopharmacol*. 2000;14:406-8.
8. Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine*. 2004; 11(6):544-8.
9. Chae IS. *Sanghanronyeokjeon*. Seoul:Koomonsa 1995:62.
10. Rho EJ, Kang HE. *Gufangleiju*. Seoul:Publishing Gobang 2011:200-2.
11. Ha JH, Lee MG, Chang SM, Lee JT. In vivo characterization of sedative activities of *Fossilia Mastodi* OSSIS. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:1414-7.
12. Hong MW. Pharmaceutical investigation of fossil shell *Crassostrea gravitesta eoilensis* Kim et Noda. *Korean J Pharmacog*. 1973;4:9-17.
13. Yun JH. Study of boiled extract LMK02 on acute oral toxicity in SD rat and effectiveness on A β (1-42) level and β -amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease, Graduate School of Oriental Medicine Won Kwang University. a doctor's thesis. 2010;37.
14. Seo JH. The Enhancing effect of Herbal Mixture (HT008-1) on Memory and Cognitive Function. Graduate School of Oriental Medicine Kyung Hee University. a master's thesis. 2008;21.
15. 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 turtschaninovi*. *J Ethnopharmacol*. 2008;119:74-80.
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. 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.
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, 1974;673-86.
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. Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24.
26. 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.
27. Hwang EW, Kim JH. *Oriental Medicine Psychiatry*. Seoul:Hyundae Medical Books.1989:135.
28. Davies P, Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2:

- 1403.
29. Giacobini E, Becker R. Present progress and future development in the therapy for Alzheimer's disease. 1989; 1122.
 30. Giacobini E. The cholinergic system in Alzheimer disease. *Prog Brain Res.* 1990;84:321-32.
 31. Bachurin SO. Medicinalchemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2003.
 32. 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.
 33. Lee JH, Jung CH. Yaozheng. Seoul: Cheonghong 2006: 228.
 34. Park JH, Lee GE, Lyu YS, Bae DB, Baek DG, Shin YJ, Kang HW, Lyu YS. The clinical study of 3 menopausal disorder patients with palpitation and depression treated by Yeongkyekamjo-tang. *J Oriental Neuropsychiatry.* 2012; 23:67-84.
 35. LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* 1993;58:69-79.
 36. Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science.* 1983;221:614-20.
 37. Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, López-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH, Blusztajn JK. Choline transporter 1 maintains cholinergic function in choline acetyltransferase haploinsufficiency. *J Neurosci.* 2004;24:5459-66.
 38. Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiol Aging.* 2005;26:939-46.
 39. Eichenbaum H. How does the brain organize memories? *Science.* 1997;277:330-2.
 40. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* 2004;50:433-40.
 41. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 1999;49:921-37.
 42. 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.
 43. Dawson GR, Heyes CM, Iversen SD. Pharmacological mechanisms and animal models of cognition. *Behav Pharmacol.* 1992;3:285-97.
 44. 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; 2011:429-505.
 45. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys.* 2009;46:9-15.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Raichle ME. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol.* 1983;13:2-10.
 51. 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.
 52. 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.
 53. Hu D, Cao Y, He R, Han N, Liu Z, Miao L, Yin J. Schizandrin, an antioxidant lignin from *Schisandra chinensis*, ameliorates A β 1-42-induced memory impairment in mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:721.