

스코폴라민으로 유도한 기억력 장애 동물모델에서 명자나무 (*Chaenomeles speciose* Nakai) 과실 추출물의 효과

김지현^{1#} · 김란희^{1#} · 김재훈¹ · 임미경² · 이상호² · 한은혜² · 장대식^{1,3} · 류종훈^{1,4*}

¹경희대학교 나노의약생명과학과, ²고려은단, ³경희대학교 약과학과, ⁴경희대학교 한약학과

Effects of *Chaenomeles speciose* Nakai on Scopolamine Induced Memory Impaired Mouse Model

Jihyun Kim^{1#}, Ranhee Kim^{1#}, Jaehoon Kim¹, Mi Kyung Lim², Sang Ho Lee²,
Eun Hye Han², Dae Sik Jang^{1,3} and Jong Hoon Ryu^{1,4*}

¹Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

²Department of R&D Center, Koreaeundan, Seongnam, Korea

³Department of Pharmaceutical and Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

⁴Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

Abstract – *Chaenomeles speciose* Nakai (CSP) or *Chaenomeles sinensis* Koehne (CSS) (Rosaceae) has been used, traditionally, to treat muscle problems and gastric dampness in eastern Asia countries. Therefore, many studies have focused on investigating its active compounds and effects on muscle pain, arthritis and gastro-intestinal diseases. Recently, several studies reported that CSS extract degrade amyloid plaques and enhance synaptic acetylcholine level *in vivo* and *in vitro*. Although these two *Chaenomeles* species are used without differences, CSP is reported to contains more phenolic compounds which are known to enhance memory. Therefore, in this study, we investigated the memory ameliorating effects of CSP by employing the passive avoidance test, Y-maze task and novel object recognition test. CSP (30 or 100 mg/kg) ameliorated the declined memory induced by scopolamine injection and enhanced the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels along with post synaptic density protein 95 (PSD 95) levels at the hippocampus of the scopolamine-injected mouse brain. These results suggested that CSP alleviates the cognition declines caused by cholinergic blockade via enhancing BDNF levels and PSD 95, and that it would enhance memory formation and be useful for treating memory declines.

Keywords – *Chaenomeles speciosa*, Alzheimer's disease, Memory declines, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

우리나라는 2000년에 고령화 사회로 진입한 이후, 불과 17년만인 2017년에 고령사회에 들어섰다. 이는 현재 우리나라 인구 중 17% 이상이 만 65세 이상의 노령 인구이며, 고령사회로의 진출이 17년이라는 단기간에 이뤄진 만큼 고령화가 빠르게 진행되고 있음을 시사한다.¹⁾ 이에 노화에 의해 발생하는 퇴행성질환들에 대한 사회적 관심이 커지고 있다. 그 중 치매는 만 65세 이상 노인의 유병률이 약 10%에 이르며, 2020년 기준 15조 2천억원의 사회적 비용이 발생할 것으로 예상되는 퇴행성 뇌 질환이다.²⁾ 치매는 기억 및 사고능력의 저하와 더불어 성격 변화 및 사회성 결여 등의 다

양한 부수적 변화를 동반한다고 알려져 있으며, 그 발병원인은 매우 다양하다.³⁾ 알츠하이머성 치매는 치매 발병의 약 65% 가량을 차지하며,⁴⁾ 그 원인으로 아밀로이드 베타 단백질(amyloid- β plaque)의 응집 또는 타우 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유 얽힘, 콜린성 신경의 기능저하 등이 제시되고 있다.^{5,6)} 그러나 아직 명확한 병인이 밝혀지지 않아 치료제 개발에 어려움을 겪고 있는 상황이다. 현재 임상에서는 콜린성 신경의 신경전달물질인 아세틸콜린의 분해효소 억제제(acetyl-cholinesterase inhibitor)로서 donepezil, galantamine, rivastigmine 등과 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체 차단약인 memantine이 주로 처방되고 있다. 하지만 이러한 약들은 오심, 구토, 수면장애, 어지럼증, 식욕부진 등의 부작용이 빈번히 나타나며, 중증도 질환을 치료하기 위

[#]These authors equally contributed to this work

*교신저자(E-mail): jhryu63@khu.ac.kr

(Tel): +82-2-961-9230

해 약물을 증량한 경우 더욱 심해진다고 알려져 있다.⁷⁾ 노인환자의 비중이 매우 높은 치매의 경우 위와 같은 부작용들은 더욱 심각한 문제들을 초래할 수 있어 부작용이 적은 천연물 유래의 치료제 개발에 대한 요구와 관심이 큰 상황이다.

모과(木瓜)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 모과나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)와 명자나무(*Chaenomeles speciosa* Nakai)의 과실을 그 기원으로 하며, 한국과 중국에 자생한다. 모과는 전통적으로 서근활락(舒筋活絡)하고 화습화위(化濕和胃)하는 효능이 있어 근육통, 관절통 및 소화기계 이상 등에 널리 사용해온 약물이다.⁸⁾ 이러한 이유로 최근 모과추출물이 *E.coli*의 내독소로 유도된 이질에 효과적이라는 연구가 진행된 바 있으며,⁹⁾ 콜라겐 등으로 유도한 관절염도 효과적으로 개선시킨다는 것이 밝혀졌다.¹⁰⁾ 뿐만 아니라, 모과나무(*C. sinensis*)의 과실이 세포실험에서 베타아밀로이드 단백질의 응집을 막고 아세틸콜린 분해효소의 저해를 활성화하며 동물실험에서도 행동실험의 개선을 나타낸다고 보고되었다.¹¹⁾ 그러나 모과의 다른 기원식물인 명자나무(*C. speciosa*)의 과실이, 인지능 개선에 효과적이라고 보고된 oleanolic acid 등의 함량이 높음에도 불구하고,¹²⁾ 관련 연구가 이루어지지 않았다. 만약, 명자나무 과실 추출물이 본 연구에서 유의적인 인지능 개선작용이 관찰된다면, 단일 또는 다른 유용성이 평가된 원료와 배합하여 상승작용을 나타내는 제제로의 개발도 기대해 볼 수 있다.

본 연구에 앞서 명자나무(*C. speciosa*)의 과실 추출물이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 모과(*C. sinensis*)의 과실보다 뛰어난 기억력 개선 효과를 나타낸다는 사실을 확인하고(Fig. 1), 본 연구를 수행하였다. 기억력의 개선을 평가하고자 수동회피시험과 Y-미로 시험을 수행하였으며 마우스의 사물 인지 능력을 평가하고자 새로운 사물 인지시험을 실시하였다. 또한, 그 작용기전을 확인하기 위하여 명자나무 과실 추출물을 투여한 뒤 해마조직과 대뇌피질 조직을 적출하여 Western blot을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 수컷 ICR 마우스(5주령)를 주식회사 오리엔트(경기도, 대한민국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 경희대학교 약학대학 동물실에서 1주일 간 적응시킨 후 사용하였으며, 동물실의 온도(23±3°C), 습도(60±10%) 및 명암주기(12시간)는 일정하게 유지하였다. 실험동물은 적응 및 실험 기간 동안 자유롭게 물과 사료를 공급받았으며, 동물 처치 및 유지 관리는 경희대학교 동물관리 및 사용지침에 따라 수행되었다. 동물을 이용한 모든 실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호; KHUASP(SE)-18-025)을 받아 수행하였다.

시험물질 - 실험에 사용된 scopolamine과 donepezil은 Sigma Aldrich(St Louis, Mo, USA)의 제품을 사용하였다. Rabbit 단일 클론 anti-mature brain derived neurotrophic factor(mBDNF)항체는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였고, mouse 단일 클론 anti-post synaptic protein(PSD) 95와 anti-GAPDH는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Rabbit anti-IgG와 mouse anti-IgG는 Gene Tex Inc(San Antonio, Texas, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence reagent(ECL) 시약은 GE Healthcare Life Sciences(Chicago, IL, USA)의 제품을 사용하였고, pierce bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher(Waltham, MA, USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 다른 모든 시료는 시중에서 구할 수 있는 최상 등급의 제품을 사용하였다.

명자나무와 모과나무 과실 추출물 및 명자나무 과실 추출물의 당 제거 분획물의 제조 - 대명제약(주) (서울특별시, 대한민국)에서 판매하는 명자나무의 과실(*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai)을 구입해서 사용하였다. 증거표본(2019-CHSP)은 경희대학교 약학대학 천연물의약실에서 보관 중이다. 건조된 명자나무 과실 절편 50.0 g에 70% EtOH 500 ml을 가하여 2시간씩 2회 반복하여 환류 추출 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 명자나무 과실 70% EtOH 추출물 12.2 g을 확보하였다. Diaion HP-20 column(Φ 2.5×41.8 cm)을 30% EtOH로 100 ml 세척한 후 명자나무 과실 70% EtOH 추출물 10.0 g을 로딩하였다. 이후 30% EtOH (1.6 L)을 용출하여 당을 제거하고 95% EtOH(1.1 L) 용출물을 농축하여 당을 제거한 명자나무 과실 추출물(당 제거 분획물) 572.1 mg을 얻었다. 모과나무의 과실(*Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne)은 선일생약(주)(강원도, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 증거표본(2018-CHSI)은 경희대학교 약학대학 천연물의약실에서 보관 중이다. 건조된 모과나무 과실 절편 50.0 g에 70% EtOH 500 ml을 가하여 2시간씩 2회 반복하여 환류 추출 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 모과나무 과실 70% EtOH 추출물 16.8 g을 확보하였다.

수동 회피 시험(Passive Avoidance Test) - 명자나무 과실 당 제거 분획물(10, 30, 100 mg/kg), 명자나무 과실 70% EtOH 추출물(30, 100, 300 mg/kg)과 모과 과실 70% EtOH 추출물(30, 100, 300 mg/kg)은 10% Tween 80 수용액에 녹인 후 실험 1시간 전에 경구투여 하였으며, 대조군과 음성 대조군에도 명자나무 과실과 모과나무 과실 추출물 투여군과 같은 용량의 10% Tween 80 수용액을 투여하였다. 양성 대조군에는 10% Tween 80 수용액에 녹인 donepezil (5 mg/kg)을 실험 1시간 전에 경구 투여하였다. 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액에 녹인 scopolamine(1 mg/kg)을 복강 투여하였다. 마

우스는 실험 전 무작위로 나눈 후 적응기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 수동 회피 시험은 각각 흰색과 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성된 2개의 박스(20×20×20 cm)로 구성되며, 그 바닥은 2 mm 간격의 grid로 전기가 흐를 수 있도록 하였다. 흰색 박스에는 50 W 전구를 설치하여 밝은 환경을 조성하였으며, 검정 박스로 이동할 수 있는 길로틴 문(5×5 cm)을 설치하였다. 마우스를 밝은 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴 문을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. 길로틴 문이 열리고 마우스가 어두운 구획으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 만약 마우스가 길로틴 문이 열린 후 60초 이내에 어두운 구획으로 들어가지 않은 경우, 마우스가 어두운 구획으로 들어갈 수 있도록 유도하였으며, 들어가기까지 걸린 시간은 60초로 기록하였다. 마우스가 어두운 구획으로 들어가면 길로틴 문을 닫고 즉시 grid를 통해 0.5 mA의 전기자극을 3초간 준 뒤 케이지로 이동시켰다. 전기자극을 주고 24시간 후에 다시 마우스를 밝은 박스에 위치시키고 10초간 탐색시간을 준 뒤 길로틴 문을 열어 마우스가 어두운 구획으로 들어가는데 걸리는 시간(latency time)을 300초까지 측정하였다.

Y-미로 시험(Y-maze Test) - 명자나무 과실 당 제거 분획물은 10% Tween 80 수용액에 녹인 후 실험 1시간 전에 경구투여 하였으며(10, 30, 100 mg/kg), 대조군과 음성 대조군에도 명자나무 과실 당 제거 분획물 투여군과 같은 용량의 10% Tween 80 수용액을 투여하였다. 양성 대조군에는 10% Tween 80 수용액에 녹인 donepezil(5 mg/kg)을 실험 1시간 전에 경구 투여하였다. 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액에 녹인 scopolamine(1 mg/kg)을 복강 투여하였다. 마우스는 실험 전 무작위로 나눈 후 적응기간을 거쳐 실험에 사용하였다. Y-미로는 Y자 모양처럼 세 갈래로 나뉘는 polyvinyl plastic으로 만들어진 미로이다. 미로의 각 세 가지는 길이 40 cm, 폭 3 cm, 높이 12 cm이며, 서로 120°의 각도로 위치해 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 뒤 마우스를 A 가지의 끝 쪽 벽면을 보게끔 위치시키고 8분간 마우스가 자유롭게 탐색하며 들어가는 가지를 기록하였다. 3개의 다른 가지에 차례대로 들어가면 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하여 다음 공식으로 그 변경행동력을 계산하였다. 변경행동력이 높은 경우 단기기억이 높음을 의미한다.

변경행동력(%) = 실제변경(actual alternation)/최대변경(총 입장 횟수 - 2; maximum alternation) × 100

새로운 물체 인지 시험(Novel Object Recognition Test) - 새로운 물체 인지 시험은 검정 polyvinyl plastic으로 만든 박스(30×30×30 cm)에서 진행하였다. 실험동물을 박스에 적응시키기 위해 2일 동안 마우스를 10분간 자유롭게 탐색할

수 있게 하였다. 실험 3일차가 되는 날, 마우스를 박스에 위치시키기 1시간 전에 명자나무 과실 당 제거 분획물(10, 30, 100 mg/kg)과 donepezil(5 mg/kg)을 10% Tween 80 수용액에 녹여 경구투여 하였으며, 대조군과 음성 대조군에도 명자나무 과실 당 제거 분획물 투여군과 같은 용량의 10% Tween 80 수용액을 투여하였다. 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액에 녹인 scopolamine(1 mg/kg)을 복강 투여한 뒤 박스 정 중앙에 위치시킨 후, 박스의 양 대각선 꼭지점으로부터 같은 거리(5 cm)에 동일한 물체를 제공하여 5분간 자유롭게 물체를 탐색하게 하였다. 탐색 24시간 후 박스 안의 물체 중 하나만 다른 모양의 새로운 물체로 바꾼 뒤, 다시 마우스로 하여금 5분간 자유롭게 물체를 탐색할 수 있게 하였다. 5분 동안 마우스가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)에 대한 접촉, 냄새 맡기, 핥기 등의 탐색 행동을 보이는 시간을 측정하였다. 다음 공식을 이용하여 물체 선호도(object preference ratio)와 물체 분별 척도(discrimination index)를 계산하였다. 분별척도가 높을수록 새로운 물체에 대한 인식이 높음을 의미한다.

물체선호도(%) = 새로운 물체 또는 기존에 있던 물체를 탐험한 시간/(새로운 물체를 탐험한 시간 + 기존에 있던 물체를 탐험한 시간) × 100

물체 분별 척도 = (새로운 물체를 탐험한 시간 - 기존물체를 탐험한 시간)/(새로운 물체를 탐험한 시간 + 기존에 있던 물체를 탐험한 시간)

Western Blot Analysis - 행동 실험 결과에서 기억력의 개선 효과를 보이는 농도가 30, 100 mg/kg이었으므로 Western blot 실험에서는 명자나무 과실 당 제거 분획물 30, 100 mg/kg을 이용하였다. 명자나무 과실 당 제거 분획물(30, 100 mg/kg)과 donepezil(5 mg/kg)을 경구투여하고 30분 후, scopolamine(1 mg/kg)을 복강투여하고 그 다음 30분 후에 마우스를 치사하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌로부터 대뇌 피질과 해마를 분리한 뒤, 각 무게의 10배에 해당하는 냉각시킨 용액[1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM EDTA, 0.32 M sucrose, protease inhibitor (50 mL용액 당 1정)을 첨가한 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)용액]에 넣어 균질화하였다. 균질액은 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 새로운 tube에 상층액을 옮긴 후 단백질을 정량하여 사용하였다. 단백질의 정량은 Western blotting ECL kit(Amersham Co., England)를 사용하여 실시하였으며, 단백질(30 µg)을 SDS-polyacrylamide gel(15%)에 reducing condition에서 전기 영동을 실시하였다. 단백질을 PSDF membrane에 transfer buffer[192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-

HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이 전시켰다. 이전 후 membrane을 상온에서 2시간 동안 blocking solution(5% skim milk)으로 blocking을 실시한 다음, 각 권고되는 비율로 희석한 1차 항체를 가하여 4°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 membrane을 Tris-buffered saline/Tween 20으로 5회 세척 후 1:3000으로 희석시킨 2차 항체로 2시간 동안 incubation하였다. 이후 enhanced chemiluminescence(ECL)로 발광시켜 LAS-4000 mini bio-imaging program(Fujifilm Lifescience, Stamford, CT, USA)을 이용하여 분석한 뒤 membrane을 20% glycine 용액으로 상온에서 20분 동안 stripping하였다.

통계처리 - 실험 결과는 mean ± S.E.M.으로 나타내었다. 수동 회피 시험과 Y-미로 시험과 Western blot 실험결과는 일원분산분석을 이용하여 통계 처리하였고, 유의적인 차이가 있을 경우 Student-Newman-Keuls방법을 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 군간 유의성 검정을 실시하였으며, 새로운 물체 인지 시험은 이원분산분석을 이용하여 통계 처리하였고, 유의적인 차이가 있을 경우 Bonferroni post-tests 방법을 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 군간 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

수동 회피 시험에서 명자나무 과실 추출물 및 이의 당 제거 분획물의 효과 - Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 동물모델에서 명자나무 과실 70% EtOH 추출물과 모과 과실 70% EtOH 추출물의 투여로 인한 기억력 개선 효과의 차이를 알아보기 위해 수동회피 실험을 수행하였다. 일원분산분석 결과 명자나무 과실이 더 우수한 기억력 개선 효과를 나타낸다는 사실을 확인하였다($F_{8,71}=61.25$, $p<0.0001$, Fig. 1). 다음으로 명자나무 과실 당 제거 분획물의 투여에 의한 실험동물의 장기기억 개선효과를 확인하기 위해 수동 회피 실험을 실시하였다. 일원분산분석 결과 각 투여군에서 유의적인 차이를 확인하였다($F_{3,40}=15.61$, $p<0.0001$, Fig. 2). Scopolamine의 투여에 의한 기억력 저하는 대조군 대비 머무름 시간(latency time)의 유의적 감소를 통해 확인할 수 있었으며($p<0.01$), 양성대조군으로 사용한 donepezil 투여군의 머무름 시간이 scopolamine 투여군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 통해 대조군이 잘 작성되었음을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 명자나무 과실 당 제거 분획물을 10, 30 및 100 mg/kg의 용량으로 단회 투여한 군의 머무름 시간(latency time)을 측정하였을 때, 30 및 100 mg/kg 투여군의 머무름 시간이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 이를 통해 명자나무 과실 당 제거 분획물이 donepezil과 유사한 정도의 수준으로 scopolamine으로 유도한 장기기억 형성 장애를 극복한다는 사실을 알 수 있었다.

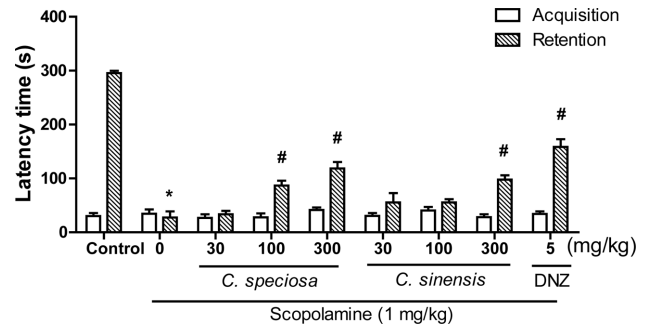


Fig. 1. Effects of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) and *Chaenomeles sinensis* (30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficit mouse model in the passive avoidance test. The difference between the efficacy of *Chaenomeles speciose* and *Chaenomeles sinensis* was shown in the results. The data represent the means ± S.E.M. ($n=8$ /group)(* $p<0.05$, when compared to vehicle-treated control; # $p<0.05$, when compared to scopolamine-treated group). DNZ, donepezil.

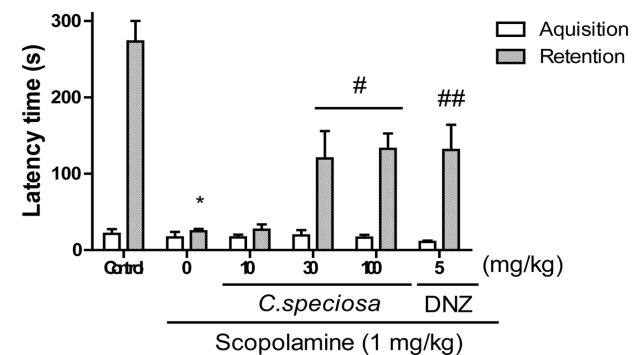


Fig. 2. Effects of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (10, 30 and 100mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory impaired mouse model in the passive avoidance test. The results from the acquisition and retention trials are presented. The data represent the means ± S.E.M. ($n=7$ /group)(* $p<0.05$, when compared to vehicle-treated control; # $p<0.05$, when compared to scopolamine-treated group). DNZ, donepezil.

Y-maze에서 명자나무 과실 당 제거 분획물의 효과 - Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 동물모델에서 명자나무 과실의 투여에 의한 실험동물의 단기 기억 개선효과를 확인하기 위해 Y-maze 실험을 실시하였다. 일원분산분석 결과 각 투여군에서 유의적인 차이를 확인하였다($F_{5,47}=7.428$, $p<0.0001$, Fig. 3A). Scopolamine에 의해 변경 행동력(spontaneous alternation, %)이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며($p<0.001$), 이러한 감소는 donepezil의 투여에 의해 유의적으로 증가하였다($p<0.005$). 명자나무 과실 당 제거 분획물을 10, 30 및 100 mg/kg의 용량으로 단회 투여한 군의 변경 행동력을 측정하였을 때, 30 및 100 mg/kg 투여군의 변경 행동력이 유의적으로 증가하는 것을 확인할

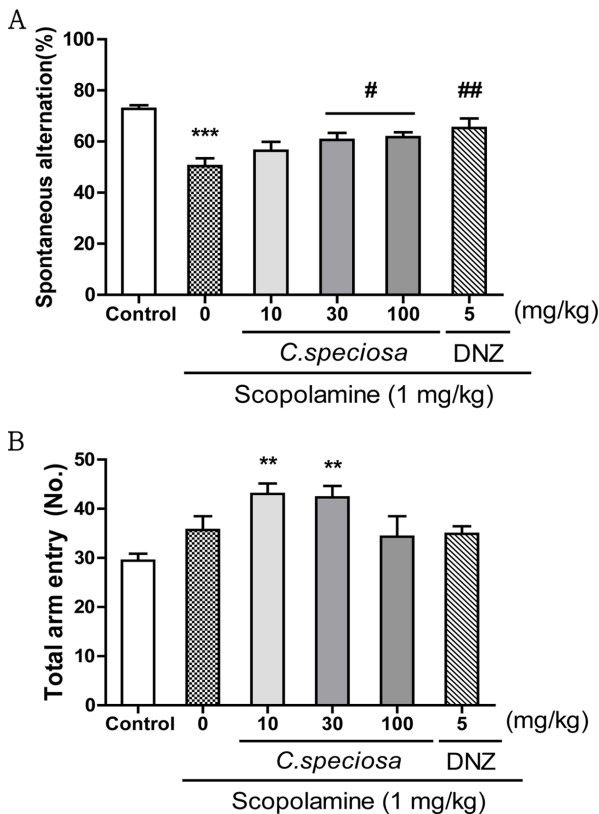


Fig. 3. Effects of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (10, 30 and 100 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory impaired mouse model in the Y-maze test. The results from spontaneous alternation(A)and total arm entries(B) are presented. The data represent the means \pm S.E.M. (n=8-9/group) (***) p <0.001, when compared to vehicle-treated control; # p <0.05, ### p <0.005 when compared to scopolamine-treated group, A) (** p <0.005, when compared to vehicle-treated control group, B). DNZ, donepezil.

수 있었다(p <0.05). 이를 통해 명자나무 과실 당 제거 분획물이 scopolamine에 의해 손상된 단기 기억(작업 기억)의 손상을 회복시키는 것을 확인할 수 있다. 그러나, Y-미로의 각 가지에 마우스가 들어간 총 횟수(total entry)를 비교하였을 때, 10 및 30 mg/kg 투여군에서 총 입장 횟수가 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 이는 Western blot을 통해 관측되는 흥분성 신경인 글루타민성 신경의 활성화에 의한 결과일 것으로 추측된다. 다만, 100 mg/kg의 용량에서는 변화가 없는 것으로 미루어 보아 과잉행동에 대한 변경 행동력의 변화는 아닐 것으로 생각되지만, 향후 추가적인 실험을 통해 확인 되어야 할 것으로 사료된다.

새로운 사물 인지시험에서 명자나무 과실 당 제거 분획물의 효과 - Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 동물 모델에서 명자나무 과실의 투여에 의한 실험동물의 장기 기억 및 인지 기억의 개선 효과를 확인하기 위해 새로운 사물 인

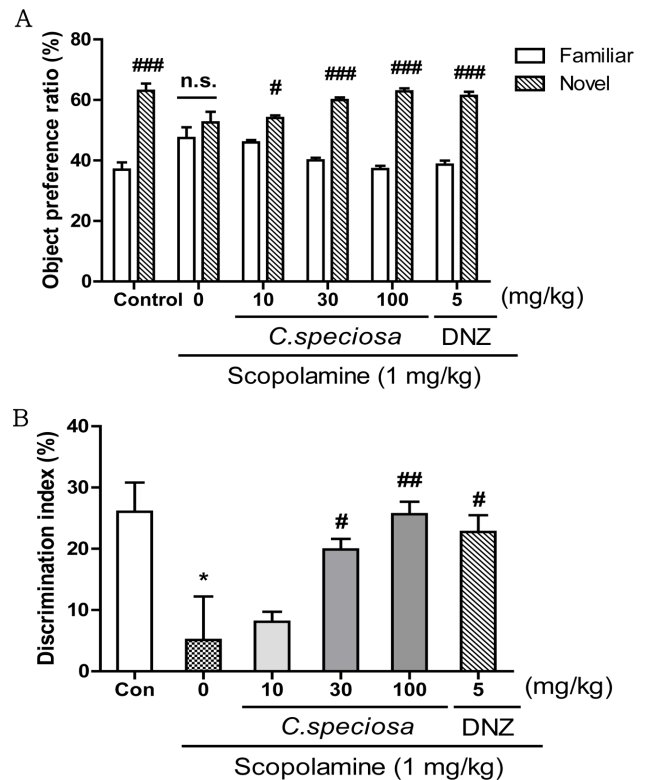


Fig. 4. Effects of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (10, 30 and 100 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory impaired mouse model in the novel object recognition test. The results from discrimination index(A) and object recognition ratio(B) are presented. The data represent the means \pm S.E.M. (n=10/group) (** p <0.005, when compared to vehicle-treated control; # p <0.05, ### p <0.005, #### p <0.001 when compared to scopolamine-treated group, Fig. 3A and B). DNZ, donepezil; n.s., not significant.

지 시험을 실시하였다. 새로운 물체와 기존 물체를 탐색하는 시간을 분석함으로써 분별척도(discrimination index, Fig. 4A)와 사물 선호도(object preference ratio, Fig. 3B)를 계산한 결과 일원분산분석과 이원분산분석에서 각 투여군의 유의적 차이를 확인하였다($F_{5,54}=5.480$, p <0.0001, Fig. 3A; $F_{5,108}=10.96$, p <0.0001, Fig. 4B). Scopolamine 투여군은 정상군에 비해 사물 분별척도가 유의적으로 감소하였으며 (p <0.005), 새로운 물체와 기존 물체를 탐색하는 시간에 유의적 차이가 없는 것을 통해 인지 기억의 손상이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 반면, donepezil을 투여한 군에서는 scopolamine으로 유도된 인지 기억 손상이 유의적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(discrimination index, p <0.05; object preference ratio, p <0.001). 이러한 인지 기억의 회복은 명자나무 과실 당 제거 분획물 30 mg/kg(discrimination index, p <0.05; object preference ratio, p <0.001)과 100 mg/kg(discrimination index, p <0.005; object preference ratio,

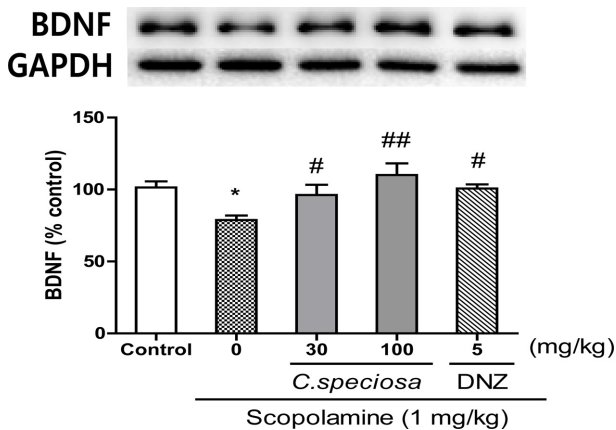


Fig. 5. Effect of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (30 and 100 mg/kg, p.o.) on the expression levels of BDNF at the hippocampus of scopolamine-induced memory impaired mice brain. The results from Western blot analysis are presented. The data represent the means \pm S.E.M. (n=6/group) (* p <0.05, when compared to vehicle-treated control; # p <0.05, ## p <0.005, when compared to scopolamine-treated group). DNZ, donepezil.

p <0.001)에서도 유의적으로 나타났으며, 이를 통해 명자나무 과실 당 제거 분획물이 효과적으로 scopolamine으로 유도된 인지 기억 손상을 회복시킬 수 있었다. 신규 물체에 대한 인식 기능의 감퇴는 AD 환자의 초기에 관찰되는 사항이어서,¹³⁾ 명자나무 과실 당 제거 분획물이 AD 환자에게도 유효할 수 있음을 의미한다.

mBDNF의 발현에 미치는 명자나무 과실 당 제거 분획물의 효과 - 명자나무 과실에 의한 기억력 개선의 원인을 규명하고자 Western blot을 진행하였다. mBDNF의 활성화는 기억을 형성하는 장기 기억 강화와 관련되었다고 알려져 있어,¹⁴⁾ 마우스의 해마에서 mBDNF를 측정하였다. 기존 보고들과 같이 해마에서의 mBDNF 수치는 scopolamine의 투여에 의해 감소하였으며(p <0.05),¹⁵⁾ 명자나무 과실 당 제거 분획물을 30 및 100 mg/kg 농도로 투여한 군에서의 mBDNF의 발현이 scopolamine 투여군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다($F_{4,25}=4.776$, $p=0.0042$, Fig. 5). 이를 통해 행동 실험 결과로 확인한 명자나무 과실 당 제거 분획물의 단기 및 장기 기억에 대한 개선 효과가 해마에서의 mBDNF 발현 증가에 의한 결과라고 추측할 수 있다.

PSD 95의 발현에 미치는 명자나무 과실 당 제거 분획물의 효과 - 해마에서의 장기 기억 형성은 글루타민성 신경의 활성화에 의한 것이라고 알려져 있으며, 글루타민 수용체인 AMPA 수용체와 NMDA 수용체는 시냅스 단백질인 PSD 95와 결합하는 형태로 존재한다.¹⁶⁾ 또한, 명자나무 과실 당 제거 분획물에 의해 해마에서 증가하는 것으로 관찰된 mBDNF는 TrkB수용체에 작용하여 PSD 95의 발현을 높인

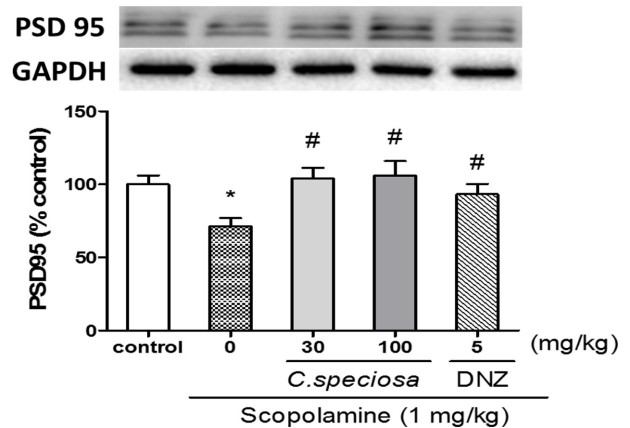


Fig. 6. Effect of the ethanol extract of *Chaenomeles speciosa* (30 and 100 mg/kg, p.o.) on the expression levels of PSD 95 at the hippocampus of scopolamine-induced memory impaired mice brain. The results from Western blot analysis are presented. The data represent the means \pm S.E.M. (n=6/group) (* p <0.05, when compared to vehicle-treated control; # p <0.05, when compared to scopolamine-treated group). DNZ, donepezil.

다고 보고되고 있어,^{17,18)} 마우스의 해마에서 PSD 95의 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 기존 보고들과 같이 scopolamine의 투여에 의해 PSD 95의 수치가 감소하는 것을 확인하였으며(p <0.05),¹⁹⁾ 명자나무 과실 당 제거 분획물을 30 및 100 mg/kg 농도로 투여한 군에서 PSD 95의 발현이 scopolamine 투여군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다($F_{4,25}=3.724$, $p=0.0164$, Fig. 6). 이를 통해 명자나무 과실 당 제거 분획물의 투여에 의해 LTP에 관여하는 글루타민성 신경의 시냅스 후 수용체가 강화될 수 있음을 의미하며, 나아가 명자나무 과실이 시냅스의 가소성을 증가 시킴으로써 기억 형성에 관여할 가능성이 있음을 시사한다.

결론

본 연구에서는 명자나무 과실 당 제거 분획물의 기억력 개선 효과를 콜린성 신경계 차단으로 인한 기억력 손상 마우스 모델에서 확인하고자 하였다. 수동 회피 실험과 Y미로 시험, 새로운 물체 탐색 시험을 수행함으로써 명자나무 과실 당 제거 분획물의 기억력 개선 효과를 확인하였으며, 그 작용 기전을 탐색하기 위해 Western blot을 진행하였다. 그 결과 명자나무 과실 당 제거 분획물에 의한 기억력 개선이 해마에서의 BDNF 발현의 증가와, 시냅스 후 뉴런에 존재하는 수용체의 지표인 PSD 95를 측정함으로써 확인할 수 있었으며, 그 수치는 30, 100 mg/kg에서 농도 의존적으로 증가하였다. BDNF의 발현은 노인 또는 치매 환자에게서 감소하는 경향을 나타낸다고 알려져 있으며,²⁰⁾ 이를 증가시키

는 것은 치매 치료 및 기억력 개선을 위한 목적으로 제시되어온 방법이다. 또한 BDNF는 신경세포의 가소성을 증가시키고, ^{21,22)} 기억의 형성에 관여한다고 알려진 글루타민성 신경의 수용체를 시냅스로 이동시켜 장기기억강화(LTP)에 관여한다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구결과는 명자나무 과실 당 제거 분획물의 섭취가 콜린성 신경의 기능저하 내지 사멸 등에 의해 유발되는 인지기능 저하를 비롯한 치매에 대한 예방 내지 치료 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 명자나무 과실이 식용 가능한 원료임을 감안할 때, 향후 인지 기능과 관련된 건강기능식품으로의 개발이 기대된다.

사 사

이 논문은 한국연구재단의 중견 연구자 지원사업 과제 (2018R1A2A2A05023165)와 농림수산식품기술기획평가원의 과제 (117077-03-1-HD040)의 재원으로 수행한 연구임.

인용문헌

- Lee, K. and Kim, S.-I. (2018) Case study for the elderly welfare center for the aging society. *Journal of the Korea Convergence Society* **9**: 177-183.
- Hwang, S. G. and Park, H. (2019) An analysis on prescribing patterns of Alzheimer's dementia treatment and choline alfoscerate using HIRA claims data. *Korean Journal of Clinical Pharmacy* **29**: 1-8.
- Stites, S. D., Harkins, K., Rubright, J. D. and Karlawish, J. (2018) Relationships between cognitive complaints and quality of life in older adults with mild cognitive impairment, mild Alzheimer disease dementia, and normal cognition. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **32**: 276-283.
- Burns, A. and Iliffe, S. (2009) Alzheimer's disease. *BMJ* **338**: b158.
- Bloom, G. S. (2014) Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA. Neurol.* **71**: 505-508.
- Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S. and Quirion, R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**: 209-45.
- Casey, D. A., Antimisiaris, D. and O'Brien, J. (2010) Drugs for Alzheimer's disease: are they effective? *Pharmacy and Therapeutics* **35**: 208-211.
- 부영민(2012) 본초학, 364-365. 영림사, 서울.
- Chen, J.-C., Chang, Y.-S., Wu, S.-L., Chao, D.-C., Chang, C.-S., Li, C.-C., Ho, T.-Y. and Hsiang, C.-Y. (2007) Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-induced diarrhea by *Chaenomeles speciosa*. *Journal of Ethnopharmacology* **113**: 233-239.
- Chen, Q. and Wei, W. (2003) Effects and mechanisms of glucosides of *Chaenomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in rats. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 593-608.
- Kim, J. E., Jo, Y. J. and Leem, J. Y. (2015) The acetylcholinesterase inhibitory activity of the EtOH extract of chaenomeles fructus and its effects on the metabolism of amyloid precursor protein in neuroblastoma cells. *Korean Journal of Pharmacognosy* **46**: 327-333.
- Miao, J., Zhao, C., Li, X., Chen, X., Mao, X., Huang, H., Wang, T. and Gao, W. (2016) Chemical composition and bioactivities of two common chaenomeles fruits in china: *Chaenomeles speciosa* and *Chaenomeles sinensis*. *J. Food Sci.* **81**: H2049-2058.
- Kim, J. M., Kim, D. H., Lee, Y., Park, S. J. and Ryu, J. H. (2014) Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Res.* **1552**: 17-25.
- Solinas, S. M. G., Edelmann, E., Lessmann, V. and Migliore, M. (2019) A kinetic model for brain-derived neurotrophic factor mediated spike timing-dependent LTP. *PLoS. Comput. Biol.* **15**: e1006975.
- Weon, J. B., Yun, B. R., Lee, J., Eom, M. R., Ko, H. J., Lee, H. Y., Park, D. S., Chung, H. C., Chung, J. Y. and Ma, C. J. (2014) Cognitive-enhancing effect of steamed and fermented *Codonopsis lanceolata*: A behavioral and biochemical study. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**: 319436.
- Petrovic, M. M., Viana da Silva, S., Clement, J. P., Vyklicky, L., Mulle, C., Gonzalez-Gonzalez, I. M. and Henley, J. M. (2017) Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **20**: 529-539.
- Hu, X., Ballo, L., Pietila, L., Viesselmann, C., Ballweg, J., Lumbard, D., Stevenson, M., Merriam, E. and Dent, E. W. (2011) BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *J. Neurosci.* **31**: 15597-15603.
- Li, M., Masugi-Tokita, M., Takanami, K., Yamada, S. and Kawata, M. (2012) Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area. *Brain Res.* **1484**: 76-84.
- Xu, Y. M., Wang, X. C., Xu, T. T., Li, H. Y., Hei, S. Y., Luo, N. C., Wang, H., Zhao, W., Fang, S. H., Chen, Y. B., Guan, L., Fang, Y. Q., Zhang, S. J., Wang, Q. and Liang, W. X. (2019) Kai Xin San ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction. *Neural. Regen. Res.* **14**: 794-804.
- Shukla, R., Oh, H. and Sibille, E. (2019) Molecular and cellular evidence for age by disease interactions: updates and path forward. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* (In press)
- Leal, G., Bramham, C. R. and Duarte, C. B. (2017) BDNF and hippocampal synaptic plasticity. *Vitam. Horm.* **104**: 153-195.
- Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L. and Duarte, C. B. (2015) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.* **1621**: 82-101.

(2019. 8. 2 접수; 2019. 9. 10 심사; 2019. 10. 1 게재확정)