

## A $\beta$ 42로 유도된 알츠하이머 마우스 모델에서 이중 가공 인삼열매 추출물의 학습 및 기억 손실 개선 효과

장수길<sup>1,#</sup> · 안정원<sup>1,#</sup> · 조보람<sup>1</sup> · 김현수<sup>1</sup> · 김서진<sup>1</sup> · 성은아<sup>1</sup> ·  
이도익<sup>2</sup> · 박희용<sup>2</sup> · 진덕희<sup>1</sup> · 주성수<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>강릉원주대학교 생명과학대학 생물의약신소재연구소, <sup>2</sup>중앙대학교 약학대학 면역질환연구소

### Double-processed ginseng berry extracts enhance learning and memory in an A $\beta$ 42-induced Alzheimer's mouse model

Su Kil Jang<sup>1,#</sup>, Jeong Won Ahn<sup>1,#</sup>, Boram Jo<sup>1</sup>, Hyun Soo Kim<sup>1</sup>, Seo Jin Kim<sup>1</sup>, Eun Ah Sung<sup>1</sup>,  
Do Ik Lee<sup>2</sup>, Hee Yong Park<sup>2</sup>, Duk Hee Jin<sup>1</sup>, and Seong Soo Joo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Gangneung-Wonju National University

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University

**Abstract** This study aimed to determine whether double-processed ginseng berry extract (PGBC) could improve learning and memory in an A $\beta$ 42-induced Alzheimer's mouse model. Passive avoidance test (PAT) and Morris water-maze test (MWMT) were performed after mice were treated with PGBC, followed by acetylcholine (ACh) measurement and glial fibrillary acidic protein (GFAP) detection for brain damage. Furthermore, acetylcholinesterase (AChE) activity and choline acetyltransferase (ChAT) expression were analyzed using Ellman's and qPCR assays, respectively. Results demonstrated that PGBC contained a high amount of ginsenosides (Re, Rd, and Rg3), which are responsible for the clearance of A $\beta$ 42. They also helped to significantly improve PAT and MWMT performance in the A $\beta$ 42-induced Alzheimer's mouse model when compared to the normal group. Interestingly, ACh and ChAT were remarkably upregulated and AChE activities were significantly inhibited, suggesting PGBC to be a palliative adjuvant for treating Alzheimer's disease. Altogether, PGBC was found to play a positive role in improving cognitive abilities. Thus, it could be a new alternative solution for alleviating Alzheimer's disease symptoms.

**Keywords:** processed ginseng berry extract, passive avoidance test, Morris water-maze test, acetylcholine, choline acetyltransferase

## 서 론

알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)은 기억과 삶을 영유하는데 중요한 정신적 기능을 파괴하는 퇴행성 질환으로서 주로 혈관성, 전 측두엽, 루이 소체, 지속적 알코올 음주 및 파킨슨병 등에 의해 유발되는 치매(dementia)의 한 부류이다(Jeong과 Han, 2013). AD는 전체 치매의 약 60~80%를 차지하는 대표적인 퇴행성 뇌 질환이나, 질환의 중대성에도 불구하고 약물치료를 통한 완치 개념의 치료 약은 전무할 뿐 아니라 단순한 증상 완화 및 기억력 개선 등의 약물이 사용되고 있다. 현재 미국 FDA에 의해 승인된 치매 약물은 근치가 아닌 증상 완화를 목적으로 하는

4중 2기전, cholinesterase inhibitor 및 NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor antagonists의 약물이 환자를 대상으로 처방이 되고 있을 뿐이다(Glynn-Servedio와 Ranola, 2017). AD 환자에서 다양한 원인으로부터 초래하는 acetylcholine 합성 감소에 의한 인지능 저하와, glutamate에 의한 NMDA 수용체 과 활성화가 치매증상을 점차 퇴행성으로 유도하기 때문에 현재 시판되는 약제의 대부분이 이러한 증상을 개선하여 치매의 경과를 늦추어 주는데 주안점을 두고 있다(Agatonovic-Kustrin 등, 2018; Francis 등, 2012).

2017년 유엔 경제 사회 사회국(UN DESA)의 발표에 따르면 2050년까지 60세 이상 전 세계 인구가 20억 명에 도달할 것으로 추정되며, 인구 고령화에 따른 치매환자의 수도 급격히 증가할 것으로 전망하고 있다. 급격한 인구 노령화 국가로 분류되는 우리나라는 2017년 65세 이상 노인인구가 14%를 넘어 이미 고령 사회에 진입하였고 노인 인구 20%의 초고령 사회를 눈앞에 두고 있다. 특히, 65세 이상 인구의 치매 유병률이 약 9.2% 임을 감안할 때 2050년에 약 270만 명으로 예측되어 치매에 의한 비용 및 사회적 부담이 심각한 수준이 될 것으로 예상하고 있다(Kim 등, 2014a). 최근까지 전 세계적으로 알츠하이머 치매 치료제 개발이 활발하게 수행되어 약 100여 종이 임상 개발 및 진행 중이며, 우리나라도 천연물 신약, 줄기세포 치료제와 펩타이드의 약물 등이 연구개발 중에 있으나 연구의 기초, 응용, 개발 단계

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Seong Soo Joo, Department of Marine Molecular Bioscience, College of Life Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 25457, Korea  
Tel.: +82-33-640-2856  
Fax: +82-33-640-2340  
E-mail: ssj66@gwnu.ac.kr  
Received February 7, 2019; revised March 26, 2019;  
accepted March 26, 2019

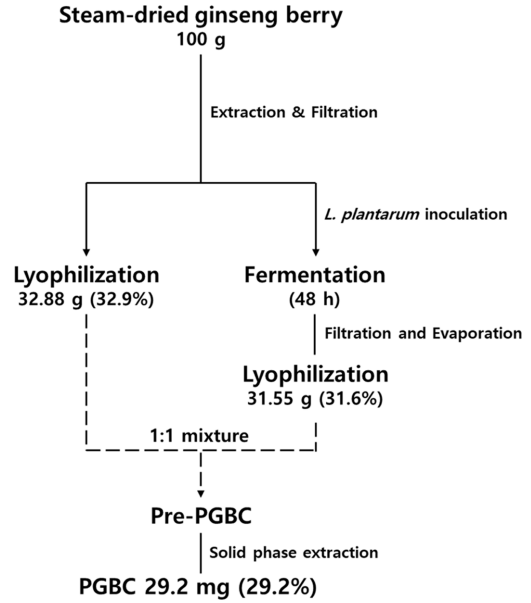
간 연계가 미흡한 것이 현실이다(Park 등, 2018). 알츠하이머 치매는 뇌 신경세포 밖에 베타 아밀로이드(Aβ)가 침착된 아밀로이드 플라그(amyloid plaque)와 세포 내에 과인산화된 타우(hyperphosphorylated tau) 단백질 축적을 병리적 특징으로 하는데, 이들이 원인이 되어 뇌신경 세포(neurons) 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다(Querfurth와 Laferia, 2010). 따라서 국내외 연구개발 추세는 Aβ42의 생성 억제, 축적 억제, 분해 및 효과적인 제거를 주요 개발 타겟으로 하고 있다(Park 등, 2018).

선행연구를 통해 인삼의 약리 활성 성분인 진세노사이드 중 Re, Rd 및 Rg3가 뇌내 소교세포의 활성화와 뇌신경 세포에서 콜린성 마커 발현 및 신경세포 분화를 촉진함을 확인하였다(Jang 등, 2015; Kim 등, 2014b). 다양한 생리 활성을 가지는 진세노사이드는 트리테펜 사포닌(triterpene saponin)이고, 대부분이 C3 및 C-20 위치에 다양한 당을 가지는 담마란 골격(dammarane skeleton)의 구조적 특징을 가지고 있다(Matsuura 등, 1984). 일반적으로 진세노사이드는 'Rx'로 표기하는데 'R'은 'root'를 의미하며 'x'는 크로마토그래피 상의 극성도 차이(알파벳순)를 의미한다(Shibata 등, 1963). 약 30여 종의 진세노사이드 중 Rg3 및 Rd는 20(S)-protopanaxadiol (PPD), Re는 20(S)-protopanaxatriol (PPT)에 속하며 각 계통에 따른 특징을 가진다(de Smet, 2002). 최근 연구에 따르면 고온(120°C) 증기로 찌는 경우 Rg3, Rg5 및 Rk1이 수신편 증가하는 것으로 보고되어 항암 효능이 증가하는 것으로 보고되었다(Liu 등, 2000; Xu 등, 2007; Kim 등, 2008). 본 연구에서는 선행연구에서 도출된 특정 가공 과정을 거친(증포 및 발효) 인삼 열매 추출물이 치매 유발 물질에 의한 단기 기능 저하 회복 및 Aβ42 투여 모델에서 인지 기능 개선 효능을 확인하여 인간의 건강한 수명연장을 돕는 미래의 천연소재를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 연구재료 및 시료 준비

본 연구의 시료인 인삼 열매는 경기도 연천군 인삼재배지에서 4년 이상의 인삼으로부터 수확하여 세척, 건조 및 증포(4중 4포, 7중 7포)를 시작 물질로 사용하였으며, 인삼 열매 원료의 표준화를 위해 6월 초 과육 내 씨앗이 아물기 전 초록색을 띤 단단한 열매만을 채취하였다. 시험 원료 확보를 위해 4중포 인삼 열매와 7중포 인삼 열매를 동량으로 혼합한 뒤 10배수 용량의 50% 발효 주정(Daehan Ethanol Life, Seoul, Korea)에 침지하여 상온에서 2회 추출하였다. 추출물은 여과지(Hyundai micro No.20, Hyundai micro, Seoul, Korea)로 여과한 후 감압 농축과 동결 건조를 수행하여 비 발효 건조 시료(수율 32.9%)를 얻었다. 상기 과정과 동일하게 추출 및 감압 농축한 비 발효 추출물을 증류수를 이용하여 4 brix로 희석하고 *Lactobacillus plantarum*을 접종(1×10<sup>7</sup> CFU/mL)한 후 30 배양기에서 48시간 발효를 수행하여 발효 건조 시료(수율 31.6%)를 얻었으며, 비 발효 건조 시료와 발효 건조 시료를 중량비 1:1로 혼합하여 1:1 mixture (GBC)를 확보하였다. GBC에 포함된 극성 잔여물을 제거하기 위한 전처리 과정으로 solid phase extraction (SPE)을 수행하였다. SPE는 Starata C18-E (1 g/6 mL, Phenomenex, CA, USA)를 사용하여 국가기술 표준원 (인삼 및 인삼 제품-진세노사이드 함량 측정-고속액체크로마토그래피법, 표준 번호 KS H 2153)를 참조하여 수행하였으며, 사전 세척(메탄올 5 mL, 물 20 mL), 시료 주입(100 mg/5 mL), 사후 세척(물 20 mL, 30% 메탄올 15 mL), 용출(메탄올 10 mL)의 과정으로 최종 수율 29.2%의 PGBC (processed ginseng berry complex)를 획득하였다(Fig. 1). 본 연구의 대조 물질로서 식품의



**Fig. 1. Schematic representation of the extraction of PGBC from steam-dried ginseng berry.** The final PGBC was obtained after the processes of SPE from 1:1 mixture of pre- and post-GBC.

약품안전처에서 기억력 개선 원료로 인증한 epigallocatechine gallate (EGCG)를 사용하였으며, 이는 다양한 연구에서 인지능 및 기억력 개선에 효능이 입증된 성분이다(Biasibetti 등, 2012; Cascella 등, 2017).

### High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC 분석은 선행연구에서 표준화한 방법에 따라 수행하였다(Jang 등, 2017). 즉, 진세노사이드 분석을 위해 HPLC (UltiMate 3000 HPLC system, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하였다. Water (A)와 acetonitrile (B) (HPLC grade, Thermo Fisher Scientific)을 이동상으로 하여 유속은 1.6 mL/min으로 하였으며 203 nm에서 검출하였다. 분석에 사용한 column은 YMC-Triart C18 column (250×4.6 mm, S-5 μm, 12 nm, YMC, Tokyo, Japan)으로 column 온도를 30°C로 설정하여 측정하였고, 시료 10 μL를 주입하였다. 이동상의 조건은 국가기술표준원(인삼 및 인삼 제품-진세노사이드 함량 측정-고속액체크로마토그래피법, 표준 번호 KS H 2153)에 명시된 조건으로, 80% A로 시작하여 0-10 min (80% A, 20% B), 10-40 min (80-68% A, 20-32% B), 40-55 min (68-50% A, 32-50% B), 55-70 min (50-35% A, 50-65% B), 70-72 min (35-10% A, 65-90% B), 72-82 min (10% A, 90% B), 82-84 min (10-80% A, 90-20% B), 84-90 min (80% A, 20% B)을 사용하였다. 진세노사이드 표준 물질 14종은 Biopurify (Chengdu, China)에서 구입하여 사용하였고, 2,000 μg/mL부터 연속 희석하여 측정 곡선을 작성하고 이에 의거하여 정성·정량 분석하였다.

### Aβ42로 유도된 치매 마우스 모델

실험동물은 체중 25 g 내외의 6주령 수컷 마우스(ICR, C57BL/6J, Central Lab. Animal Inc., Seoul, Korea)를 구입하여 7일간 순화 과정을 거친 후 사용하였다. 실험동물은 무작위로 분리시키고 고형 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고 실험 기간 동안 공기가 조절된 semi-SPF 실에서 23±2°C의 온도와 상대습도

**Table 1. Test groups for the efficacy evaluation of PGBC and EGCF in A $\beta$ -induced dementia mouse model**

Group	Substance	No. of animal
Normal	Purified water	8
A $\beta$ 42 alone	Purified water	8
+GFE 100 mg/kg	PGBC 100 mg/kg	8
+GFE 300 mg/kg	PGBC 300 mg/kg	8
+GFE 500 mg/kg	PGBC 500 mg/kg	8
+EGCG 100 mg/kg	PGBC 100 mg/kg	8

55±10%, 환기 횟수 12회/시간, 조명 주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절되었다. 본 실험은 강릉원주대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(GWNU-R2017-15) 하에 동 기관의 표준작업 지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

치매 유발 및 처치를 위해 7주령의 마우스(n=8/group)에 PGBC를 3주간 매일 경구로 투여하였으며, 투여 용량은 사전 연구에서 이상반응이 없고 효능 비교가 가능한 100, 300 또는 500 mg/kg을 각각 투여하였다(Table 1)(Kim 등, 2012). 비교 물질로는 EGCG (100 mg/kg)를 투여하였다. 시험 물질 마지막 투여일에 동물을 에테르로 흡입 마취시킨 후 stereotaxic frame (Stoelting, IL, USA)에 고정하고, A $\beta$ 42 (5  $\mu$ L, 5 mg/mL)/head로 뇌실 내(AP: -2.0, ML: 2.9, DV: -3.0 mm)로 투여하여 치매를 유발하였다.

#### 학습/기억력 측정

인지 기능 결핍 유도를 위해 A $\beta$ 42 투여 48시간 후 20분 간격으로 6회의 수동 회피 시험(passive avoidance test, PAT)을, 매일 1회씩 수중 미로 시험(Morris water-maze test, MWM)을 6일간 실시하여 학습 및 기억력을 평가하였다(Park 등, 2013). PAT(Model ENV-010MD; Med Associates, VT, USA) 실험은 어두운 방과 밝은 방으로 나누어진 수동 회피 상자의 밝은 방에 동물을 위치시키고 동물이 어두운 방으로 이동하면 1mA로 2초간 전기 충격을 가했다. 이후 같은 시험에서 어두운 방의 전기 충격으로 인한 기억을 확인하기 위해 밝은 방에서 동물이 체류하는 시간을 측정하여 기억력을 평가하였다. 또한, MWM (model Smart v2.5; Panlab Technology, Barcelona, Spain)은 원형의 수조에 물을 채워 22±2로 유지하면서 수면을 스티로폼으로 채워 수면 아래의 피신용 플랫폼(platform)을 가리고 연속적인 실험을 진행하였다. 실험 동물이 수조 주변의 표지물을 기억하여 수조 내 일정한 장소에 위치한 플랫폼을 찾아갈 때까지 소요되는 시간을 측정하고, 180초 간 플랫폼을 찾지 못할 경우 동물을 플랫폼에 30초 간 머물게 하여 기억을 유도하였다.

#### Acetylcholinesterase (AChE) 억제능 평가

AChE의 활성도는 Ellman's assay에 따라 측정하였다. 7주령 수컷 ICR 마우스(Daehan Bio Link, Chungcheongbuk, Korea)를 에테르 흡입 마취하에 멸균 생리식염수(10 mL)로 심장 관류하여

안락사시킨 후 뇌 조직을 적출하였다. 적출한 뇌 조직에 차가운 100 mM PBS를 가하고 조직 파쇄기(Polytron PT-MR 2100, Lot. 528787, Luzern, Switzerland)를 사용하여 5% 균질 액을 제조하였다. Acetylthiocholine iodide (Cat. No. A5751, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Cat. No. D8130, Sigma-Aldrich)를 각각 PBS와 에탄올에 녹여 최종 0.5 mM 농도로 맞추었다. 시험 물질 PGBC는 최고 농도(10  $\mu$ g/mL)로부터 단계별 희석하여 10, 1, 0.1 또는 0.01  $\mu$ g/mL로 준비하였다. 용매 대조군(vehicle)은 시험 물질 대신 PBS를 첨가하여 측정하였다. Table 2와 같이 큐벳에 용매 vehicle 군 및 PGBC군을 설정하고, 총용량에 맞춰 흡광도 412 nm 조건에서 1분 간격으로 총 5분간 측정하였다.

#### 뇌조직 내 ACh 농도 측정

마지막 행동 검사 24시간 후 부검하여 차가운 생리식염수로 뇌를 충분히 관류하여 뇌조직을 적출한 후 액체 질소에 동결시켜 -80°C에 보관하였다. 적출한 뇌조직의 중량을 측정 후, 10배 부피의 차가운 PBS를 넣고 조직 파쇄기를 이용하여 균질화한 균질 액을 Amplex Red acetylcholine/acetylcholinesterase assay kit (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 치매 마우스 모델의 뇌손상 분석

뇌 손상 여부를 확인하기 위해 부검 시 차가운 생리식염수로 뇌를 충분히 관류하여 뇌조직을 적출하고 4% formaldehyde 용액에 고정시켜 동결 조직 슬라이드를 제작하였다. 기억을 담당하는 hippocampal CA1 구역에서의 정상세포(astrocytes) glial fibrillary acidic proteins (GFAP)에 대한 면역 형광 염색으로 뇌 손상에 따른 정상세포 수의 반응, 즉 활성화된 세포를 계수하였다.

#### 세포배양

사람 뇌신경 줄기세포인 F3.ChAT 세포주는 10% 우 태아 혈청을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Hyclone, Logan, UT, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포가 90% 성장이 되었을 때 실험에 사용하였으며, 20 passage가 넘지 않도록 조절하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA로 부유시킨 후 혈구계산기로 세포 수를 산정하였다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 1.0×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 하였고 유전자 발현 관련 시험은 6 well plate 또는 60 mm culture dish에 1.5×10<sup>6</sup> cells/well 및 5×10<sup>6</sup> cells/dish이 되도록 분주하여 2시간 선 배양 후 본 실험에 사용하였다.

#### 세포 독성

PGBC에 의한 신경세포의 세포 보호 유무를 확인하기 위하여 세포막 손상에 따라 배지로 유출된 lactate dehydrogenase (LDH)량을 측정하는 LDH release assay (CytoTox 96 Kit, Promega, Madison, WI, USA)를 수행하였다. 세포 독성은 F3.ChAT 세포주 (1.0×10<sup>4</sup> cells/96well)에 PGBC (0.1-500  $\mu$ g/mL)로 처치 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였으며 양성대조군은

**Table 2. Composition of the control and treatment groups**

Group	Test substance
Vehicle	492 $\mu$ L PBS+ 18 $\mu$ L ATCh + 18 $\mu$ L DTNB + 30.6 $\mu$ L brain homogenates (5%)
PGBC	432 $\mu$ L PBS + 60 $\mu$ L PGBC+ 18 $\mu$ L ATCh + 18 $\mu$ L DTNB + 30.6 $\mu$ L brain homogenates (5%)

**Table 3. Primer sequences used for real-time qPCR**

Gene	Primer	Amino acid sequences	Product size	Accession No.
hChAT	5'Primer	5'- GTGGCTCAGAACAGCAGCAT	274 bp	NM_020984
	3'Primer	5'- CAATCATGTCCAGCGAGTCC		
hGAPDH	5'Primer	5'- GGAGCCAAAAGGGTCATCAT	203 bp	AK_026525
	3'Primer	5'- GTGATGGCATGGACTGTGGT		

**Table 4. Profiles of ginsenosides analyzed from pre- and post-fermentation of PGBC (LOD, limit of detection) (µg/mg)**

	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	F2	Rg3	Rk1	Rg5	Com K	Rh2
Pre	5.17	80.52	19.62	12.94	19.96	41.3	5.29	1.2	0.63	0.71	0.23	LOD
Post	LOD	LOD	50.26	6.27	2.44	15.01	70.6	46.81	11.46	13.85	0.15	0.33

로 Aβ42를 이용하여 상대 비교하였다. LDH 측정을 위해 배양액을 새로운 96-well plate에 50 µL 분주하고, 동량의 LDH 용액을 50 µL씩 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료와 함께 반응 중지 용액 동량을 첨가하여 반응을 중지 시킨 후, Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정된 흡광도 상대 수치를 대조군(무처리군) 대비 세포독성(%)으로 표시하였다.

**Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) 분석**

유전자 발현 분석을 위해 Trizol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 세포 및 조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. 즉, Trizol 용액 1 mL를 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 5분 동안 방치 후 클로로포름 200 µL를 첨가하여 13500 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 투명한 상층액(500 µL)을 취하여 새로운 튜브로 옮기고 동량의 이소프로필 알코올을 첨가한 후 13500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 RNA를 침강시켰다. RNA 침전물을 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) 처리한 증류수로 희석한 70% 에탄올 0.75 mL로 세척한 후 공기 중에서 건조해 역전사 샘플(reverse transcription sample)로 사용하였다. 1차 가닥(first strand) cDNA 합성은 추출된 총 RNA 1 µg을 사용하여 수행되었고, Improm-II reverse transcription system (Promega)과 oligo dT primer를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. qPCR 분석은 Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Netherlands)을 사용하였으며, Table 3의 primer를 이용하여 ChAT 유전자의 발현을 정량적으로 측정하였고 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 정상화(normalization) 시킨 상대 수치를 비교 분석 하였다.

**통계처리**

결과 분석은 GraphPad Prizm 5.01 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 군별 mean±SD로 나타내었고 각 실험 군간 비교는 일원 분산분석(one-way ANOVA)로 분석한 후 Duncan's multiple range tests로 p<0.05 수준에서 검증하였다.

**결과 및 고찰**

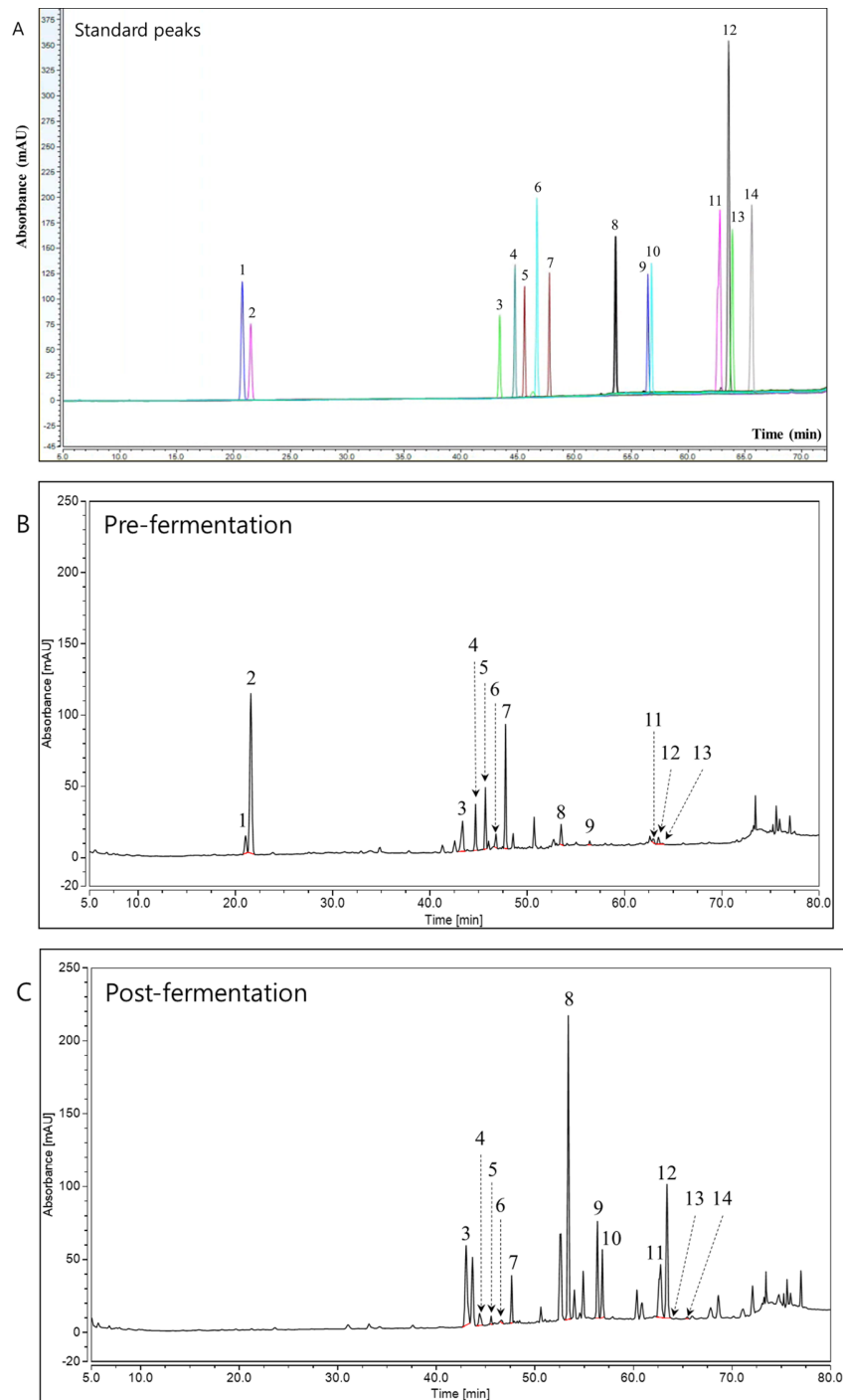
**GC-MS 및 HPLC 분석**

재료 및 방법에서 제시된 분석 법에 따라 비 발효(pre-GBC), 발효(post-GBC) 및 혼합 최종 물질(PGBC)에 대한 성분분석을 수

행하였다. HPLC를 이용한 진세노사이드 함량 측정 결과 발효 전 후의 ginsenoside 함량/peak pattern은 Table 4 및 Fig. 2와 같이 나타났다. 일반적으로 인삼 뿌리에 포함되어있는 major ginsenoside는 Rb1, Rb2, Rc, Re 및 Rg1으로 보고되었으며(Kim 등, 1987), 본 연구에서도 발효 전의 (pre-GBC) 함량 분석 결과, HPLC로 분석된 12종의 ginsenosides 중 Rb1, Rb2, Rc, Re, Rg1가 차지하는 비율이 90%를 차지하여 major ginsenosides를 다량 함유하는 것으로 나타났다. 흥미롭게는 약 80% 수준인 인삼 뿌리에 비해 pre-GBC가 보다 높은 농도의 major ginsenosides를 함유하고 있음이 확인되어 소재 유용성 측면에서 가치가 높을 것으로 판단되었다. 최근 많은 연구에서 Rd와 같이 높은 약리학적 활성을 가지는 minor ginsenosides의 함량을 높이는 방안으로 발효를 통한 미생물 bioconversion 기법을 많이 적용하고 있다(Lee 등, 2015). 본 연구에서는 자체 동정 생체친화균인 *Lactobacillus plantarum* 발효 공정을 적용하여 발효 후의 post-GBC ginsenosides 함량을 분석한 결과 Rb1, Rd, Rg3의 함량이 pre-GBC에 비해 post-GBC에서 감소하는 추세로 확인되어 발효에 의한 성분 전환이 활발히 진행되었음을 제시하였다(Ko 등, 2007). 특히, Rb1과 같은 major ginsenoside는 발효를 통해 당이 제거되는 비 당화 과정(deglycosylation)이 진행되기 때문에 F2, Rg3 및 compound K 등과 같이, 보다 minor한 ginsenoside로 전환되는데, 이렇게 전환된 ginsenosides들이 우수한 약리학적 특성을 가지는 것으로 보고되었다(Hou 등, 2014; Yang과 Kim, 2015; Yoo 등, 2013; Yu 등, 2017).

**Acetylcholinesterase (AChE) 억제 효능**

Acetylcholine (ACh)는 뇌의 신경세포에서 적절히 분비되어 기억력이 유지되고 학습이 가능하게 해주는 신경전달물질이나, 알츠하이머 환자의 뇌에서 ACh 분비 신경세포가 선택적으로 파괴되어 대뇌피질 전반에 영향을 끼치는 결과 기억과 학습력 저하를 초래하는 것으로 알려졌다(Bartus 등, 1982; Michael과 Hasselmo, 2006). 뇌의 대부분을 차지하는 콜린성 신경은 뇌 전반에 영향을 주고 있으며, 이러한 콜린성 시스템은 뇌에서 작용하여 주의력, 학습, 기억, 스트레스 반응, 수면 및 감각 정보 등에 매우 중요한 역할을 담당한다(Bucci 등, 1998; Voytko 등, 1994). 인지능과 관련된 신경전달물질인 ACh는 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT)에 의해 신경세포 내에 존재하는 콜린(choline)과 아세틸코에이(acetyl-CoA)로부터 생성되어 신경말단에서 분비된 후 수용체에 결합을 통해 신호전달 역할을 주로 한다. ACh는 AChE에 의해 아세테이트(acetate)와 콜린(choline)으로 분해되어 다시 신경계로 재흡수 된 후 ACh 생성 기질로 사용되므로(Augustinsson과 Nachmansohn, 1949), AChE 활성 저해

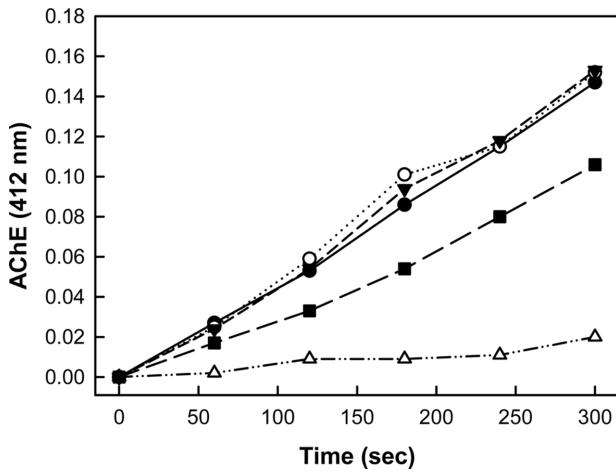


**Fig. 2.** HPLC chromatogram of PGBC. (A) 1-Rg1, 2-Re, 3-Rb1, 4-Rc, 5-Rb2, 6-F1, 7-Rd, 8-F2, 9-Rg3(20S), 10-Rg3(20R), 11-Rk1, 12-Rg5, 13-Compound K, 14-Rh2. (B) pre-GBC. (C) post-GBC.

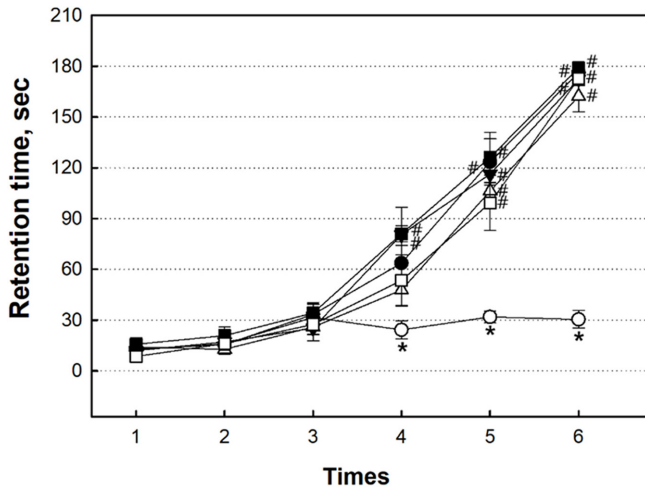
는 적절한 수준의 ACh 농도 유지를 통해 신경세포가 손상된 환자에게 학습 능력, 기억력 감퇴 및 인지력 저하를 개선하는 주요한 치료법이 될 수 있다(Mehta 등, 2012). 이를 반영하듯 최근까지 미국 FDA에서 donepezil, tacrine, galantamine, rivastigmine 등 4종의 약이 승인되어 시판 중에 있다. 본 연구에서도, Fig. 3에 나타난 바와 같이 뇌 균질액에 PGBC를 처치하여 수행한 AChE 억제 활성은 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 유의하게 나타났으며, 고농도인 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 극적인 활성이 나타나는 것으로 확인되어 PGBC가 AChE 억제를 통해 인지 기능을 증진 시켜줄 것으로 예측되었다.

#### 인지능 개선 효능(Passive avoidance test & Morris water maze test)

PGBC 투여 기간(3주) 및 A $\beta$ 42를 이용한 치매 모델 유도 기간 중 유의할 만한 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 부검 시 전장기에서 육안적 이상 조직 및 다른 이상 소견도 관찰되지 않았다(data not shown). 학습 및 기억 능력 평가를 위해 치매 유발 48시간 후 20분 간격으로 6회 실시한 PAT에서는 왕복 상자(shuttle box)에서 어두운 방의 전기 자극을 기억해 일정 시간(180초) 이상 밝은 방에 오래 머무는 동물을 기억력이 형성된 것으로 평가

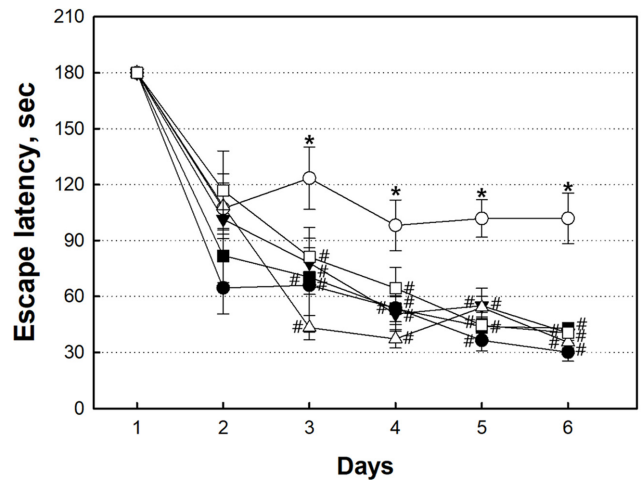


**Fig. 3. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity.** ●-vehicle, ○-PGBC 0.01 μg/mL, ▼-PGBC 0.1 μg/mL, ■-PGBC 1 μg/mL, △-PGBC 10 μg/mL.

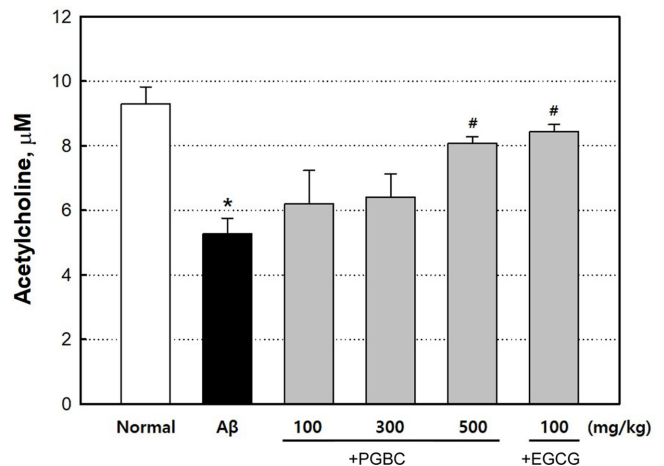


**Fig. 4. Passive avoidance performances.** ●-normal, ○-Aβ42 alone, ▼-PGBC 100 mg/kg, △-PGBC 300 mg/kg, ■-PGBC 500 mg/kg, □-epigallocatechin gallate (EGCG) 100 mg/kg. \*Significantly different from normal,  $p < 0.05$ . #Significantly different from Aβ42 alone,  $p < 0.05$ .

하였다(Nikkhah 등, 2004). PAT 결과 Aβ42로 인지 기능 저하를 유발한 치매 유발 군은 6회차까지 학습에 의한 기억력이 회복되지 않은 반면 PGBC 100과 500 mg/kg 군에서 4회차부터 유의적인 회복 효능이 관찰되었으며, 5회차부터는 양성대조군인 EGCG 100 mg/kg 군 및 PGBC 전 군에서(100-500 mg/kg)에서 정상 군에 필적하는 수준으로 인지 기능이 회복되었다(Fig. 4). 공간지각 능력 평가는 Aβ42 치매 유발 48시간 후 수중 미로(water-maze)를 이용해 매일 반복적인 수영으로 숨어있는 플랫폼(hidden platform)에 안착할 때까지의 시간이 단축되는 시간으로 인지 기능 향상 여부를 평가하였다(Bromley-Brits 등, 2011). 시험 결과, Aβ42 투여 치매 유발 군에서는 6일째까지 공간지각 능력이 회복되지 않았으나 PGBC를 3주간 사전 투여했던 모든 군에서 3일 차부터 유의적인 개선 효능을 나타냈으며, 6일 차에는 정상 군에 필적하는 수준으로 공간지각 능력이 회복됨을 확인하였다(Fig. 5). AD는 Aβ peptides와 tau 단백질이 외에 축적되어 진행성 인지능 쇠퇴를 수반하는 신경퇴행성 뇌질환으로서(Hardy와 Selkoe, 2002; McKhann 등, 1984; Wood 등, 1986) 보다 정교한 AD 개선 효능



**Fig. 5. Morris water-maze performances.** ●-normal, ○-Aβ42 alone, ▼-PGBC 100 mg/kg, △-PGBC 300 mg/kg, ■-PGBC 500 mg/kg, □-epigallocatechin gallate (EGCG) 100 mg/kg. \*Significantly different from normal,  $p < 0.05$ . #Significantly different from Aβ42 alone,  $p < 0.05$ .

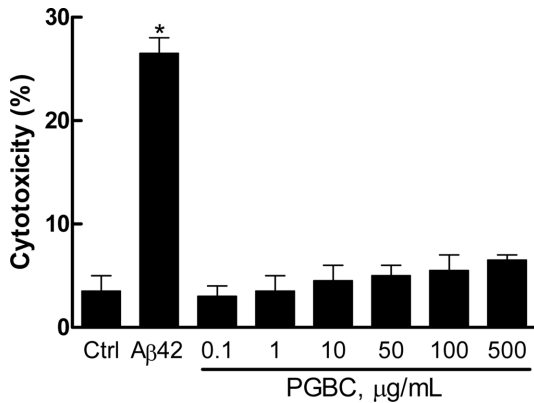


**Fig. 6. Effects of PGBC on the brain acetylcholine concentration in Aβ42-challenged mice.** \*Significantly different from normal,  $p < 0.05$ . #Significantly different from Aβ42 alone,  $p < 0.05$ .

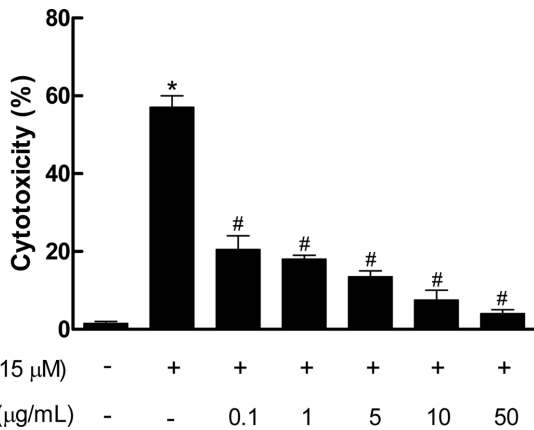
을 평가하기 위해 Aβ peptides의 뇌내 축적과 인지능 결핍 마우스 모델이 요구된다(Hsiao 등, 1996; Wolf 등, 2016). 본 연구에서는 공간 기억/학습 능을 평가하는 수중 미로 시험 및 공포 학습을 통한 기억 능을 평가하는 수동 회피 시험을 수행하여 분석한 결과 PGBC 투여가 Aβ42로 유발되는 인지능 쇠퇴를 개선하는 것으로 판단되었으며, 이는 PGBC를 투여받은 군의 뇌에서 ACh 농도가 증가에 따른 인지능 개선 효과가 나타난 것으로 사료되었다(Fig. 6).

**세포독성 및 ChAT 유전자 발현 조절**

PGBC는 고농도인 500 μg/mL까지 세포독성을 나타내지 않아 비교적 안전한 물질로 판단되며(Fig. 7), 15 μM Aβ42로 유발한 *in-vitro* 세포독성 모델에서 0.1-50 μg/mL 투여 시 신경세포 보호 활성이 관찰되어 비교적 안전한 물질로 AD 관련 실험에 사용할 수 있을 것으로 사료되었다(Fig. 8). 전술한 바와 같이 ACh는 말초(peripheral) 및 중추신경계(central nervous system)에서 신경전달물질로서 인지능(학습 및 기억) 유지에 매우 중요한 역할을 하



**Fig. 7. Cytotoxicity of Aβ42 (7 μM) and PGBC (0.1-500 μg/mL) in F3.ChAT human neural stem cells.** \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

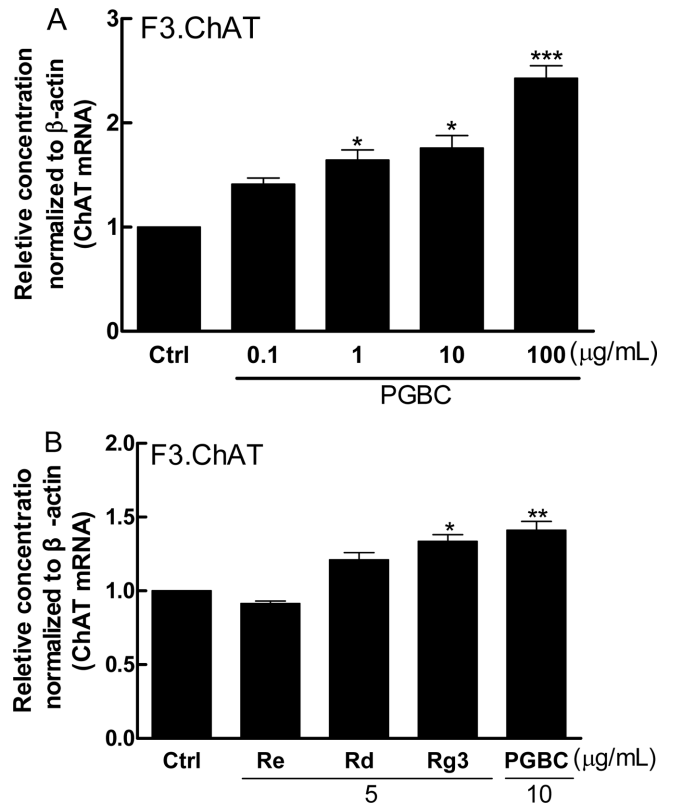


**Fig. 8. Cytoprotective effects of PGBC (0.1-50 μg/mL) in the presence of Aβ42 (15 μM) in F3.ChAT human neural stem cells.** \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from Aβ42 alone ( $p < 0.05$ ).

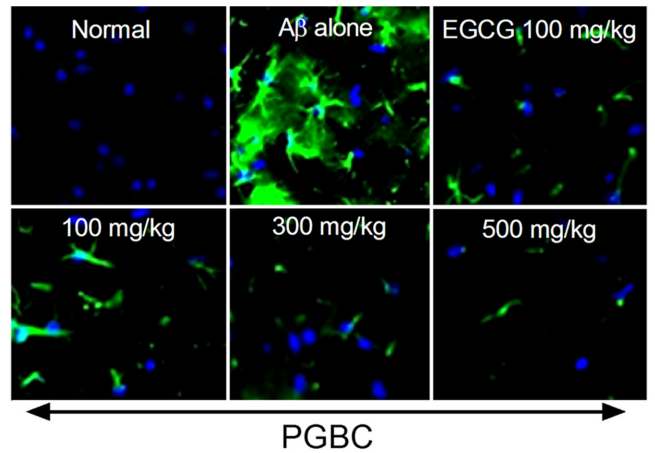
며, ACh는 세포질 내에서 ChAT 효소에 의해 acetyl-CoA와 choline 으로부터 합성된 후 vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) 수송 단백질을 통해 신경세포 말단에서 분비되어 신경전달물질로서 활동을 하게 된다(Hasselmo 등, 1992; Miranda와 Bermudez-Rattoni, 1999; Sugita 등, 2016). 신경세포의 탈분극 후 세포 외로 분비된 ACh는 시냅스의 수용체에 결합하여 신호전달을 유도하거나 AChE에 의해 신속히 acetate와 choline으로 가수분해되어 재순환된다(Campoy 등, 2016). 따라서, ChAT 발현 증가는 직접적인 ACh 양 조절을 통해 인지능 개선에 직간접적인 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되며, AD 치료 요법의 한 부류로 포함될 수 있다(Gil-Bea 등, 2005). Fig. 9에 나타난 바와 같이 ChAT 유전자를 과발현하는 신경줄기세포(F3.ChAT)에 PGBC 투여 시 ChAT 유전자 농도의존적으로 증가함이 관찰되어 치매 모델에서 뇌내 ACh 농도 증가의 원인으로 사료되었으며, 이는 *in-vitro* 모델에서 PGBC의 주요 활성 물질인 Re, Rd 및 Rg3 단독 투여 시 ChAT 유전자 발현이 유의한 수준으로 증가되어 PGBC에 의한 인지능 개선 효과의 주요 활성 물질로 사료되었다(Hasselmo, 2006).

**Aβ42 치매 마우스 뇌조직 보호 효능**

치매 유발 마우스로부터 적출된 뇌조직에서 기억을 담당하는 hippocampal CA1 구역의 GFAP 발현을 면역 형광염색으로 확인



**Fig. 9. Facilitation of choline acetyltransferase (ChAT) gene expression in F3.ChAT neural stem cells by PGBC and major ginsenosides (Re, Rd and Rg3) contained in PGBC.** Results are expressed as means±standard deviations from three separate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs. Control.



**Fig. 10. Effects of PGBC and epigallocatechin gallate (EGCG) on the activation of GFAP positive astrocytes (green) in Aβ42-challenged mice.** Scale bar=100 μm.

한 후, 뇌 손상에 따른 정상세포(astrocyte)의 세포 수를 계수하여 뇌조직의 손상 정도를 평가하였다. GFAP은 뇌의 정상세포가 사멸하거나 심하게 손상을 받은 결과 세포 외로 분비되어 뇌 손상을 받은 환자의 바이오마커로 잘 알려진 단백질이다(Schiff 등, 2012). 다수의 연구에서 AD 진행과 GFAP의 증가 사이에 상호연관성이 있음이 보고되었으며, 아밀로이드 반(amyloid plaque) 근처에서 정상세포의 GFAP 증가가 보고되었다(Serrano-Poza 등,





- Glynn-Servedio BE, Ranola TS. AChE inhibitors and NMDA receptor antagonists in advanced Alzheimer's disease. *Consult. Pharm.* 32: 511-518 (2017)
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356 (2002)
- Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16: 710-715 (2006)
- Hasselmo ME, Anderson BP, Bower JM. Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J. Neurophysiol.* 67: 1230-1246 (1992)
- Hou YL, Tsai YH, Lin YH, Chao JCJ. Ginseng extract and ginsenoside Rb1 attenuate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 14: 415 (2014)
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102 (1996)
- Jang SK, Par JS, Ahn JW, Jo BR, Kim HS, Kim JH, Kim SY, Park JY, Lee DI, Park HY, Joo SS. Antihepatotoxic effect of ethanol extracts from steam-dried ginseng berry on d-galactosamine/lipoplysaccharide-sensitized mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 676-684 (2017)
- Jang SK, Yu JM, Kim ST, Kim GH, Park DW, Lee DI, Joo SS. An Aβ42 uptake and degradation via Rg3 requires an activation of caveolin, clathrin and Aβ-degrading enzymes in microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 758: 1-10 (2015)
- Jeong HG, Han CS. Diagnosis and treatment of dementia in primary care. *J. Korean Med. Assoc.* 56: 1104-1112 (2013)
- Kim YJ, Han WJ, So YS, Seo JY, Kim KY, Kim KW. Prevalence and trends of dementia in Korea: a systematic review and meta-analysis. *J Korean Med. Sci.* 29: 903-912 (2014a)
- Kim ST, Kim HJ, Jang SK, Lee DI, Joo SS. Establishment of optimal fermentation conditions for steam-dried ginseng berry via friendly bacteria and its antioxidant activities. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 77-83 (2013)
- Kim ST, Kim HB, Lee KH, Choi YR, Kim HJ, Shin IS, Gyoung YS, Joo SS. Steam-dried ginseng berry fermented with *Lactobacillus plantarum* controls the increase of blood glucose and body weight in type 2 obese diabetic db/db mice. *J. Agric. Food Chem.* 60: 5438-5445 (2012)
- Kim MW, Ko SR, Choi KJ, Kim SC. Distribution of saponin in various sections of Panax ginseng root and changes of its contents according to root age. *Korean J. Ginseng Sci.* 11: 10-16 (1987)
- Kim YJ, Kwon HC, Ko H, Park JH, Kim HY, Yoo JH, Yang HO. Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 826-830 (2008)
- Kim MS, Yu JM, Kim HJ, Kim HB, Kim ST, Jang SK, Choi YW, Lee DI, Joo SS. Ginsenoside Re and Rd enhance the expression of cholinergic markers and neuronal differentiation in Neuro-2a cells. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 826-833 (2014b)
- Ko SR, Suzuki Y, Suzuki K, Choi KJ, Cho BG. Marked production of ginsenosides Rd, F2, Rg3, and compound K by enzymatic method. *Chem. Pharm. Bull.* 55: 1522-1527 (2007)
- Konishi K, Hori K, Tani M, Tomioka H, Kitajima Y, Akashi N, Inamoto A, Kurosawa K, Yuda H, Hanashi T, Ouchi H, Hosoi M, Hachisu M. Hypothesis of endogenous anticholinergic activity in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 15: 149-156 (2015)
- Lee SJ, Kim Y, Kim MG. Changes in the ginsenoside content during the fermentation process using microbial strains. *J. Ginseng Res.* 39: 392-397 (2015)
- Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* 67: 1297-1306 (2000)
- Matsuura H, Kasai R, Tanaka O, Saruwatari Y, Kunihiro K, Fuwa T. Further studies on the dammarane-saponins of ginseng roots. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 1188-1192 (1984)
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944 (1984)
- Mehta M, Adem A, Sabbagh M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012: 728983 (2012)
- Miranda MI, Bermudez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 6478-6482 (1999)
- Nikkhah A, Ghahremanitamadon F, Zargooshnia S, Shahidi S, Sara Soleimani Asl. Effect of amyloid β-peptide on passive avoidance learning in rats: a behavioral study. *Avicenna J. Neuro. Psych. Physio.* 1: e18664 (2004)
- Park SH, Lee JH. National dementia research and development project. *J. Korean Med. Assoc.* 61: 304-308 (2018)
- Park D, Yang G, Bae DK, Lee SH, Yang YH, Kyung J, Kim D, Choi EK, Choi KC, Kim SU, Kang SK, Ra JC, Kim YB. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve cognitive function and physical activity in ageing mice. *J. Neurosci. Res.* 91: 660-70 (2013)
- Querfurth HW, LaFeria FM. Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* 362: 329-344 (2010)
- Schiff L, Hadker N, Weiser S, Rausch C. A literature review of the feasibility of glial fibrillary acidic protein as a biomarker for stroke and traumatic brain injury. *Mol. Diagn. Ther.* 16: 79-92 (2012)
- Serrano-Pozo, A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. Aphenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimerdisease. *Am. J. Pathol.* 182: 2332-2344 (2013)
- Shibata S, Fujita M, Itokawa H, Tanako O, Ishii T. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude frugs. XI. Panaxadiol, a saponin of ginseng roots. *Chem. Pharm. Bull.* 11: 759-761 (1963)
- Simpson JE, Ince PG, Lacey G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB; MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol. Aging* 31: 578-590 (2010)
- Sugita S, Fleming LL, Wood C, Vaughan SK, Gomes MP, Camargo W, Naves LA, Prado VF, Prado MA, Guatimosim C, Valdez G. VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions. *Skelet. Muscle.* 6: 31 (2016)
- Tata AM, Velluto L, D'angelo C, Reale M. Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13: 1294-1303 (2014)
- Voytko ML, Olton DS, Richardson RT, Gorman LK, Tobin JR, Price DL. Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J. Neurosci.* 4:167-186 (1994)
- Wolf A, Bauer B, Abner EL, Ashkenazy-Frolinger T, Hartz AM. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. *PLoS One* 11: e0147733 (2016)
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83: 4040-4043 (1986)
- Xu TM, Xin Y, Cui MH, Jiang X, Gu LP. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. *Chinese Med. J. (Engl.)* 120: 584-588 (2007)
- Yang JW, Kim SS. Ginsenoside Rc promotes antiadipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by down-regulating C/EBPα and PPARγ. *Molecules* 20: 1293-1303 (2015)
- Yoo YC, Lee J, Park SR, Nam KY, Cho YH, Choi JE. Protective effect of ginsenoside-Rb2 from Korean red ginseng on the lethal infection of haemagglutinating virus of Japan in mice. *J. Ginseng Res.* 37: 80-86 (2013)
- Yu T, Yang Y, Kwak YS, Song GG, Kim MY, Rhee MH, Cho JY. Ginsenoside Rc from Panax ginseng exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2. *J. Ginseng Res.* 41: 127-133 (2017)