

# 제비집 시알산 유래 영양전달체(Nutrient Delivery System)의 인지기능 및 운동기능 개선 효과

†김동명 · 정주영\* · 이형곤\*\* · 권용성\*\* · 백진홍\*\*\* · 한인석\*\*\*\*

(주)케이제이엠바이오 바이오연구소 총괄연구소장, \* (주)케이제이엠바이오 바이오연구소 선임연구원,  
\*\* (주)케이제이엠바이오 바이오연구소 책임연구원, \*\*\* (주)김정문알로에 생명과학연구소 수석연구원,  
\*\*\*\* 유타대학교 화학공학과 교수

## Improvements in Cognitive and Motor Function by a Nutrient Delivery System Containing Sialic Acid from Edible Bird's Nest

†Dong-Myong Kim, Ju-Yeong Jung\*, Hyung-Kon Lee\*\*, Yong-Seong Kwon\*\*,  
Jin-Hong Baek\*\*\* and In Suk Han\*\*\*\*

CTO, Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd., Seoul 06649, Korea

\*Senior Researcher, Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd., Seoul 06649, Korea

\*\*Research Manager, Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd., Seoul 06649, Korea

\*\*\*Research Director, R&D Center of Aloe, Kim Jung Moon Aloe Ltd., Jeju 63636, Korea

\*\*\*\*Professor, Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering, The University of Utah, UT 84112, USA

### Abstract

The objective of this study was to produce a nutrient delivery system (NDS) using sialic acid extracted from edible bird's nest (EBN), which improves brain function in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease, by affinity bead technology (ABT). The inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) and pyramidal cells in the dentate gyrus of the hippocampus were analyzed to investigate the effect of a sialic acid NDS on Alzheimer's disease. Also, the effect of a sialic acid NDS on Parkinson's disease was evaluated by rota-rod test and pole test in an animal model. Among the groups treated with donepezil, EBN, and sialic acid NDS, the AChE activity was the lowest in the sialic acid NDS-treated group. The results of the hippocampus analysis of the rat model confirmed that the sialic acid NDS inhibited amyloid-beta accumulation depending upon the concentration. Also, the sialic acid NDS group showed more improvement in motor deterioration than the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced group in both the rota-rod test and pole test. Therefore, the sialic acid NDS had an effect of protecting not only Alzheimer's disease by inhibiting AChE and amyloid-beta accumulation, but Parkinson's disease by preventing neurotoxicity induced by MPTP.

Key words: dementia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, bird's nest, N-acetylneuraminic acid

### 서론

우리나라는 2000년에 65세 이상의 인구 비율이 전체의 7.2%에 도달하여 이미 고령화 사회에 진입하였고, 이후 꾸준히 증가하여 2018년에는 전체의 14.4%로 집계되었다(Korea National Statistical Office 2018). 통계청의 장래인구추계에 따

르면, 2025년에는 65세 이상의 인구 비율이 전체 인구의 20.3%로 초고령사회에 진입할 것이며, 2030년에는 전체 인구의 25.0%에 이르러 그 정도가 더욱 심화될 것으로 예측된다(Kim & Han 2012; Korea National Statistical Office 2019a). 이러한 노인 인구 비율의 급격한 증가와 더불어 각종 노인성 만성질환을 비롯하여 인지기능의 장애와 치매 환자의 비율

† Corresponding author: Dong-Myong Kim, CTO, Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd., Seoul 06649, Korea. Tel: +82-2-405-6167, Fax: +82-2-405-6154, E-mail: happyvirus@naver.com

이 증가할 것으로 예측되며, 2018년에는 치매, 파킨슨병, 알츠하이머 질환 및 뇌질환 등의 노인성질환을 가진 노인의 비율이 65세 이상 인구의 8.8%에 이르렀다(Korea National Statistical Office 2019b). 노인성 질환 중 가장 큰 문제가 되는 치매는 뇌의 퇴행성 변화, 뇌혈관 장애, 뇌의 염증성 장애, 대사성 질환 등에 의해 일어나는 인지기능의 장애를 특징으로 하는 뇌 증후군이다(Kang JS 2016). 인지기능 장애는 치매환자의 독립성과 삶의 질을 저해할 뿐 아니라 간호자의 간호부담도 가중시키게 되기 때문에 뇌질환의 예방 또는 치료에 대한 필요성이 증대되고 있으며, 이에 따라 뇌 순환, 대사개선향 또는 치매 치료제 등의 뇌기능 개선성을 가진 의약품의 연구가 진행되고 있다.

알츠하이머 질환은 중추신경계의 신경퇴행성 질환으로, 치매의 가장 흔한 형태이다(Van Cauwenberghe 등 2016). 알츠하이머성 치매 환자의 인지 기능의 감소 및 신경세포의 손상이 유발되는 과정에서 아세틸콜린(acetylcholine), 도파민(dopamine), 가바( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)와 같은 신경전달물질의 전달 및 생성, 분비, 제거 과정의 이상이 중요한 역할을 한다. 이러한 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는데, 치매의 주 증상인 기억력 장애는 기억과 학습에 있어서 중요한 역할을 수행하는 콜린성 시스템(cholinergic system)의 심각한 손상에 의한 것으로 알려져 있다(Kasa 등 2000; Trabace 등 2000; Lee 등 2013). 특히 알츠하이머성 치매의 인지력 감소 증상은 아세틸콜린을 생성하는 신경세포의 손상과 아세틸콜린을 분해하는 효소인 아세틸콜린가수분해효소(acetylcholinesterase, AChE)의 활성 증가와 함께 기억장애가 더욱 악화된다(Park 등 1996). 치매는 다양한 원인만큼 그 치료제 또한 다양한 경로를 표적으로 하고 있는데, 대표적으로 뇌 조직의 콜린계 활성의 감소로 기억력이 감퇴하기 때문에 뇌 신경접합부의 콜린성 작용을 활성화하기 위해 신경전달물질인 아세틸콜린의 작용을 활성화시키는 콜린성 작용제(cholinergic agonist), 아세틸콜린 전구체, AChE의 활성을 억제하는 AChE 효소 저해제(inhibitor)를 사용하는 많은 연구가 수행되고 있다(Canal 등 1996; Lee 등 2009).

제비집(edible bird's nest)은 동남아시아 지역에 주로 서식하는 '금사연(*Aerodramus fufi*)'이라 불리는 작은 바다 제비가 분비한 타액(saliva)과 깃털 등으로 만들어진 동지로, 중국 명나라 시기부터 섭취되던 중국의 전통식품이다(Chantler & Driessens 2010). 제비집은 비타민, 호르몬 및 지방산이 풍부할 뿐만 아니라 단백질, 탄수화물, 무기질 염과 아미노산과 같은 다양한 영양 성분을 포함하고 있다(Careena 등 2018). 특히 제비집의 탄수화물 성분은 인체에 다양한 약리학적 효과를 가지는데, 그 중에서도 약 60~160 mg/kg 가량의 농도로 함유되어 있는 시알산(sialic acid)은 9개의 탄소 골격을 가지

는 뉴라민산(neuraminic acid)의 아실 유도체의 총칭으로 현재 동물계에 20여종 이상이 알려져 있다(Marni 등 2014). N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid)이라고도 알려져 있는 시알산은 바이러스에 대한 리셉터 작용, 세포와 분자의 면역학적 인식 부위, 세포접착 또는 암의 전이 등 중요한 생리적 기능에 관여하고 있는 산성당으로 보고되어 왔다. 대사과정에서 일시적으로 유리형으로 존재할 뿐, 대부분 당쇄의 비환원 말단에 글리코시드로 결합되어 올리고당의 형태로 존재하는데, 유아의 지적 능력에 도움을 줄 뿐만 아니라 생리학적 및 병리학적 과정을 조절하는 항염증 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있다(Kang 등 2013). 일반적으로 시알산은 글리코시드 결합을 통해 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine, GalNAc)을 형성하는데, 이 화합물은 시냅스의 적절한 기능에 중요한 역할을 하며 기억 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Kathan & Weeks 1969; Goh 등 2001; Colombo 등 2003; Careena 등 2018). 앞선 연구에서 제비집은 복용량과 비례하게 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 유도 신경염증(neuroinflammation) 및 역 LPS 유도 기억 장애를 방지하는 것을 확인하면서, 제비집의 시알산은 신경퇴행성 질환에 대한 기능성 식품일 뿐만 아니라 기억력을 증진시키고 신경염증 반응과 산화적(oxidative) 스트레스 과정을 저해하면서 잠재적으로 신경보호(neuroprotective) 역할을 할 수 있다는 것이 보고되었다(Careena 등 2018).

친환경 비드 기술(affinity beads technology, ABT)은 친환경적인 분리·정제 방법으로, 비극성 고분자 비드를 이용하여 목표 성분을 비극성 고분자 비드에 흡착시키고, 이를 분리 후 탈착제를 투입해 목표 성분을 비극성 고분자 비드에서 탈착시키는 기술이다. 간단한 방법으로도 선택적인 분리 및 정제가 가능하며, 낮은 에너지를 이용하여 생산성이 높고 반복적인 생산 공정의 적용이 용이하다는 장점이 있다. 또한, ABT 기술은 조작 에너지가 이온성 고분자 비드에 비해 낮은 비극성 고분자 비드를 사용하기 때문에 환경오염을 유발하는 유기용매의 사용을 최소화할 수 있어 친환경적이다(Kim & Jo 2020).

영양전달체(nutrient delivery system, NDS)란 식품의 영양물질을 체내 목표 지점에 효과적으로 전달해주는 시스템이다(Kim & Cho 2006; McClements DJ 2015). 섭취한 영양물질이 체내에 흡수된 후 특정 장기조직이나 세포로 용이하게 전달되지 않는 경우가 발생하여 체내 목표 지점에 그 효능을 온전히 전달하기 어려울 수 있기 때문에 전달체를 이용한다. 이와 비슷한 전달체 시스템으로 제약업계의 약물전달체(drug delivery system, DDS) 및 화장품업계의 피부약물전달체(transdermal drug delivery system, TDDS)에 관한 연구가 진행되어 왔다(Manish & Vimukta 2011; Patel 등 2012; Rastogi &

Yadav 2014). 이에 본 연구팀에서는 식품 영양물질의 체내 흡수율을 높이는 제제화를 실현하기 위해 NDS 물질에 관한 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 담즙산을 이용한 체내 흡수율 및 효능이 우수한 마이셀(micelle) 나노 입자에서 착안하여, 조직 투과율 및 흡수율이 우수한 NDS 시스템으로 담즙산-시알산 마이셀 나노 입자를 제조하였고 최초로 연구에 이용하였다(Kim & Jo 2020).

본 연구에서는 ABT 기반 제비집으로부터 시알산의 분리정제 방법을 개발하고 이를 함유하는 시알산 영양전달체의 인지기능 및 운동기능 개선 효과에 대한 연구가 진행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 재료

제비집 추출물 제조에는 네스투랄(Nestural Ltd, Pathum Thani, Thailand)사가 제조한 제왕의 아침(The King's Morning)이라는 상품명으로 판매되고 있는 제비집 농축액이 사용되었다. 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 실험동물로 5주령의 평균 체중 30~35 g의 수컷 ICR 생쥐(mice, Orient Bio, 경기도, 대한민국)를 분양 받았다. 1주일동안 표준온도( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) 및 습도( $50\pm 5\%$ )와 조명조절 환경(12 h 채광 후 12 h 차광)에서 물과 음식이 자유롭게 가능하도록 사육한 뒤 건강한 동물만 사용하였다. 본 연구를 위해 건국대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받았다(KKUASP (SE)-18-023).

### 2. 실험방법

#### 1) 시알산 NDS 제조

##### (1) 제비집 추출물과 시알산의 제조

제비집을 distilled water(DW)와 함께 분쇄하고 추출하였다. 이 제비집 추출물을 Sep-Pac Plus C18 Cartridge 칼럼(Waters Corporation, Milford, MA, USA)에 흡착시키고, 멸균수로 세척한 후, 1% HCl-메탄올 용액으로 용출시킴으로써 ABT기술을 적용하여 제비집 중의 시알산을 분리했다(Fig. 1). 이렇게 하여 얻어진 시알산을 온도  $37^\circ\text{C}$ 에서 증발기(Buchi LAB., Rotavapor, FW, Switzerland)를 이용해 농축한 후 pH 7.0으로 조정하였으며, 다시 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 건조하여 제비집 추출물로부터 시알산 분말을 수득했다.

##### (2) 시알산의 순도 측정

초고속액체크로마토그래피(UFLC XR HPLC System w/LC-

20AD xr, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분리정제한 시알산의 순도를 측정하였다. 분석 column으로는 Zorbax XDB-C18 column ( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ )이 이용되었다. 두 가지 이동상으로 1% acetonitrile-DW 및 1% acetic acid-acetonitrile을 이용하였으며, flow rate는  $1.0\text{ mL/min}$ 으로, column 온도는  $25^\circ\text{C}$ 로 유지하며  $20\ \mu\text{L}$ 의 시알산을 주입하여  $254\text{ nm}$ 의 파장에서 분석하였다.

### (3) 마이셀 나노입자의 제조

시알산 NDS인 마이셀 나노입자의 제조 방법은 다음과 같았다. 담즙산의 주 성분인 타우로콜산(taurocholic acid)  $5.78\text{ g}$ 을  $25\text{ mL}$ 의 85% 메탄올에 혼합하여  $430\text{ mM}$ 의 타우로콜산 용액을 만들었다. 타우로콜산 용액  $2.25\text{ mL}$ 에 레시틴 용액  $1.8\text{ mL}$ (클로로포름에  $100\text{ mg/mL}$ 로 용해된 레시틴 용액)를 첨가하여 1차 용액을 제조하였다. 제조된 1차 용액을 테플론 캡을 가진 유리 튜브에 넣고  $55^\circ\text{C}$  water bath에서 5 h 온열처리 후 질소 가스를 이용하여 증발시켰다. 증발된 잔여물을 2 h 동안  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동시킨 후 튜브를 열어 9 h 이상 감압하에서 동결건조 시키고, 다시 PBS에서 용해시켜 4 h 동안  $56^\circ\text{C}$ 에서 온열처리 하였다. 온열처리가 완료된 용액을 무혈청 배지에서 10%(v/v)로 희석하고  $0.45\ \mu\text{m}$  필터로 여과하여 Fig. 2의 시알산-담즙산 콘주게이트된 마이셀 나노 입자로 이루어진 시알산 NDS를 제조하였다.

### 2) 인지기능 개선 효능 분석

#### (1) AChE 활성에 대한 제비집 추출물과 시알산의 효능 비교

제비집 추출물과 시알산을 이용한 AChE 활성 실험은 다

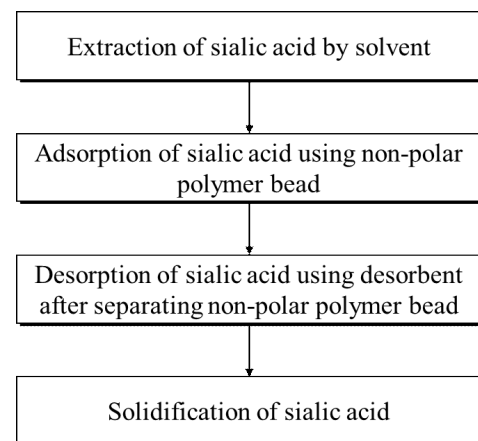


Fig. 1. Process flow diagram of affinity bead technology (ABT).

음과 같이 진행하였다. 마우스 생체 내 AChE 활성 억제 효과를 비교하기 위하여 양성대조군(Donepezil 1.0 mg/kg), 시알산 NDS (100 mg/kg) 및 제비집 추출물(100 mg/kg)을 각각의 마우스(각 군당 3마리)에 1회 경구 투여하였다. 각각의 물질을 투여하고 6 h 후에 해마를 분리하여 1 M 인산 완충용액(phosphate buffer pH 8.0)을 이용하여 균질화 시켰다. 획득한 균질액은 Amplex red assay kit(Molecular probe, OR, USA)를 이용하여 생체 내 AChE 활성을 측정하였다. 이때 대조군으로는 시료 대신 증류수를 투여한 후 반응시켜 비특이적 반응이 일어나지 않음을 확인하였다.

## (2) 아밀로이드 베타 단백질 유도 치매 레트 모델에서 해마 부위의 조직학적 검사

시알산 NDS가 뇌 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 2개월된 레트(Male Wister rats)에게 아밀로이드 베타(amyloid- $\beta$ , A $\beta$ ) 단백질을 이용해 치매를 유도하여 해마 부위의 신경 세포 사멸을 관찰하였다. 모든 동물은 1주 동안 적응기간을 가지게 하였고 Hidalgo 등(2006)의 방법과 동일하게 행동학적 검사(behavioral procedure)를 실시하여 이상이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 실험기간 동안 항온, 항습이 가능한 사육장에서 12 h 채광 후 12 h 차광의 조건에서 식수와 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 비교를 위해 아무것도 처리하지 않은 군(대조군), 아밀로이드 베타 처리군, 아밀로이드 베타 및 100 mg/kg의 시알산 NDS 처리군, 그리고 아밀로이드 베타 및 200 mg/kg의 시알산 NDS 처리군으로 나누어 실험을 진행하였다. 각각의 처리 시료를 레트에 4주간 투여한 후, 다이에틸 에스터(diethyl ester)로 마취한 뒤 복강을 열어

심장을 통하여 염수로 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 10% 중성의 완충용 포르말린에 고정시킨 뒤 헤마톡실린-에오신염색(Hematoxylin-Eosin staining)을 통해 해마 부위의 신경 세포의 퇴화 정도를 관찰하였다. 분석에는 아포토시스(apoptosis) 확인용 키트인 ApopTag (CHEMICON, CA, USA)가 사용되었다. 본 연구를 위해 건국대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받았다(KKUASP (SE)-18-025).

## 3) 운동기능 개선 효능 평가

시알산 NDS가 신경손상모델의 운동 능력 개선에 미치는 효과를 확인하기 위해 *in vivo* 신경손상 모델에서의 운동능력 개선 효능을 평가법으로 rota-rod test 및 pole test를 진행하였다. Rota-rod test는 Kim & Choi(2013)의 방법을 살짝 변형하여 진행하였으며, Rota-Rod(UGO BASILE 7650, Italy)를 사용하여 전봉(직경 3 cm, 매분 8회전) 위에 올려놓고 2분 이상 떨어지지 않는 마우스를 선별하여 10마리씩 3군으로 나누었다. 생리식염수만 처리한 정상군, 20 mg/kg의 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)를 5일간 투여한 군 및 28일간 200 mg/kg의 시알산 NDS를 처리한 후 20 mg/kg의 MPTP를 5일간 투여한 군으로 나누었으며, 각 군에 대하여 각각 1마리씩 회전봉 위에 올려놓고 낙하할 때까지의 시간 및 총 운동거리를 측정했다. Pole test는 Park 등(2014)의 방법으로 진행했으며, rota-rod test와 동일하게 3군으로 나누었다. 높이 55 cm, 지름 8 mm의 막대 위에 마우스를 머리가 위로 향하게 두고, 마우스가 꼭대기를 180° 돌아서 마우스의 머리가 완전히 아래로 내려오는 시간을 측정하였다.

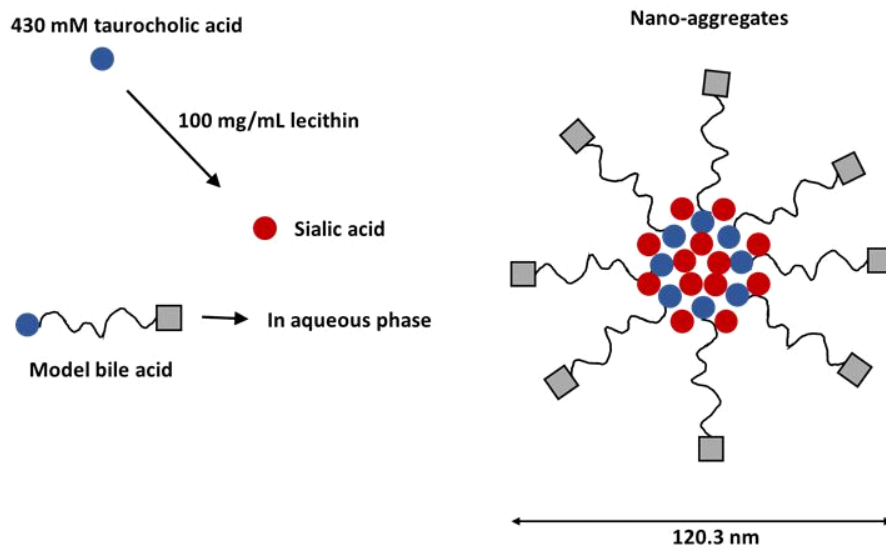


Fig. 2. Nutrient delivery system which is consisted of sialic acid-bile acid conjugated micelle nano particles.

#### 4) 통계 처리

각 시료 간의 차이를 비교하기 위해 통계처리를 실시하였다. 모든 시료에 대하여 3회 반복 실험을 진행하였으며, 각 자료는 평균과 표준오차로 나타났다. 통계 분석에는 SPSS 12.0(IBM SPSS Statistics, NY USA)가 이용되었으며, 95% 유의수준에서 던컨(Duncan)의 일원배치 다중검정 시험으로 각 처리 간의 유의적인 차이를 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 시알산의 분리정제

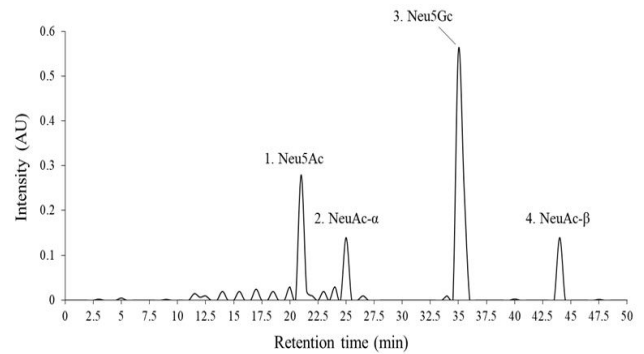
시알산은 일반적으로 산가수분해, 효소가수분해, 이온교환(ion-exchange) 크로마토그래피, 셀룰로오스 크로마토그래피 방법으로 분리정제되며, 그 외에도 thin-layer 크로마토그래피 방법 등이 이용되는 것으로 알려져 있다(Schauer & Corfield 1982). 본 연구에서 사용한 ABT 분리정제 기술의 경우는 친화성 비드가 충전된 칼럼에서 흡착과 탈착 반응을 진행시켜 4가지의 시알산을 선택적으로 분리하였다(Kim & Jo 2020).

ABT기술을 적용하여 시알산을 분리정제 후 순도를 측정 한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 시알산 용액의 HPLC 크로마토그램은 4개의 명백한 시알산 흡착 피크를 나타내었다. Neu5Ac의 경우 21.8 min, Neu5Ac- $\alpha$ 의 경우 25.2 min, Neu5Gc의 경우 35.3 min, Neu5Ac- $\beta$ 의 경우 44.8 min의 retention time에서 피크가 관찰되었다. 또한, 시알산 이외의 다른 이물질들은 흡착 피크가 대부분 사라진 것을 보았을 때, 4가지 시알산의 상대 피크는 ABT 처리를 통한 분리정제 후에 명백히 증가했다는 것을 알 수가 있었다.

#### 2. 인지능력 개선 효능 분석

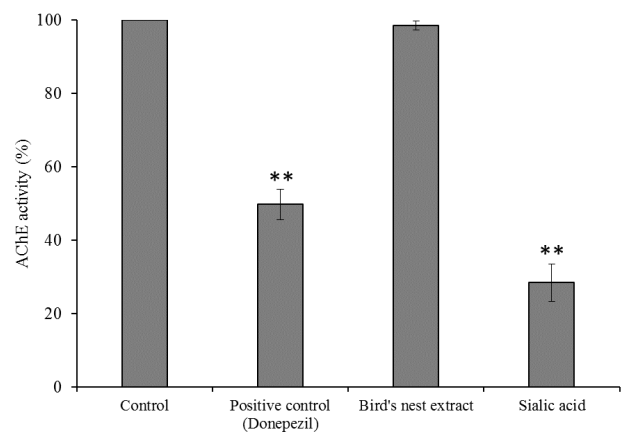
##### 1) AChE 활성에 대한 제비집 추출물과 시알산의 효능 비교

AChE 활성에 대한 제비집 추출물과 시알산의 효능을 비교한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 제비집 추출물을 처리한 시험군의 경우 AChE 활성이 98.6 $\pm$ 1.2%로 아무 처리도 하지 않은 음성대조군(100%)과 유사한 수치를 보이며 AChE 활성 억제 효과가 미미했다. 반면에 시알산을 처리한 시험군의 경우 양성대조군인 donepezil(49.8 $\pm$ 4.2%)보다 낮은 28.5 $\pm$ 5.1%의 AChE 활성을 보이며, 우수한 AChE 활성 억제 효능을 가지는 것이 확인되었다. Stefanović 등(1975)에 따르면, 세포 표면의 시알산을 제거할 경우 콜린 흡수가 현저하게 감소하고 동시에 AChE 활성이 향상되었다. 이를 통해 시알산은 세포의 외부 표면에서 콜린 흡수 및 AChE 활성을 매개하는 것이 확인되었다.



**Fig. 3. HPLC chromatogram of sialic acid after separation by the affinity bead technology.** 1: N-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac); 2:  $\alpha$ -anomer of Neu5Ac (Neu5Ac- $\alpha$ ); 3: N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc); 4:  $\beta$ -anomer of Neu5Ac (Neu5Ac- $\beta$ ).

알츠하이머 질환은 노화 관련 신경퇴행성 질환으로, 진행성 뇌수축에 의한 기억장애 및 인지능력 저하가 주된 증상이며 뇌 부위에 신경섬유다발(neurofibrillary tangle)과 노인반(senile plaque)이 침착되는 것이 특징이다. 알츠하이머성 치매의 병리학적 원인에 관한 가설은 크게 두 가지로 나뉘는데, 첫번째는 ‘콜린성 가설’이고 두번째는 ‘아밀로이드 가설’이다. 먼저 콜린성 가설에서는 AChE는 알츠하이머 질환 초기에 신경 전달 물질인 아세틸콜린을 콜린과 아세트산염(acetate)으로 분해시켜 콜린성 뉴런을 소실시키고, 콜린성 신



**Fig. 4. Results of *in vivo* acetylcholinesterase (AChE) activity test of normal mice (control), treated with donepezil as a positive control, treated with extract of bird's nest and treated with sialic acid.** Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test. \*\*  $p < 0.05$  compared to control group.

경전달을 감소시켜 알츠하이머 질환을 유발한다고 보고되었다(Schliebs & Arendt 2011). 따라서 알츠하이머의 인지기능을 개선하거나 진행을 늦추기 위해 AChE 저해제로 아세틸콜린의 분해를 막아 아세틸콜린의 효능을 높이는 기전이 활용되고 있다(Jeong 등 2017). 따라서 본 연구에서는 콜린성 신경 손상을 유발하는 AChE의 억제제에 관한 실험을 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군, donepezil을 처리한 양성 대조군, 제비집 추출물을 처리한 군 및 시알산 NDS를 처리한 군의 AChE 활성을 확인한 결과, 제비집을 처리한 군의 AChE 활성 억제율(1.4%)은 대조군의 억제율(0%)과 극미한 차이를 보여 효능이 미미하였다. 그러나 제비집에서 추출한 시알산의 NDS를 처리한 군의 경우 AChE 활성 억제율이 71.5%로 나타나며 양성대조군(50.2%)보다 AChE 활성 억제 정도가 높은 것으로 확인되었다. 제비집에 시알산이 함유되어 있음에도 불구하고 제비집 추출물과 시알산 NDS의 활성 억제 차이가 극명하게 나타난 데에는 두 가지 이유 때문인 것으로 사료된다. 첫번째는 마우스에 투여된 시알산 함량의 차이이다. 제비집에 포함된 시알산의 함량은 약 60~160 mg/kg으로 알려져 있는데, 따라서 제비집에서 시알산을 선택적으로 추출해 낸 시료에 비해서 제비집 추출물의 AChE 활성 억제도가 다소 떨어진 것으로 생각된다(Mami 등 2014). 두번째는 체내 NDS 작용의 유무이다. 시알산 NDS 시료의 경우 시알산-담즙산 콘쥬게이트된 마이셀 나노입자를 이용하여 NDS로 제조하여 투여하였으나, 제비집 추출물의 경우 추출물 상태 그대로 투여하였기 때문에 마우스의 체내에서 목표 지점에 적절한 작용을 전달하는 것이 부족했던 것으로 생각된다. 이 결과를 통해 시알산 NDS는 AChE 억제 활성, 즉 인지기능 저하를 억제하는 것에 도움을 줄 뿐만 아니라, 체내 목표 지점에 효과적으로 적용하는 스마트한 영양물질이 될 수 있음이 확인되었다. 현재까지 시알산의 AChE 억제 활성에 관해서는 많은 연구가 진행되어 왔으나, 시알산 NDS에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 후속 연구를 통해 시알산 NDS가 신경 세포의 사멸을 방지하는 명확한 작용 기전을 규명하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

## 2) 아밀로이드 베타 단백질 유도 치매 래트 모델에서 해마 부위의 조직학적 검사

해마 부위의 조직학적 검사 결과, 아밀로이드 베타 단백질을 뇌실 내 처리한 군을 보면 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 해마의 치상회(dentate gyrus) 부위의 기억과 관련된 피라미드 세포(pyramidal cell)의 퇴화가 관찰되었다(Fig. 5). 대조군, 100 mg/kg의 시알산 NDS 처리군 및 200 mg/kg의 시알산 NDS 처리군에서는 해마 부위의 손상에 대해 차이가 관

찰되지 않았다.

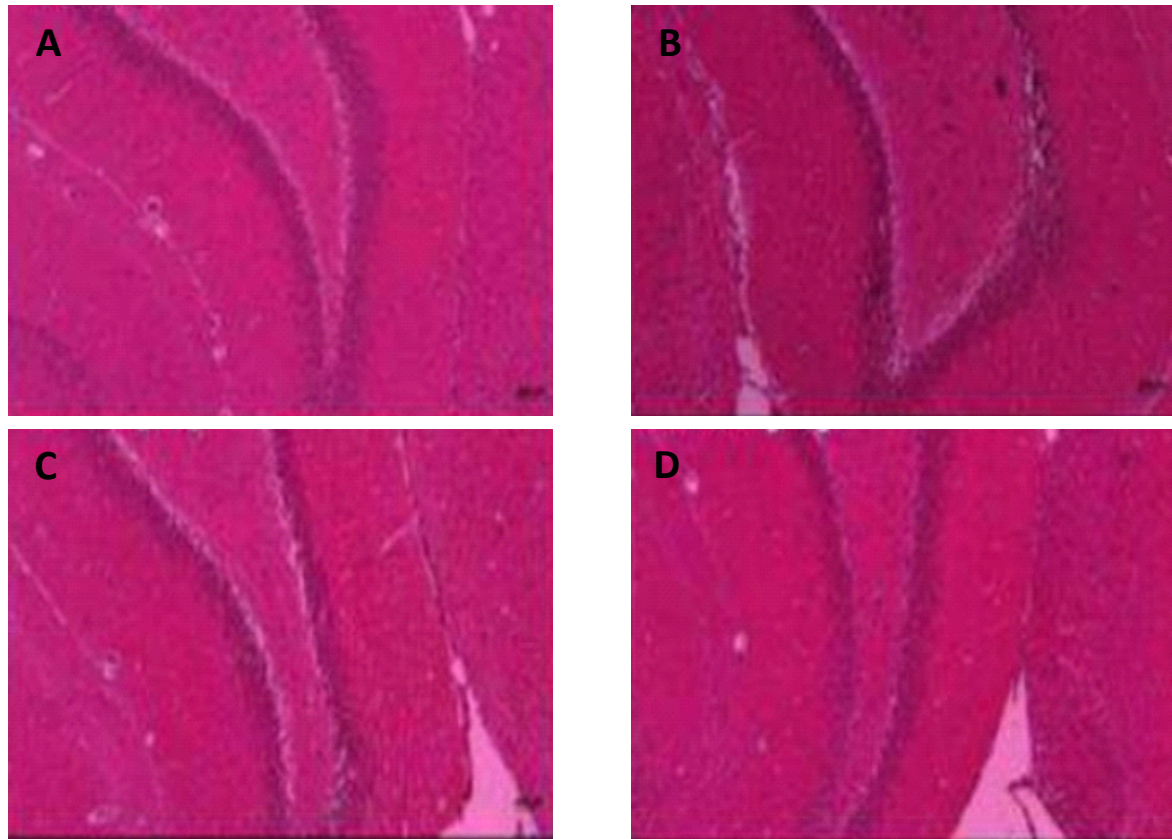
알츠하이머성 치매의 병리학적 원인에 관한 두 번째 가설 '아밀로이드 가설'에서, 아밀로이드 베타 플라크(plaque)는 치매의 증상이 나타나기 약 15년 전부터 발생하기 시작한다고 보고된다(Schliebs & Arendt 2011). 세포막에 존재하는 amyloid precursor protein(APP)가  $\beta$ -와  $\gamma$ -secretase의 작용으로 아밀로이드 베타 펩타이드를 생성하는데, 최근 아밀로이드 베타 펩타이드가 알츠하이머 질환의 중요한 원인으로 여겨지고 있다. 생성된 아밀로이드 베타 펩타이드가 플라크 형태로 응집되면 뇌의 신경세포에서 정상적인 뉴런 기능을 간섭하고, 산화적 스트레스를 증가시켜 알츠하이머 질환을 진행시키는 것으로 보고되고 있다. 한번 뉴런 기능의 손상으로 인해 알츠하이머 질환이 발병하고 인지 능력이 감소한 후에는 치료를 통해 뇌의 아밀로이드 베타 농도를 낮춘다고 해도 다시 원래 상태로 돌아오지 못하기 때문에, 아밀로이드 베타의 축적을 예방하는 것이 알츠하이머 질환 예방의 중요한 요소로 꼽히고 있다(Gandy S 2011; Selkoe DJ 2012). 래트 모델의 해마 부위의 조직학적 검사를 통해 시알산 NDS는 아밀로이드 베타 축적을 억제하는 것이 확인되었다. 시알산 100 mg/kg을 처리한 시험군의 경우 정상 래트에 비해 해마 부위가 변형되었으나, 시알산 200 mg/kg을 처리한 시험군의 해마 조직은 정상 래트와 가장 유사하여 거의 훼손되지 않은 것이 확인되었다. 이는 시알산의 아밀로이드 베타 축적 억제 활성이 농도 의존적으로 증진되는 것을 시사한다.

시알산의 인지능력 개선 결과는 Morgan & Winick(1980)가 발표한 연구와 유사하였다. 시알산을 복약시킨 래트를 대상으로 Y-maze test를 실시한 결과 미처리군에 비해 유의적으로 빠르게 Y-maze를 학습하여 통과하였다. 이들에 따르면, 시알산은 대뇌 및 소뇌의 강글리오사이드(ganglioside)를 증가시키고, 시알화된 뇌의 당포합체(glycoconjugate)가 학습능력을 개선하였다고 보고되었다. 이와 같이, 시알산은 뇌의 신경세포막에 존재하며 신경세포 생존과 시냅스 유지에 중요한 역할을 담당하는 강글리오사이드 함량을 증가시키면서 이를 통해 아밀로이드 베타 축적을 억제하고 인지능을 증진시키는 작용기전을 갖는 것으로 추정하였다(McLaurin 등 1998).

## 3. 운동기능 개선 효능 평가

시알산 NDS가 MPTP로 유도한 신경독성에서 파킨슨병적 운동기능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 운동능력 개선 효과를 평가했다. Rota-rod test 결과는 낙하할 때까지의 시간(Fig. 6A) 및 총 운동거리(Fig. 6B)로 나타났다. 마우스 10마리를 한 군으로 하여 생리식염수를 투여한 정상군에서는 낙하할 때까지 173.28±25.02 sec가 소요되었으며 총 운동거리는 69.48±11.02 m였으나, 5일간 20 mg/kg의 MPTP를





**Fig. 5. Hematoxylin-eosin staining of pyramidal cell in dentate gyrus of rat hippocampus.** (A) Normal rat, (B) Treated with amyloid  $\beta$ , (C) Treated with amyloid  $\beta$  and 100 mg/kg of sialic acid, (D) Treated with amyloid  $\beta$  and 200 mg/kg of sialic acid.

처리한 군에서는 낙하할 때까지의 시간 및 총 운동거리가 각각  $76.11 \pm 8.52$  sec 및  $19.83 \pm 2.34$  m로 운동 능력이 크게 감소하였다. 반면에 28일간 200 mg/kg의 시알산 NDS를 처리한 후 5일간 20 mg/kg의 MPTP를 투여한 군에서는 낙하할 때까지 시간과 총 운동거리가 각각  $148.36 \pm 9.14$  sec 및  $57.61 \pm 2.79$  m로 MPTP 처리군에 비하여 운동 능력이 크게 개선되었다.

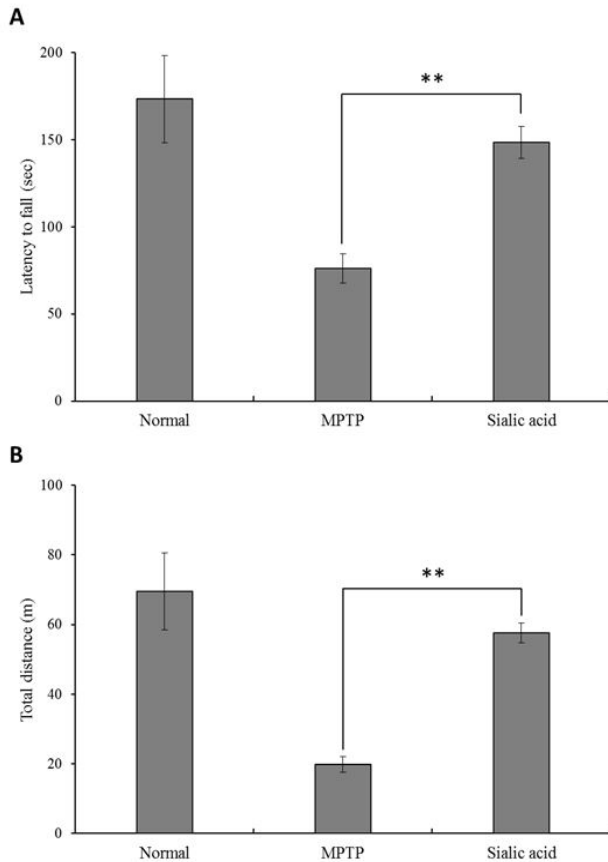
Pole test 결과는 마우스가 꼭대기를  $180^\circ$  돌아서 마우스의 머리가 완전히 아래로 내려오는 시간을 측정하여 Fig. 7에 나타냈다. 생리식염수를 투여한 정상군에서는  $9.91 \pm 2.22$  sec가, 20 mg/kg의 MPTP 투여군에서는  $44.72 \pm 9.58$  sec가 소요되었으며, 시알산 NDS 전처리 후 MPTP 투여군에서는  $7.63 \pm 1.84$  sec가 소요되었다. Pole test 결과 역시 rota-rod test 결과와 마찬가지로 시알산 NDS를 전처리할 경우 운동 능력이 크게 개선되는 것으로 확인되었다.

노인성 질병의 하나인 파킨슨병을 유발하는 것으로 알려진 화학물질로는 paraquat, rotenone, amphetamine 및 MPTP 등이 있다(Ferger 등 2000; West 등 2006). MPTP는 생체 내로 유입되면 뇌에서 몇 단계를 거친 후 MPP+로 변환되어 중뇌

의 흑질 부위를 비가역적으로 파괴한다. 현재까지 MPTP의 신경독성을 완화시킨다고 알려진 것은 vitamin E, allopurinol, selenium, selegiline, centropheoxine 등이 있으며, 주로 활성산소 소거능에 의해 도파민성 신경세포의 파괴를 완화하거나, 생체 내에서 MPTP 대사를 저해시키는 기전으로 파킨슨병의 치료에 활용되고 있다(Halliwell 2006; Sun 등 2010). Rota-rod test 및 pole test를 통해 시알산 NDS와 MPTP를 함께 투여하였을 경우 운동능력에 미치는 영향을 평가한 결과 MPTP의 투여로 운동능력이 현저하게 저하되던 것이 개선되는 것을 확인하였다. 또한 상기의 인지능력 개선 기작과 마찬가지로, 시알산은 대뇌 및 소뇌의 강글리오사이드의 함량을 증가시켜 MPTP의 신경독성을 완화시키고 이를 통해 운동능력을 개선하는 작용기전을 가지는 것으로 추정하였다(Saulino & Schengrund 1994; Chiavegatto 등 2000).

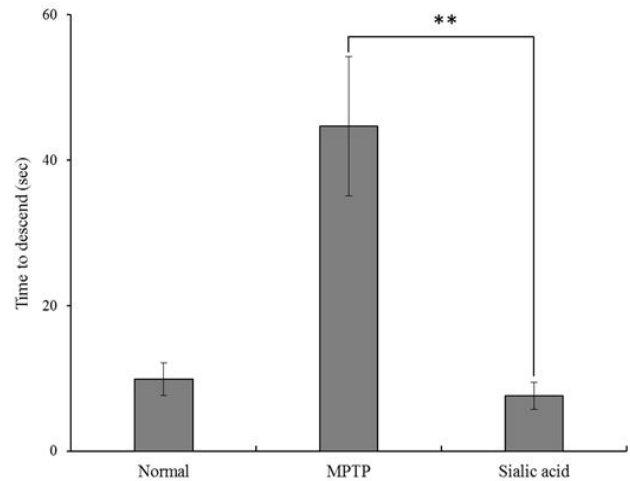
## 요약 및 결론

본 연구에서는 인구 고령화에 따른 노인성 치매의 증가에



**Fig. 6. Protective effect of sialic acid on 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced behavioral impairment in a mouse Parkinson's disease model using the rota-rod test.** (A) Latency to fall, (B) Total distance; Mice in normal group were not treated with MPTP. Mice in MPTP group were treated with 20 mg/kg of MPTP for 5 days. Mice in sialic acid group were treated with 200 mg/kg of sialic acid for 28 days before treating 20 mg/kg of MPTP for 5 days. Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test (\*\* $p < 0.05$ ).

대비하기 위한 뇌기능 개선용 조성물을 제조하기 위해 ABT 기술을 적용하여 제비집에서 추출한 시알산을 이용해 NDS를 제조하였다. 시알산 NDS가 뇌 질환에 미치는 영향을 알아보기 위해 마우스 모델의 AChE 활성 평가 및 레트 모델의 아밀로이드 베타 유도 조직 검사를 실시하였다. 제비집 추출물, 시알산 및 양성대조군 donepezil을 마우스에 투여한 후 AChE 활성을 측정할 결과, 각각 98.6%, 28.5% 및 49.8%로 시알산의 AChE 활성 억제율이 가장 높았다. 아밀로이드 베타 단백질과 200 mg/kg의 시알산을 함께 처리한 레트는 대조군, 100 mg/kg 시알산 처리군에 비해서 아무것도 처리하지 않은 군과 해마 부위의 손상도에서 차이가 없어 시알산 NDS



**Fig. 7. Protective effect of sialic acid on 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced behavioral impairment in a mouse Parkinson's disease model using the pole test.** Mice in normal group were not treated with MPTP. Mice in MPTP group were treated with 20 mg/kg of MPTP for 5 days. Mice in sialic acid group were treated with 200 mg/kg of sialic acid for 28 days before treating 20 mg/kg of MPTP for 5 days. Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test (\*\* $p < 0.05$ ).

는 농도 의존적으로 아밀로이드 베타 축적을 억제함을 확인하였다. 시알산 NDS가 파킨슨병에 미치는 영향을 알아보기 위해 동물 운동 능력 평가로 마우스를 정상군, MPTP 처리군 및 시알산 전처리 후 MPTP 투여군으로 나누어 rota-rod test와 pole test를 실시하였다. Rota-rod test로 마우스가 낙하할 때까지의 시간과 총 운동거리를 측정할 결과 MPTP 처리군(각각 76.11 sec 및 19.83 m)에 비하여 시알산 전처리군(각각 148.36 sec 및 57.61 m)에서 운동 능력이 크게 개선된 것을 확인하였다. Pole test 역시 시알산 전처리군이 MPTP 처리군에 비해 월등히 우수한 운동 능력을 보였다. 따라서 시알산 NDS는 뇌의 글리코사이드 함량을 증가시킴을 통해 신경 전달물질을 분해하는 효소의 활성을 저해하고 아밀로이드 베타 축적을 억제함으로써 알츠하이머성 치매를 예방할 뿐만 아니라, MPTP에 의해 유도된 신경세포 사멸을 방지하여 파킨슨병적 증상을 예방하여 뇌기능 개선에 효과적으로 작용하는 천연물 유래 기능성 물질로 생각된다. 본 연구에서 얻어진 시알산 NDS의 알츠하이머 질환 및 파킨슨병 예방과 관련된 실험 자료를 기초로 한 성분연구를 통하여 뇌기능 개선용 NDS 물질을 탐색하고 물질의 치매 치료제로서의 가능성을 확인하기 위한 작용기전 연구는 추후 항치매 천연소재 개발에 중요한 기초자료가 될 것이라 사료된다. 따라서 향후



후속 연구를 지속적으로 진행하여 선행연구를 통해 알려진 일반적인 시알산 작용기전과 제비집 유래의 시알산 및 그의 NDS에 관한 작용기전의 연구를 통해 보다 명확한 인지기능 및 운동기능 향상에 영향을 미치는 작용기전을 비교평가 할 예정이다.

## 감사의 글

본 논문의 연구는 2018년도 한국산업기술진흥원의 재원으로 기술개발 지원사업(과제번호: N0001395)과 2020년도 중소벤처기업부의 재원으로 기획 지원사업(과제번호: S2953 529)을 받아 수행되었습니다.

## References

- Canal N, Imbimbo BP, Group ES. 1996. Relationship between pharmacodynamic activity and cognitive effects of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther* 60:218-228
- Careena S, Sani D, Tan S, Lim CW, Hassan S, Norhafizah M, Kirby BP, Ideris A, Stanslas J, Bin Basri H. 2018. Effect of edible bird's nest extract on lipopolysaccharide-induced impairment of learning and memory in wistar rats. *Evid Based Complementary Altern Med* 2018:9318789
- Chantler P, Driessens G. 2010. Swifts: A Guide to the Swifts and Treeswifts of the World. 2<sup>nd</sup> ed. pp.150-152. Bloomsbury
- Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. 2000. A functional role for complex gangliosides: Motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol* 166:227-234
- Colombo JP, Garcia Rodenas C, Guesry PR, Rey J. 2003. Potential effects of supplementation with amino acids, choline or sialic acid on cognitive development in young infants. *Acta Paediatr* 92:42-46
- Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. 2000. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol Biochem Behav* 65:425-431
- Gandy S. 2011. Perspective: Prevention is better than cure. *Nature* 475:S15
- Goh DLM, Chua KY, Chew FT, Liang RCMY, Seow TK, Ou KL, Yi FC, Lee BW. 2001. Immunochemical characterization of edible bird's nest allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107: 1082-1088
- Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658
- Hidalgo A, Burgos V, Viola H, Medina J, Argibay P. 2006. Differential expression of glycans in the hippocampus of rats trained on an inhibitory learning paradigm. *Neuropathology* 26:501-507
- Jeong YS, Hwang BS, Cho SM, Hwang KA, Hwang IG. 2017. Antioxidant and anti-diabetic, anti-Alzheimer activities of stem from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* cultivated in Jeju at harvest time. *Korean J Food Nutr* 30:1332-1340
- Kang BG, Seo YM, Lee JW, Kim NM, Hong SK, Baek SS. 2013. Method for preparing antler extract containing increased sialic acid content. Korea Patent 10-2013-0087670
- Kang JS. 2016. Effect of medicinal herb composites on antioxidative and cognition-enhancing activities in rats. *Korean J Food Nutr* 29:382-391
- Kasa P, Papp H, Kasa Jr P, Torok I. 2000. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience* 101:89-100
- Kathan RH, Weeks DI. 1969. Structure studies of collocalia mucoid: I. Carbohydrate and amino acid composition. *Arch Biochem Biophys* 134:572-576
- Kim DM, Lee HK, Kwon YS. 2020. Purification method of sialic acid in Swallow's nest using ABT. Korea Patent 10-2020-0012156
- Kim DM, Cho GS. 2006. Nanofood and its materials as nutrient delivery system (NDS). *J Appl Biol Chem* 49:39-47
- Kim SH, Choi JW. 2013. Antioxidant activity of water extract of *Chrysanthemum boreale* against MPTP-induced mice models. *J Physiol Pathol Korean Med* 27:49-56
- Kim SH, Han SH. 2012. Prevalence of dementia among the South Korean population. *J Korean Diabetes* 13:124-128
- Korea National Statistical Office. 2018. Population census: 2018. Available from <http://kostat.go.kr/> [cited 1 September 2020]
- Korea National Statistical Office. 2019a. Population projections for Korea: 2017~2067. Available from <http://kostat.go.kr/> [cited 1 September 2020]
- Korea National Statistical Office. 2019b. Long term care insurance statistics. Available from <http://kostat.go.kr/> [cited 1 September 2020]
- Lee DS, Kim DS, Kim SH. 2013. Herbal compositions for treating neurological diseases and improving memory impairment. Korea Patent 10-2013-0130069

- Lee MR, Sun BS, Gu LJ, Wang CY, Fang ZM, Wang Z, Mo EK, Ly SY, Sung CK. 2009. Effects of the deer antler extract on scopolamine-induced memory impairment and its related enzyme activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 409-414
- Manish G, Vimukta S. 2011. Targeted drug delivery system: A review. *Res J Chem Sci* 1:135-138
- Marni S, Marzura MR, Norzela AM, Khairunnisak M, Bing CH, Eddy AA. 2014. Preliminary study on free sialic acid content of edible bird nest from johor and kelantan. *Malays J Vet Res* 5:9-14
- McClements DJ. 2015. Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: Improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. *J Food Sci* 80:N1602-N1611
- McLaurin J, Franklin T, Fraser PE, Chakrabartty A. 1998. Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides with gangliosides. *J Biol Chem* 273:4506-4515
- Morgan BL, Winick M. 1980. Effects of administration of N-acetylneuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. *J Nutr* 110:416-424
- Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Sun YH. 1996. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med* 62:405-409
- Park GH, Kim HG, Ju MS, Kim AJ, Oh MS. 2014. *Thuja orientalis* leaves extract protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity via inhibiting inflammatory action. *Korea J Herbol* 29:27-33
- Patel D, Chaudhary SA, Parmar B, Bhura N. 2012. Transdermal drug delivery system: A review. *Pharma Innovation* 1:66-75
- Rastogi V, Yadav P. 2014. Transdermal drug delivery system: An overview. *Asian J Pharm* 6:161-170
- Saulino M, Schengrund CL. 1994. Differential accumulation of gangliosides by the brains of MPTP lesioned mice. *J Neurosci Res* 37:384-391
- Schauer R, Corfield AP. 1982. Isolation and purification of sialic acids. In Schauer R (Ed.), *Sialic Acids*. pp.51-57. Springer
- Schliebs R, Arendt T. 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555-563
- Selkoe DJ. 2012. Preventing Alzheimer's disease. *Science* 337: 1488-1492
- Stefanović V, Massarelli R, Mandel P, Rosenberg A. 1975. Effect of cellular desialylation on choline high affinity uptake and ecto-acetylcholinesterase activity of cholinergic neuroblasts. *Biochem Pharmacol* 24:1923-1928
- Sun L, Xu S, Zhou M, Wang C, Wu Y, Chan P. 2010. Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice. *Brain Res* 1335:74-82
- Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. 2000. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 294:187-194
- Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. 2016. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet Med* 18:421-430
- West BD, Shughrue PJ, Vanko AEH, Ransom RW, Kinney GG. 2006. Amphetamine-induced locomotor activity is reduced in mice following MPTP treatment but not following selegiline/MPTP treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 84:158-161

---

Received 03 September, 2020

Revised 13 October, 2020

Accepted 07 November, 2020