

## 오미자칠해목 추출물의 과산화수소로 유발된 PC12뇌세포 사멸과 스코폴라민으로 유발된 렛드 동물모델에 대한 개선 효과

박은국·한경훈\*·허재혁\*\*·김남기\*\*\*·배문형\*\*\*·  
서영하\*\*\*·용윤중\*\*\*\*·정선용\*\*\*\*·†최춘환\*\*\*\*\*

아주대학교 의과대학 의학유전학과 연구교수, \*서울의료원 의학연구소 연구원, \*\*서울의료원 신경과 연구원,  
\*\*\*알피바이오(주) 연구소 연구원, \*\*\*\*(주)나인비 연구소 연구원,  
\*\*\*\*\* (주)나인비 대표, \*\*\*\*\* (재)경기도경제과학진흥원 바이오센터 천연물연구팀 책임연구원

### Ameliorative Effect of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* Extracts on Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death in Neuroblastic PC12 Cells and the Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in a Rat Model

Eun-kuk Park, Kyung-Hoon Han\*, Jae-Hyeok Heo\*\*, Nam-Ki Kim\*\*\*, Mun-Hyoung Bae\*\*\*,  
Young-Ha Seo\*\*\*, Yoon-joong Yong\*\*\*\*, Seon-Yong Jeong\*\*\*\* and †Chun-Wan Choi\*\*\*\*\*

Research Professor, Dept. of Medical Genetics, Ajou University School of Medicine, Suwon 16499, Korea

\*Researcher, Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

\*\*Researcher, Dept. of Neurology, Seoul Medical Center, Seoul, Korea

\*\*\*Researcher, Rpbio Research Institute, Rpbio Co. Ltd., Suwon 16229, Korea

\*\*\*\*Researcher, NineB Research Institute, NineB Co. Ltd., Suwon 16499, Korea

\*\*\*\*\*CEO, NineB Co. Ltd, Suwon 16499, Korea

\*\*\*\*\*Senior Researcher, Natural Product Research Team, Biocenter, Gyeonggido Business and Science Accelerator, Suwon 16229, Korea

#### Abstract

Cognitive impairment is considered to be key research topics in the field of neurodegenerative diseases and in understanding of learning and memory. In the present study, we investigated neuroprotective effects of *Schisandra chinensis* (SC) and *Ribes fasciculatum* (RF) extracts in hydrogen peroxide-induced neuronal cell death *in vitro* and scopolamine-induced cognitive impairment in Sprague Dawley® (SD) rat *in vivo*. Apoptotic cell death in neuroblastic PC12 cell line was induced by hydrogen peroxide for 1 hour at 100 μM. However, mixture of SC and RF treatment prevented peroxide induced PC12 cell death with no neurotoxic effects. For *in vivo* experiment, the effect of SC and RF extracts on scopolamine-induced cognitive impairment in SD rat was evaluated by spontaneous alternation behavior in Y-Maze test. After 30 min scopolamine injection, the scopolamine-induced rats presented significantly decreased % spontaneous alteration and acetylcholine level, compared to non-induced group. However, treatment of SC+RF extracts rescued the reduced % spontaneous alteration with acetylcholine concentration from hippocampus in scopolamine-induced rats. These results suggested that mixture of SC and RF extract may be a potential natural therapeutic agent for the prevention of cognitive impairment.

Key words: *Schisandra chinensis*, *Ribes fasciculatum*, scopolamine-induced rat, neuroprotection, oxidative stress

† Corresponding author: Chun-Wan Choi, Senior Researcher, Natural Product Research Team, Biocenter, Gyeonggido Business and Science Accelerator, Suwon 16229, Korea. Tel: +82-31-888-6131, Fax: +82-31-888-6139, E-mail: cwchoi78@gmail.com

## 서 론

대표적인 노인성 질환인 알츠하이머병은 치매의 가장 흔한 질환으로, 인지기능 저하 및 사회활동의 기능장애가 함께 장애를 동반하게 되며(Kang & Choi-Kwon 2009), 알츠하이머병 환자의 뇌조직의 경우 acetylcholine 감소는 중요한 병리적 특징으로 알려져있다(Chuong 등 2014). 실제 알츠하이머병 환자에서 해마와 대뇌피질에서 콜린 흡수(choline uptake)와 acetylcholine이 감소하는 것으로 확인되었고, acetylcholine을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase(AChE) 발현이 높은 것으로 보고되었다(Talesa VN 2001).

기억력 감퇴는 acetylcholine, GABA, dopamine 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것(Trabace 등 2000)과 기억과 학습에 있어서 중요한 역할을 하는 cholinergic system의 심각한 손상에 의한 것으로 알려져 있다(Park 등 1996). 알츠하이머병의 인지기능 감소는 acetylcholine을 생성하는 신경세포의 손상과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 활성이 증가되어 기억력 감퇴는 더욱 악화되게 된다(Kasa 등 2000). 뇌 조직의 choline계 활성감소로 기억력이 감퇴되기 때문에 뇌 신경접합부의 콜린성 작용을 활성화하기 위하여 신경전달물질인 acetylcholine의 작용을 활성화시키는 cholinergic 작용제, AChE의 활성을 억제하는 AChE 억제제 그리고 acetylcholine 전구체에 대한 많은 연구가 수행되고 있다(Bartus 등 1982; Canal 등 1996). AChE 억제제는 tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine 등이 대표적이며, 그 중 tacrine은 AChE 억제제로 FDA 승인을 받았으나, ALT 수치를 상승시키는 부작용으로 사용이 금지되었다(Watkins 등 1994). 그 외에도 다른 AChE 억제 약물들도 구토, 식욕감소, 장 운동의 이상증가 등의 다양한 부작용으로 그 사용이 제한되고 있으며, 이러한 부작용에 대한 우려로 근래에는 부작용이 적은 천연물을 이용한 항 치매 약물을 찾기 위한 연구가 시도되고 있다(Xiao 등 2014; Hasanein & Mahtaj 2015). 스코폴라민은 멀미 예방을 위해 효과적인 물질로 acetylcholine의 muscarinic cholinergic receptor에 경쟁적 억제제로 작용하여 움직임에 대한 정보를 생성하는 전정기관들로부터 구토를 촉진하는 정보를 뇌간으로 전달하지 못하게 한다(Brand & Perry 1966; Kohl & Homick 1983; Warburton & Wesnes 1984). 하지만 스코폴라민의 항콜린성 효과로 인한 다양한 인지장애와 자율신경계의 부작용이 나타날 수 있는 단점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Price 등 1981). 또한 스코폴라민을 이용한 랫드 실험동물 모델에 있어 기억력 감퇴(건망증) 및 인지능력 저하에 대한 연구 분야에서 널리 사용되는 물질이며, cholinergic dysfunction과 인지능력 저하를 확인하였으며(Oh 등 2009), 사람을 이용한 임상 연구 결과에서 동물과 마찬가지로 기억력과 인지능

력이 저하가 나타나는 것을 확인하였다(Haycock 등 1973; Ghoneim & Mewaldt 1977).

국내 천연물질인 오미자칠해목 추출혼합물의 신경세포 보호효과는 Park 등(2018)이 논문을 통해 효과를 발표하였으며, 이에 본 연구는 스코폴라민으로 기억력 감소가 유발된 랫드 실험동물에서 오미자칠해목 추출혼합물 투여에 따른 기억력 개선에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 제조

본 연구에 사용한 오미자와 칠해목 약제는 각각 협동조합 약초대학과 괴산 약초유기농산물협동조합에서 2018년도에 구입하여 사용하였다. Park 등(2018)이 추출한 방법과 동일한 방법인 에탄올 추출방법을 이용하여 각각의 약제를 추출하였으며, 추출액은  $-70^{\circ}\text{C}$  극초저온 냉동고에서 보관 후, 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 2. 신경세포 배양

PC12 세포는 한국세포주은행(KCLB, KOREA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 성장배양액은 10% FBS(Gibco, USA)와  $50\ \mu\text{g/mL}$  항생제(Gibco, USA)를 첨가하였으며,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator(Invitrogen, USA)에서 배양하였다.

### 3. 세포 독성 평가

PC12 세포에 산화 스트레스를 유도하기 위해 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 이용하였으며(Peng & Zhaohui 2015; Shuheng 등 2019), 본 실험에 사용할 과산화수소의 적정농도를 알아보기 위해 PC12 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/0.1 mL/well로 분주 후 24시간 동안 배양시켰으며, 각각의 well에 과산화수소가 10~100  $\mu\text{M}$ 의 첨가된 성장배양액을 1시간씩 처리하였다. MTT assay를 이용하여 각각의 농도에 따른 신경세포의 생존율을 확인하였으며(Wang 등 2017), 성장배양액만 첨가한 신경세포와 비교 시 50%의 감소한 과산화수소 농도를 본 실험에 사용하였다. 오미자칠해목 복합추출물의 PC12 세포 독성평가는 앞서 실시한 과산화수소의 독성평가 방법과 동일한 방법으로 1  $\mu\text{g/mL}$ ~100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 확인 후, 세포 독성을 보이지 않는 농도를 본 실험에 사용하였다.

### 4. Annexin-propidium iodide(PI) 유세포 분석

오미자칠해목 복합추출물이 신경세포인 PC12세포주의 세포사멸에 미치는 영향을 분석하기 위해서 세포자동해석분리장치(flow cytometry(FACS Calbur, BD Biosciences, USA))를 이용하여 확인하였다. 오미자칠해목 복합추출물을 처리한

세포에 과산화 수소를 처리한 후 trypsin-EDTA(0.05%/mL)로 처리하며, 배양된 세포를 분리하여 PBS로 세번 세척하였다. 세척된 세포에 세포사멸사와 관련된 항체인 FITC Annexin V와 Propidium iodide buffer(BD Biosciences, USA)를 첨가하여 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하여, 세포와 반응하지 않는 항체를 제거하였다.  $1 \times 10^4$ 세포를 카운트하여 Diva software (BD Biosciences, USA)FACS를 이용하여 세포사를 분석하였다.

### 5. 단백질 추출 및 단백질 분석

세포 사멸사 신호전달과 관련한 단백질인 caspase-3와 관련된 단백질 발현을 측정하였다. Protease inhibitor cocktail(Roche)과 phosphatase inhibitor cocktail(Roche)이 함유된 RIPA buffer (Sigma, USA)를 넣어 lysate를 추출하여 bicinchoninic acid(BCA, Pierce, USA)로 단백질 정량을 하였다. 20  $\mu$ g의 단백질을 4~12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel(Invitrogen, USA)에서 전기 영동을 한 후, PVDF membrane(Millipore, Germany)에 이동시켰다. 5% skim milk로 1시간 blocking 시킨 후 1차 항체로서 Caspase-3(Cell signaling, USA)를 4°C에서 12시간을 반응시킨 후, 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질의 발현은 enhanced chemiluminescence(ECL, Santa Cruz, USA)를 이용하여 반응시켰으며, iBright CL1000(Chemidoc, Invitrogen, USA)을 이용하여 측정하였다.

### 6. 실험동물 사육 및 실험설계

실험동물은 렫드는 6주령의 수컷 Sprague-Dawley를 (주)오리엔트바이오에서 공급받아 사용하였다. 반입 시 동물의 외관 검사를 실시한 후 이상이 없는 개체를 선별하였으며, 9일간의 순화과정을 거쳤으며, 48마리를 선발하여 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 환경은 온도( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 습도( $50 \pm 10\%$ ), 주명주기 12시간(8:00~20:00), 조도(150~300 Lux), 환기(10~15회/시간)의 사육환경으로 설정되었으며, 실험기간 내 사료와 음용수는 자유 급여하였다. 본 연구는 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인 받아 진행되었다(승인번호: 190292).

### 7. Y-maze 실험

수컷 SD 렫드를 이용하여 오미자칠해목 추출혼합물을 28일간 투여한 후, 투여 마지막 날 scopolamine으로 일시적 기억력을 손상시킨 뒤 Y-maze test를 실시하여 시험물질이 기억력 개선에 효과 유무를 확인하고자 실시하였다(Kim 등 2007; Jegal 등 2010; Kang JS 2016; Park 등 2019). 개체는 정상대조군, 음성대조군, 75, 150, 그리고 300 mg/kg 용량의 오미자칠해목 추출혼합물 투여군 및 대조물질 포스파티딜세린 50 mg/kg 투여군으로 설정하였다. 관찰기간 동안 매일 1회 일반

증상을 관찰하였고, 주 1회 체중을 측정하였다. 행동시험은 오미자칠해목 추출혼합물 투여 마지막 날에 실시하였고, 스코폴라민은 오미자칠해목 추출혼합물 투여 30분 후에 복강 투여하였다. 스코폴라민 투여 30분 후 Y-maze test를 실시하였다. SMART video tracking system(Smart 3.0, Panlab Harvard Apparatus, Spain)을 이용하여 측정하였으며, 다음의 수식에 의해 계산하였다.

$$\text{Spontaneous alternation \%} = \frac{\# \text{ spontaneous alternations}}{\text{total number of arm entries} - 2} \times 100$$

### 8. 해마의 acetylcholine(Ach) 농도 측정

각 군의 개체의 해마 조직에서의 acetylcholine(Ach) 농도 측정은 Universal Acetylcholine ELISA Kit(Lot No. 1BPB6CIFHC, Novus Biologicals, LLC, CO, USA)를 사용하였다. 각 오미자칠해목 추출혼합물 처리군의 백서 해마조직은 동일한 무게의 조직 샘플을 1.5 mL 튜브에 옮겨 담은 후, 10배 volume의 cold PBS를 넣고 homogenizer pestle을 이용하여 1차 분쇄 과정을 거쳤으며, sonicator(VCX130, Sonics & Materials INC. CT, USA)를 이용하여 20% amplitude, on 5 sec, off 10 sec, 6 cycle의 조건으로 2차 분쇄 과정을 거쳤다. 분쇄된 해마 조직 샘플은 4°C에서 13,000 rpm으로 15 min 동안 원심분리한 후, 상층액을 본 실험에 사용하였다.

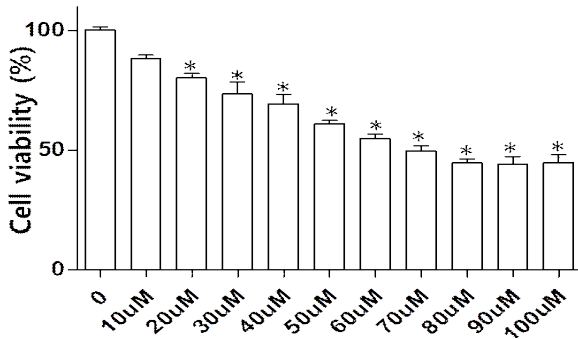
### 9. 통계처리

모든 실험 결과는 각 항목에 따라 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 통계적 분석은 SPSS 20.0 K를 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며, Tukey's HSD(honest significant difference) post hoc test를 통해 사후검정을 하였으며,  $p < 0.05$  미만의 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. PC12 세포에서 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )의 처리에 따른 독성 평가

연구에 사용될 과산화수소의 PC12 세포 처리 농도를 결정하기 위해 과산화수소를 10~100  $\mu\text{M}$ 의 농도의 성장배양액을 만든 후, 1시간 동안 처리하였다. 1시간 처리 후 세포의 생존율은 MTT-assay로 측정하였으며, 각각 농도에 따른 세포 생존율은 정상 세포군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 과산화수소를 PC12 세포에 50  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 세포 생존율에서 60%의 유의적인 감소를 확인할 수 있었으며( $p < 0.05$ ), 이에 본 연구에서는 PC12 세포에 처리되는 과산화수소의 농도는 50  $\mu\text{M}$ 을 사용하였다.



**Fig. 1.** Cell survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in PC12 cells. Cells were treated with various concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cell viability were measured by MTT assay. The data shown are means±S.E. \* $p < 0.05$  vs. 0, # $p < 0.05$  vs. 40 μM, & $p < 0.05$  vs. 50 μM.

## 2. PC12세포에서 오미자칠해목 추출혼합물의 독성 및 보호효과 확인

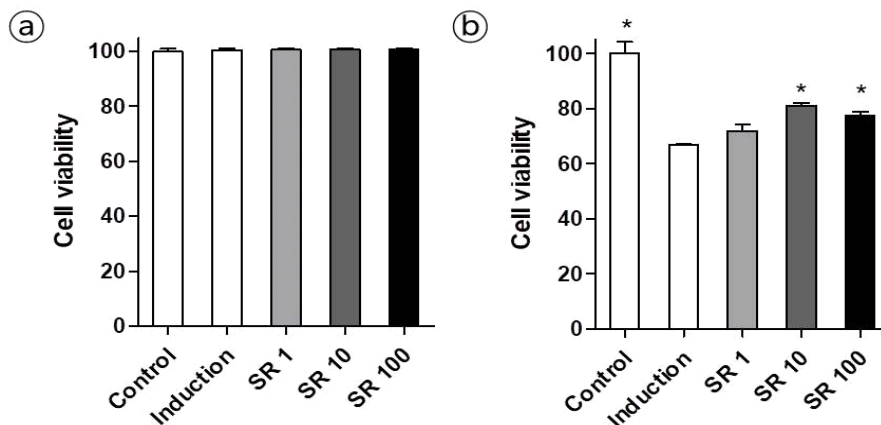
오미자칠해목 추출혼합물(SR)의 세포 독성을 확인하기 위해 1, 10, 그리고 100 μg/mL의 세가지 농도를 PC12 세포에 24시간 처리한 후, 과산화수소의 독성평가와 동일한 방법으로 세포생존율을 확인하였다. 각각의 농도에 따른 세포 생존율은 Fig. 2a에서 보는 바와 같으며, 오미자칠해목 추출혼합물은 정상군과 비교 시 모든 처리군에서 감소되지 않는 것을 확인하였다. 이에 실험에서는 과산화수소 50 μM의 농도 1시간 처리에 따른 오미자칠해목 추출혼합물 전처리에 의한 세

포 보호효과를 확인하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 2b와 같다. 오미자칠해목 추출혼합물군과 과산화수소만을 처리한 군과 비교 시, 1 μg/mL의 농도에서의 세포생존율은 유의적인 차이가 확인되지 않았으나, 10 μg/mL와 100 μg/mL에서 각각 15%와 11.5%로 유의적으로 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 이는 오미자칠해목 추출혼합물 10 μg/mL 이상의 농도에서 과산화수소로 유발된 세포 독성에서 PC12 세포를 보호해주는 것으로 사료된다.

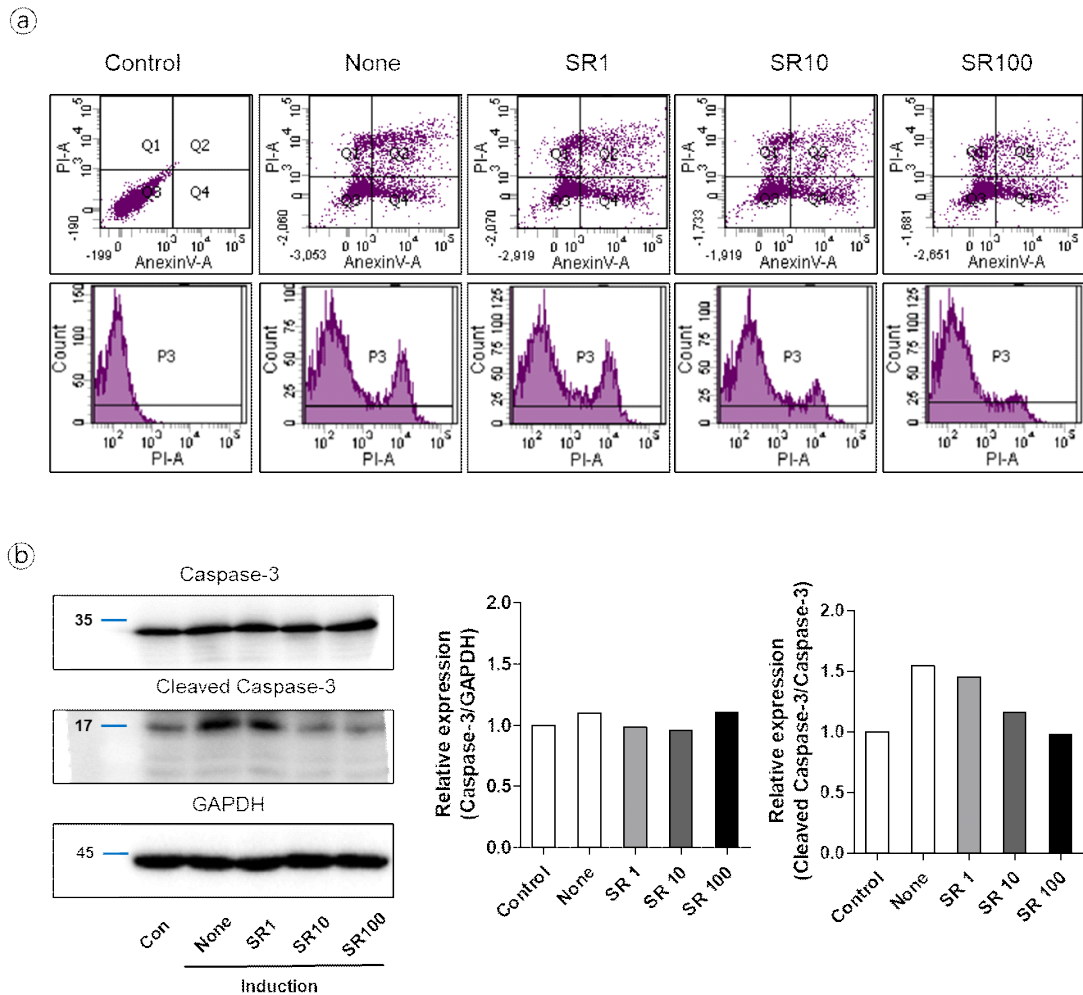
## 3. 오미자칠해목 추출혼합물 처리에 의한 세포사 확인

오미자칠해목 추출혼합물의 처리에 따른 PC12세포의 사멸을 분석하기 위하여 본 실험에서는 FACS(세포자동해석분리장치)를 통한 Annexin V와 PI의 분석과 caspases-3와 cleaved caspase-3의 단백질 발현 분석은 Western blotting을 통해 세포사를 확인하였다.

Annexin V와 PI는 세포사와 관련된 단백질로써 세포사가 일어날 경우, 세포질에 존재하는 PS(phosphatidyl serine)는 세포 표면에 노출되게 되어 Annexin V와 결합하게 되어 세포사 일으키게 되며, 이와 반대로 세포막의 손상으로 인한 세포괴사의 경우 PI 화합물이 세포 안에 유입되어 핵을 염색시키는 것으로 알려져 있으며(Hong & Yi-min 2006; Park & Kang 2015), Caspase 3 단백질은 세포 내에서 비활성화 효소원으로 존재하지만 세포사 과정 중 마지막 단계에서 중요한 역할을 하며, 높은 활성도를 나타내는 것으로 알려져 있다(Nicholson & Thornberry 1997; Jänicke 등 1998; Hengartner MO 2000). FACS를 이용하여 Annexin V와 PI 발현을 확인한 결과(Fig. 3a),



**Fig. 2.** The effects of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on cell survival rate and proliferation. Cells were treated with three different concentrations (1, 10, and 100 μg/mL) of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum*(SR) extracts. SR extracts did not affect proliferation of neuronal cells. After induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SR extracts inhibited neuronal apoptosis in PC12 cells \*Statistical significant difference, compared to control ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$  (Tukey's honest significant difference post hoc test, analysis of variance).



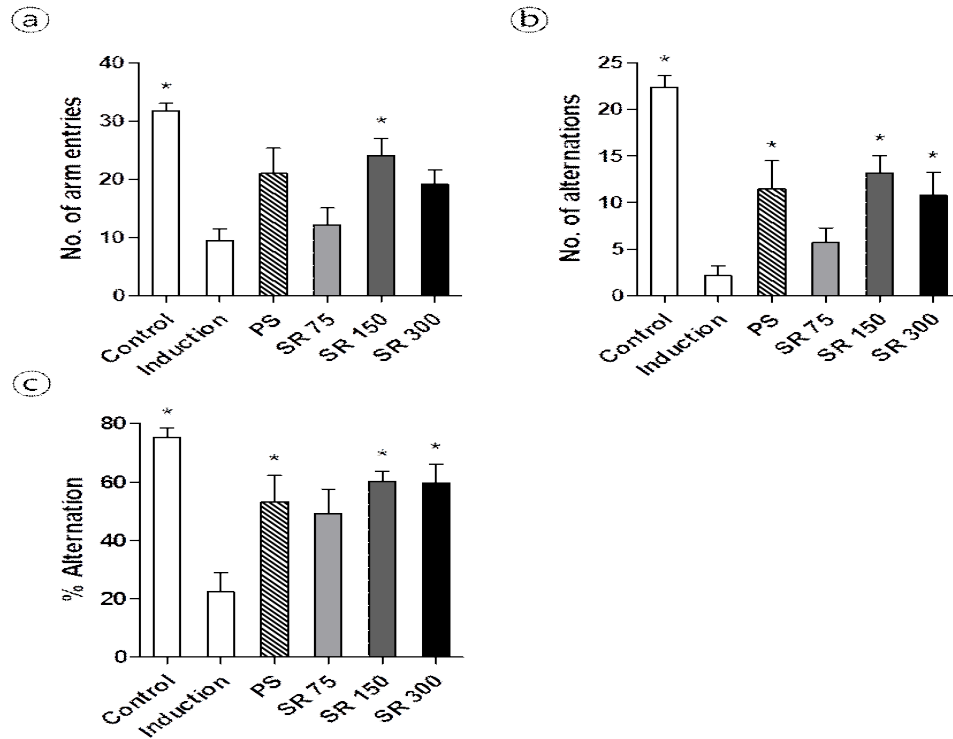
**Fig. 3.** The effects of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on neuronal apoptosis in PC12 cells. Cells were treated with ethanol extracts of SC and RF(SR) in  $H_2O_2$ -induced neuronal cells. Neuronal apoptosis and necrosis were analyzed by Annexin V and PI positive cells using an immunophenotypic analysis. Neuronal apoptotic cells death was accessed by western blotting, using Caspase-3 antibody. SR prevented protein expression of cleaved caspase-3, indicating protective effect of SR in  $H_2O_2$ -induced neuronal cells.

PC12세포에 과산화수소 처리 시 사멸 및 괴사가 나타났다. 하지만 오미자칠해목 추출혼합물의 처리 시 Annexin V의 발현은 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 79%와 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 65% 감소되었으며, 세포괴사와 관련된 PI의 발현 또한 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3b에서 Cleaved Caspase 3의 발현은 오미자칠해목 추출혼합물의 10  $\mu\text{g/mL}$ 와 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 감소하는 경향을 보였다. 이는 오미자칠해목 추출혼합물은 과산화수소로 유도된 세포 독성으로 인한 세포괴사와 세포사멸 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 이는 선행 연구되었던 천연 추출물들과 같은 세포사멸 억제 효과가 있는 것을 본 실험 결과를 통해서 재확인할 수 있었다 (Moon YH 2012; Shin 등 2013; Zhao 등 2016).

#### 4. Y-maze 실험

스코플라민으로 유발된 기억력 손상에 대한 오미자칠해목 추출혼합물의 효과를 확인하기 공간인지를 평가하는 Y-미로를 이용한 랫드 동물실험을 실시하였다. 랫드를 8분간 자유롭게 움직이게 하는 동안 미로에 들어간 팔의 횟수를 기록하여 세 개의 미로에 팔이 들어간 경우 1점씩 부여하였고, spontaneous alternation은 3개의 미로에 차례로 팔이 들어가는 것으로 정의하였으며, spontaneous alternation을 계산할 수 없는 경우(4회 이하로 들어간 경우), 데이터 산출 및 통계분석에서 제외하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같으며, 스코플라민을 투여한 음성대조군의 경우 팔을 넣은 횟수와 spontaneous alternation에서 정상대조군에 비해 통계학적으로 유의하게



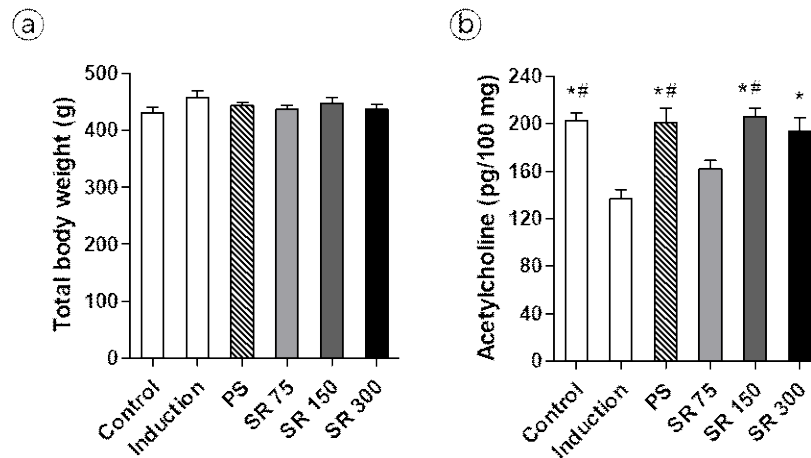


**Fig. 4.** The effects of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on spontaneous alternation ratio in the Y-maze test. Rats were orally treated with three different concentrations of SC and RF (SR) (75, 150, or 300 mg/kg/day) for 23 days and on scopolamine-induced cognitive impairment was assessed by Y-maze test in scopolamine-treated rats. \* $p < 0.05$  (Tukey's honest significant difference post hoc test, analysis of variance).

감소된 것으로 확인되었으며, 이는 스코폴라민 투여로 인하여 렫드의 기억력이 감소로 인한 결과로 사료된다. 렫드의 팔이 미로에 들어간 횡수에서는 오미자칠해목 추출혼합물에서 150 mg/kg에서만 24회로 스코폴라민 음성대조군이 유의적인 차이를 확인할 수 있었으나(Fig. 4a), Fig. 4b spontaneous alternation의 횡수에서는 150과 300 mg/kg에서 각각 13.2회와 10.8회로 스코폴라민 음성대조군보다 증가하는 차이를 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). Spontaneous alternation(%)에서도 Fig. 4b와 동일한 결과를 확인할 수 있었으며(Fig 4c), 양성대조군인 포스파티딜세린 투여군도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 이는 스코폴라민으로 기억력 손상이 유발된 실험동물에서 당귀 추출물, 백삼과 홍삼 추출물, 그리고 생약복합물을 이용하여 대조군과 비슷한 개선효과를 나타냈다는 보고들과 같은 결과를 확인할 수 있었으며(Oh 등 2004; Lee 등 2008; Kang JS 2016), 저농도 투여군인 75 mg/kg의 경우 Byun SN(2010)이 발표한 보고와 같이 추출물 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 사료된다.

#### 5. 해마의 acetylcholine(Ach) 농도 측정

관찰기간 동안 SD 렫드의 이상증상 및 사망사례는 관찰되지 않았으며, 본 실험에 사용된 모든 용량의 오미자칠해목 복합추출물 투여군과 대조물질 투여군에서 개체의 체중 감소, 외형 변화, 행동 변화 등이 발견되지 않았다(Fig. 5a). Y-maze 실험 종료 후, 각군의 렫드에서 뇌의 해마(hippocampus) 부분을 적출하여 acetylcholine의 양을 측정된 결과는 Fig. 5b와 같다. Acetylcholine은 신경세포들에서 발견되며, 중추신경계의 콜린성 신경시스템과 관련성이 높은 것으로 알려져 있다(Choe 등 2016). 콜린성 신경시스템은 뇌의 신경 전달물질계에서 중요한 시스템 중 하나로 기억과 학습에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 실험동물 및 임상연구에서 acetylcholine의 감소로 유발된 콜린성 신경시스템의 손상으로 나타나는 기억력과 학습능력 감퇴는 초기 알츠하이머병의 주요 원인으로 알려져 있다(Davies & Maloney 1976; Park 등 1996). 본 연구에서도 스코폴라민을 투여한 음성대조군의 acetylcholine양은 137.2 pg/100 mg hippocampus로 정상대조군의 202.9 g/100 mg hippocampus에 비해 통계학적으로 유의하게 감소되었다( $p < 0.001$ ). 오미자칠해목 추출혼합물 75 mg/kg투여군은 음성



**Fig. 5. The effects of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on body weight and acetylcholine concentration in scopolamine-treated rats.** Seven-week-old male Sprague Dawley<sup>®</sup> rats were orally administered a mixture of SC and RF(SR) for 28 days before scopolamine injection. Total body weight was measured at the end of experiment. The hippocampus of rats was dissected, and acetylcholine content was measured with the Amplex<sup>®</sup> Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit. Fluorescence was measured in a multimode microplate reader at an excitation of 540 nm and emission of 595 nm. \* $p < 0.05$  vs. Induction, # $p < 0.05$  vs. SR75. (Tukey's honest significant difference post hoc test, analysis of variance).

대조군과 차이를 보이지 않았으나, 150과 300 mg/kg 투여군에서 206.2 pg/100 mg(150.03%)과 193.6 pg/100 mg(141.14%)으로 음성대조군(137.1 pg/100 mg)보다 유의적으로 증가되었으며 ( $p < 0.05$ ), 양성대조군인 포스파티딜세린도 음성대조군과 비슷한 농도를 보이는 것으로 확인할 수 있었다. 이는 오미자칠해목 복합추출물이 실험동물인 랫드의 해마에서 acetylcholine의 감소를 억제하는 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 혈당 저하, 항균, 독성 등의 해독물질로 알려진 오미자와 출혈, 통증, 증풍, 움 등의 해독물질로 잘 알려진 칠해목을 추출 혼합하여 PC12세포와 스코폴라민으로 유도된 기억력 손상 동물모델 실험을 통해서 효과를 확인하고자 하였다.

과산화수소를 이용한 산화 스트레스를 유발하기 위해서 세포 독성 평가 후, 50  $\mu\text{M}$ 의 농도를 본 연구에 사용하였으며, 오미자칠해목 추출복합물의 경우 혼합처리 실험 전 처리 농도에 따른 세포 독성이 없는 것을 확인하였다. 오미자칠해목 추출복합물의 경우, 10  $\mu\text{g/mL}$ 와 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 과산화수소 처리에 따른 산화스트레스에 대한 세포보호 효과를 확인할 수 있었으며, 세포사멸사 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Annexin V과 PI를 FACS 분석한 결과, Annexin V의 수치 감소는 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 확인하였으며, 세포사멸사의 주요 단백질인 caspase-3의 발현을 확인한 결과,

10  $\mu\text{g/mL}$ 와 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 cleaved caspase-3의 발현량이 과산화수소 처리군보다 줄어드는 경향을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 오미자칠해목 추출혼합물이 가진 항산화능으로 때문이라고 사료된다. 스코폴라민을 이용한 일시적인 기억력 손상이 유발된 기억력 손상 랫드 실험동물 결과에서는 Y-maze를 이용하여 기억력 평가에서 스코폴라민을 투여한 군의 spontaneous alternation은 정상 대조군에 비해 미로에 팔을 넣는 횟수가 유의적으로 감소하였으나, 28일간 오미자칠해목 혼합추출물을 섭취한 군에서는 스코폴라민을 투여하에서도 테스트 결과 기억력이 개선된 것으로 확인되었다. 또한 해마에서의 acetylcholine 농도는 scopolamine만 투여한 군에서 유의적으로 감소하였으며, 오미자칠해목 혼합추출물 150 mg/kg과 300 mg/kg 투여군에서는 유의적인 증가하는 것으로 확인하였다.

이런 실험결과를 바탕으로 오미자칠해목 혼합추출물은 과산화수소로 유발된 산화스트레스와 스코폴라민을 이용한 기억력 손상 랫드 동물실험을 이용하여 보호효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2017년도 농림수산식품기술기획평가원 고부가 가치식품기술개발사업(317042-03-1-SB010)의 보조금을 지원을 받아 수행된 “오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발”의 연구결과로 이에 감사드립니다.

## References

- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414
- Brand JJ, Perry WL. 1966. Drugs used in motion sickness. A critical review of the methods available for the study of drugs of potential value in its treatment and of the information which has been derived by these methods. *Pharmacol Rev* 18:895-924
- Byun SN. 2010. Effects of mixed extracts of *Chenwhangbosimdan* and *Curcuma longa* L. on memory and antioxidant enzyme activities in intracerebroventricular amyloid  $\beta$ -injected Alzheimer's disease model rat. Ph.D. Thesis, Kyung Hee Univ. Seoul. Korea
- Canal N, Imbimbo BP, Eptastigmine Study Group. 1996. Relationship between pharmacodynamic activity and cognitive effects of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther* 60:218-228
- Choe DJ, Ahn HY, Kim YW, Kim TH, Kim MD, Cho YS. 2016. Improvement effect of *Stachys sieboldii* MIq. According to mixing ratio of calcium on memory impairment in scopolamine-induced dementia rats. *J Life Sci* 26:812-818
- Chuong NN, Trung BH, Luan TC, Hung TM, Dang NH, Dat NT. 2014. Anti-amnesic effect of alkaloid fraction from *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurosci Lett* 575:42-46
- Davies P, Maloney AJF. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 308:1403
- Ghoneim MM, Mewaldt SP. 1977. Studies on human memory: The interactions of diazepam, scopolamine, and physostigmine. *Psychopharmacology* 52:1-6
- Haycock JW, Gold PE, Macri J, McGaugh JL. 1973. Noncontingent footshock attenuation of retrograde amnesia: A generalization effect. *Physiol Behav* 11:99-102
- Hasanein P, Mahtaj AK. 2015. Ameliorative effect of rosmarinic acid on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Neurosci Lett* 12:23-27
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776
- Hong HU, Yi-min Q. 2006. Grape seed proanthocyanidin extract induced mitochondria-associated apoptosis in human acute myeloid leukaemia 14.3D10 cells. *Chin Med J* 119:417-421
- Kohl RL, Homick JL. 1983. Motion sickness: A modulatory role for the central cholinergic nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 7:73-85
- Jegal KH, Park SJ, Kim CY, Lee C, Park JH, Jang JH. 2010. Effect of *Poria cocos* on the scopolamine-induced memory impairment and Its underlying molecular mechanism. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24:228-235
- Kang JS. 2016. Effect of medicinal herb composites on antioxidative and cognition-enhancing activities in rats. *Korean J Food Nutr* 29:382-391
- Kang SJ, Choi-Kwon S. 2009. Comparison of instrumental activities of daily living in early and late-onset Alzheimer's disease. *Dementia Neurocogn Disord* 8:119-125
- Kasa P, Papp H, Kasa P Jr, Torok I. 2000. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience* 101:89-100
- Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, Jun WJ, Cho HY, Kim YJ, Shin DH. 2007. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1063-1068
- Lee MR, Sun BS, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Yang SA, Ly SY, Sung CK. 2008. Effects of white ginseng and red ginseng extract on learning performance and acetylcholinesterase activity inhibition. *J Ginseng Res* 32:341-346
- Lee EJ, Cho JA, Seong SY. 2011. Cell death and immunity. *J Bacteriol Virol* 41:309-311
- Moon YH. 2012. Induction of apoptosis by extract of *Phlox paniculata* L in KB human oral cancer cells. *Oral Biol Res* 36:139-143
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306
- Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. 2004. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive for anti-cholinesterase function activity. *Phytomedicine* 11:544-548
- Oh JH, Choi BJ, Chang MS, Park SK. 2009. Nelumbo nucifera semen extract improves memory in rats with scopolamine-induced amnesia through the induction of choline acetyltransferase expression. *Neurosci Lett* 461:41-44
- Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH. 1996. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med* 62:405-409
- Park EK, Han KH, Lee SH, Kim NK, Bae MH, Seo YH, Yong



- YJ, Jeong SY, Choi CW. 2018. Neuroprotective effects of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* extract on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress in neuroblastic SH-SY5Y cell line. *Korean J Food Nutr* 31:865-872
- Park, HB, Kim SY, Park SJ. 2019. Effects of ginseng sprout extract and modified Kyung-Ok-Ko on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *J Agric Life Environ Sci* 31:151-159
- Park MA, Kang KJ. 2015. Effect of grape skin extract on apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J East Asian Soc Diet Life* 25:87-98
- Peng L, Zhaohui L. 2015. Neuroprotective effect of paeoniflorin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells by modulation of reactive oxygen species and the inflammatory response. *Exp Ther Med* 9:1768-1772
- Price NM, Schmitt LG, McGuire J, Shaw JE, Trobough G. 1981. Transdermal scopolamine in the prevention of motion sickness at sea. *Clin Pharmacol Ther* 29:414-419
- Shin JA, Park JH, Kim SH, Song KY. 2013. Inhibition effect of cell proliferation and apoptosis by *Inonotus obliquus* in human glioblastoma U-87 MG cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:1022-1028
- Shuheng L, Guisheng Y, Guohua S, Qingguo Z. 2019. Green tea polyphenols protect PC12 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damages by upregulating lncRNA MALAT1. *Int J Immunopathol Pharmacol* 33:2058738419872624
- Talesa VN. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122:1961-1969
- 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
- Wang XP, Zhou J, Han M, Chen CB, Zheng YT, He XS, Yuan XP. 2017. MicroRNA-34a regulates liver regeneration and the development of liver cancer in rats by targeting Notch signaling pathway. *Oncotarget* 8:13264-13276
- Warburton DM, Wesnes K. 1984. Drugs as research tools in psychology: cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology* 11:121-132
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. 1994. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* 271:992-998
- Xiao J, Li S, Sui Y, Wu Q, Li X, Xie B, Zhang M, Sun Z. 2014. *Lactobacillus casei-01* facilitates the ameliorative effects of proanthocyanidins extracted from lotus seedpod on learning and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice. *PLOS ONE* 9:e112773
- Zhao Q, Kim YU, Han IH, Yun JM. 2016. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ethanolic extract of *Lespedeza cuneata* G. Don in human colorectal cancer HT-29 cells. *Korean Soc Food Sci Nutr* 45:911-917

---

Received 07 May, 2020  
 Revised 02 June, 2020  
 Accepted 11 June, 2020