

# 스코폴라민으로 유도된 Mice에서 榆根皮(Ulmi Cortex)의 기억력 개선 효과

김응규<sup>#</sup>, 노성수<sup>\*</sup>

대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

## Ulmi Cortex Ameliorates Scopolamine-induced Memory Impairments in Mice.

Eung-Gyu Kim<sup>#</sup>, Seong-Soo Roh<sup>\*</sup>

Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objectives** : In the present study, we assessed the effects of water extract of *Ulmus davidiana*(UDE) on the learning and memory impairments induced by scopolamine in mice through its favorable acetylcholinesterase (AChE) activity and antioxidant effect.

**Methods** : The memory and cognitive enhancing effect of the UDE was investigated using a passive avoidance test, the Morris water maze test and Y-maze test in mice. In addition, to examine the mechanism of UDE using acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant activity.

**Results** : The water extract of UDE (100, and 200 mg/kg) significantly reversed the scopolamine-induced cognitive impairments in the passive avoidance test ( $P < 0.05$ ). Moreover, UDE (100, and 200 mg/kg) also improved escape latencies in training trials and increased swimming times and distances within the target zone of the Morris water maze ( $P < 0.05$ ). On the Y-maze test, UDE (100, and 200 mg/kg) also significantly reversed scopolamine-induced cognitive impairments in mice ( $P < 0.05$ ). In an in *vitro* study, UDE was found to inhibit acetylcholinesterase, changes in neurotrophic factor (CREB), and antioxidant activity in a dose-dependent manner.

**Conclusions** : The water extract of UDE dramatically possesses the anti-amnesic and cognitive-enhancing activities related to the memory processes, and these activities were parallel to treatment duration and dependent on the learning models. These results suggest that the administration of UDE enhances learning and memory, and that this effect is partially mediated by ERK-CREB-BDNF signaling and the survival of immature neurons.

**Key words** : *Ulmus davidiana*, Learning and Memory, Scopolamine, acetylcholinesterase, Antioxidant, CREB

\*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Shincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Eung-Gyu Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-768-6340

· Received : 17 June 2022

· Revised : 15 July 2022

· Accepted : 25 July 2022

## I. 서론

인류의 평균 수명이 의학 기술의 발전으로 점차 높아지는 추세에 따라 각종 퇴행성 질환들이 더욱 증가하고 있다. 여러 퇴행성 질환 중 癡呆는 치료와 조절이 어렵고 환자와 보호자에게 많은 고통을 주는 질병이다. WHO에서 발표한 癡呆 예방 기준에 따르면 癡呆는 신속하게 확산되는 공공위생 문제로 매년 1000만 명의 환자가 새로 증가하고 있고 2050년에는 3배의 증가를 예상하고 있다<sup>1)</sup>. 국내의 상황을 건강보험심사평가원의 癡呆에 대한 의료통계정보를 통해 살펴보면 우리나라의 癡呆 환자 역시 매년 증가추세로 2013년 315,216명의 환자가 2018년 511,931명으로 5년 사이 62.41%의 빠른 증가를 보이고 있다<sup>2)</sup>.

현대의학에서의 癡呆는 사람의 기억력과 인지능력의 소실을 의미하며, 일상생활에 장애를 가져올 정도의 상황으로 여러 가지 질환들에 의해 나타나는 병적 증상이라고 정의하고 있으며 원인 질환으로는 알츠하이머병, 루이소체 癡呆, 혈관성 癡呆, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크루즈펠트-제이아콕병, 픽병, 癡呆 등이 주로 癡呆 증상으로 나타난다고 알려져 있다<sup>3)</sup>. 주로 이용되는 약물치료는 항산화제, 항소염제, 여성호르몬 치료, 타크린, 아리셉트, 엑셀론 등이 치료제로 이용되고 있다. 하지만 국내·외의 癡呆환자의 빠른 증가율을 보면 현재 이용되고 있는 치료법의 효과는 높지 않은 것을 알 수 있다.

韓醫學에서의 癡呆는 智能低下, 기억감퇴, 이해력 저하, 판단력의 명확한 저하와 精神부진, 반응둔감, 언어감소, 善忘이 나타나고 自力 생활 불가 등의 증상을 위주로 한 질병이다. 발병의 病機는 精血虧虛, 또는 痰濁瘀血이 上犯清竅하여 腦髓失養을 유발하고 元神失調가 된다고 정의하고 있다<sup>4)</sup>. 그 유형을 髓海不足, 肝腎陰精虧虛, 脾腎不足, 痰濁阻竅, 氣虛(氣滯) 血瘀, 風痰瘀阻으로 구분하고 유형에 따라 補腎填精, 益髓增智, 補益肝腎, 潛陽熄風, 補益脾腎, 生精益智, 健脾化濕, 滌痰開竅, 益氣(理氣) 化痰, 通絡開竅, 熄風通絡, 化痰開竅으로 치료법을 적용한다<sup>4)</sup>. 韓醫學에서의 癡呆에 대한 분류와 현대의학의 범주에서 그 관련성을 살펴보면 先天性癡呆, 腦血管性癡呆, 老年性癡呆, 早老性癡呆, 그리고 感染性疾病, 中毒性疾病, 外傷性疾病과 精神病 후기의 癡呆 증상 등이 관련성이 있는 범위라고 할 수 있다<sup>5)</sup>. 病因, 病機와 증상의 상호 관련성과 약물의 효능을 바탕으로 약물에 대한 선행연구를 진행한 결과, 榆根皮의 효능이 증상 개선의 가능성이 있을 것으로 예상되었고 기원에 따라 榆根皮를 구분하고 연구를 진행하였다.

榆根皮의 기원 식물은 한방 약용식물 도감에서 참느릅나무(*Ulmus parvifolia* Jacq), 느릅나무(*U. davidiana* Planch, var. *japonica* Nakai), 비슬나무(개느릅나무(*U. pumila* Linne) [*U. mandshurica* Nakai.], 왕느릅나무(*U. macrocarpa* Hance) 등으로 나누고 있다. 각각의 효능을 비교해 보면 참느릅나무의 효능은 利水, 通淋, 消癰이며, 느릅나무의 효능은 利水, 通淋, 消癰이다. 비슬나무의 효능은 利水通淋, 解毒消腫으로 참느릅나무의 효능과 유사하며, 왕느릅나무의 효능은 殺蟲消積, 散寒止瀉, 祛風燥濕이다<sup>6)</sup>. 이들 약물 중에서 느릅나무가 癡呆의 개선 효과가 기대되어 실험 대상 재료로 선택하였다. 약리작용을 기준으로 한 대상 약물을 비교했을 때 참느릅나무는 진통, 소염작용, 항암 효과가 있었고, 비슬나무는 항알러지 활성이 있었으며, 느릅나무(*U. davidiana*(榆根皮)의

강한 항산화 활성이 癡呆 개선에 효과가 기대되었다.

연구에 이용된 스코폴라민(scopolamine)은 무스카린성 아세틸콜린 수용체에 비특이적으로 작용하는 길항제로 콜린 신경계 신호전달을 방해하여 동물모델과 사람의 기억력 손상을 유발한다고 알려져 있으며, 또한 해마의 장기기억 유지를 방해하고, 대뇌의 신경영양인자(BDNF, CREB 등)를 하향 조절한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 스코폴라민은 설치류와 영장류의 학습과 기억 장애를 유도하기 위해 사용되어 왔으며, 오랫동안 인지 및 기억력 증가 약물 개발에 이용되어 왔다.

조사한 고전 문헌에서 확인한 내용에 따라 癡呆 개선에 효과가 기대되는 *U. davidiana*(榆根皮)를 과학적으로 확인하기 위하여 스코폴라민으로 기억력 감퇴를 유발한 동물모델에서 *U. davidiana*(榆根皮) 추출물(UDE)이 기억력과 관련된 행동 변화에 미치는 영향을 측정하였다. 본 연구에서는 Y-maze 시험, 수동회피 시험 및 수증미로 시험 등의 행동 실험을 진행하였고 작용기전을 연구하기 위하여 아세틸콜린 분해효소 억제제, 뇌 영양인자(CERB, BDNF 등) 및 항산화 활성에 미치는 영향을 살펴보았다.

## II. 재료 및 실험 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

실험에 사용된 BV-2 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 제공받아 37℃ (5% CO<sub>2</sub>) 배양기에서 5% Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, South Logan, UT, USA)과 1% penicillin streptomycin (FBS, Hyclone, South Logan, UT, USA)이 포함된 dulbecco's modified eagle's medium (FBS, Hyclone, South Logan, UT, USA)을 사용하여 배양하였다. 또한 본 실험에 사용한 (-) scopolamine hydrobromide, tacrine (9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), acetylthiocholine iodide and DTNB (5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]), phosphoric acid 및 aluminium(III) chloride은 Wako사 (Japan), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), hydrochloric acid, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), phenol reagent, ascorbic acid, garlic acid, 등은 Sigma-Aldrich (USA)의 것을 사용하였다. 그 외에 기타 시약은 최상급의 시약을 사용하였다.

#### 2) *U. davidiana* 추출물(UDE) 제조

실험재료로 연구에 사용된 *U. davidiana*(榆根皮)는 동일약업사에서 구입하여 사용하였다. 약재 100g에 증류수 1 L를 가하여 80℃의 온도에서 2시간 동안 추출하였으며, 추출된 액은 여과지(Advantec No.2)로 여과하고 감압 조건에서 농축하여 용매를 제거하고 -20℃에 냉동 보관하고 실험에 이용하였다 (수득율: 4.5%).

### 3) 실험동물

실험에 사용된 동물은 수컷의 ICR mouse (SPF/VAF CrIjBgi: CD-1) 4주령을 대한바이오텍(충북, 한국)에서 구매하여 순화 기간은 1주일을 거쳤고 이상 증상이 없는 개체를 선별 후 실험에 사용했다. 사육 기간 중 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 사육실 내부의 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ , 조명 시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 간격 및 조도  $150 \sim 300 \text{ Lux}$ 로 설정된 사육실 조건에서 polycarbonate cage ( $27\text{L} \times 22\text{W} \times 13\text{H} \text{ cm}$ )에 5마리 이내로 사육상자 내의 개체 수를 조절하여 사육하고 실험에 사용하였다. 이 연구에서 진행되는 동물실험 수행 절차는 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제8852호)에 근거하여 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행하였다(승인번호: DHU2014-101). 모든 동물실험은 각각의 행동 실험마다 새로운 동물로 실시하였으며 그 중 모리스 수중 미로 실험이 끝난 동물을 처치하여 뇌를 적출 후 western blotting 실험을 진행하였다. 실험동물은 7일간의 순화 기간을 통해 안정되게 하였고 행동 실험 1시간 전 UDE를 단회 경구 투여하고 30분 뒤 기억손상을 유발을 위하여 scopolamine 1 mg/kg을 복강 투여 하였다. 실험동물의 군은 총 6개 군으로 나누어 용매만 처치한 정상군(NOR), scopolamine을 투여한 대조군(CON), UDE 50, 100 또는 200 mg/kg와 scopolamine을 투여한 실험군(UDE 50, UDE 100, UDE 200) 및 tacrine 10 mg/kg와 scopolamine을 투여한 양성대조군(THA, tetrahydroaminoacridine, Tacrine)으로 나누어 실험을 진행하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 세포실험

#### (1) 세포증식률 측정(MTT assay)

BV-2 세포를 96 well plate에  $100 \mu\text{L}$ 씩  $1 \times 10^5 \text{ cell/mL}$  밀도로 분주한 후 24 H 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고,  $1 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  농도의 UDE를 단독 또는 2 H 뒤 lipopolysaccharide (LPS)  $100 \text{ ng/mL}$  첨가하여 24 H 동안 처리하였다. 그 후  $5 \text{ mg/mL}$ 의 농도가 되도록 조절한 MTT 용액을  $10 \mu\text{L}$  첨가하여 1 H 동안 배양 후 배지를 제거하고 DMSO를 가해 생성된 formazan을 용해하였다. 최종적으로 처리된 반응액을  $570 \text{ nm}$  파장에서 흡광도를 microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포 생존율의 측정 결과는 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도의 변화 정도에 따라 감소율 나타내었다.

#### (2) NO 생성 저해능 분석

BV-2 세포를  $1 \times 10^5 \text{ cell/mL}$  비율로 48 well plate에 분주한 다음 24 H 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고,  $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  농도의 UDE를 2 H 동안 처리한 후 LPS를  $100 \text{ ng/mL}$  농도로 처리하였다. 24 H 처리한 후 각 well의 반응액을  $100 \mu\text{L}$ 씩 96 well plate에 옮겨 담고, 1% sulfanilamide  $50 \mu\text{L}$  와 0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine

dihydrochloride (NED)  $50 \mu\text{L}$ 를 추가하여 혼합한 후  $540 \text{ nm}$  조건에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) 동물실험

#### (1) Y-maze test

실험은 단기 기억력을 측정 목적으로 순차적 행동 능력을 실험하기 위하여 Y-maze test 실시하였다. 측정 장비는 세 개의 통로로 되어 있고 각 통로의 길이는  $42 \text{ cm}$ , 넓이는  $3 \text{ cm}$ , 높이는  $12 \text{ cm}$ 이고 각 통로의 각도는  $120^\circ$ 이다. 이 장치의 재질은 검정색의 polyvinyl plastic으로 되어 있고, 세 개의 통로를 각각 A, B, C로 정하여 실험을 진행하였다. Mouse를 장치에 넣고 8분 동안 각 가지에 mouse의 꼬리까지 통로에 들어갈 때의 횡수와, 각 통로에 차례로 진입한 횡수를 카운트하여 1점 (실제변경, actual alternation)을 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 세 통로 각각에 중복되지 않게 진입하는 것으로 정의되며, 다음의 계산 공식에 의해 계산하였다.

변경 행동력 (Spontaneous alteration, %)

$$= \frac{\text{실제변경 (actual alternation)}}{\text{최고변경(maximum alternation)}} \times 100 \quad (\text{최고변경: 총 입장횡수}-2)$$

#### (2) Passive avoidance test

해마의 일정 조건화 기억과 변연계와 관련 있는 기억력에 관련된 영향 및 working memory ability를 평가를 회피학습 상자((주)정도비앤피, 대한민국, 서울)를 적용하여 실험을 진행하였다. 수동회피 상자는 두 개의 공간이 어두운 공간과 밝은 공간으로 구분되어 있고, 밝은 공간에 mouse를 넣으면 본능에 따라 어두운 공간으로 이동하는 순간에 맞춰  $5 \text{ 초간 } 0.5 \text{ mA}$ 의 전기자극을 가한다. 전기충격을 가한 실험 다음 날 mouse를 밝은 방에 다시 넣었을 때 어두운 공간에서의 전기충격을 기억하여 밝은 공간에 정류하게 되는데, 이때 머무름 시간(step-through latency)으로 기억력을 측정하고 평가하였다.

#### (3) Morris water maze test

해마 의존적인 공간학습 능력 및 장기 기억력 개선을 확인하는 실험으로 원지름  $90 \text{ cm}$ , 높이  $45 \text{ cm}$ 로 만들어진 수조를 사등분하고 한 분획구역에 원지름  $9 \text{ cm}$ , 높이  $25 \text{ cm}$ 의 플랫폼을 설치하고  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  검은 색소를 희석한 물을 플랫폼 보다  $1 \text{ cm}$  정도 높게 채운 뒤 mouse가 플랫폼을 찾아가는데 소요되는 시간을 측정하였다. 원형 수조에 4개의 표지판을 설치하고 하루 4번씩 반복하고 매회 60초간 진행하였으며 mouse가 60초 안에 플랫폼에 도달하면 실험을 완료하였고 도달하지 못한 경우 손으로 유도하여 10초간 정류 하였다. 5일간 진행되는 실험 중 마지막 날, 학습능력을 측정하기 위해 플랫폼을 제거하고 2분간 플랫폼이 위치했던 지역에 정류하는 시간을 측정하였다. 실험의 자료는 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록하고 측정하였다.

### 3) 아세틸콜린에스테라아제(AChE) 활성 억제 실험

AChE 활성 억제능 확인을 위하여 Ellman GL<sup>8)</sup> 등의 방법인 acetylthiocholine iodide(ASCh)를 기질로 이용해서 비색분석법으로 처리하였다. 실험에 사용하지 않은 실험동물의 전체 뇌를 적출하여 냉각된 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 8.0)로 등질화 하고, 12,500 rpm, 20분간 원심분리를 거친 후 상층부의 액을 AChE 활성을 측정하는데 효소로 사용하였다. 시료와 양성 대조군으로 사용한 donepezil(Sigma-aldrich, USA)을 단계별 희석하여 이용하였다. Sodium phosphate buffer 134  $\mu$ L, 75 mM ASCh 1  $\mu$ L, 10 mM Ellman's 용액 (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 5  $\mu$ L, 시료 또는 donepezil을 50  $\mu$ L 넣고 25°C에서 10분간 반응을 유지한 후 효소원 10  $\mu$ L를 추가하고 25°C로 5분 동안 반응을 유지한 후 405 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 효소 첨가를 제외하고 sodium phosphate buffer를 첨가한 반응액을 이용하였고, ASCh 첨가를 제외한 반응액으로 시료와 효소 활성용 시약 사이의 비특이적 반응이 발생하지 않는 것을 측정하였다. 시료를 추가하지 않은 반응액의 AChE의 활성도의 조절을 100%으로 하고 반응액은 각 시료가 첨가된 후 AChE 활성 저해도의 결과에 따라 그래프로 정리 하였다.

### 4) 항산화 활성

#### (1) DPPH radical 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능은 화학적으로 안정화된 자유 radical인 암자색의 DPPH를 방향족 아민류 등의 환원 작용으로 탈색되는 원리를 응용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 방법으로 각 시료를 증류수에 용해한 후 0.2 mM DPPH 용액과 100  $\mu$ L씩 동일 양으로 혼합하여 차광 상태에서 30분간 반응을 유지한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교와 분석을 하였으며 자유 radical 소거능은 다음의 공식을 적용하여 처리하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} \\ = 100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \\ \times 100]$$

#### (2) ABTS radical 소거능 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) radical 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와 반응시켜 짙은 청록색의 안정화된 ABTS 자유 radical을 생성하여 항산화 물질의 작용으로 탈색이 나타나는 원리를 응용하여 항산화 물질의 활성 정도를 측정하는 방법으로 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1(v:v)로 혼합한 후 냉암소에서 12~16시간 반응을 유지하고 ABTS+를 형성된 후 734 nm에서 흡광도를  $0.7 \pm 0.03$ 으로 ABTS 기질용액을 에탄올로 희석한 후 이용하였다. 각 시료를 증류수에 용해한 후 ABTS+ 용액과 100  $\mu$ L씩 같은 양으로 혼합하고 암실에서 7분 동안 반응을 유지한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 이용하여 비교 하였고 자유 radical

소거능은 다음의 계산식을 통하여 처리하였다.

$$\text{ABTS radical 소거활성(\%)} \\ = 100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \\ \times 100]$$

#### (3) 총 폴리페놀 정량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis법에 따라 시료 10  $\mu$ L과 페놀 시약 10  $\mu$ L, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200  $\mu$ L를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성한 후 정량하고 계산 처리하였다.

#### (4) 총 플라보노이드 정량

총 플라보노이드 함량은 시료 50  $\mu$ L에 1 N NaOH 50  $\mu$ L, diethylene glycol 200  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 5분간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 표준물질로 사용하여 검량선을 작성 후 정량해 계산하였다.

### 5) Western blot

실험동물의 해마조직을 적출하여 단백질을 BCA kit를 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리했고, polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane로 이동시켰다. Membrane을 5% 탈지 분유액(skim milk)으로 1시간 blocking 하고, p-ERK(1:4000, santa cruz), ERK(1:1000, santacruz), pCREB(1:1000, cell signaling), CREB(1:1000, cell signaling)와 함께 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이를 TBST (Tris-buffered saline with 0.1% tween 20)로 3회 세척하고 2차 항체와 같이 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST로 3회 세척하고 ECL 용액을 처리한 뒤 관찰한 단백질은 LAS 4000 mini system (GE Healthcare, VA, USA)으로 촬영하였다.

### 6) 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 산출하였다. 실험군들의 유의성 검정은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)를 실시하고 Newman-Keuls test에 의해 유의수준  $p < 0.05$  이상에서 사후검정을 실시하였다. 모든 측정 결과의 표시는 mean  $\pm$  standard error of mean(S.E.M)으로 하였다.

## III. 결 과

### 1. 세포실험

#### 1) UDE의 세포 생존율(MTT assay)

UDE가 BV-2 세포 생존율에 미치는 영향 확인을 MTT assay로 진행한 결과, UDE 단독 처리 또는 LPS와 함께 처리

한 모든 군에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 UDE가 BV-2 세포 생존율에 영향을 주지 못하는 것으로 확인 되었

다(Figure 1A, 1B).

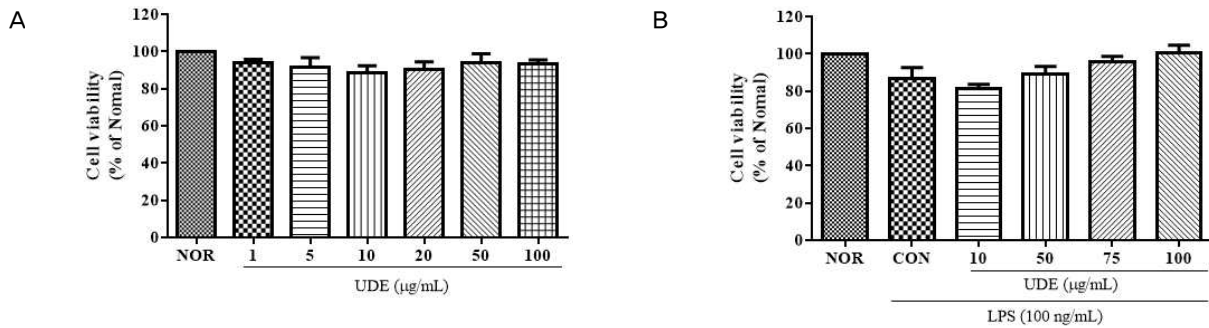


Figure 1. Effects of UDE on BV2 cell viability. A: BV2 cells were treated with various doses of UDE (1 to 100 µg/mL) for 24 hours. Cell viabilities were measured via MTT assay. B: BV2 cells were treated with various doses of UDE (1 to 100 µg/mL) for 2 hours, and 100 ng/mL LPS for 24 hours. Cell viabilities were measured via MTT assay. Results are presented as the mean ± S.E.M. All data are presented as the mean ± S.E.M of three independent experiments.

2) UDE의 NO 생성 저해능

BV-2 세포에 LPS 처치로 NO 생성을 유발시킨 결과, LPS 단독 처리한 CON군에서 높은 NO 생성율을 보였으며, UDE 처리 후 LPS로 자극한 BV-2 세포의 NO 생성율은 CON군과 비슷한 수준으로 LPS로 증가된 NO의 수치를 UDE가 감소시키지 못하는 것을 확인하였다(Figure 2).

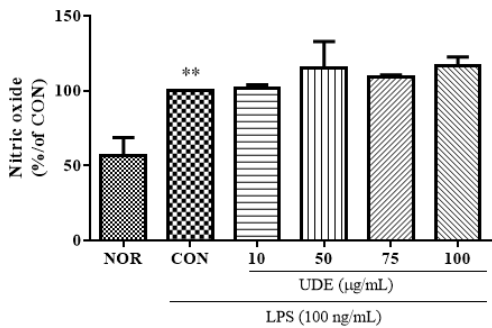


Figure 2. Effects of UDE on nitric oxide (NO) production of LPS-treated BV-2 cell. BV-2 cells were treated with UDE for 2 hours and 100 ng/mL LPS for 24 hours. Supernatants of the wells were analyzed on NO contents via measuring the absorbance at 540 nm. Results are presented as the mean ± S.E.M. All data are presented as the mean ± sem of three independent experiments.  $P < 0.01$  compared with the NOR group.

2. 동물실험

1) Y-maze test

단기 기억의 공간 인지력을 측정하는 Y-maze test에서 변경행동력이 scopolamine만 복용으로 투여한 CON군은 변경행동력이  $60.4 \pm 1.8\%$ 로 나타났고, 정상인 NOR군은  $78.8 \pm 2.5\%$ 의 결과를 나타내어 기억력 손상이 유발된 것을 확인하였고, UDE 50, 100 또는 200 mg/kg을 투여한 실험군은 각각  $64.0 \pm 1.9\%$ ,  $69.0 \pm 1.3\%$  및  $70.0 \pm 1.6\%$ 를 기록하여 CON군과 비교하여 용량 의존적으로 변경 행동력이 증가하여 UDE의 공간 인지력과 단기 기억력 향상의 결과를 확인하였으며 양성 대조군으로 사용한 THA군 역시  $73.3 \pm 2.0\%$ 로 NOR군과 비슷한 수준으로 나타났다(Figure 3A). 총 출입 횟수는 각 군간 유의한 차이가 없어 UDE가 mouse의 일반적 운동성에 영향 없이 기억력 향상에 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3B).

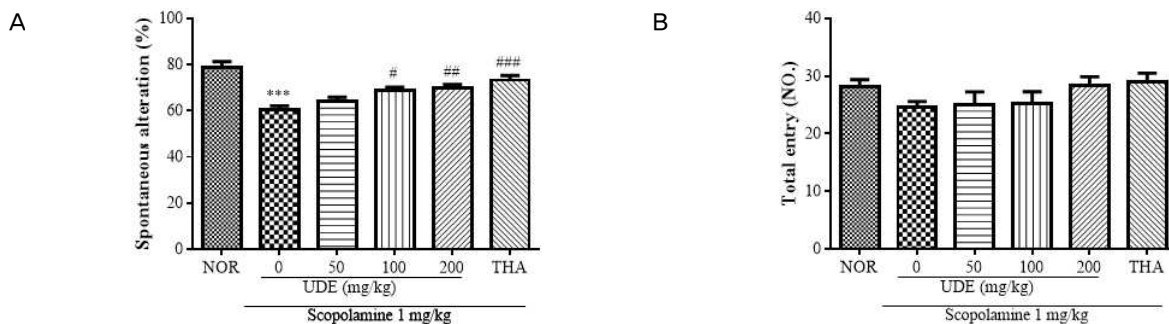


Figure 3 Effect of UDE in scopolamine-induced memory impairment on the Y-maze test. Mice were administered with UDE (50, 100 or 200 mg/kg, p.o.) 1 h before the test. After 30 min, the mice were treated with scopolamine (1 mg/kg, i.p.) and tested in the Y-maze. A: spontaneous alteration (%), B: total entry (No.). Results are presented as the mean ± S.E.M (n=8-10).  $P < 0.001$  compared with the NOR group. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  compared with the CON group.

2) Passive avoidance test

해마의 일정 조건화 기억과 변연계와 관련 있는 기억력에 관련된 영향 및 working memory ability를 측정하는 passive avoidance test에서 실험 약물을 처음 투여한 시점에는 NOR군, CON군, THA군 및 UDE 50, UDE 100, UDE 200 실험군이 유사한 머무름시간(step-through latency time)의 결과를 나타내었으나 24시간 경과 후 기억시험(test trial)에서 머무름시간(step-through latency time)이 NOR군은  $283.6 \pm 13.3$ 초를 기록하였고, CON군은  $117.8 \pm 13.7$ 초를 기록하여 통계적으로 유의미한 결과를 나타내어 CON군의 기억력 손상이 확실히 유도된 것으로 확인되었다. UDE 50, 100 또는 200 mg/kg을 투여한 실험군은 각각  $137.5 \pm 12.0$ 초,  $221.8 \pm 14.7$ 초,  $174.8 \pm 16.3$ 초로 나타났고 THA군 역시  $213.3 \pm 13.0$ 초로 나타나 UDE가 손상된 기억력의 회복에 유의미한 결과를 나타내는 것을 확인하였다(Figure 4).

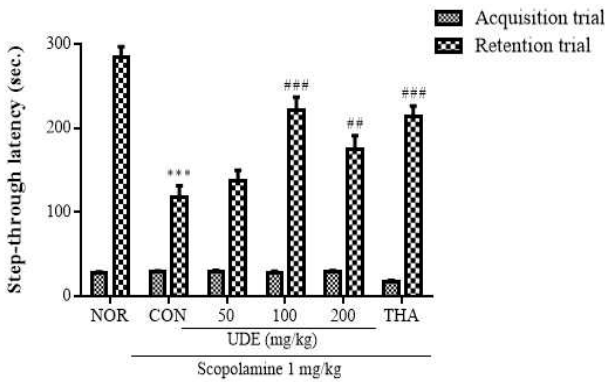


Figure 4. Effect of UDE in scopolamine-induced memory impairment on the passive avoidance test. Mice were administered with UDE (50, 100 or 200 mg/kg, p.o.) 1 h before the test. After 30 min, the mice were treated with scopolamine (1 mg/kg, i.p.) and tested in the passive avoidance. Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8-9). \*\**P* < 0.001 compared with the NOR group. \*\*\**P* < 0.001 compared with the CON group.

3) Morris water maze test

Morris water maze test의 training trial에서 4일간 플랫폼에 도달되는 소요 시간을 측정하는 학습시험에서 NOR군은 학습이 진행될수록 플랫폼에 도달하는 시간이 감소하는 반면 CON군 첫날과 비슷한 수준으로 나타나 CON군에서 NOR군에 비해 학습능력이 확연히 저하되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 UDE를 투여한 실험군과 THA군에서는 학습이 진행될수록 플랫폼에 도달하는 시간이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 5A). 실험 마지막 5일째에 기억력 확인의 방법으로 플랫폼을 제거한 후 2분간 자유롭게 수영을 실시하면서 동시에 Ethovision program으로 총 수영시간 중 플랫폼이 위치했던 4분원 구역에 유영하는 시간을 측정하였다. 각 실험군의 기억력 측정결과는 NOR군  $53.3 \pm 3.1$ 초, CON은  $29.2 \pm 1.3$ 초, UDE 50, 100, 200 mg/kg 투여한 UDE 50, UDE 100, UDE 200군은  $31.3 \pm 1.3$ 초,  $46.1 \pm 1.1$ 초 및  $44.6 \pm 1.7$ 초로 나타났고, THA군은  $51.7 \pm 1.6$ 초로 CON군에서 감소된 유영 시간이 UDE에 의해 증가하는 결과를 확인하였다(Figure 5B).

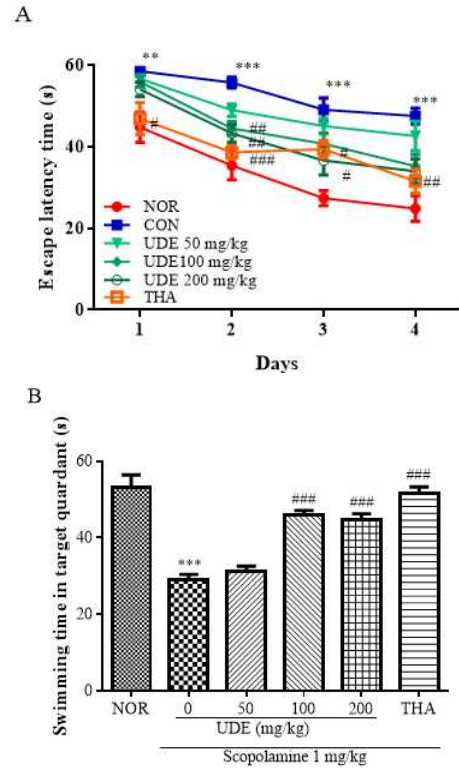


Figure 5. Effect of UDE in scopolamine-induced memory impairment on the Morris water test. Latency time was measured for 4 days, probe test was performed last day. Mice were administered with UDE (50, 100 or 200 mg/kg, p.o.) 1 h before the test. After 30 min, the mice were treated with scopolamine (1 mg/kg, i.p.) and tested in the Morris water. A: escape latency time (s), B: swimming time in target quadrant (s). Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n=7). \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 compared with the NOR group. #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 compared with the CON group.

3. AChE 활성 억제

UDE의 AChE 활성 억제 효과를 측정된 결과 UDE의 IC<sub>50</sub> 값은  $1,841 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났고, 양성대조군으로 이용한 donepezil의 결과는 IC<sub>50</sub>값이  $0,1789 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Figure 6).

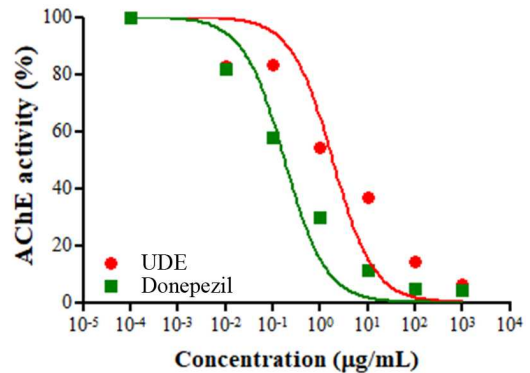


Figure 6. Effects of UDE on the AChE activity.

#### 4. 항산화 활성

##### 1) DPPH radical 소거 활성

항산화제는 산화의 원인으로 비정상적 화합물의 형성을 방지하기 위해 지질 시스템 내부에 침투되어 DNA 손상을 방지하고 노화 및 질병 예방에 도움을 준다고 알려져 있다. DPPH는 비교적 안정된 자유 radical을 소유하는 화합물로 항산화 물질과 접촉하면 환원 작용에 의해 radical이 소거되어 탈색되는 원리를 응용하여 실험을 진행하였다. 본 실험에서는 천연 항산화제인 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 UDE와의 효과를 비교한 결과 ascorbic acid 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는  $99.9 \pm 0.4\%$ 의 DPPH radical 소거활성을 나타내었고, UDE의 DPPH radical 소거 활성 실험결과는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $26.3 \pm 1.4\%$ ,  $46.9 \pm 7.1\%$ ,  $73.2 \pm 1.6\%$ ,  $87.6 \pm 0.6\%$ ,  $91.9 \pm 0.0\%$ ,  $93.1 \pm 0.0\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였다(Figure 7).

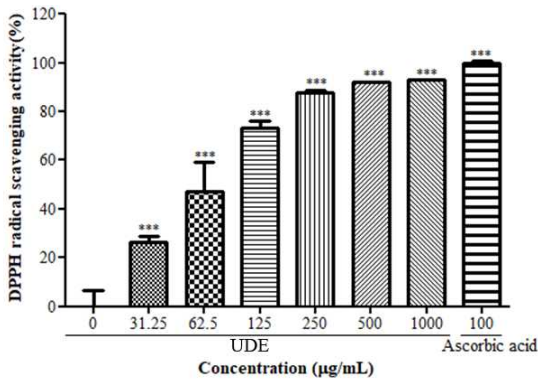


Figure 7. DPPH radical scavenging activity of UDE. The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with blank group.

##### 2) ABTS radical 소거 활성

ABTS radical을 이용하여 항산화능의 측정하는 방법으로는 항산화물질의 수소 이온 공여능을 측정을 통하여 항산화능 분석 방법으로 ABTS와 potassium persulfate와 반응해 생성된 ABTS free radical이 항산화 물질에 제거되어 radical 고유의 색인 청록색이 탈색되는 원리를 응용한 방법이다. 본 실험에

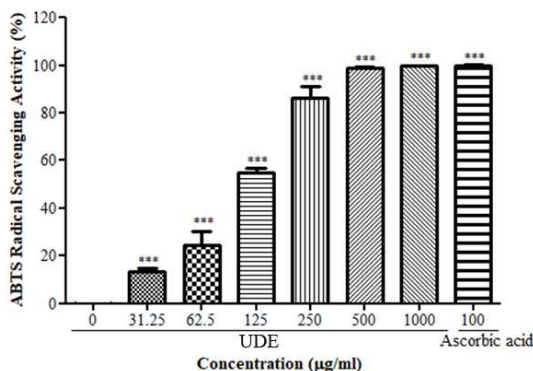


Figure 8. ABTS radical scavenging activity of UDE. The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with blank group.

서는 천연 항산화제인 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 UDE의 효과를 비교한 결과 ascorbic acid 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는  $99.9 \pm 0.5\%$ 의 ABTS radical 소거활성을 나타내었고, UDE의 ABTS radical 소거 활성 실험결과는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $13.3 \pm 1.0\%$ ,  $24.4 \pm 3.3\%$ ,  $55.1 \pm 0.9\%$ ,  $86.4 \pm 2.8\%$ ,  $99.1 \pm 0.2\%$ ,  $99.6 \pm 0.1\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였다(Figure 8).

##### 3) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

UDE의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과  $15.4 \pm 0.7$  mg GAE/g으로 나타났고, 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과  $47.4 \pm 1.9$  mg RUE/g으로 나타났다(Table 1).

Table 1. The total phenolic and flavonoid contents of UDE.

Total phenolics(mg GAE <sup>1)</sup> /g)	Total flavonoids(mg RUE <sup>2)</sup> /g)
$15.4 \pm 0.7^{(3)}$	$47.4 \pm 1.9$

<sup>1)</sup> Gallic acid equivalent.

<sup>2)</sup> Rutin equivalent.

<sup>3)</sup> Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M of 3 independent in triplicate.

#### 5. Western blot 단백질 발현량 확인

실험동물의 해마에서 pERK의 발현양을 측정한 결과, NOR군 27.2, CON군 100으로 증가하였고, UDE 1, 10, 50, 100,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 투여한 실험군이 190.1, 289.2, 412.8, 256.8로 CON군에 비하여 증가하는 것으로 나타났다(Figure 9A). 또한 pCREB의 발현양을 측정한 결과 NOR군  $1.0 \pm 0.1$ , CON군  $0.5 \pm 0.0$ 으로 감소하였고, UDE 50, 100, 200 mg/kg 을 투여한 실험군이  $0.6 \pm 0.1$ ,  $0.7 \pm 0.1$ ,  $0.8 \pm 0.1$ 으로 CON군에 비하여 증가하는 것으로 나타났다(Figure 9B). BDNF의 발현양을 측정한 결과 NOR군  $1.0 \pm 0.2$ , CON군  $0.8 \pm 0.0$ 으로

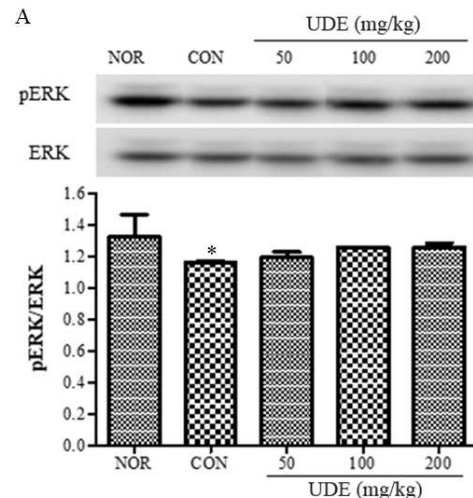


Figure 9A Effects of *U. davidiana* extracts on pERK production in BV-2 cells treated with LPS. Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M.

감소하였고 UDE 50, 100, 200 mg/kg을 투여한 실험군이  $0.8 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.0$ 으로 CON군에 비하여 증가하는 것으로 나타났다(Figure 9C).

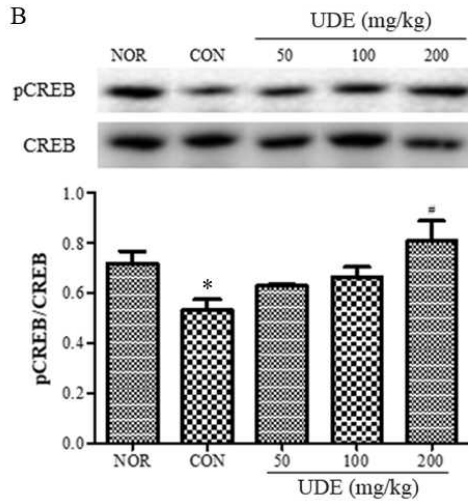


Figure 9.B Effects of UDE on the CREB signaling pathway in scopolamine-induced memory impairment mice. The hippocampus was lysed and analyzed by Western blotting. pCREB and CREB. Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n=3-4/group). \* $P < 0.05$  with the NOR group.

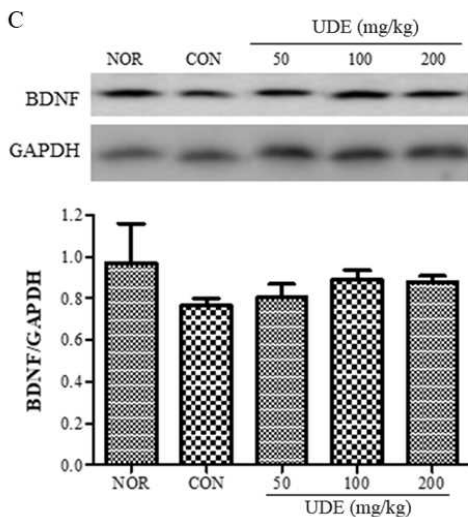


Figure 9C. Effects of UDE on the BDNF signaling pathway in scopolamine-induced memory impairment mice. The hippocampus was lysed and analyzed by Western blotting. BDNF Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n=3-4/group). \* $P < 0.05$  with the NOR group.

#### IV. 고찰

본 연구에서는 스코폴라민으로 유도된 인지능력 및 기억력 감퇴 모델을 이용하여 UDE의 개선 효능에 대하여 연구를 진행하였다. 동물실험 결과, Y-미로 시험, 수동회피 시험, 모리스 수중 미로 시험 모두에서 UDE 100 및 200 mg/kg를 투여한 결과 스코폴라민 그룹에 대해 유의성 있게 기억력 개선 및 인지

능력 개선을 확인하였다. 또한, 동물실험에서 나타난 UDE의 효과에 대한 작용기전을 확인하기 위해 아세틸콜린 분해 효소 활성 억제능, 뇌 영양 인자(ERK, CREB)의 변화 및 활성산소에 대하여 미치는 영향을 진행하였다. 그 결과 UDE가 뇌에서 AChE의 활성을 용량 의존적으로 억제하였고, 해마 부위에서의 ERK 및 CREB의 인산화율을 증가시켰으며, 우수한 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 UDE가 뇌의 영양 인자(ERK, CREB) 및 콜린성 신경계를 통하여 기억력 및 인지능력 개선 효과가 있음을 알 수 있었다.

韓醫學에서는 癡呆의 구분은 輕症과 重症으로 나누어 神志 淡漠, 反應遲鈍, 健忘 정도의 증상과 정도가 심한 顛倒, 行爲 失常 등의 증상으로 각각 구분한다. 病因은 첫째, 노령화에 따른 肝腎不足, 腎精不足 원인의 腦髓不充 둘째, 氣血虛弱, 精氣不足 원인의 腦神失養 셋째, 과도한 감정의 손상인 七情 內傷으로 肝氣鬱結 원인의 肝氣乘脾 넷째, 脾失建運으로 痰飲 원인의 蒙蔽清竅 다섯째, 心脾耗傷이 脾虛 氣血生化 無原 원인의 氣血不足 여섯째, 脾虛失運으로 생성된 痰飲 원인의 清竅受蒙 일곱째, 驚恐傷腎 원인의 腎虛精虧, 髓海失充, 腦髓所 養 등으로 정리하고 있다<sup>9)</sup>. 또한 癡呆 치료에 痰飲이 중요한 이차적인 病因으로 인식되고 있으며 祛濕, 祛痰작용이 중요한 치료 방법 중 하나가 되고 있다<sup>10)</sup>. 이런 韓醫學적인 개념을 바탕으로 여러 약물을 선행 연구한 결과 UDE가 기억력과 癡呆 개선에 영향이 있을 것으로 예상되었다.

먼저 UDE의 세포독성을 확인하기 위하여 BV-2 세포 생존율에 미치는 영향 확인을 MTT assay로 진행한 결과, UDE 단독 처치 또는 LPS와 함께 처리한 모든 군에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 UDE가 BV-2 세포 생존율에 영향을 주지 못하는 결과를 확인하였다(Fig. 1A, 1B). 또한 추가적으로 UDE의 기억력 개선 효과와 뇌 염증과의 관련성을 확인하기 위하여 NO 생성 저해능을 진행하였으나, LPS로 증가된 NO 수치를 UDE가 감소시키지 못하여 염증 인자와는 관련이 없는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

본 연구에서 UDE의 인지능력 및 기억력 개선 효과를 확인하여 위하여 무스카린성 수용체에 비특이적으로 작용하는 길항제로 알려진 스코폴라민으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 Y-미로 시험, 수동회피 시험, 모리스 수중 미로 시험 등 다양한 행동 실험을 진행하였다. 먼저 단기 기억에 대한 UDE의 효능을 측정하기 위하여 Y-maze 시험을 시행한 결과, 스코폴라민을 투여한 그룹에서 자발적 변경행동력(spontaneous alternation)이 감소하였지만, UDE의 투여로 자발적 변경행동력이 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 감퇴된 단기 기억력이 회복되는 것을 알 수 있었다(Fig 3A). 또한 동일한 조건에서 실험동물이 각 가지(arm)에 들어간 전체 횟수(total entry) 및 운동력에는 영향을 주지 않았다(Fig. 3B). 또한 장기 기억을 측정하는 수동회피 시험에서도 UDE가 스코폴라민으로 감소되었던 밝은 방에 머무른 시간(step-through latency time)이 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 기억력이 회복되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 마지막으로 공간 및 학습 기억을 평가하기 위하여 모리스 수중 미로 시험을 확인한 결과 먼저 4일 동안 진행되는 학습 시험(training trial)에서 스코폴라민을 단독 투여한 경우 플랫폼에 도달하는 시간이 정상군에 비하여 유의적으로 높게 나타나서 기억력 감퇴가 잘 이루



어진 것을 알 수 있었다(Fig 5A). 반면에 UDE의 경우에는 플랫폼에 도달하는 시간이 스코폴라민 투여군에 비하여 유의적으로 감소하였으며(Fig. 5A) 실험 마지막 날인 5일째에 플랫폼을 제거한 후 진행된 기억검사(retention trial)에서도 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간이 스코폴라민 투여군에 비하여 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5B).

선행된 연구결과에 참고에 따르면 기억력 장애와 癡呆의 치료를 위해 현재까지 개발된 기억력 개선 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체 (acetylcholine precursor), 수용체 활성화제 (Receptor agonist), 아세틸콜린분해 억제제 (Acetylcholine esterase inhibitor) 등이 있으나 효과가 미약하고 심각한 부작용 및 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다<sup>11-12</sup>. 확실한 치료나 예방에 효능 있는 약물이 개발되지 못하고 있는 현재 상황에 대응하기 위하여 천연물을 이용한 연구의 필요성은 점차 높아지고 있으며, 최근 기억력의 개선에 관한 천연물을 이용한 아세틸콜린 분해효소 관련 연구 동향은 고분, 산사 추출물을 이용한 기억력 개선 및 인지능력 향상에 관한 연구<sup>13-14</sup>, 흑지마를 이용한 기억력 감퇴에 대한 개선 효과 및 증진 효과에 대한 연구<sup>15</sup> 등이 보고되어 있다. 본 연구에서도 UDE의 아세틸콜린 분해효소 억제실험을 진행한 결과 유의하게 활성 억제 효과를 확인하였으며 IC<sub>50</sub>값은 1.841 µg/mL로 나타났다(Fig. 6). 이 결과는 UDE가 기존 약물과 같이 아세틸콜린 분해효소 억제 효과를 통해 기억력 감퇴를 억제하는 것을 알 수 있었다.

활성산소는 세포의 신진대사 및 외인성 물질에 의해 세포 내에서 만들어지며 노화에 따라 활성산소도 증가한다<sup>16</sup>. 이런 현상과 관련하여 인간의 뇌는 에너지 요구량과 산소 소비량이 많으며 쉽게 과산화될 수 있는 고도 불포화지방산이 풍부하고 항산화제 및 관련 효소의 상대적 결핍으로 인해 산화적 불균형에 매우 민감하다고 알려져 있다<sup>17</sup>. 이렇게 증가한 활성산소는 두뇌에서 생체분자와 반응을 하며 신경 퇴행과 기억력 손상을 유발하게 된다<sup>18</sup>. 선행 연구결과에 따라 퇴행성 질환과 관련 있는 활성산소의 기억력 장애와 癡呆에 대한 영향을 조사하기 위하여 항산화 활성 실험을 진행하였다. 활성산소 제거 효능을 확인하는 방법은 안정된 자유 radical을 함유하는 DPPH 및 ABTS 분자는 항산화제의 radical 소거능을 평가하기 위해 가장 많이 사용된다<sup>19-20</sup>의 연구결과에 따라 DPPH와 ABTS radical 소거능 측정을 진행한 결과 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 7, Fig 8). 이외에도 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량도 gallic acid를 표준물질로 측정할 결과 UDE가 다량의 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다(Table 1.). 이러한 결과로 UDE의 항산화 효과를 확인할 수 있었고, 항산화의 효과가 활성산소를 억제하여 퇴행성 질환인 기억력과 癡呆의 개선 가능성을 찾을 수 있었다.

또한 항산화 기능 강화 이외에도 다양한 내인성 인자들에 의해 신경세포를 보호하여 癡呆를 치료하는 연구가 늘어나고 있다. 이러한 유전자 발현을 조절하는 신호 경로를 식별하는 것은 효과적인 약물의 개발을 위한 새로운 분자 표적을 발견할 수 있으며, 그중에서 CREB(c-AMP response element-binding protein)은 학습과 기억의 기초가 되는 필수 분자 대상으로서 장기기억과 시냅스 가소성을 위해서는 CREB에 의해

매개되는 유전자 발현이 중요하다. 이외에도 BDNF는 인산화된 CREB의 하류 표적 중 하나로, 시냅스 가소성과 인지능에 중요한 역할을 담당하며, 뇌에서 ERK-CREB-BDNF 신호 전달 경로의 활성화는 알츠하이머병과 같은 인지장애를 치료하는 잠재적인 치료 표적으로 알려져 있다<sup>21</sup>. 본 연구에서도 UDE의 ERK-CREB-BDNF 발현 여부를 확인한 결과 pCREB/CREB에서 스코폴라민 투여군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 9B). 그러나 ERK와 BDNF에서는 스코폴라민 투여군에 비해 증가하였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다(Fig 9A, Fig 9C).

이상의 결과를 통하여 UDE가 아세틸콜린 분해 효소 억제와 뇌 영양인자(CREB)의 증가 및 자유 라디칼 제거로 인한 항산화 작용을 통하여 스코폴라민으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선과 인지능력 개선 효과를 확인하였으며, 이러한 결과는 *U. davidiana*(榆根皮)가 항치매 소재로서의 가능성을 시사한다.

## V. 결 론

본 연구에서는 *U. davidiana*(榆根皮) 추출물의 기억력 개선에 대한 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. UDE의 세포독성을 확인하기 위하여 BV-2 세포 생존율에 미치는 영향 확인을 MTT assay로 진행한 결과, UDE 단독 처리 또는 LPS와 함께 처리한 모든 군에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 UDE가 BV-2 세포 생존율에 영향을 주지 못하는 것을 알 수 있었다.
2. 동물실험에서 단기 기억을 확인하는 Y-maze 시험을 시행한 결과, 스코폴라민을 투여한 그룹에서 정상군에 비교하여 변형행동력(spontaneous alternation)이 감소하였으며, 이에 반해 UDE는 스코폴라민으로 감소하였던 변형행동력이 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 감퇴된 단기 기억력이 회복되는 것을 알 수 있었다.
3. 수동회피 및 수중 미로 실험에서도 UDE가 스코폴라민으로 유도된 기억력 감퇴를 유의적으로 개선하는 것을 확인할 수 있었다.
4. UDE가 아세틸콜린 신경계와 연관이 있는지 확인하기 위하여 아세틸콜린 분해효소 억제실험을 진행한 결과 활성 억제 효과를 확인하였으며, UDE가 기존 약물과 같이 아세틸콜린에스테라아제 억제 효과를 통해 기억력 감퇴를 억제하는 것을 알 수 있었다.
5. 항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH와 ABTS radical 소거능과 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과 UDE의 농도가 증가함에 따라 DPPH와 ABTS radical 소거 활성도가 증가하는 것을 확인할 수

있었으며, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 총량도 gallic acid를 표준물질로 측정 한 결과 UDE가 다량의 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다.

6. UDE의 뇌 영양인자 ERK-CREB-BDNF 발현 여부를 확인한 결과 CREB에서 스코폴라민 투여군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 ERK와 BDNF에서는 스코폴라민 투여군에 비해 증가하였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

이러한 결과는 *U. davidiana*(榆根皮) 추출물이 기억력 개선 및 인지능력 회복에 치료 효과가 있음을 의미하며, 향후 *U. davidiana*(榆根皮)를 이용한 다양한 분석 및 활성 연구를 통하여 건강기능식품 및 의약품 개발에 사용될 수 있는 천연물 소재임을 시사하고 있다.

## References

1. Dr Ren Minghui. Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines, 2019; Foreword 5.
2. Healthcare Bigdata Hub 2019, 11, 15. URL <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfrnIntrsIlnsInfo.do>
3. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82(3):171-7.
4. Wang yingyan, Lu zhaolin. TCM internal medicine People's Medical Publishing House. 1999;322.
5. Wang yingyan, Lu zhaolin. TCM internal medicine People's Medical Publishing House. 1999;325-29.
6. Bu Il Seo, Ji Ha Par, Seong-Soo Roh Illustrated book of herbal plants in oriental medicine. 2011;355-58.
7. Park H, Hwang E, Choi G, Kim H, Park K, Sul J, Hwang Y, Choi GW, Kim BI, Park H, Maeng S, Park J. Sulforaphane enhances long-term potentiation and ameliorate scopolamine-induced memory impairment. *Physiol Behav.* 2021;238:113467.
8. Ellman, G. L. Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem, Pharmacol.* 1961;7:88.
9. Zhou ZhongYing, CaiGan Traditional Chinese Medicine2, People's Medical Publishing House, 2008; 227-28.
10. YinHuiHe, TongYao TCMBasicSciences2, People's Medical Publishing House, 2006;310-11.
11. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol.* 1997;74(3): 225-4.
12. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. *J Neural Transm Suppl.* 2000;59:231-42.
13. Sa Rang Oh, Ji Wook Jung. The Root of *Angelica tenuissima* Nakai ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine *Journal of Oriental Medicine Industry* 2009; Vol.1, No.1:1-11.
14. Wang ShuBin, Ahn Enn Mi, Jung Ji Wook The Fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates Learning and Memory Impairments Induced by Scopolamine *The Korea Association Of Herbology* 2009;24(4): 165-71.
15. Kim Dong-Hyun, Se Jin Park, Jung Ji Wook, Ryu Jong Hoon. Memory Enhancing Properties of the Ethanolic Extract of Black Sesame and its Ameliorating Properties on Memory Impairments in Mice *The Korean Society Of Pharmacognosy* 2010; 41(3):9-19, 196-03.
16. Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. *Zingiber officinale* mitigates brain damage and improves memory impairment in focal cerebral ischemic rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;429505.
17. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:759-67.
18. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys.* 2009;46: 9-15.
19. Blois MS. Antioxidants determination by the use of stable free radical. *Nature.* 1958;4617:119-00.
20. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A study of Antioxidant and Hypoglycemic Activities of *Omiija* (*Schizandra chinensis* Baillon) Extract under Variable Extract Conditions. *Korean J Food Nutr.* 2009;22(1):41-7.
21. Amidfar M, Oliveira JD, Ewa Kucharska E, Josiane Budni J, Kim Y. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2020;257:118020