동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):125-144

장뇌삼 잎 추출물의 분획물이 Scopolamine으로 유도된 Mouse의 기억력 개선에 미치는 영향

김주봉, 김수현, 박선영, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과 교실

Effects of Korean Mountain Ginseng Leaves and Its Active Constituents on Scopolamine-induced Amnesia in Mouse

Ju-Bong Kim, Soo-Hyun Kim, Sun-Young Park, Dae-Kyoo Chung

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Hanny University

Abstract

Objectives :
The purpose of this study was to characterize the effect of the fraction of Korean mountain ginseng folium (FKG) on the learning and memory impairments induced by scopolamine.

Methods :
The memory ameliorating effect of FKG was investigated using a passive avoidance test, the Y-maze test, and the Morris water maze test in mice. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (1 mg/kg, i.p.).

Results :
FKG (2 or 4 mg/kg, p.o.) administration significantly reversed scopolamine-induced cognitive impairments in mice by the passive avoidance test and the Y-maze test (P<0.05), and also improved escape latency in the Morris water maze test at 2 or 4 mg/kg (P<0.05). Although FKG has little inhibitory activity for AChE (IC50 value: 1847 μg/ml) in an invitro study, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) was increased by the administration of FKG in hippocampus on immunohistochemistry.

Conclusions :
These results suggest that FKG may be a useful cognitive impairment treatment, and its beneficial effects are mediated, in part, via activation of ERK pathway.

Key Words :
Korean Mountain Ginseng, Memory, Extracellular signal-regulated kinase, Scopolamine, Acetylcholine esterase activity, Immunihistochemistry

투고 : 2010. 1. 20. 수정 : 2010. 3. 4. 채택 : 2010. 3. 8.
교신저자 : 정대규, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대 부속 대구한방병원
Tel) 053-770-2176, Fax) 053-770-2169, E-mail) 83baby@hanmail.net
이 논문은 2010년 2월 대구한의대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

현대사회의 급격한 발달에 따라 획득해야 할 정보의 양이 증가하면서 학습량이 많은 청소년층 및 청장년층에서의 뇌기능 활성화의 필요성이 많이 요구되고 있는 실정이다. 또한 고령화에 따른 기억력 감퇴증상도 증가하고 있다. 그리고 치매와 같은 퇴행성 질병에 이환된 환자에 있어서는 사회생활 가능 여부에 있어서 기억력 저하가 매우 중요한 요소이다[1].

지금까지 알츠하이머형 치매의 경우 뇌 cholinergic 신경세포의 광범위한 변성 및 소실이 인지능 감퇴의 주요 원인으로 생각되어, 남아 있는 cholinergic 신경계의 활성을 증가시켜 손상된 인지능을 부분적으로나마 회복시킬 수 있는 약물들에 관한 연구가 주로 진행되어 왔으나 아직까지 효과적인 약물은 부족한 상태이다[2,3].

한의학에서 기억력 장애 즉 치매는 健忘에 해당되며 善忘, 多忘, 好忘, 遺忘, 遂忘 등으로 불려 왔다. 또한 치매를 呆病이나 健忘에 근거하여 辨證施治하고 있는데 크게 肝腎陰虛, 心脾兩虛, 腎精虧虛, 脾腎陽虛 등의 虛症과 痰迷心竅, 瘀血內阻등의 實症으로 구분하여 치료한다[4]. 健忘은 記憶力障碍, 遇事易忘하는 病症을 말하며 임상적으로 遇事有時無終, 言語不知首尾 등이 주된 특징이다[5].

최근에는 치매에 대하여 心·脾·肝·腎의 虛症증상, 痰飮으로 인한 순환장애, 氣血의 순환장애 등으로 인한 痴呆로 분류하고 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 박 등[6]은 滋陰·補腎의 대표적인 처방인 六味地黃湯을 투여하여 임상에서 기억력이 향상됨을 보고하였으며, 최근 일본에서는 유전자 마우스를 이용한 알츠하이머 모델에서 抑肝散의 항 치매효과가 보고 된 바 있다[7].

장뇌삼은 인삼(*Panax ginseng* C.A Meyer)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 산삼의 씨앗이나 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 삼을 말한다. 그 효능은 간기능 활성화, 혈당 강하, 암세포 성장억제 작용 등이 있고 중추신경에 대한 자극 및 진정 효과로 학습능력과 기억력 촉진, 스트레스와 피로해소 효과 등으로 매우 다양하게 알려져 있다[8,9]. 한의학적으로 장뇌삼 잎은 맛이 쓰고(苦) 성질이 차며(寒), 淸肺, 生津, 止渴의 효능이 있다[10].

장뇌삼에 대한 연구로는 장뇌산삼 및 인삼의 항암효과에 대한 비교연구[11], 생리활성물질 비교 및 세포배양 연구, 페놀성 성분 비교 연구[12], 유리아미노산 비교[13] 등이 있다. 인삼 생산과정에서 부산물로 나오는 인삼의 잎과 줄기 등에 관한 연구는 대부분이 잎과 줄기 각각에 대한 ginsenoside 및 영양성분 분석에 관한 보고 등이 있으나 장뇌삼 잎을 이용하여 기억력감퇴 모델을 이용한 기억력 개선효과에 대한 연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 장뇌삼 잎 추출물의 분획물(fraction of Korean mountain ginseng leaves, FKG)의 기억력 개선효과에 대하여 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 모델을 이용하여 수동회피시험(passive avoidance test)과 Morris 수중미로장치시험(Morris water maze test)을 통해 확인하였고, 아세틸콜린 분해효소(Acetylcholine esterase, AChE) 실험 및 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통하여 FKG의 작용기전을 확인하고자 실험을 실시하여 기억력 개선효과에 관한 다음과 같은 결론을 얻어 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse(SPF/VAF CrljBgi : CD-1) 5주령을 주식회사 오리엔트 (경기도, 한국)에서 공급받아 사용한 것이었다. 실험동물을 대구한의대 동물실에서 7일간 적응 시킨 후 정상군(normal group), 대조군(Control Group) 및 장뇌삼잎 분획군(sample group)으로 구분하였다. 실험동물은 온도 23 ± 3℃, 습도 50 ± 10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육되었으며, 적응기간 동안 사료와 물이 제한 없이 공급되었다.

2) 시료의 준비

본 실험에 사용한 장뇌삼 잎은 (주) 어인마니(경북, 한국)에서 구입한 4년근 이상 된 잎으로 정선되어 사용하였다. 장뇌삼 잎을 증류수로 2회 세척한 뒤 70% 에탄올을 장뇌삼 잎의 10배 부피만큼 가한 후 3회 초음파 추출하였다. 이를 감압 증류장치로 농축하고 이를 다시 동결건조한 뒤 얻어진 붉은색 분말을 실험에 사용하였다(수득률 7.2%). 다음 단계로 추출물에 대한 효능평가를 위하여 용매분획별로 분획을 실시하였다. 용매분획을 통하여 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH 및 H_2O층으로 각각 극성 별로 분리하였다. 이 중에서 효과가 우수한 EtOAc층을 $CHCl_3$와 MeOH로 Gradient 용리시켜 화합물을 분리시킨 후 6개의 분획물을 얻어 시료로 사용하였다.

3) 시험물질

본 실험에 사용한 tacrine(9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), (-) scopolamine hydrobromide, acetylthiocholine iodide and DTNB (5, 5′-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]), Tween80 (Polyethylene glycol sorbitan monooleate), Sodium chloride는 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 polyclonal rabbit anti-brain-derived neurotrophic factor(BDNF) 및 polyclonal rabbit anti-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase(pERK), polyclonal phosphorylated cAMP respond element binding protein(pCREB) antibody는 산타크루즈(Santa cruz, USA)에서 구입하였다. 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

4) 시험장치

본 실험에 사용한 시험 장치는 아래와 같다.

Evaporator(Eyela, SB-1000, Japan)

Freezing Dryer(Eyela, FDU-2000, Japan)

Ethovision system(Noldus, Wageningen, Netherlands)

- Morris water maze system(Scitech, Korea)
- Y-maze system(Scitech, Korea)

UV/VIS spectrophotometer(Jasco V-530, Japan)

Sonicator(Hwashin 410/510, Korea)

Water bath(Vision Scientific, Korea)

Active / Passive Avoidance System(Gemini, San Diego, USA)

Optical microscope(Leica, DM-2500, Germany)

Microscope camera(Leica, DFC-295, Germany)

Obital shaker(Dai Han Sci, SHO-2D, Korea)

2. 방법

1) 검액의 조제

장뇌삼 잎 추출물의 효능을 바탕으로 활성성분에 대한 탐색을 실시하였다. 신선한 장뇌삼 잎

717 g에 6 L EtOH을 첨가하여 실온에서 24시간 동안 침지추출을 3회 반복한 후, Whatman No.1 여과지로 여과하고, 감압농축기를 이용하여 40℃ 이하에서 농축하여 31.68 g의 분말시료를 얻었다. 농축된 결과물 3.9 g을 물에 희석시킨 뒤 동량의 유기용매(n-Hexane, EtOAc, n-BuOH 등)를 이용한 Liquid-Liquid Partition을 수행해 n-Hexane층 0.17 g, EtOAc층 8.8 g, n-BuOH층 1.4 g, H_2O층 1.4 g을 각각 극성 별로 분리하였다(Fig. 1).

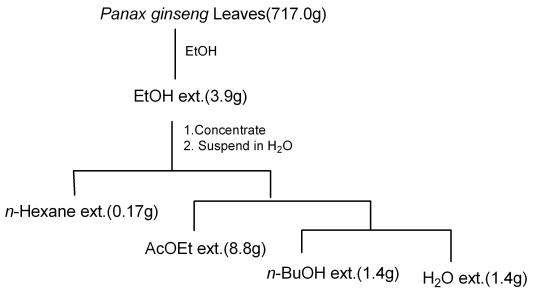


Fig. 1. Procedure for separation of *Panax ginseng* leaves.

1차 분획물의 *in vitro* 및 *in vivo*계 실험을 통한 활성이 가장 우수한 물질을 확인한 후 2차 분획을 검색하였다. 활성을 나타낸 EtOAc 분획물의 일부 4.38 g을 Kiesel 60(C-18, 0.063~0.2 mesh, 1.8 i.d.×41 cm) 겔에 흡착시키고 $CHCl_3$와 MeOH를 Gradient 용리시켜 F1(0.48 g), F2(2.42 g), F3(0.92 g), F4(0.16 g), F5(0.08 g), F6(0.31 g)을 수득했다. 각 추출물은 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다(Fig. 2).

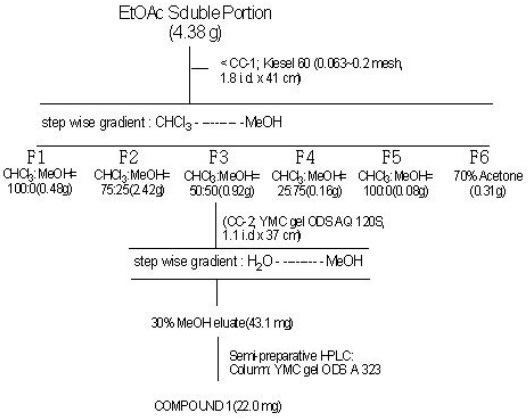


Fig. 2. Isolation procedure of the EtOAc soluble portion from *P. ginseng* leaves.

2) 수동회피시험(Passive avoidance test)

(1) 조건회피반응장치

조건회피반응장치는 shuttle box(52.6 × 17.3 ×21.3 cm)로 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 guillotine door(8.9 × 8.9 cm)가 설치되어 있어 자동으로 상하로 열고 닫을 수 있게 되어 있다. 우측 방에는 매우 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였다. 좌측 방에는 빛이 전혀 들어오지 않게 하여 실험동물이 상대적으로 편안함을 느끼게 하였다.

(2) 실험동물군의 분류

실험동물은 각 군 당 10마리씩 실험을 진행하였다. 투여용량은 각 물질의 수득율에 따라 조절하였다.

① 대조군

정상상태의 mouse에게 10% Tween80을 경구로 투여한 후 학습 및 기억검사를 실시하였다.

② 음성대조군

정상상태의 mouse에게 학습시험을 실시하기 1시간 전에 10 % Tween80을 경구투여하였으며 학습시험을 실시하기 30분 전 증류수에 녹인 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강투여하여 학습시험을 시행하였다. 학습시험 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 기억검사를 실시하였다.

③ 양성대조군

정상상태의 mouse에게 학습시험을 실시하기 1시간 전에 tacrine (THA, 10 mg/kg)을 경구투여하였으며 학습시험을 실시하기 30분 전 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강투여하여 학습시험을 시행하였다. 학습시험 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 기억검사를 실시하였다.

④ FKG 투여군

정상상태의 mouse에게 학습시험을 실시하기 1시간 전에 FKG를 용량별로 경구투여하였으며 학습시험을 실시하기 30분 전 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강투여하여 학습시험을 시행하였다. 학습시험 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 기억검사를 실시하였다.

(3) 수동회피시험

실험은 LeDoux[14]의 방법을 응용하여 시행하였다.

실험 시작 1시간 전에 mouse를 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다.

① 학습시험(training trial)

왕복상자의 우측 방에 불을 켜고 mouse의 머리가 gillotin door의 반대쪽으로 향하게 살며시 내려놓는다. mouse를 10초간 탐색시킨 후 gillotin door를 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. mouse는 방을 탐색하다가 본능적으로 어두운 좌측 방으로 이동하게 되는데, 이때 gillotin door가 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외시켰다. 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 gillotin door가 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 된다. gillotin door가 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다.

② 기억검사(test trial)

기억검사는 학습시험이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 장뇌삼잎 분획물의 효과를 확인하고자 실시하였다. mouse를 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 gillotin door가 열리고 어두운 쪽으로 mouse의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 180초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다.

3) Morris 수중미로 (Morris water maze) 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

Morris water maze를 통한 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있다. 본 maze의 제원은 지름 90 cm, 높이 45 cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6 cm로 구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다.

실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30 cm가

되도록 물을 채우고 mouse가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1 cm 밑에 설치하였다. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 4분원이 되도록 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서 (SW)로 구분하였고, maze의 한 4분원에 플랫폼을 설치하였다. Morris water maze test는 6일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 mouse들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1분간 maze 안에서 자유로이 수영하도록 하고, 이때 플랫폼은 설치하지 않았으며, 두 번째 날부터 5일 째 되는 날까지는 하루에 각각의 mouse가 1일 4회씩 10분 간격으로 1분 동안 maze에서 수영하도록 하였다. 두 번째 되는 날부터 5일 째가 되는 4일간 1회의 실험방법은 이미 maze 안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 mouse는 실험을 마치고 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 mouse는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하며, 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6일 째 되는 날에는 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있던 분원에 mouse가 머문 시간을 측정하였다.

건망증 유발 물질로는 scopolamine을 사용하며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30분전에 1 mg/kg로 복강으로 투여하였으며, 대조군 및 F3 분획 투여군은 각각 10% tween 및 F3 분획 2 mg/kg 용량으로 경구 투여하였다. 4일 동안 투여 후 마지막 5일째에는 시간은 최대 60초를 주고, 약물 투여는 하지 않는다. 모든 실험 data는 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

4) Y-미로시험(Y-maze test)

약물 투여는 수동회피시험에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로시험에 이용되는 기구는 3개의 arm으로 구성되어 있으며 각 arm의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 arm이 접하는 각도는 120 °였다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학식에 의해 계산된다.

변경 행동력(%)

= 실제변경(actual alternation) / 최고변경(maximum alternation) X 100

(최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

5) 면역조직화학법(Immunihistochemistry)

Mouse를 pentobarbital sodium(60 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 만든 4% paraformaldehyde(PFA) 용액을 심장을 통해 관류시켜 고정하였다. 관류고정 끝난 후 뇌를 적출하여 PFA 용액에 넣어 overnight 시킨 후 0.05 M phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 만든 30% sucrose 용액에 넣어 48시간 동안 냉장 보관하였다. 뇌를 저온유지장치가 장착된 두정 절편기로 30 μm 두께의 뇌절편을 작성하였다. 뇌절편을 24시간 동안 pERK 또는 pCREB, BDNF antibody(1:1000, Santa cruz, USA), 0.3% Triton X-100, 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 1.5% normal horse 혈장이 함유된 PBS(4℃)에서 overnight으로 incubating 하였다. 그 다음 이차항체용액(Vector, Burlingame,

USA)을 1:200으로 희석시켜 만든 용액에 90분 동안 incubation 시키고, avidin-biotin-peroxidase complex(1:100 Vector, Burlingame, USA) 혼합액에 상온에서 1시간 동안 incubation 시켰다. 마지막으로 뇌절편을 PBS 용액에 5분 동안 3회 세척한 후 고정 및 탈수의 과정을 거쳐 봉입하였다.

6) 아세틸콜린 분해효소 억제 확성 측정 (AChE inhibition assay)

AChE 억제 확성 측정은 Ellman 등이 서술한 바와 같이 acetylcholine iodide를 기제로 사용해 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였다[15].

AChE의 제조는 Teflon homogenizer(Eyela, Japan)를 이용해 mouse의 대뇌피질을 분리하여 10배의 인산완충용액(400 mM NaCl를 포함한 12.5 mM 인산완충용액, pH 7.0)을 첨가하고 조직그라인더(Potter-Elvehjem Tissue Grinders, DaiHan, Korea)로 대뇌피질을 분쇄하여 균질액을 1,000 ×g로 10분간 4℃에서 원심분리 후 상등액을 수득하여 그 상등액을 AChE의 시료로 사용하였다.

FKG를 각 농도별로 인산완충용액(100 mM, sodium phosphate buffer, pH 8.0)으로 200 μg/ml의 농도가 되도록 희석하고 희석한 검색 대상 물질 1.5 ml, 완충용액 2.6 ml, 75 mM acetylthiocholine iodide 용액 20 μl 및 Ellman 시약(buffered Ellman's reagent: 10 mM DTNB(5.5'-dithiobis-bis (2-nitrobenzoic acid)) 및 15 mM $NaHCO_3$로 구성된 용액) 100 μl를 혼합하여 25℃에서 30분간 반응시킨다. 그 후 이 용액에 400 μl의 enzyme source를 가하고 5분 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다(Optizen 2120UV, Mecasys Co. Ltd., Korea). 이때, 대조군으로는 AChE시료를 첨가하지 않고 대신에 saline을 첨가한 반응액을 사용하며 또한, acetylthiocholine iodide를 첨가하지 않고 반응시켜 흡광도를 측정함으로써, FKG와 효소활성 측정용 시약 사이의 비특이적 반응은 일어나지 않음을 확인하고, FKG를 첨가하지 않은 반응액의 AChE 활성도를 100%로 하였을 때 각 검색 대상 물질을 첨가한 반응액의 AChE 활성 저해도를 확인하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. FKG의 수동회피시험에서의 효과

1) EtOAc 분획의 수동회피시험

Scopolamine을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 EtOAc 분획 10, 50, 100 및 200 mg/kg의 경구 단회투여에 의하여 추출물이 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정장치를 이용하여 확인하였다.

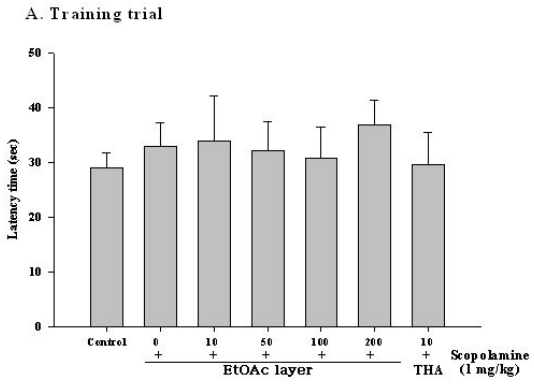
Scopolamine의 투여에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 scopolamine그룹은 기억시험에서 latency time이 32.13 ± 2.54초로 control 그룹의 149.12 ± 11.41초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다($P < 0.05$). 이는 학습시험시의 전기 충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 scopolamine에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각된다.

반면에 EtOAc 분획을 10, 50, 100 및 200 mg/kg로 단회 투여한 결과 각각 67.13 ± 5.62초, 63.63 ± 8.17초, 114.50 ± 14.92초 및 145.50 ± 11.66초로 scopolamine 그룹의 32.13 ± 2.54초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였으며, 특히 200 mg/kg의 용량에서 대조군의 97.3% 수준으로 회복하는 것을 확인하였다($P < 0.05$, Table Ⅰ, Fig. 3B). 뿐만 아니라 양성 대조군으로 사용한 THA 대조군의 65.1% 수준의 latency time을 보여준 것에 비해 훨씬 높은 개선효과를 나타내었다.

Table Ⅰ. Effect of a Single Administration of EtOAc layer Scopolamine-induced Memory Deficits in the Passive Avoidance Test in Mice

Group	Dose	Tranining trial	Test trial
		Latency time(sec)	
Control		29.00 ± 2.82	149.12 ± 11.41
Scopolamine	1	33.00 ± 4.37	32.13 ± 2.54*
EtOAc layer	10	34.00 ± 8.14	67.13 ± 5.62
	50	32.25 ± 5.21	63.63 ± 8.17
	100	30.75 ± 5.78	114.25 ± 14.92†
	200	36.88 ± 4.60	145.50 ± 11.66†
Tacrine	10	29.63 ± 5.89	96.75 ± 17.55†

Data represent means ± S.E.M(N = 10).
*$P < 0.05$ as compared with the control group,
†$P < 0.05$ as compared with the scopolamine-treated group.



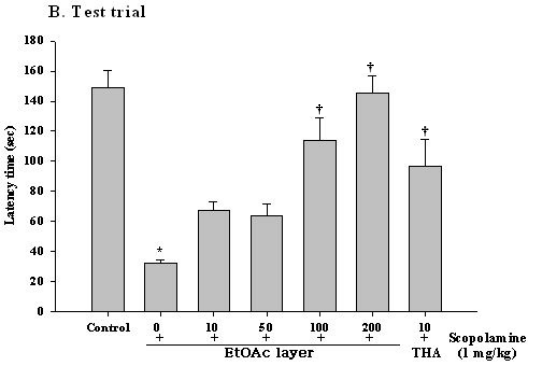


Fig. 3. Effect of a single administration of EtOAc layer(10, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice.
A : latency time of training trial, B : latency time of test trial. Data represent means ± S.E.M(N = 10). Sco; scopolamine(1 mg/kg, i.p.), THA; tacrine (10 mg/kg, p.o.). *$P < 0.05$ as compared with the control group, †$P < 0.05$ as compared with the scopolamine-treated group.

2) BuOH 분획의 수동회피시험

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 BuOH 분획 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg의 경구 단회투여에 의하여 추출물이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정장치를 이용하여 확인하였다.

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 scopolamine 그룹은 기억시험에서 latency time이 54.25 ± 16.95초로 control 그룹의 161.00 ± 5.01초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였으나($P < 0.05$), BuOH 분획을 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg로 단회 투여한 결과 양성대조군의 tacrine의 경우 기억시험에서 latency time이 110.75 ± 15.62초로 scopolamine을 투여한 그룹의 54.25 ± 16.95초와 비교하여 유의성 있게 증가하였지만 BuOH 분획의 경우에는 유의성 있는 결과가 나타나지 않았다(Table Ⅱ, Fig. 4B). 이러한 결과를 통하여

EtOAc 분획에서 유효성분이 있을 거라 판단되어 계속 분리를 진행하였다.

Table Ⅱ. Effect of a Single Administration of BuOH layer Scopolamine-induced Memory Deficits in the Passive Avoidance Test in Mice

Group	Dose	Tranining trial	Test trial
		Latency time(sec)	
Control		28.13 ± 2.75	161.00 ± 5.01
Scopolamine	1	35.25 ± 5.86	54.25 ± 16.95*
BuOH layer	2.5	38.35 ± 4.62	49.86 ± 19.00
	5	39.53 ± 3.26	65.13 ± 16.62
	10	40.38 ± 4.54	24.13 ± 4.37
	20	32.25 ± 5.49	27.75 ± 4.37
Tacrine	10	38.52 ± 3.52	110.75 ± 15.62†

Data represent means ± S.E.M(N = 10). *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

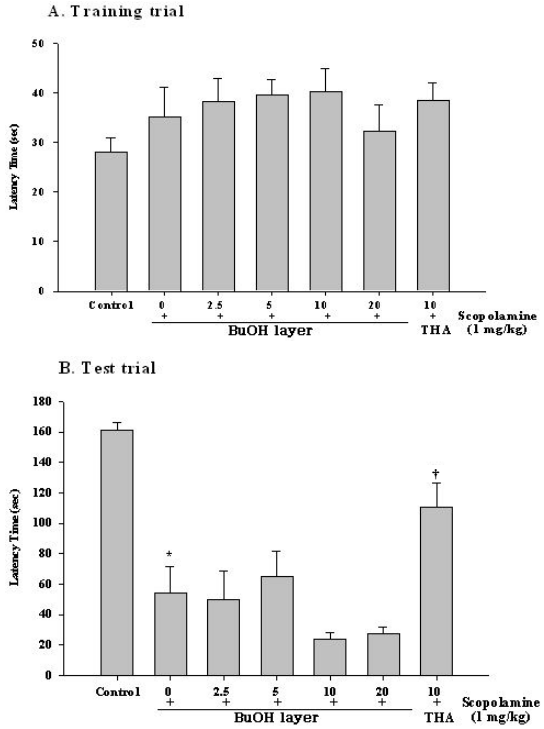


Fig. 4. Effect of a single administration of BuOH layer(2.5, 5, 10 and 20 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice.

A : latency time of training trial, B : latency time of test trial. Data represent means ± S.E.M(N = 10). Sco; scopolamine(1 mg/kg, i.p.), THA; tacrine(10 mg/kg, p.o.). *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

3) AChE의 저해활성 활성을 갖는 분획의 수동회피시험

EtOAc 분획물을 이용하여 AChE의 저해활성 측정 결과 F2와 F3 분획의 활성이 가장 우수하여 이 두 분획을 이용하여 수동회피시험을 실시하였다. 수득률을 기준으로 결정한 투여량으로 두 분획을 비교 실험한 결과, *in vitro*에서 F3 분획과 비슷한 활성을 나타내던 F2 분획은 수동회피실험에서 유의성 있는 결과를 나타내지 못하였다(Data not shown). 추가적으로 F3 분획을 용량의존적으로 실험한 결과, 2 및 4 mg/kg에서 각각 120.88 ± 21.07 및 136.63 ± 15.52초로 scopolamine 그룹의 17.88 ± 2.29초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였다(P < 0.05, Table Ⅲ, Fig. 5B).

Table Ⅲ. Effect of a Single Administration of F3 fraction Scopolamine-induced Memory Deficits in the Passive Avoidance Test in Mice

Group	Dose	Tranining trial	Test trial
		Latency time(sec)	
Control		15.00 ± 0.98	168.13 ± 8.24
Scopolamine	1	15.00 ± 1.85	17.86 ± 2.29*
F3 fraction	0.5	13.25 ± 1.83	45.50 ± 8.66
	1	13.88 ± 2.47	53.38 ± 8.41
	2	15.13 ± 2.47	120.88 ± 21.07†
	4	15.37 ± 3.21	136.63 ± 15.52†

Data represent means ± S.E.M(N = 10). *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

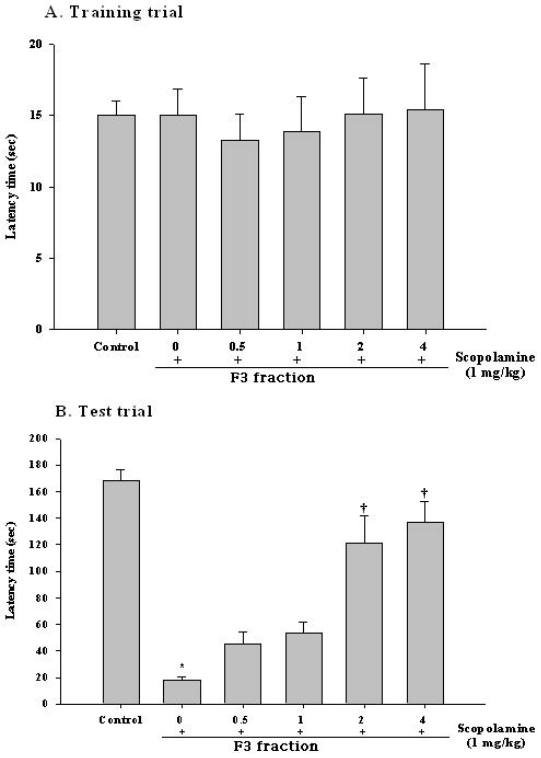


Fig. 5. Effect of a single administration of F3 fraction(0.5, 1, 2, and 4 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice.
Data represent means ± S.E.M(N = 10). *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

2. FKG의 Morris 수중미로 장치에 의한 학습 및 기억력 효과

F3 분획이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서 손상된 기억에 대한 개선 효과를 수동회피시험을 통하여 확인하였고, 공간 기억에 대한 F3 분획의 기억력 개선 효과를 확인하기 위하여 추가적으로 Morris water maze 실험을 실시하였다.

Morris water maze를 통한 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물의 스크리닝의 한 방법으로 많이 사용되고 있다.

1) Training trial of Morris Water Maze

Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제 1일째 control 군은 46.69 ± 2.88초, scopolamine 투여군은 55.75 ± 1.36초, scopolamine + F3 분획 2 mg/kg 투여군은 54.19 ± 2.20초, scopolamine + tacrine 투여군은 50.53 ± 3.16초로 각 집단간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 control 군은 14.84 ± 2.10초, scopolamine 투여군은 56.56 ± 1.40초, scopolamine + F3 분획 2 mg/kg 투여군은 19.59 ± 1.42초, scopolamine + tacrine 투여군은 33.81 ± 4.15초로 집단간 유의성($P < 0.05$) 있는 차이를 보였다. 이에 측정일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 scopolamine 투여군에서 control 군에 비해 학습능력이 저하되었다.

이에 비해 F3 분획 2 mg/kg 투여군에서는 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, 즉 3일째부터 플랫폼에 도달하는 소요시간이 scopolamine 투여군에 비해 통계적($P < 0.05$)으로 유의하게 감소하였다(Table Ⅳ, Fig. 6).

Table Ⅳ. Effects of F3 fraction in Morris Water Maze during 4 Days(Latency unit: sec)

Group (mg/kg)	N	1st day	2nd day	3rd day	4th day
Control	10	46.7±2.9	32.4±4.5	25.0±4.8	14.8±2.1
Scopolamine (1)	10	55.8±1.4	57.9±1.5*	56.9±1.1*	56.6±1.4*
F3 fraction(2)	10	54.2±2.2	37.2±4.5*	26.6±2.3†	19.6±1.4†
THA(10)	10	50.5±3.2	49.3±2.5	38.9±5.3†	33.8±4.2†

Each value represents the means ± S.E.M. of 10 mice. *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

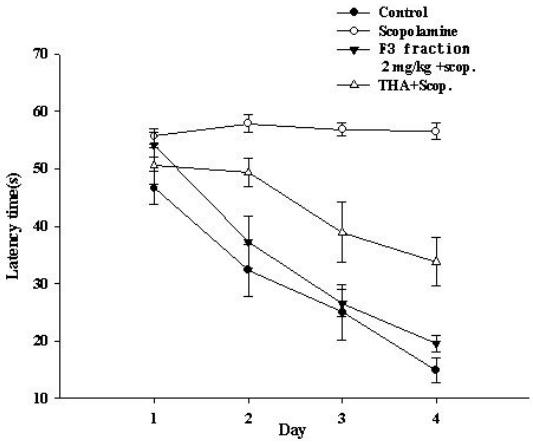


Fig. 6. Effect of F3 fraction on performance in the training trial sessions of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice. At 60 min before training trial session, F3 fraction(2 mg/kg, p.o.), tacrine(THA, 10mg/kg, p.o.) or Control (same volume of 10% tween 80) solution was administered to mice.

Memory impairment was induced by scopolamine treatment(1 mg/kg, i.p.). The training trial sessions were composed as described in the Materials and Methods. Data represent means ±S.E.M(n = 10). THA; tacrine, Scop.; scopolamine.

2) Retention Test of Morris Water Maze

Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 실시하고 이를 Ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였다. 각 군의 기억력 측정결과는 control 투여군은 24.09 ± 2.20초, scopolamine 투여군은 14.68 ± 2.04초, scopolamine + F3 분획 투여군은 25.25 ± 2.36초, scopolamine + tacrine 투여군은 23.38 ± 0.47초로 집단간 유의성($P < 0.05$) 있는 차이를 보였다. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, scopolamine 손상군은 control 군에 비해 유의한($P < 0.05$) 감소가 나타났고 F3 분획 투여군(scopolamine ± F3 분획) 2 mg/kg)에서 scopolamine 손상군에 비해 유의성($P < 0.05$) 있게 증가를 보였다 (Table Ⅴ, Fig. 7).

Table Ⅴ. Effects of F3 fraction on 5th day Retention in Morris Water Maze (Latency unit: sec)

Group(mg/kg)	N	Duration of 5th day Retention time(sec)
Control	10	24.1 ± 2.2
Scopolamine(1)	10	14.7 ± 2.0*
F3 fraction(2)	10	25.3 ± 2.4†
THA(10)	10	23.4 ± 0.5†

Each value represents the means ± S.E.M. of 10 mice. *$P < 0.05$ as compared with the control group, †$P < 0.05$ as compared with the scopolamine-treated group.

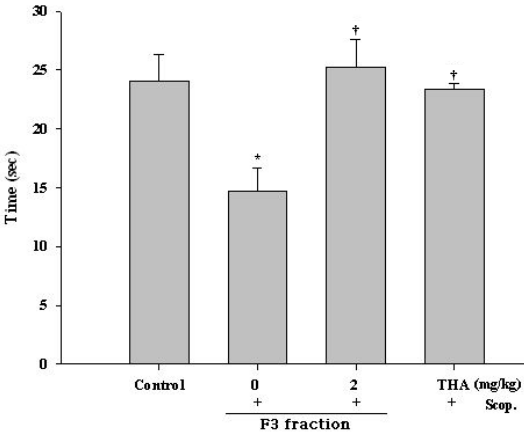


Fig. 7. Effect of F3 fraction on performance in the probe trial session of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice.

The the probe trial sessions were composed as described in the Materials and Methods. Data represent means ± S.E.M(n = 10). THA; tacrine, Scop.; scopolamine(*$P < 0.05$ versus control group, †$P < 0.05$ versus scopolamine-treated group).

3. FKG의 Y-미로시험(Y-maze test)에서의 효과

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의해 spontaneous alternation이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다($P < 0.05$). 반면

F3 분획 투여군에 의해 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$, Fig. 8A). Spontaneous alternation이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미한다. 반면 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 total entry에서는 변화가 없는 것으로 나타나 수동회피시험에서 확인하였듯이 spontaneous alternation이 mouse의 활동성 변화에 의해 나타난 것이 아님을 알 수 있었다(Fig. 8B).

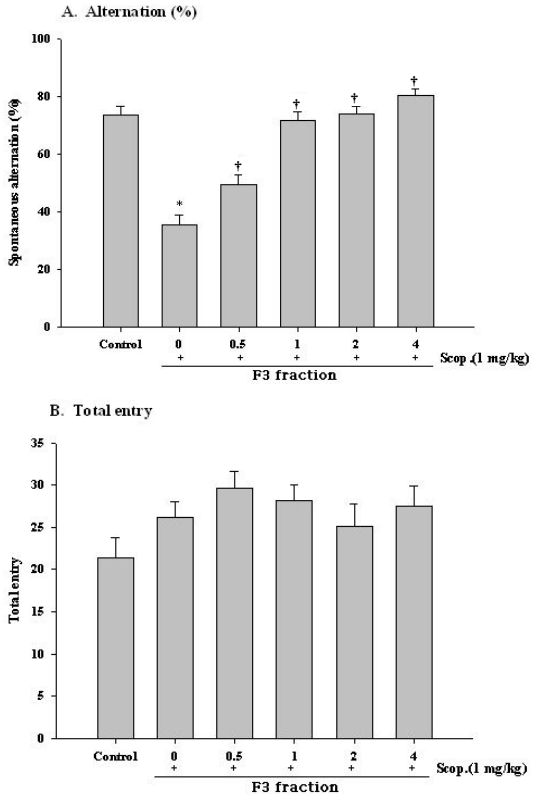


Fig. 8. Effect of a single administration of F3 fraction on scopolamine-induced memory deficits in Y-maze test in mice.
A : spontaneous alternation, B : total arm entry. Data represent means ± S.E.M(N = 10). *P < 0.05 as compared with the control group, †P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

4. 면역조직화학법(Immunihistochemistry)

FKG의 기억력 개선 효능에 대한 작용기전을 주요 신경계인 cholinergic 신경계 외에 학습 및 기억에 관련되는 pERK 및 pCREB, BDNF pathway를 확인하고자 하였다. Mouse hippocampus에서의 pERK 및 pCREB, BDNF의 발현 정도를 면역염색법으로 관찰한 결과, F3 분획 2 mg/kg 투여는 pCREB 및 BDNF의 발현에 영향을 미치지 못했으나, F3 분획 4 mg/kg의 투여에 의하여 hippocampus의 CA1 및 CA3, dentate gyrus 부분에서 pERK의 발현이 증가하였다. 특히 ERK pathway의 활성화는 학습 및 기억뿐만 아니라 synaptic plasticity 등, 신경의 기능에 매우 중요하게 관여하고 있으므로 FKG의 기억력 개선효과를 설명하는 중요한 열쇠로 보인다(Fig. 9).

5. FKG의 AChE 활성 측정 결과

FKG EtOAc 분획과 이의 Gradient 용리물인 F1 분획, F2 분획, F3 분획 및 F4 분획이 AChE의 활성을 억제하여 기억력 및 인지능력 개선작용이 있는지 확인하기 위하여 AChE 활성실험을 측정하였다. 실험 결과 양성대조군인 tacrine은 용량 의존적으로 AChE 활성을 억제하였으며 F2($CHCl_3$:MeOH=75:25) 및 F3($CHCl_3$:MeOH=50:50) 분획 용리액에서 활성 효과가 우수함을 알 수 있었다(Fig. 10).

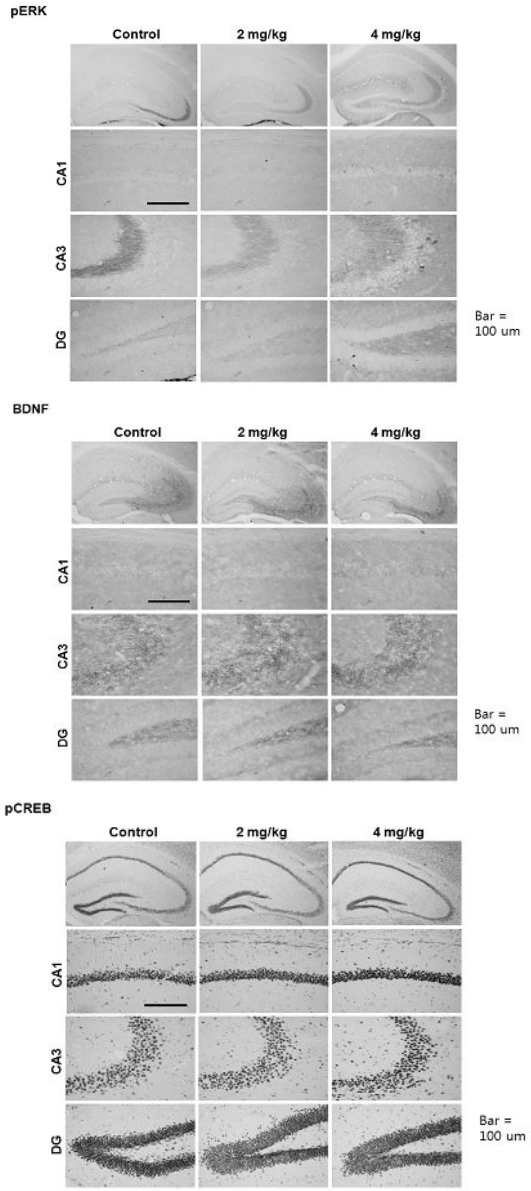


Fig. 9. Photomicrographs of brain-derived neurotrophic factor(BDNF), phosphorylated cAMP response element binding protein(pCREB) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase(pERK)-positive cells in the hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus region.

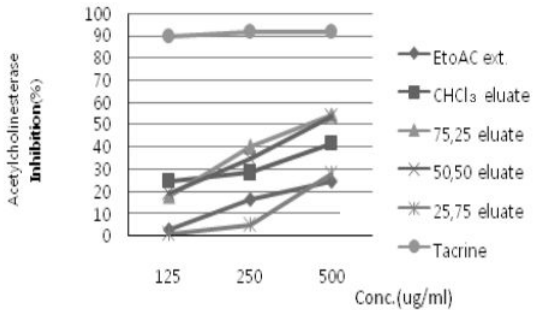


Fig. 10. Effects of FKG on the Acetylcholine esterase activity.
Inhibition efficacy was expressed as percent inhibition of enzyme activity compared to the control value(100%). Each value represent means ± S.E.M(n = 3).

Ⅳ. 고 찰

학습력과 기억력은 두뇌기능이 효과적으로 수행되고 있음을 나타내는 지표가 된다. 두뇌를 구성하고 있는 신경세포의 손상은 이러한 기능의 손상으로 연결되므로, 기능적 차원에서의 두뇌기능 개선방안은 뇌신경의 보호라는 차원에서도 중요한 의학적 가치를 갖는다. 또한 현대사회의 매우 급격한 발달과 다량의 정보 습득의 요구가 필요하게 되면서 학습량이 가장 큰 청소년층은 물론 왕성한 사회활동을 해야 하는 청장년층에서도 뇌기능의 효과적인 개선의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 상황이다[16,17].

치매의 경우를 예를 들면, 우리나라의 경우 2000년의 치매 환자 수가 28만 명 정도로 집계되었고, 이를 인구증가 예상치로 하여 향후 치매 환자를 추이 예상해 보면, 2015년에는 약 53만 명, 2020년에는 62만 명의 치매 환자가 발생할 것으로 예상된다. 한편, 국내의 사망원인을 살펴보면, 알츠하이머병으로 인한 사망률이 심혈관 질환, 악성종양, 그리고 뇌졸중에 이어 제 4위를

차지하고 있어 심각한 수준이다. 이러한 노령화로 인한 환자수의 증가는 치매치료제 시장의 규모가 커지는 것을 의미하며, 앞으로 치매와 관련된 다양한 치료법들이 개발될 것으로 예상 할 수 있으므로, 우리나라의 치매 치료제 시장은 점차적으로 확대될 것으로 예상된다[18].

치매는 인지기능과 정신기능이 감퇴되는 대표적인 기질성 정신 장애로서 행동장애, 기억장애 및 성격변화 등을 수반하는 복합적인 임상증후군이다. 국내에서는 그 발병률이 6.26 ~ 11.3%이고 그 중 알츠하이머형 치매는 4.17 ~ 5.3%, 혈관성 치매는 1.05 ~ 2.5%라는 보고가 있다[19]. 비록 노년층에서 많이 발생하지만 20대 또는 30대에서도 발생할 수 있으며 최근 10년 동안 발생률은 줄어들지 않고 있다. 현재 전 세계적으로는 2,400만 명 이상의 알츠하이머병 환자가 있고, 65세 이상 인구에서는 4-5세가 증가할 때마다 환자수가 2배씩 늘어나 85세 이상 노인의 경우 30%가 알츠하이머 치매 발병을 보인다고 알려져 있다[20,21].

기억의 각 단계에는 많은 뇌 부위와 신경계들이 관여하고 있다. 감각기관으로부터의 신호 유입이 여러 신경계를 통해 각각의 기억을 관장하는 부위로 모여 분자수준의 신호를 통해 비로소 기억이라는 형태로 저장된다[22]. 습득된 외부의 정보는 매우 불안정한 것(labile state)으로, 그것이 기억의 도출과정에서 재생되기 위해서는 기억의 강화라는 과정을 거쳐야 하는데 이 과정은 단백질과 RNA합성과 무관하면서 수 분에서 한 시간 정도 지속되는 단기기억과 단백질과 mRNA 합성에 의존하는 수 시간에서 수 일, 나아가 평생까지 이어지는 장기기억이 있다[23,24].

기억의 강화 과정에서의 여러 자극에 의해 기억이 손상받을 수도 있고, 기억이 증가할 수도 있다. 기억의 강화 과정에서는 많은 세포내 신호전달과정이 관여한다. 특히 세포의 핵 내에 존재하는 전사인자인 cAMP-responsive element binding protein(CREB)의 인산화 과정이 가장 중요하다고 알려져 있다. 따라서 CREB의 인산화에 관여하는 세포내 신호전달과정들, 특히 PKA(protein kinase A), ERKs(extracellular signal-regulated kinases), CaMKs(Ca2+/calmodulin kinases)들이 기억의 강화 과정에 필요하다고 알려져 있다.

기억의 장기 저장에 관여하는 실질적 인자는 CREB의 인산화에 의해 생산되는 c-fos와 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)라고 하지만 아직은 명확하지 않다[25,26]. 전기 자극 등의 자극 후에 발현되는 특정 시간대의 BDNF를 억제하였을 때 기억의 장기저장에 손상을 받는다는 사실과 이들을 발현하는 gene을 knock-out 시킨 동물 모델에서 기억의 저장 과정에 손상을 받는다는 사실이 보고되어 있다[27]. 이렇게 기억의 습득과정을 거쳐 들어온 신호가 강화과정을 거쳐 비로소 장기기억이라는 형태로 저장되는 것이다. 하지만 아직도 기억의 강화와 저장에 대한 여러 가지 가설과 의견이 분분한 상황이다.

기억력과 관련된 신경계는 cholinergic 신경계, glutamatergic 신경계, GABAergic 신경계, serotonergic 신경계, adrenergic 신경계 등이 알려져 있으나 특히 cholinergic 신경계가 주로 기억력과 관계가 있다고 알려져 있다[28,29]. Scopolamine은 cholinergic 신경의 subtype 중 하나인 무스카린 수용체(mAChR)를 차단하는 약물로 아세틸콜린의 양은 변화시키지 않고 시냅스 간극에서 아세틸콜린이 수용체에 결합하는 것을 방해한다. 이는 중추 신경계 cholinergic 신경의 손상에 의해 나타나는 현상과 유사한 기억력 감퇴를 나타내며 이 모델에서 효과가 있는 약물은 cholinergic 신경계를 경유하여 효능을 나타낼 것이라 생각할 수 있다[30]. 본 연구에서 FKG는 AChE에 대한 억제

작용이 매우 뛰어난 것으로 나타나 FKG의 기억력 활성 효능이 아세틸콜린의 분해 억제에 의한 cholinergic 신경 활성화에 의한 작용이라고 생각된다(Fig. 10).

현재까지 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성 전구체(acetylcholine precursor), 수용체활성제(Receptor agonist), 아세틸콜린분해억제제(AChE inhibitor) 등이 있으나 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다[31,32]. 국내외에서 현재 사용되고 있는 기억력 개선 치료제들은 증상개선을 위한 항콜린약물, 대사를 비특이적으로 항진시키는 대사항진약물, 혈액순환을 좋게 해주는 혈액순환개선제 등이 있으나 이들 약물의 효과는 일시적이며 이들 약물은 부교감신경자극을 통해 오심, 구토, 기관지 수축 등의 부작용을 나타내고 우울증, 불면증, 고혈압, 변비 등을 야기하기도 한다[33].

최근에는 우리나라의 경우 전통적으로 사용되어 온 한약재로부터 치매예방 및 기억력증진소재 개발에 관심이 집중되고 있고, 다양한 약물에서 그 가능성들이 점차적으로 보고되고 있다.

장뇌삼(Korean mountain ginseng)은 오가과(두릅나무과: Araliaceae)에 속하는 다년생 초목인 인삼(*Panax ginseng* C.A Meyer)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 재배한 삼을 말한다. 장뇌삼에 관한 효능은 간기능 활성화 작용, 혈당강하 작용, 암세포 성장억제, 고혈압환자의 혈압강하, 동맥경화 예방, 체내 면역기능 활성화, 빈혈 예방, 체내 신진대사 촉진, 중추신경에 대한 자극 및 진전 효과로 학습능력과 기억력 촉진, 스트레스와 피로해소 효과 등으로 매우 다양한 효과가 알려져 있다[8,9]. 한의학적으로 장뇌삼 잎은 맛이 쓰고(苦) 성질이 차며(寒), 淸肺, 生津, 止渴의 효능이 있다[10].

한의학에서 현대의학의 기억과 관련된 분야는 痴呆, 呆病, 健忘 등의 용어로 표현되고 있다. 치매와 관련하여 明代 張介賓[34]의 『景岳全書』에 痴呆와 유사한 '痴獃'라는 病名이 언급된 이후[35,36] 淸代의 『石室秘錄』[37], 『辨證奇門全書』[38] 등도 痴獃와 呆病의 病因病機와 症候에 관하여 설명하고 있으며 현대적 의미의 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease; AD)와 증상면에서 유사하다[39]. 특히 錢鏡湖의 『辨證奇聞』에서는 "呆病之始 必有其因 大約其始也 起於肝氣之鬱...", "呆病成於鬱"등 鬱症에서 呆病이 형성될 수 있음을 언급하였다[38]. 또, 明代 李中梓는 健忘에 대해 『醫宗必讀』에서 "接內經之原健忘俱責心腎不交..."라 하여 心腎不交를 주된 병리로 보았다[40].

치매의 치료에 있어서는 益氣活血, 調心補腎, 化痰開竅시키는 처방을 주로 사용하여 왔으며, 또한 이외에도 痴呆의 원인을 痰飮, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷으로 분류하여 割痰順氣, 塡精補髓, 滋補肝腎 등의 치법을 제시하고 있으나 사용하는 이러한 한약재들이 어떠한 작용기전을 가지고 있는지는 여전히 불분명하여 현대의학에서 배척당하고 있는 부분이 다소 있는 실정이다[41,42].

장뇌삼에 대한 연구로는 장뇌산삼 및 인삼의 항암효과에 대한 비교연구[11], 생리활성물질 비교 및 세포배양 연구, 페놀성 성분 비교 연구[12], 유리아미노산 비교[13] 등이 있다. 인삼 생산과정에서 부산물로 나오는 인삼의 잎과 줄기 등에 관한 연구는 대부분이 잎과 줄기 각각에 대한 ginsenoside 및 영양성분 분석에 관한 보고 등이 있으나 장뇌삼 잎을 이용하여 기억력감퇴 모델을 이용한 기억력 개선효과에 대한 연구는 접할 수 없다.

이에 본 연구에서는 FKG EtOAc 분획과 이의

Gradient 용리물인 F3 분획이 감퇴된 기억력을 개선시켜 줄 수 있는지를 밝히기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력감퇴 동물모델을 이용하여 passive avoidance test, morris water maze test 및 Y-maze test를 실시하였다.

실험동물에 전기충격을 가하여 전기자극을 기억하는 시간을 측정하는 방법으로 학습 및 기억능력을 측정하는 대표적인 행동실험방법인 수동회피시험에서 EtOAc 분획 및 F3 분획의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4). 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 생쥐의 수동회피시험에서 latency time이 길어졌다는 것은 FKG가 cholinergic 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억력과 인지기능감퇴 증상뿐만 아니라 치매질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각되어진다.

또한 공간의 학습과 기억을 검사하는 실험장치로 사용되는 morris 수중미로실험에서도 4일 동안 실시되는 획득시행에서 양성대조군인 tacrine 그룹과 비슷한 양상으로 공간인지능력의 향상이 관찰되었으며 마지막 날 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있는 분원에 머문 시간을 측정한 결과 FKG 및 tacrine 투여군 모두 대조군과 유사하게 학습 및 기억능력이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4, 5). 또한 Y-maze test에서도 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

이상의 결과 FKG EtOAc 분획 및 F3 분획의 경구 투여에 의해 효과적으로 기억력 및 공간지각능력을 개선시키고 향상시킬 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 실시한 기전 연구에서 FKG는 AChE에 대한 억제작용이 매우 뛰어난 것으로 나타나 FKG의 기억력 활성 효능이 아세틸콜린의 분해 억제에 의한 cholinergic 신경 활성화에 의한 작용이라고 생각된다. 이외에도 ERK pathway의 활성화는 학습 및 기억뿐만 아니라 synaptic plasticity 등 신경의 기능에 매우 중요하게 관여하고 있다. Berkeley 등은 해마 slice에 cholinergic agonist인 carbacho을 처리하였을 때 CA1 영역의 the pyramidal cells를 통하여 ERK activation이 증가함을 확인하였다[30]. 이는 본 연구에서 FKG에 의해 AChE가 저해되고 pERK가 증가되었다는 결과와 일치하는 것으로, FKG의 기억력 개선효과를 설명하는 중요한 열쇠임에 틀림없다. ERK와 mAChR 모두 학습 및 기억에 중요한 역할을 한다고 이미 잘 알려져 있다.

본 연구의 결과 scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 모델의 FKG EtOAc 분획과 이의 Gradient 용리물인 F3 분획 투여군에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과를 나타냄을 확인하였다.

수동회피시험에서 FKG EtOAc 분획 100 및 200 mg/kg 및 F3 분획 2 및 4 mg/kg를 투여한 결과 scopolamine 그룹에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었으며 수중미로실험에서도 F3 분획 4 mg/kg 투여군이 마지막 날인 6일째 기억검사를 시행한 결과 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간이 scopolamine 그룹에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다. 또한 Y-maze test에서도 F3 분획 투여군에 의해 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 향상된 것을 알 수 있었다. AChE 활성 측정 및 immunihistochemistry를 통하여 이러한 FKG의 기억력 개선 효능이 cholinergic 신경계와 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

결론적으로, FKG EtOAc 분획 및 F3 분획은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효능을 가지는 천연물이라고 생각되며, 이러한 작용이 특히 cholinergic 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다. 향후 장뇌삼 잎 추출물의 기억력 개선 작용의 평가를 위하여 다양한 활성성분에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어져야 할 필요성이 있다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

기억력 감퇴모델에서 장뇌삼 잎 및 활성성분의 기억력 개선효과에 관한 연구를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수동회피시험에서 EtOAc 분획을 단회 투여한 결과 200 mg/kg의 용량에서 양성 대조군으로 사용한 THA(tacrine; 10 mg/kg, p.o.)이 대조군의 65.1 % 수준의 latency time를 보여준 것에 비해 훨씬 높은 97.3 % 수준으로 개선효과를 나타내었다. 그러나 BuOH 분획은 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg로 단회 투여한 결과 FKG의 BuOH 분획의 경우에는 latency time 증가의 유의성 있는 결과가 나타나지 않았다. AChE 활성실험을 통하여 효능이 가장 우수한 F3 분획을 단회 투여한 결과 2 및 4 mg/kg에서 scopolamine 그룹에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였다.
2. Morris 수중미로 학습실험 결과 F3 분획 2 mg/kg에서는 학습수행에서 플랫폼에 도달하는 소요시간이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
   Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5 일째 기억검사를 시행한 결과 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
3. F3 분획이 Y-미로 시험(Y-maze test)에서의 실험결과 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
4. Mouse hippocampus에서의 pERK 및 pCREB, BDNF의 발현 정도를 면역염색법으로 관찰한 결과, F3 분획 투여는 pCREB 및 BDNF의 발현에 전혀 영향을 미치지 못 했으나, F3 분획 4 mg/kg의 투여에 의하여 hippocampus의 CA1 및 CA3, dentate gyrus 부분에서 pERK의 발현이 증가하였다.
5. EtOAc 분획과 이의 Gradient 용리물인 F1 분획, F2 분획, F3 분획 및 F4 분획중 AChE 활성실험을 측정한 결과 F2(CHCl3:MeOH= 75:25) 및 F3(CHCl3:MeOH=50:50) 분획에서 활성 효과가 우수함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 Scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 모델을 이용한 본 연구에서 EtOAc 분획과 이의 Gradient 용리물인 F3 분획 투여군에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 AChE 저해활성 측정 및 immunihistochemistry를 통하여 이러한 FKG의 기억력 개선 효능이 choloinergic 신경계와 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 오세관. 신경전달물질과 뇌질환. 서울:신일상사. 2005:345-64.

2. Aisen PS. Pharmacologic treatment options in Alzheimer's disease: optimizing disease management. J Am Acad Nurse Pract. 2005; Suppl:5-7.
3. Colombres M, Sagal JP, Inestrosa NC. An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds. Curr Pharm Des. 2004;10(25):3121-30.
4. 박순권, 이홍재, 김형택, 황의완. 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):19-35.
5. 대한한방신경정신과학회. 한방신경정신의학. 파주:집문당. 2006:125.
6. Park E, Kang M, Oh JW, Jung M, Park C, Cho C, Kim C, Ji S, Lee Y, Choi H, Kim H, Ko S, Shin M, Park S, Kim HT, Hong M, Bae H. Yukmijihwang-tang derivatives enhance cognitive processing in normal young adults: a double-blinded, placebo-controlled trial. Am J Chin Med. 2005;33(1):107-15.
7. Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y, Kase Y. Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. J Ethnopharmacol. 2009;122(1):157-62.
8. 김창민, 신민교, 이성순, 안덕균. 중약대사전. 서울:정담. 1997:3894-5.
9. Kim TH, Jeon SH, Hahn EJ, Paek KY, Park JK, Youn NY, Lee HL. Effects of tissue-cultured mountain ginseng(Panax ginseng CA Meyer) extract on male patients with erectile dysfunction. Asian J Androl. 2009;11(3):356-61.
10. Bae MJ, Kim SJ, Ye EJ, Nam HS, Park EM. Antioxidant Activity of Tea Made from Korean Mountain-Cultivated Ginseng Leaves and its Influence on Lipid Metabolism. Journal of the Korean society of dietary culture. 2009;24(1):77-83.
11. Kim SJ, Shin SS, Seo BI, Jee SY. Effect of Mountain Grown Ginseng Radix, Mountain Cultivated Ginseng Radix, and Cultivated Ginseng Radix on apoptosis of HL-60 cells. The Korea Journal of Herbology. 2004;19(2):41-50.
12. Yoo BS, Lee HJ, Byun SY. Differences in Phenolic Compounds between Korean Ginseng and Mountain Ginseng. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2000;15(2):120-4.
13. Lee HJ, Yoo BS, Byun SY. Differences in Free Amino Acids between Korean Ginsengs and Mountain Ginsengs. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2000;15(3):323-8.
14. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. Eur J Clin Invest. 1998;28(11):944-9.
15. Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. Phytomedicine. 2004;11(6):544-8.
16. Lockhart BP, Lestage PJ. Cognition enhancing or neuroprotective compounds for the treatment of cognitive disorders: why? when? which?. Exp Gerontol. 2003;38(1-2):119-28.
17. Simard M, van Reekum R. Memory assessment

in studies of cognition-enhancing drugs for Alzheimer's disease. Drugs Aging. 1999;14(3) :197-230.
18. Cummings JL. Cognitive and behavioral heterogeneity in Alzheimer's disease: seeking the neurobiological basis. Neurobiol Aging. 2000;21(6):845-61.
19. 조명재. 한국노인정신질환의 현황. 신경정신의학. 2002;41(5):760-1.
20. David D, Shelley JA. Neurobiology of Alzheimer's Disease. The United Kingdom :Oxford university press. 2007:2-36.
21. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Herbert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. JAMA. 1989;262(18) :2551-6.
22. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF -dependent phase in the hippocampus. Neuron. 2007;53(2):261-77.
23. McGaugh JL. Memory–a century of consolidation. Science. 2000;287(5451):248-51.
24. McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. Trends Pharmacol Sci. 2000;21(6):208-10.
25. Mizuno K, Giese KP. Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist?. J Pharmacol Sci. 2005; 98(3):191-7.
26. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. Learn Mem. 2000;7(5):333-40.
27. Bozdagi O, Rich E, Tronel S, Sadahiro M, Patterson K, Shapiro ML, Alberini CM, Huntley GW, Salton SR. The neurotrophin -inducible gene Vgf regulates hippocampal function and behavior through a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. J Neurosci. 2008;28(39):9857-69.
28. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta -analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Rev. 2003;41:268-87.
29. Blokland, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory. Brain Res. Brain Res Rev. 1995;21:285-300.
30. Nobili L, Sannita WG. Cholinergic modulation, visual function and Alzheimer's dementia. Vision Res. 1997;37(24):3559-71.
31. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. Jpn J Pharmacol. 1997; 74(3):225-41.
32. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. J Neural Transm Suppl. 2000;59 :231-42.
33. Bachurin SO. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. Med Res Rev. 2003;23(1):48-88.
34. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
35. 楊思澍, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全. 北京: 北京科學技術出版社. 1991:224-30, 814-6.

36. 宋美令, 尹暢烈. 노인치매의 치료에 관한 한의학적 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1997;6(11):37-75.
37. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
38. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
39. 許曉蓉. 淺淡老年痴呆證的證治. 浙江中醫學院學報. 1995;19(3):2.
40. 李中梓. 醫宗必讀. 上海:上海科學技術出版社. 1987:323-4.
41. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울:신일상사. 2005:29-32.
42. Chi JF, Niu JZ, Xu SQ, Li J, Wang JF, Liu JP. Treatment of Alzheimer disease: an evidence-based review. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2007;5(3):247-54.