감태(甘苔)에서 추출한 Dieckol 성분이 쥐의 인지능력에 미치는 영향

오재근^{1#}, 송기재¹, 지무엽¹, 윤진호^{2*}

1 : 한국체육대학교 스포츠의과학연구소, 2 : 극동대학교 사회체육학과

Effect of *Ecklonia cava* Extracts Supplementation on cognitive ability in mice

Jae-Keun Oh^{1#}, Ki-Jae Song¹, Mu-Yeop Ji¹, Jin-Ho Yoon^{2*}

1 : Institute of sports medicine and science, Korea National Sport Univ. Seoul, Republic of Korea

2 : Dept. of sports and Leisure Studies, Far East Univ. Chungbuk, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study aimed to investigate that dieckol - isolated from *Ecklonia cava* - supplementation can improve cognitive ability in mice.

Methods : 48-male mice(6 weeks old) were divided into four groups; High-Dieckol group(n=12), Low-Dieckol group(n=12), Placebo group(n=12), Control group(n=12) and they were administered orally 5 days per week for 4 weeks at the same time. We performed Morris water maze test, Passive avoidance test, Blood serotonin analysis. And there was examined on neurogenesis in dentate gyrus of hippocampus using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) to label proliferating cells.

Results : The results are as follows; As a Morris water maze results, Trial duration was significantly decreased in high dieckol group comparing to placebo group and control group. Distance to target was significantly decreased in high dieckol group and low dieckol group comparing to placebo group and control group. Mean speed was significantly low in high dieckol group comparing to low dieckol group, placebo group and control group. As a Passive avoidance test results, latency time was significantly long in high dieckol group comparing to low dieckol group, placebo group and control group. BrdU cell count was significantly high in high dieckol group comparing to low dieckol group, placebo group and control group.

Conclusions : As a conclusion, it is considered that dieckol supplementation might improve learning and cognitive ability.

Key words : *Ecklonia cava*, Dieckol, Cognitive ability

서론

현대사회의 급격한 의학의 발달로 우리나라 노인 인구는 빠르게 증가해 65세 이상 고령인구는 2010년(545만명)에 비해 2030년 2.3배(1,269만명), 2060년 3배(1,762만명)이상 증가할 것으로 전망된다¹⁾. 이러한 노령인구의 증가에 따라 노인성 질병이 늘고 있으며 이에 대한 대책도 다양하게 논의되고 있다. 노인성 질병 중에서도 가장 문제가 되고 있는 것은 인지장애인 치매(dementia)이다. 치매는 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의

대뇌기능 장애로 인해²⁾ 일상생활이나 사회생활을 하는데 어려움을 초래하는 상태를 말하는 것으로, 치매의 정의는 기억력을 포함하여 다른 인지기능 중 한 가지 이상의 장애가 있는 경우를 말한다³⁾. 치매의 유형으로는 알츠하이머 치매(50-60%), 뇌혈관성 치매(20-30%), 기타 질병이 혼재하는 혼합형 치매(10-30%)로 구분하고 있다⁴⁾. 가장 높은 비율을 차지하는 알츠하이머 치매는 베타-아밀로이드 plaque 축적, 유전자 이상 발현, 산화적 스트레스, free radical 생성, 단백질 합성 저해 등의 다양한 발생 기전이 보고되고 있으나, 기전이

*Corresponding author : Jin-Ho Yoon, Dept. of sports and Leisure Studies, Far East Univ
· Tel : +82-43-880-3233 · E-mail : tkd97@hanmail.net

#First author : Jae-Keun Oh, Institute of sports medicine and science, Korea National Sport Univ
· Tel : +82-2-410-6954 · E-mail : sportsomd@knsu.ac.kr
· Received : 21 October 2014 · Revised : 19 November 2014 · Accepted : 19 November 2014

복잡해 현재까지 정확한 기전이 밝혀 지지 않았다^{5,6)}. 현재까지 개발된 치매인지능력 개선 약물들에는 아세틸콜린분해 억제제(Acetylcholine esterase inhibitor, AchEI), 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor), 수용체 활성화제(Receptor agonist) 등이 있으나, 이들 약물은 인지 기능의 개선과 함께 장기간 복용 시 간독성 등 심각한 부작용 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많다^{8,9)}. 따라서 천연물을 이용해 부작용이 적고, 효능이 뛰어나며, 원인적인 치료(뇌병변개선)가 가능한 새로운 기억력 개선 및 치매 치료제를 찾아내고 효과를 입증하여 개발하는 노력이 절실히 요구되고 있다^{10,11)}.

감태(甘苔)는 한의학에서 청화열담(淸火熱痰)약에 속하며 연건산결(軟堅散結)하고 이수소종(利水消腫)의 효능이 있어 영류(癭瘤)와 나력(癰癤), 수종장만(水腫脹滿)과 습열각기(濕熱脚氣) 등의 증상을 치료한다¹²⁾. 해조류 중 감태(甘苔)가 속한 갈조류는 복합다당류를 함유 하고 있을 뿐만 아니라 각종 미네랄과 비타민 및 단백질 등이 풍부하게 함유되어 있고 항암, 항산화, 항염증, 고지혈증 및 고혈압 예방 등 다양한 생리적 효능을 지니고 있다¹³⁻¹⁷⁾. 최근 감태 추출물 성분의 항산화 기능 및 여러 생리활성 기능이 밝혀지면서 미용과 건강보조식품 및 약제로도 많이 이용되고 있다. 김진아와 이종미¹⁸⁾는 감태의 주요 성분 및 항산화 활성에 관한 연구에서 해조류에 다량의 항산화 활성을 나타내는 polyphenol이 함유되어 있다고 확인하였다. 김영명 등¹⁹⁾은 국내산 주요 갈조류 추출물의 항혈액응고 활성을 살펴 본 연구에서 미역, 다시마, 감태, 대황, 곰피, 툇 등의 추출물이 항혈액응고 활성이 높음을 확인하였으며 이러한 물질은 심장질환 및 성인병의 예방과 치료에 적용될 수 있다 하였다.

감태(甘苔)는 약리학적으로 효능이 높은 플로로타닌(phlorotannin)을 포함하고 있다^{20,21)}. 플로로타닌의 연구들을 살펴보면, antioxidant, α -glucosidase inhibitor, antiallergic, antiallergic, anti-virus, anti-hypercholesterolemia, anti-inflammatory 여러 생리학적 특성을 가지고 있어 인지능력 치료제의 가능성을 제시하였다²²⁻²⁷⁾.

감태의 플로로타닌 성분들은 eckol(a closed chain phloroglucunol trimer), 6,6'-bieckol(a hexamer), dieckol(a hexamer), ph:profucofuroeckol(a prentamer) 그리고 phlroethol-A를 포함한다.

최근 Myung et al.(2005)²⁸⁾의 연구에 의하면 *Ecklonia cava*에서 추출한 dieckol, PFF의 플로로타닌 복합체가 뇌에서 중심 신경전달물질 레벨을 조절하고 특히 아세틸콜린 에스테라제의 활동을 억제함으로써 뇌에서 아세틸콜린 레벨을 증가시키는 것으로 보고하여 dieckol과 PFF성분이 인지능력 향상과 연관이 있는 것으로 보고하였다. 그러나, 알츠하이머 모델과 유사한 알콜성치매 모델을 대상으로 10mg/kg의 Dieckol을 1회 투여로 분석한 연구이므로 정상모델을 대상으로 한 반복섭취에 따른 효과 검증이 필요하다. 따라서 이 연구의 목적은 감태에서 추출한 Dieckol 성분이 정상주의 인지능력 개선에 미치는 효과를 검증하여 뇌기능 향상에 도움을 줄 수 있는 후보 물질에 대한 기초자료를 제공하는데 있다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 연구는 한국체육대학교 동물 실험실에서 실시하였으며 Mouse 수컷(코아텍, 한국) 6주령을 사용하였다. 동물입수 시, 외관을 육안으로 검사한 후, 1주일간 동물실험실에서 적응 후 실험에 착수하였다. 적응 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23 \pm 1^\circ \text{C}$, 상대습도 $50 \pm 51\%$, 환기횟수는 12~16회, 조명은 12시간 명암주기(점등:7:00, 소등:19:00) 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 실험동물용 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 체중은 주 3일(월, 수, 금) 조사하여 건강지표로 활용하였다²⁹⁾. 집단의 구분은 고농도 Dieckol을 투여하는 고농도군(HDG)과 저농도 Dieckol을 투여하는 저농도군(LDG), 물을 투여하는 Placebo군(PG), 아무것도 하지 않는 Control군(CG)으로 12마리씩 무선배정 하였다.

2) 시료

본 실험에 사용된 갈조류 추출물은 제주시에 위치한 (주)보타메디로부터 제공받은 감태 건조 시료를 가지고 분리하였다.

2. 방법

1) 감태추출물 분리 및 정제

음건 및 조분쇄 된 감태를 50% 메탄올로 70℃에서 1시간 동안 2회 반복하여 추출하였다. 추출액은 Büchner 깔때기를 이용하여 여과하였다. 추출액은 상온에서 회전 증발기를 사용하여 감압 건조하여 농축하여 건조시켰다. 용매의 극성을 이용해 함량이 높은 폴리페놀을 얻기 위해 용매분획을 하였다. 초기 일정량의 감태추출물을 물에 용해시킨 후 클로로포름(CHCl_3)을 첨가하여 반복적으로 색소 층을 제거하였다. 색소 층이 제거된 물 층에는 감태 특성상 염분 및 당 성분들이 대부분이므로, 이를 제거하기 위해 물보다 비극성인 에틸아세테이트(Ethyl acetate, EA)를 이용해 최대한 이 성분을 제거하였다. 이 EA 층을 가지고 역상크로마토그래피 기법을 이용하여 영역별로 분리를 하였다. 분리 과정은 용매의 극성을 변화 시키면서 영역별로 분리하였으며, 총 4개의 분획 (20%메탄올, 40%메탄올, 60%메탄올, 80%메탄올)으로 나누었다. 이를 HPLC로 분석하여 영역별로 분리된 정도를 확인하였다. 최종 단일 화합물을 얻기 위해 크기배제 크로마토그래피 과정을 실시하였다. Sephadex LH-20인 충전제를 이용하여 앞서서 대략적으로 분리된 각 분획층(OP-Fr.3, 4, 5와 80%메탄올 분획층)을 분리한 결과 순도가 98%이상인 총 4개의 순수한 단일 성분들을 얻었다. 분리된 단일 성분들은 1D, 2D NMR 자료를 이용하여 구조분석을 하여 compound 3이 Dieckol로 확인되었다. Dieckol의 분자구조는 대전에 위치한 한밭대학교에 의뢰하여 분석하였으며, figure 1과 같다.

fig. 1. Chemical structures of Dieckol

2. 실험방법

(1) 투여방법

제공받은 시료를 고농도군은 200mg/kg, 저농도군은 100mg/kg 을 한 마리당 1ml의 증류수에 희석하여 4주간 주 5일 동일한 시간에 경구투여 하였다.

(2) 수중미로 검사(Morris water maze test)

생후 6주째에 마우스의 몸무게를 측정하고 수중미로 사전 훈련을 실시하였다. 도피대는 10시 30분 시침방향, 수조 내 벽에서 30cm 되는 곳에 둔다. 우선 쥐를 20초간 도피대 위에 두었다가 출발점으로 옮겨 쥐의 머리가 벽을 향한 자세로 수면에 가만히 놓았다. 이때부터 쥐가 도피대 윗면에 올라설 때까지의 시간을 0.1초 단위로 측정하였다. 쥐가 90초 이내에 도피대를 찾지 못하면 15초간 도피대에 머물도록 하고, 90초 이내에 도피대에 올라서면 5초간 도피대에 머물도록 하였다. 한 시도가 끝나면 마른 수건으로 몸을 닦고 자기 사육 상자에서 다음 시도까지 쉬게 하였다.

(3) 수동회피 검사(Passive avoidance test)

상자의 칸막이를 이용하여 두 구획으로 구분하는데 동물이 어두운 구획으로 넘어가는 즉시 0.25mA의 전류를 바닥의 stainless grid를 통해 1초 동안 흘려 전기충격을 주는 장치이다. 조명이 켜진 구획에 마우스를 넣은 후부터 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간(latency)을 타이머로 측정하였다. 본 실험 24시간 전에 어두운 방과 전기충격과의 관계를 기억하게 되며 24시간 후 다시 박스에 위치시켰을 때 밝은 구획에서 어두운 구획으로 들어가기까지의 시간을 측정하였다. 기억력이 좋은 쥐는 이러한 전기적인 충격을 기억하고 있어 어두운 곳으로 들어가는 시간이 지체되며, 밝은 곳에 머무르는 시간(latency time)이 길어지고 이 latency time을 측정하여 인지능 개선 효능을 측정하였다.

(4) 세로토닌 혈액 성분 분석(Blood Sampling)

본 연구에서 4주간의 실험종료 후 실험동물의 복대정맥에서 혈액 1.5ml을 채취하였으며, 채취된 혈액은 즉시 4℃에서 4,000rpm으로 20분간 원심분리를 하여 -70℃ 냉동고에서 보관하였다. 혈중 세로토닌의 농도 분석은 Serotonin Elisa Kit(BAE-5900)를 이용하여 분석하였다.

(5) 면역조직화학법(Immuno-histochemistry)

각 집단에서 cryocut 1800으로 뇌 절편을 최소 6장 선택하여 0.05M PBS에서 세척한 후 0.3% Triton X-100으로

incubation 시켰다. 그 후 다시 PBS에서 세척한 다음 formamide 용액에 조직을 넣고 shaking incubation 시켰으며, 이후 세척과 incubation을 반복하고 마지막으로 고정하였다. 고정 후 antibody로 반응시키고 발색용액을 사용한 다음 표본을 슬라이드에 놓고 탈수 시킨 후 고정시켰다.

3. 통계처리

이 연구에서 회수된 모든 자료들은 Window용 SPSS/PC 18.0 통계프로그램을 이용하여 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였으며 Dieckol 추출물 섭취에 따른 인지능력검사는 반복측정에 의한 변량분석(repeated-measured ANOVA)을 사용하여 검증하고, 혈중 세로토닌, 조직분석방법은 일원변량분석(one-way ANOVA)을 사용하여 검증하였다. 유의한 차이가 있을 경우 t-test 와 LSD를 사용하여 사후검증을 실시하였으며, 통계적 유의수준은 $p < .05$ 로 설정하였다.

결 과

1. 수중미로검사(Morris water-maze test)의 변화

1) 집단 간 Trial duration의 차이

Dieckol 섭취 농도에 따른 Trial duration의 변화를 분석한 결과(Table 1)와 같이 시기에서 유의한 차이가 나타났으며($p < .000$), 시기 $\times$ 집단에서 유의한 차이가 나타났으며($p = .047$). 집단에서 유의한 차이가 나타났으며($p = .047$). 사후검증결과 고용량과 저용량 집단에서 측정 전·후에 소요시간이 유의하게 감소했다($p = .021$, $p = .013$). 사후 측정에서 고용량 집단이 위약과 대조군에 비해 소요시간이 유의하게 낮게 나타났으며($p = .008$, $p = .044$).

Table 1. Change of Water Maze test in mice

	Group	Pre	Post	p.
Trial duration	HDG(n=12)	60.00a $\pm$.00	43.49 ^{cd} $\pm$ 18.72	Period : .000 Group $\times$ Period : .047 Group : .047
	LDG(n=12)	60.00a $\pm$.00	50.59 $\pm$ 9.71	
	PG(n=12)	60.00 $\pm$.00	58.66 $\pm$ 2.92	
	CG(n=12)	60.00 $\pm$.00	54.66 $\pm$ 11.01	
Distance to Target	HDG(n=12)	793.35 ^a $\pm$ 245.07	439.47 ^{cd} $\pm$ 189.75	Period : .617 Group $\times$ Period : .000 Group : .025
	LDG(n=12)	764.73 $\pm$ 341.89	533.08 ^{ef} $\pm$ 215.60	
	PG(n=12)	699.40 ^b $\pm$ 357.80	1030.09 $\pm$ 361.09	
	CG(n=12)	845.40 $\pm$ 372.85	987.10 $\pm$ 336.65	
Mean speed	HDG(n=12)	14.41 ^a $\pm$ 4.12	8.78 ^{bd} $\pm$ 4.03	Period : .673 Group $\times$ Period : .002 Group : .048
	LDG(n=12)	14.05 $\pm$ 4.74	14.48 $\pm$ 4.26	
	PG(n=12)	13.46 $\pm$ 4.04	17.49 $\pm$ 4.33	
	CG(n=12)	14.78 $\pm$ 5.59	17.43 $\pm$ 5.48	

Mean $\pm$ SD. ^a: Pre vs Post, ^b: HDG vs LDG, ^c: HDG vs PG, ^d: HDG vs CG, ^e: LDG vs PG, ^f: LDG vs CG

2) 집단 간 Distance to Target의 차이

Dieckol 섭취 농도에 따른 Distance to Target의 변화를 분석한 결과(Table 1)와 같이, 시기 $\times$ 집단 간 유의한 차이가 나타났으며($p < .000$), 집단 간 유의한 차이가 나타났으며($p = .025$). 사후검증결과 고용량집단이 측정 전·후에 이동거리가 유의하게 감소한 반면($p = .001$), 위약집단은 유의하게 증가한 것으로 나타났으며($p < .015$). 사후 측정에서 고용량 집단이 위약과

대조군에 비해 이동거리가 유의하게 낮게 나타났으며($p < .001$, $p < .001$), 저용량 집단도 위약과 대조군에 비해 이동거리가 유의하게 낮게 나타났다($p < .001$, $p = .01$).

3) 집단 간 Mean speed의 차이

Dieckol 섭취 농도에 따른 Mean speed의 변화를 분석한 결과(Table 1)와 같이 시기 $\times$ 집단 간 유의한 차이가 나타났으며($p = .002$), 집단 간 유의한 차이가 나타났다($p = .048$). 사후검증결과 고용량 집단이 측정 전·후에 따라 평균속도가 유의하게 감소했다($p < .001$). 사후 측정에서 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 평균 속도가 유의하게 낮게 나타났다($p = .008$, $p < .001$, $p < .001$).

2. 수동회피검사(Passive avoidance test)의 변화

Dieckol 섭취 농도에 따른 수동회피검사의 변화를 분석한 결과(Table 2)와 같이 시기에서 유의한 차이가 나타났으며($p < .000$), 시기 $\times$ 집단 간 유의한 차이가 나타났다($p = .006$). 집단 간 유의한 차이가 나타났다($p = .002$). 사후검증결과 고용량, 저용량, 위약, 대조군 집단에서 측정 전·후에 따라 회피시간이 유의하게 증가했으며($p < .001$, $p = .001$, $p < .001$, $p = .023$), 사후측정에서 고용량 집단이 저용량 집단과 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다($p = .036$, $p < .001$).

Table 2. Change of Passive avoidance test in mice

	HDG(n=12)	LDG(n=12)	PG(n=12)	CG(n=12)	p.
Serotonin	4051.94 $\pm$ 513.40	3938.97 $\pm$ 423.82	3696.60 $\pm$ 404.00	3738.72 $\pm$ 645.80	.362
BrdU cell	1025.04 $\pm$ 188.35	715.36 ^{**} $\pm$ 143.19	563.81 ^{***} $\pm$ 126.93	680.46 ^{***} $\pm$ 153.21	.001

Mean $\pm$ SD, ^a: Pre vs Post, ^b: HDG vs LDG, ^c: HDG vs PG, ^d: HDG vs CG, ^e: LDG vs PG, ^f: LDG vs CG

3. 혈중 Serotonin의 변화

Dieckol 섭취 농도에 따른 혈중 Serotonin의 변화를 분석한 결과(Table 3)와 같이 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았다($p = .362$).

Table 3. Change of Blood sampling and Immuno-histo chemistry analysis

	Group	Pre	Post	p.
Latency time(sec)	HDG(n=12)	28.22 ^a $\pm$ 19.06	247.57 ^{bd} $\pm$ 100.21	Preiod : .000 Group $\times$ Period : .006 Group : .002
	LDG(n=12)	14.80 ^a $\pm$ 6.91	152.83 $\pm$ 102.64	
	PG(n=12)	13.83 ^a $\pm$ 6.60	187.05 $\pm$ 105.69	
	CG(n=12)	18.41 ^a $\pm$ 8.07	85.74 $\pm$ 75.36	

Mean $\pm$ SD, ^{**}: HDG vs LDG ($p < .01$), ^{***}: HDG vs PG, CG ($p < .001$).

4. BrdU cell 개수의 변화

Dieckol 섭취 농도에 따른 혈중 BrdU cell 개수의 변화를 분석한 결과(Table 3)와 같이 집단 간 유의한 차이가 나타났다($p < .001$) 사후검증결과 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 BrdU cell 개수가 각각 30.2%, 4.99%, 33.61% 높게 나타났다($p = .003$, $p < .001$, $p < .001$).

고찰

기억력과 학습력은 두뇌기능이 효과적으로 수행되고 있음을 나타내는 하나의 지표로 뇌를 구성하고 있는 신경세포의 손상은 이러한 기능의 부전으로 연결된다. 따라서 기능적 차원에서의 두뇌기능 개선 방안은 뇌신경의 보호라는 차원에서 중요한 의학적 가치를 가진다³⁰⁾. 본 연구에서는 기억력 개선 효과 측정을 위해 가장 보편적인 행동 실험인 수중 미로 실험과 수동 회피 실험을 진행하였다.

Morris 수중 미로장치(morris water maze)는 동물의 공간 학습과 기억력을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다³¹⁾. Hickey, Akino, Strausbaugh와 De Courten-Myers(1996)³²⁾는 Morris 수중미로과제가 신경손상평가에 유용한 실험방법이라고 보고하였다. 본 연구의 결과 수중미로 실험결과 도피대 지역에 도달하기 까지 소요된 시간을 나타내는 Trial duration은 고용량 집단의 이동시간이 위약과 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 도피대 지역에 도달하기까지의 수영한 거리를 나타내는 Distance to Target은 고용량과 저용량 집단의 이동거리가 감소하였고, 위약집단과 대조군은 증가하였다. 도피대 지역에 도달하기까지의 평균 수영 속도를 나타내는 Mean speed는 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 평균 속도가 유의하게 낮게 나타났다. Redish와 Touretzky(1998)³³⁾는 이 수중미로검사의 수행에 있어 해마가 기억의 고정에 관여한다고 하였으며 이봉호와 Steven(2004)³⁴⁾은 다시마목 해조 추출물 NX42를 4주간 경구투여하고 전기적 스트레스를 준 실험군이 유의한 AChE 억제효과와 수중미로실험에서 유의하게 짧은 Trial duration과 긴 Time Spent in the Platform을 나타냈다고 보고하였는데 이는 전적으로 NX42에 함유된 플로로탄닌(Phlorotannin)에 의한 것이라고 추정하였다. 본 연구의 결과 또한 4주간의 Dieckol 반복된 섭취가 Dieckol의 AChE 억제제 효과로 고용량과 저용량 집단의 공간기억 능력의 향상에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 단순 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있다³⁵⁾. 수동회피 실험결과 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 유의하게 밝은 곳에 머무르는 시간(latency time)이 긴 것으로 나타났다. 이러한 latency time의 유의한 증가는 다른 집단들과 비교하여 학습(learn)과 기억력(memory)의 향상을 의미한다. 갈조류에 속하는 감태(*Ecklonia cava*)에서 추출한 Dieckol과 PFF(phlorofucofuroeckol)를 7일간 경구 투여하여 알콜성 치매를 일으킨 마우스를 대상으로 수동회피 실험을 한 결과 Dieckol과 PFF를 투여한 집단에서 유의하게 기억력이 좋아진 결과를 보고하였으며, Dieckol과 PFF 모두 AChE를 억제하는 역할을 해서 ACh level을 증가시킨 것으로 추정하였고, Ellman's coupled enzyme assay를 사용한 AChE의 활성을 분석한 결과 Dieckol이 PFF 보다 1.6배 정도 더 큰 억제력을 보고하였다³⁶⁾. 본 연구에서는 정상 쥐에게 4주간 반복적으로 투여된 Dieckol이 스트레스 기억에 대한 학습, 기억력의 향상에 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단되며, 선행연구의 결과는 한 번의 Dieckol 경구 투여시 용량이 높음에 따라 아세틸콜린에스테라제 억제 효과가 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 선행 연구에 비해 저용량

그룹은 10배, 고용량그룹은 20배 많이 투여 되었지만, 용량에 비례하여 기억력 향상이 일어났으며 이것은 정상 쥐에 반 복적인 투여 시 기억력 향상에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

세로토닌(Serotonin)은 신경세포의 생성과 분화를 자극하여 증가시키는 작용을 하며³⁷⁾, 기억과 인지능력, 뇌의 발달 및 성숙도에 관련되어 있다³⁸⁾. 또한 중추신경계에 광범위하게 존재하며, 주로 중뇌 봉선핵(dorsal raphe nuclei) 부위에서 세로토닌성 신경세포에 의해 최초로 생성되고 발현된다. 이런 세로토닌은 시상하부(hypothalamus)에서 선조체(striatum)와 미상핵(caudate nucleus)을 지나서 대뇌(cerebrum)를 거쳐 해마로 전달되어 뇌 전체에 분포하게 되며³⁹⁾, 해마에서 새로운 신경세포의 생성이 증가되면 synaptic plasticity가 증가되어 인지기능의 향상을 가져온다고 하였다^{40,41)}. 이는 음식으로 섭취된 아미노산의 일종인 트립토판이 인체 내에서 신진대사작용을 하여 세로토닌으로 합성이 되면서 신경세포와 중추신경계에서 다양한 작용을 한다⁴²⁾. 본 연구의 혈중 Serotonin의 결과 갈조류 유용성분을 투여한 고용량군과 저용량군이 위약군, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았지만($p=.362$), 고용량군과 저용량군이 대조군에 비해 약 8.4%, 약 5.4% 높게 나타났다. 선행연구에서 세로토닌과 TPH(triptophan hydroxylase)는 세로토닌성 기능조절에 매우 중요한 역할을 하며⁴³⁾, 신경세포의 생성지표인 BrdU의 발현을 증가시키는 요소라고 하였다⁴⁴⁾. 비록 통계적으로 유의하지는 않았을지라도 BrdU cell의 발현 증가가 나타난 본 연구결과와 위약군, 대조군에 비해 높은 경향을 나타낸 고용량, 저용량군의 경향이 관련이 있는 것으로 생각된다.

해마는 학습과 기억의 형성과정에 관여하는 중요한 뇌 영역이며 신경의 발생기 뿐 아니라 성장 이후에도 신경세포가 생성되는 특징을 지니고 있다⁴⁵⁾. 따라서 해마 신경세포의 증가는 학습과 기억 형성의 향상을 유발하며 뇌신경세포의 사멸은 기억력 및 인지기능 저하를 가져올 수 있다^{46,47)}. 많은 선행연구에서 BrdU cell의 증가에 신경세포의 생성과 생존을 조절하여 기억을 형성하고 장기기억으로 전환하는 BDNF와^{48,49)} 해마신경에서 발현되어⁵⁰⁾ 신경세포의 손상예방과⁵¹⁾ 성장을 조절하는 NGF가⁵²⁾ 여러 신경영향성인자 중 중요한 단백질이라고 보고하고 있다. 본 연구에서 해마의 치상화에서 생성된 BrdU 양성 세포수를 확인한 결과 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 30.2%, 4.99%, 33.61% 높게 나타난 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다양한 신경영향성인자들이 신경세포의 생성을 촉진하는 매개체로⁵³⁾ 신경세포의 억제 를 조절함으로써 BrdU의 양성세포수를 증가시킨다고 한 선행 연구의 결과처럼⁵⁴⁻⁵⁶⁾ 신경세포의 생성과 분화를 유도하는 Serotonin의 증가와 함께 신경계 질환과 밀접하게 연관된 BDNF, NGF의 영향으로 인해 갈조류 유용성분을 투여한 고용량군의 해마 치상화에서 BrdU 양성 세포수가 높게 나타난 것으로 사료된다.

결론

본 실험을 통해 감태(甘苔)에서 추출한 Dieckol 성분이 쥐의 인지능력에 미치는 영향에 대하여 다음과 같은 결론을 얻

었다.

1. 수중 미로 검사에서 Trial duration, Distance to target, Mean speed의 결과는 모두 고용량 집단이 유의하게 감소한 것으로 나타났다.
2. 수동회피 검사 결과 고용량 집단의 Latency time이 유의하게 증가한 것으로 나타났다.
3. BrdU 양성 세포수를 확인한 결과 고용량 집단이 저용량, 위약, 대조군에 비해 높게 나타난 것으로 나타났다.

결론적으로 해조류에서 추출한 Dieckol 성분의 섭취는 뇌 신경세포의 증가로 학습과 기억력 개선뿐만 아니라 뇌기능 향상에 도움을 줄 수 있는 안전하고 효과적인 후보물질일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011~2014년도 농림수산식품기술기획평가원의 갈조류를 이용한 집중력 및 인지기능 개선 응용제품 개발 과제 연구비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Statistics Korea. Future Population Projection, 2011.
2. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. Trends Neurosci, 1997 ; 20(4) : 154-9.
3. Korean Dementia Association. Dementia A Clinical Approach. Seoul : Academia, 2006 : 63, 76, 391-2.
4. Henderson AS. The risk factors for Alzheimer's disease ; a review and a hypothesis. Acta Psychiatr Scand, 1988 ; 78(3) : 257-75.
5. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm, G, Andreasson N, Wallin A, Westman-Brinkmalm A, Blennow K. An Alzheimer's disease-specific betaamyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. Neurosci Lett, 2006 ; 409(3) : 229-37.
6. Citron M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. Nat Neurosci, 2002 ; 5 Supple : 1055-7.
7. Bartus RT, Dean RL, Beer D, Lipa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 1982 ; 217(4558) : 408-17.
8. Fayuk D, Yakel JL. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor channel function by acetylcholinesterase inhibitors in rat hippocampal CA1 interneurons. Mol Pharmacol, 2004 ; 66(3) : 658-66.
9. Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. Br

- J Pharmacol, 2004 ; 141(4) : 746-54.
10. Kim DK, Lee JY, Sung JJ, Kim ET, Kim YS, Kwon OS, Yun YC, Lee TJ, Kang YK, Chung YH, Kim SS, Kim KY, Lee WB. The Role of BF-7 on Enhancement of Memory and Cognitive Function, Anat Cell Biol, 2004 ; 37(6) : 519-27.
 11. Weon JB, Lee BY, Yoon BR, Lee JW, Lee HY, Park DS, Chung HC, Chung JY, Ma CJ. Memory Enhancing Effect of Codonopsis lanceolata by High Hydrostatic Pressure Process and Fermentation, Korean J Pharmacogn, 2013 ; 44(1) : 41-6.
 12. Universities of Korean Medicine Herbology professor. Herbology. Seoul : Younglimsa, 1992 : 473-4.
 13. Park SM, Lee GW, Cho YH. Effect of Rheum undulatum Extract on Antioxidant Activity and Activity of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts, J Life Sci, 2008 ; 18(12) : 1700-4.
 14. Joo DS, Lee JK, Choi YS, Cho SY, Je YK, Choi JW. Effect of sea tangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2003 ; 32(8) : 1364-9.
 15. Kong CS, Um YR, Lee JI, Kim YA, Lee JS, Seo YW. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from Limonium tetragonum on growth of human cancer cells, Korean J Biotechnol, Bioeng, 2008 ; 23(2) : 177-82.
 16. Kang MC, Lee YJ, Ko RK, Kim HB, Hong SH, Kim GO. Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of Dictyota coriacea extracts derived from adjacent sea of the Jeju island, Korean J Biotechnol Bioeng, 2008 ; 23(4) : 311-6.
 17. Sung JH, Ha YS, Im MH, Im JG, Kang KS. Seaweed and health In: Foods and Health, Seoul : Hyungseol press Co, 2002.
 18. Kim JA, Lee JM. The Changes in the Chemical Components and Antioxidant Activities in *Ecklonia Cava* According to the Drying Methods, J Korean Home Econ Assoc, 2004 ; 42(5) : 193-203.
 19. Kim YM, Kim DS, Choi YS. Anticoagulant Activities of Brown Seaweed Extracts in Korea, Korean Soc Food Sci Technol, 2004 ; 36(6) : 1008-13.
 20. Sakai T, Kato I. Development of fucoidan from Kagome seaweed as novel health food materials, New Food Industry, 1998 ; 40 : 1-5.
 21. Sakai T, Kato I. Functionality and health food application of seaweed fucoidans, New Food Industry, 2001 ; 43 : 8-12.
 22. Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga Eisenia bicyclis, Fisheries Sci, 1996 ; 62(6) : 923-6.
 23. Shibata T, Fujimoto K, Nagayama K, Yamaguchi K, Nakamura T. Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase, Int J Food Sci Tech, 2002 ; 37(6) : 703-9.
 24. Kim YM, Han CK, Bang SJ, Park JH. Effect of laminaran from Eisenia bicyclis on serum lipids in rats fed high cholesterol diet, J. Korean Soc Food Sci Nutr, 2006 ; 35(7) : 841-6.
 25. Moon HE, Islam N, Ahn BR, Chowdhury SS, Sohn HS, Jung HA, Choi JS. Protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, Ecklonia stolonifera and Eisenia bicyclis, Biosci Biotechnol Biochem, 2011 ; 75(8) : 1472-80.
 26. Sugiura Y, Matsuda K, Yamada Y, Nishikawa M, Shioya K, Katsuzaki H, Imai K, Amano H. Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from and edible brown alga, Eisenia arborea, Biosci Biotechnol Biochem, 2006 ; 70(11) : 2807-11.
 27. Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs, Gen Pharmacol, 1997 ; 29(4) : 497-511.
 28. Myung CS, Shin HC, Bao HY, Yeo SJ, Lee BH, Kang JS. Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase, Arch Pharm Res, 2005 ; 28(6) : 691-8.
 29. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training, Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1998 ; 77(4) : 372-8.
 30. Kim DK, Lee JY, Sung JJ, Kim ET, Kim YS, Kwon OS, Yun YC, Lee TJ, Kang YK, Chung YH, Kim SS, Kim KY, Kim WB. The Role of BF-7 on Enhancement of Memory and Cognitive Function, Anat Cell Biol, 2004 ; 37(6) : 519-27.
 31. Kong MJ, Ha NN, Lee HY, Kim YT, Rho SJ, Kim HC. Effect of Hwangryunhaedok-tang and its modified prescription on the recovery of spatial cognitive function in the brain ischemia induced by four-vessel occlusion in rats, Kor J Herbology, 2004 ; 19(4) : 161-8.
 32. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courten-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphyxial arrest in rats, Pediatr Res, 1996 ; 39(1) : 77-84.
 33. Redish AD, Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze, Neural Comput, 1998 ; 10(1) : 73-111.
 34. Lee BH, Stein SM. Improvement of Learning Behavior of Mice by an Antiacetylcholinesterase and Neuroprotective Agent NX42, a Laminariales-Alga Extract, Korean J Food Sci Technol, 2004 ; 36(6)

- : 974-8.
35. Woen JB, Yun BR, Lee JW, Eom MR, Ko HJ, Lee HY, Park DS, Chung HC, Chung JY, MA CJ. Effect of Steamed Codonopsis Lanceolata on Spatial Learning and Memory in Mice. *Korean J Pharmacogn*. 2014 ; 45(1) : 48-54.
36. Myung CS, Shin HC, Bao HY, Yeo SJ, Lee BH, Kang JS. Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. *Arch Pharm Res*. 2005 ; 28(6) : 691-8.
37. Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 1999 ; 21(2 Suppl) : 46S-51S.
38. Russo-Neustadt A, Ha T, Ramirez R, Patrick Kesslak J. Physical activity antidepressant treatment combination: impact on brain derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behavioural Brain Research*. 2001 ; 120(1) : 87-95.
39. Hariri AR, Weinberger DR. Functional neuroimaging of genetic variation in serotonergic neurotransmission. *Genes Brain Behav*. 2003 ; 2(6) : 341-9.
40. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999 ; 2(3) : 260-5.
41. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998 ; 18(9) : 3206-12.
42. Majnemer A, Barr RG. Association between sleep position and early motor Development. *J Pediatr*. 2006 ; 149(5) : 623-9.
43. Clark MS, Russo AF. Measurement of tryptophan hydroxylase mRNA levels by competitive RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1998 ; 2(4) : 273-85.
44. Lim BV, Lee SP. Influence of cold condition exposure on cognitive function and cell proliferation in rats. *Korean Sci Emotion Sensibil*. 2011 ; 14(3) : 425-34.
45. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Norberg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 ; 4(11) : 1313-7.
46. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993 ; 262(5134) : 689-95.
47. Shores TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 ; 410(6826) : 372-6.
48. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 ; 105(7) : 2711-6.
49. Donovan MH, Yamaguchi M, Eisch AJ. Dynamic expression of TrkB receptor protein on proliferating and maturing cells in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus*. 2008 ; 18(5) : 435-9.
50. Korsching S, Auburger G, Heumann R. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J*. 1985 ; 4(6) : 1389-93.
51. Gage FH, Batchelor P, Chen KS, Chin D, Higgins GA, Koh S, Deputy S, Rosenberg MB, Fischer W, Bjorklund A. NGF receptor reexpression and NGF-mediated cholinergic neuronal hypertrophy in the damaged adult neostriatum. *Neuron*. 1989 ; 2(2) : 1177-84.
52. Parent JM, Vexler ZS, Gong CL. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol*. 2002 ; 52(6) : 802-13.
53. Chan JP, Cordeira J, Calderon GA. Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 2008 ; 39(3) : 372-83.
54. Lee HH, Shin MS, Kim YS. Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Diabetes Complications*. 2005 ; 19(6) : 339-46.
55. Beauquis J, Roig P, Homo-Delarche F. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 2006 ; 23(6) : 1539-46.
56. Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience*. 2009 ; 164(4) : 1665-73.