

# 스코폴라민으로 유도한 기억 손상 모델에서 龍眼肉의 보호 효과 연구

정태영 · 이희웅<sup>1</sup> · 박종현<sup>1\*</sup>

대구한의대학교 한의과대학 진단학교실, 1: 병리학교실

## Memory Enhancing Effect of Longanae Arillus against Scopolamine-induced Amnesia in C57BL/6 Mice

Tae Young Jung, Heuiwoong Lee<sup>1</sup>, Jong Hyun Park<sup>1\*</sup>

*Department of Diagnostics, 1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University*

In this study, we have verified the memory and cognitive enhancing effect of Longanae Arillus, the fruit of *Euphoria longana* Lamarck, which has been used as a tonic and for the treatment of amnesia, insomnia, and palpitations in oriental medicine. To investigate the effect of Longanae Arillus water extract(LAE) on the memory and cognitive dysfunction, scopolamine (1 mg/kg, i.p.) was injected in C57BL/6 mice and several behavior tests including Y-maze, Morris water-maze, passive avoidance and fear conditioning tests were conducted. Administration of LAE (100 or 200 mg/kg/day, p.o.) effectively improved scopolamine-induced memory impairment and dysfunction. To further determine the possible molecule mechanism of LAE, we have examined the activity and/or mRNA expression of diverse proteins involved in the acetylcholine metabolism. LAE particularly increased the amount of acetylcholine in the cortex which was mediated by suppression of acetylcholine esterase (AChE) activity. In addition, LAE elevated the mRNA expression of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) without affecting the mRNA levels of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholine esterase (AChE). In another experiment, LAE effectively inhibited mRNA expression of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which seemed to be mediated by inhibition of upstream transcription factor NF- $\kappa$ B and extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). These results demonstrate that Longanae Arillus can increase acetylcholine amount the cortex via regulation of AChE activity as well as mAChRs expression and decrease pro-inflammatory responses via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway, thereby having therapeutic potential to improve memory and cognitive deficit in amnesia.

**Key words :** AChE, acetylcholine, IL-1 $\beta$ , inflammation, Longan Arillus, memory and cognition, NF- $\kappa$ B, scopolamine, ChAT, mAChR, TNF- $\alpha$

### 서 론

생활의 변화와 의학의 발달 등으로 평균 수명이 연장되어 노인 인구가 급속하게 증가하면서 노인성 질환 또한 증가하고 있는데, 특히 치매는 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습능력, 언어와 판단력을 포함하는 고위대뇌피질기능의 장애를 초래하여<sup>1)</sup> 현대사회의 큰 문제점으로 대두되고 있는 실정이다.

\* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : moguri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248

· 접수 : 2011/03/28 · 수정 : 2011/04/15 · 채택 : 2011/05/26

치매는 뇌의 위축성 변화, 뇌혈관의 장애로 인한 뇌의 만성 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 노화 증후군<sup>2)</sup>으로 발생 원인에 따라 혈관성 치매(vascular dementia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 및 기타 질환에 의한 치매로 분류되며, 전체 치매 환자의 50-60%가 알츠하이머병에 의한 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. AD는 뇌신경 세포가 변성 탈락하여 전반적인 뇌 위축과 뇌세포의 소실을 초래하여 나타나며<sup>4)</sup>, 이로 인한 기억력 감퇴는 뇌가 위축되고, 대뇌피질부위로 투사하는 콜린성 신경 압력통로인 마이너트 기저핵(nucleus basalis of Meynert)의 신경세포의 수가 급격히 감소되고, 해마(hippocampus)와 대뇌피질(cortex)에서 콜

린 흡수 및 아세틸콜린 합성량과 아세틸콜린 합성 효소인 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도 감소와 니코틴성 및 무스카리닉성 아세틸콜린 수용체의 감소로 인해 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 따라서 치매환자의 삶의 질 향상과 병증 개선 및 치료를 위해서는 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 아세틸콜린 대사를 지표로 하는 항건망제 및 기억력 개선제의 개발이 필요한 것으로 생각된다. 현재 FDA의 승인을 받아 시판되고 있는 다수의 약물들이 아세틸콜린 분해 효소 (acetylcholine esterase, AchE)를 저해하여 치매와 관련된 증상을 호전시키는 것으로 알려져 있으나 이들의 효과는 미약하며 아직 뚜렷한 치료법이 개발되고 있지 않아 최근에는 약리 효능이 증가되고 부작용이 상대적으로 적은 천연에 존재하는 새로운 소재에 대한 관심이 높아지고 있다.

한의학에서 痴呆는 痴獸<sup>6)</sup>, 呆病<sup>7)</sup>, 健忘<sup>8)</sup> 등의 범주에 속하는 것으로 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등으로 분류하여 치료하고 있으며<sup>9)</sup>, 치매의 주요 특징인 기억력 장애는 健忘에 근거하여 腎精虧虛, 心腎不交, 心脾兩虛, 痰濁擾心, 瘀血攻心 등으로 구분하여 치료하고 있다<sup>10)</sup>.

치매환자가 증가하면서 한의학계에서도 치매에 대한 연구가 활발히 진행되어, 류 등<sup>11)</sup>과 최 등<sup>12)</sup>이 치매에 대한 연구동향에서 보고한 것처럼 문헌연구는 물론, 여러 종류의 치매 병태모델을 이용한 한약의 유효성에 대한 연구가 진행되고 있다.

龍眼肉(Longanae Arillus)은 補益心脾, 滋養營血, 安神的 효능을 가지고 있어 心脾血虛로 인한 健忘·怔忡·驚悸를 치료하고<sup>13)</sup>, 歸脾湯, 壯元丸 등의 처방에 구성되어 기억력 증진을 목적으로 많이 사용되고 있으며, 스트레스 억제 효과가 있는 것으로 동물실험을 통해 보고된 바 있다<sup>14,15)</sup>.

본 연구에서는 치매의 주요 증상인 健忘에 중점을 두고 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 길항제인 스코폴라민(scopolamine)으로 유도 한 건망증 동물 모델을 이용하여 龍眼肉의 학습 및 기억력 향상 효과와 생체 내 작용기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

인지능 및 기억력 손상을 유발하는 물질인 스코폴라민(scopolamine, SCO)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 龍眼肉은 베트남에서 채취한 것을 계림약업사(대구)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 龍眼肉 600 g을 5 L 증류수로 100℃에서 4 시간 동안 열수추출 한 뒤 여과하여 70℃의 온도에서 감압농축(Rotavapor R-220, BUCHI, Switzerland) 시켰다. 이후 농축액을 -70℃의 온도에서 동결건조(Freezone 6, Laboconco, Germany)하여 龍眼肉 추출물(Longanae Arillus Extract: LAE) 72.67 g (수율 : 12%)을 수득하였다.

### 2. 동물

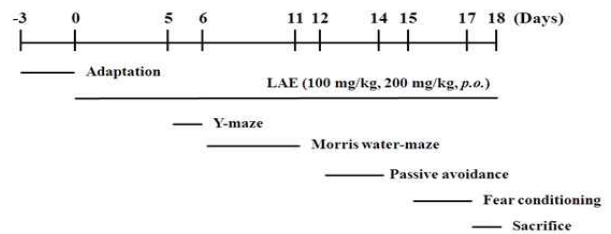
효창사이언스(대구)에서 분양 받은 20-25 g 내외의 8주령 수

컷 C57BL/6 마우스(C57BL/6 mouse)를 대구한의대학교 상동캠퍼스 사육실에서 3일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 이때 사육실의 조건은 온도 22-24℃ 및 습도 55-65%, 낮 12시간-밤 12시간 조명주기로 설정하였다.

### 3. 실험군 설정과 실험의 진행

그룹은 정상군(SHAM), 스코폴라민 투여 기억 손상군(SCO), 기억손상 + 龍眼肉 투여 실험군(SCO + LAE, 100 mg/kg, 200 mg/kg), 龍眼肉 단독 처리군(LAE, 100 mg/kg, 200 mg/kg)의 총 6개 그룹으로 나누어 하기와 같은 행동실험을 진행을 하였다. 행동실험 실시시간 동안 행동실험에 들어가기 1시간 전에 龍眼肉을 경구 투여 하였으며, 약물 투여 30분 후 스코폴라민을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였다(Table 1).

Table 1. Experimental schedule



### 4. Y-미로 실험(Y-maze test)

실험동물의 공간인지능력을 확인하기 위하여 Y-미로 실험(Y-maze test)를 실시하였다. Y-미로는 Y자 모양의 끝이 막혀 있는 동일한 3개의 통로(A, B, C : 가로 6 cm, 세로 28 cm, 높이 18 cm)로 구성되어 있으며, 마우스를 한쪽 통로 끝에 조심스럽게 위치시킨 후 8분 동안 자유롭게 Y자 통로를 돌아다니도록 하였다. 이때 꼬리까지 들어간 경우를 통로에 들어간 것으로 인정 하였으며, 각 통로에 들어간 횟수 및 순서를 천장에 설치된 카메라로 측정하여 비디오 추적 장치(video-tracking system : Ethovision, Noldus, 네덜란드) 이용하여 자발적 교차행동력(spontaneous alternation)을 평가하였다. 자발적 교차행동력은 3개의 통로를 순차적으로 들어가는 경우 즉 ABC, BCA, CAB 등으로 정의하였으며, 따라서 % 교차행동력은 다음과 같은 공식으로 계산 가능 하였다.

% 변경 행동력 (% spontaneous alteration)

$$= \frac{\text{실제 변경 횟수}}{(\text{총 출입 횟수} - 2)} \times 100$$

### 5. 모리스 물-미로 실험(Morris water-maze test)

모리스 물-미로 실험(Morris water-maze test)는 공간학습 및 기억력을 측정하는 대표적인 행동실험 방법으로 원통의 물탱크(지름 120 cm, 높이 45 cm) 안에 도피대(지름 10 cm, 높이 30 cm)를 설치하여 마우스의 움직임을 비디오 추적장치(Ethovision)를 사용하여 관찰하였다. 이 때 물의 온도는 23-25℃로 유지하고, 높이는 도피대 위 2 cm까지 채웠으며, 도피대가 보이지 않는 상

태에서 마우스의 움직임을 관찰하기 위하여 마우스와 대조적인 색을 사용하였다. 도피대 우측 45도를 기준으로 원통을 4등분으로 나누고(A, B, C, D), 도피대가 있는 곳을 A로 정한 뒤 B, C, D 방향에서 하루 3회 마우스를 입수 시켜 숨겨진 도피대를 찾아가도록 하였다. 각 구역에는 마우스가 도피대의 위치를 확인하여 기억 할 수 있는 모양이 다른 지표(marker)들을 설치하였으며, 매일 입수 방향의 순서를 바꾸어 주어 순차적으로 돌아가며 총 5일에 걸쳐 실험을 실시하였다. 마우스가 도피대를 찾아가 도피대에서 10초 이상 머무르는 경우 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출 잠복기(escape latency)로 하였으며, 하루 3번 수행하여 계산된 평균값을 평균 탈출잠복기(mean escape latency)로 하였다. 이 때 탈출 잠복기가 120초를 초과하는 경우에는 120초로 간주하였으며, 120초 동안 찾지 못한 마우스는 도피대로 인도하여 10초 동안 머무르며 주위 사물을 기억하도록 하였다. 훈련 마지막 날 probe test에서는 도피대의 위치를 정확하게 기억하는지를 확인하기 위하여 도피대를 제거한 다음 마우스가 이곳을 찾아와 머무는 시간(time spent in platform quadrant)을 측정하였다.

#### 6. 수동회피 실험 (passive avoidance test)

수동회피 실험은 동일한 구조의 조명이 있는 방과 조명이 없는 방(가로 25 cm, 세로 20 cm, 높이 20 cm)이 길로틴 문(guillotin door)으로 연결되어 있는 장치에서 수행되었다(Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 마우스를 조명을 비춘 밝은 쪽 방에 놓고 10초간 탐색시킨 후 문을 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있게 하였으며, 이때 어두운 방으로 들어갈 때까지 걸리는 시간을 측정하였다(학습 시험 : acquisition trial). 마우스가 어두운 방으로 들어가면 자동으로 문이 닫히고 0.5 mA의 전기 자극이 5초 동안 바닥의 철망(stainless grid)을 통해 주어졌다. 장기 기억에 미치는 定志丸의 인지기능 회복효과를 확인하고자 24시간 후 다시 마우스를 밝은 쪽 방에 놓아 주고 전기 자극을 받았던 어두운 방으로 들어가는데 걸리는 시간(step-through latency time : 머무름 시간)을 30초까지 측정하였다(유지 시험 : retention trial).

#### 7. 공포조건화 실험(fear conditioning test)

공포조건화 실험은 환경적 맥락 또는 조건자극을 전기쇼크와 연합시켜 학습과 기억을 평가하는 실험이다. 이 실험은 환경적 맥락 조건화(contextual fear conditioning)와 단서 조건화(cued fear conditioning)로 나눌 수 있으며, 훈련시행은 소리자극(15초, 68~80db, 30 kHz)과 전기쇼크(1초, 0.5 mA)를 짝지어 150초 간격을 두고 2회 시행하였다. 마지막 전기쇼크가 주어질 다음 60초 후에 마우스를 조건화 상자에서 꺼내어 24시간 뒤 다음과 같은 검사를 실시하였다.

##### 1) 맥락조건화 실험

실험동물을 동일한 조건화 상자에 둔 상태에서 소리자극을 제시하지 않고 동결반응(freezing response)을 5분 동안 측정하여 맥락에 대한 조건화된 공포반응 척도로 삼는다(해마-의존적 기억력 : hippocampal-dependent memory).

##### 2) 단서 조건화 실험

2시간 후 맥락을 변화시키기 위해 훈련 시행과는 다른 새로운 상자에 마우스를 넣고 훈련시행과 동일한 조건의 소리자극을 제시하여 나타나는 공포로 인해서 움직이지 않는 시간을 측정하여 단서에 대한 조건화된 공포반응 척도로 삼는다(편도체-의존적 기억력 : amygdala-dependent memory). 동결반응이란 숨쉬기를 제외한 다른 움직임이 없는 상태를 측정하였다.

#### 8. 아세틸콜린 양 측정

조직 내 아세틸콜린(acetylcholine, Ach)의 양 측정을 위하여 행동실험을 종료 후 마우스를 희생시켜 대뇌 피질(cortex) 및 해마(hippocampus) 부위를 적출하여 10배의 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하고 homogenizer로 균질화한 다음 12,000 g에서 30분간 원심 분리한 후 상층액을 취하였다. 아세틸콜린 양의 측정을 위하여 invitrogen사의 Amplex Red Acetylcholine Assay Kit (Eugene, USA)를 이용하였다. 먼저 아세틸콜린 측정에 사용되는 반응 시약들(20  $\mu$ l Amplex red reagent, 10  $\mu$ l HRP stock solution, 10  $\mu$ l choline oxidase stock solution, 10  $\mu$ l acetylcholine esterase stock solution)을 950  $\mu$ l 1  $\times$  reaction buffer에 가한 후 혼합하여 400  $\mu$ M Amplex red reagent working solution을 만들었다. 이후 미리 분리해놓은 시료 100  $\mu$ l를 형광 96-well plate에 분주한 다음 100  $\mu$ l의 400  $\mu$ M Amplex red reagent working solution을 가하여 실온에서 30분간 배양 뒤 544 nm excitation 및 590 nm emission의 파장에서 형광을 측정하였다(SPECTRA MAX GEMINI XS, Molecular Device, USA).

#### 9. 아세틸콜린에스테라제 활성 측정

아세틸콜린에스테라제(acetylcholine esterase, AchE)의 활성 측정을 위해 아세틸콜린 양을 측정한 실험과 동일한 방법으로 조직 샘플을 준비하였으며, invitrogen사의 Amplex Red Acetylcholine Assay Kit (Eugene, CA USA)를 이용하여 AchE 활성을 측정하였다. 미리 준비한 시료와 AchE 활성 측정에 사용되는 반응시약(20  $\mu$ l Amplex red reagent, 10  $\mu$ l HRP stock solution, 10  $\mu$ l choline oxidase stock solution, 10  $\mu$ l acetylcholine stock solution, 950  $\mu$ l 1  $\times$  reaction buffer)을 각각 100  $\mu$ l씩 형광 96-well plate 넣어준 후 실온에서 30분간 배양하였다. 이 후 SPECTRA MAX GEMINI XS를 사용하여 형광의 변화를 544 nm excitation 및 590 nm emission의 파장에서 측정하였다.

#### 10. mRNA 발현 측정

(Reverse transcriptase - polymerase chain reaction : RT-PCR)

mRNA는 TRI Reagent (Molecular Research Center, OH, USA)로 행동실험이 끝난 마우스의 대뇌 피질 및 해마 조직 샘플로부터 추출하였다. TRI reagent를 넣어 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화 시켰으며, 10분 동안 상온에서 방치하였다. 이후 TRI reagent 1 ml 당 0.2 ml의 BCP 용액(phase separation reagent)을 넣어 강하게 vortex를 시킨 뒤 상온에서 10분 반응시

킨 다음, 12,000 g, 4°C 조건에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 투명한 상층액을 분리하여 동량의 이소프로판올(isopropanol)을 넣어 조심스럽게 섞어준 뒤 10분 동안 반응시켰다. 다시 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 얻어진 하얀색 RNA pellet을 85% 에탄올로 세정을 한 뒤 DEPC를 처리한 증류수에 녹였다. 분리한 RNA 용액에 5 x reaction buffer, dNTP, oligo dT를 넣어 준 뒤 72°C에서 10분간 반응시킨 다음 M-MLV 역전사 효소(reverse transcriptase, Promega, WI, USA)를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 역전사 시켰다. cDNA의 증폭을 위하여 하기에 기술된 합성 프라이머(primer)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다(Table 2).

PCR에 의해 증폭된 DNA는 ethidium bromide로 염색된 1.5 % 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동 한 뒤 UV를 조사하여 이미지 분석 장치(TCP -20. M, Vilber Lourmat, France)로 관찰하였다.

Table 2. The specific sequence for each primer

Gene	PCR
ChAT	Forward 5'-AGG GTG ATC TGT TCA CTC AG-3'
	Reverse 5'-TCT TGT TGC CTG TCA TCA TA-3'
AchE	Forward 5'-AGA AAA TAT TGC AGC CTT TG-3'
	Reverse 5'-CTG CAG GTC TTG AAA ATC TC-3'
M1 AchR	Forward 5'-CAG AAG TGG AGA TGC C-3'
	Reverse 5'-GAG CTT TTG GGA GGC TGC TT-3'
M2 AchR	Forward 5'-TGC TGT GGC CTC CAA TAT GA-3'
	Reverse 5'-TGA CCC GAC GAC CCA ACT-3'
TNF-α	Forward 5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3'
	Reverse 5'-TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3'
IL-1β	Forward 5'-CAA ATC TCG CAG CA GCA CA-3'
	Reverse 5'-TCA TGT CCT CAT TCC TCC AAC G-3'
GAPDH	Forward 5'-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3'
	Reverse 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3'

11. 단백질발현 측정(Western blot analysis)

행동실험이 끝난 실험동물의 대뇌피질 부위를 분리하여, 차갑게 한 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail)로 균질화 하였다. 이후 4°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. BCA시약으로 단백질을 정량 한 뒤, 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 겔은 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST [인산완충액(phosphate-buffered saline, PBS), 0.1% Tween-20]로 비특이적 결합을 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 일차항체를 1:1000의 희석배율로 overnight으로 불리고, PBST용액으로 10분간 3회 세척한 뒤 이차항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 불린 다음 PBST용액으로 다시 10분간 3회 세척하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) 용액과 반응시켜 Amersham Chemiluminescent Immunoblotting Imaging (UVP, CA, USA) 장비를 이용하여 이미지를 촬영하였다.

12. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준오차 또는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계 처리는 SPSS Version 16.0을 사용하여 하였다. 스코폴라민으로 유도된 기억 및 인지능 손상에 대한 龍眼肉의 효능을 평가하기 위하여 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 수행하였으며 Turkey test를 사후검정으로 실시하여 다중분석을 실시하였다. 통계수치는 p값이 0.05이하일 경우 그룹 간 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. Y-미로 실험을 이용한 기억력 개선 효과

Y-미로 실험을 통하여 자발적 교차행동력(spontaneous alternation %)을 측정된 결과, 정상군 (SHAM)은 75.30 ± 1.24%로 나왔지만 스코폴라민에 의하여 기억력 손상된 대조군(SCO)은 56.11 ± 1.72%로 통계적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 1A). 한편, 스코폴라민에 의하여 기억력이 감소된 그룹에 龍眼肉을 투여한 경우(SCO + LAE), 龍眼肉 용량 의존적으로 기억력 증대를 나타내는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 200 mg/kg의 용량에서 자발적 교차행동력이 63.40 ± 0.76%로 스코폴라민에 의한 기억력 손상군(SCO)과 통계적으로 차이가 나는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1A). 또한 A, B, C 통로에 들어간 총 횟수(number of arm entries)의 경우 모든 그룹에서 유사한 수치를 보였으며, 스코폴라민 투여로 인한 특별한 행동양상의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

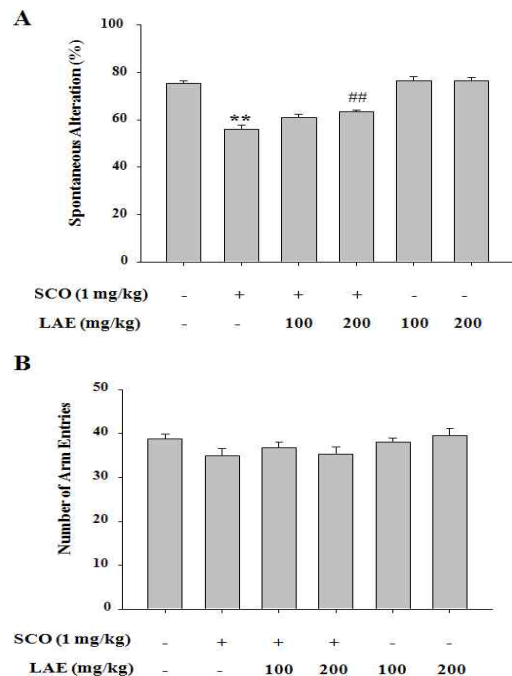


Fig. 1. Effect of LAE on the SCO-induced memory deficits in Y-maze test. Mice were orally administered with LAE (100, 200 mg/kg, p.o.) or vehicle 30 min before SCO treatment (1 mg/kg, i.p.). Memory impairment was induced by SCO 30 min before conducting Y-maze test. Spontaneous alteration behavior (A) and total number of arm entries (B) during 8-min sessions were monitored. All data are expressed as mean ± S.E.M. \*\*p < 0.01 vs. vehicle-treated control group. ##p < 0.01 vs. SCO-treated model group.

2. 모리스 물-미로 실험을 이용한 기억력 개선 효과

공간 인지 능력 및 기억력 측정 하는 대표적인 실험 중 하나인 물-미로 실험을 5일 동안 실시를 하였다. 훈련 둘째 날 부터 정상군(SHAM)과 스코폴라민만 투여한 그룹(SCO)은 평균탈출잠복기(mean escape latency)가 각각  $93.80 \pm 8.01$ 초와  $111.67 \pm 3.86$ 초로 차이가 나타나기 시작 하였으며, 셋째 날에는  $56.62 \pm 1.43$ 초 및  $102.81 \pm 2.18$ 초로 통계적인 유의성을 보였다(Fig. 2A). 한편, 龍眼肉을 전처리 한 그룹(SCO + LAE)에서는 100 mg/kg 용량의 경우  $63.33 \pm 2.61$ 초, 200 mg/kg 용량의 경우  $71.05 \pm 4.97$ 초로 스코폴라민 단독 그룹에 비해 현저히 낮은 수치를 보였다(Fig. 2A). 넷째 날 이후 스코폴라민에 의해 기억력이 감소된 그룹(SCO)은 숨겨진 도피대를 찾아가는데 걸린 시간이 여전히 높게 유지된 반면, 龍眼肉을 투여한 그룹(SCO + LAE)은 이와 비교하여 정상군과 유사한 수준으로 도피대를 빠른 시간 안에 찾아가는 것을 확인 할 수 있었다. 훈련 마지막 날 평균탈출잠복기가 정상군(SHAM)은  $17.33 \pm 0.73$ 초, 스코폴라민에 의해 기억력이 손상된 그룹(SCO)은  $85 \pm 1.42$ 초로 도피대에 찾아가는 시간이 약 4배 정도 차이가 났지만, 龍眼肉을 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량으로 투여한 그룹(SCO + LAE)에서는 각각  $33.33 \pm 1.10$ 초 및  $30.52 \pm 1.30$ 초로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2A). 훈련 첫째, 셋째, 다섯째 날 숨겨진 도피대를 찾아가는 대표적인 경로를 Fig. 2B에서 도식화 하여 보여주었다.

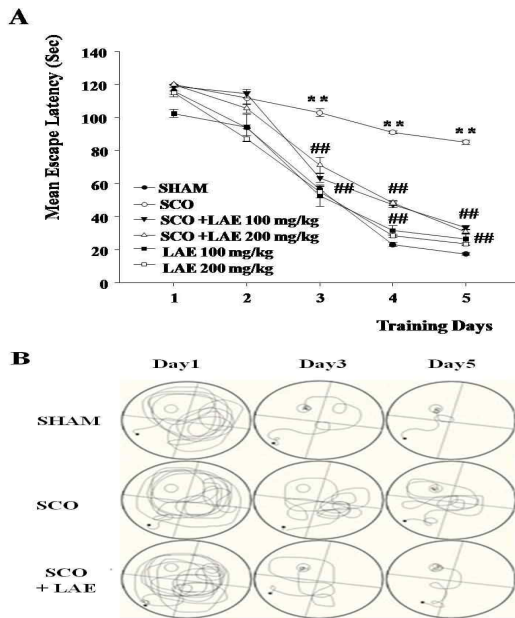


Fig. 2. Effect of LAE on the SCO-induced memory deficits in Morris water-maze test. Mice were treated with LAE (100, 200 mg/kg, p.o.) or the same volume of vehicle 30 min prior to the treatment of SCO (1 mg/kg, i.p.). SCO was injected 30 min before beginning of the behavior test. A. Mean escape latency to find the submerged platform was calculated for five consecutive training days. The data are shown as mean  $\pm$  S.E.M.  $**p < 0.01$  vs. vehicle-treated control group.  $##p < 0.01$  vs. SCO-treated model group. B. Typical swimming pathways in each group at 1st, 3rd, and 5th days of training were represented.

3. 수동회피 실험을 이용한 기억력 개선 효과

훈련 첫째 날(aquisition trial)에는 모든 그룹에서 실험동물

이 10초안에 어두운 방에 들어가는 것을 확인 할 수 있었다. 한편, 24시간 뒤에 같은 조건으로 실험을 수행 한 결과(retention trial), 정상군(SHAM)의 경우 평균  $245.89 \pm 12.81$ 초 동안 밝은 쪽 방에서 머물러 전기충격의 기억으로 어두운 쪽 방에 들어가는 것을 꺼려하였다(Fig. 3). 이에 비해 스코폴라민 투여로 인하여 기억력이 손상된 그룹(SCO)에서는 어두운 방으로 들어가기까지 평균  $41.04 \pm 1.25$ 초 소요됨으로써 정상군(SHAM)에 비하여 6 배 정도 빨리 어두운 방으로 이동하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 이때 龍眼肉을 전처리 한 그룹(SCO + LAE)의 경우 100 mg/kg 용량에서는  $99.17 \pm 4.24$ 초 및 200 mg/kg 용량에서는  $111.27 \pm 3.96$ 초로 스코폴라민 투여군(SCO)에 비하여 2배 이상 오랫동안 밝은 쪽 방에 머무른 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

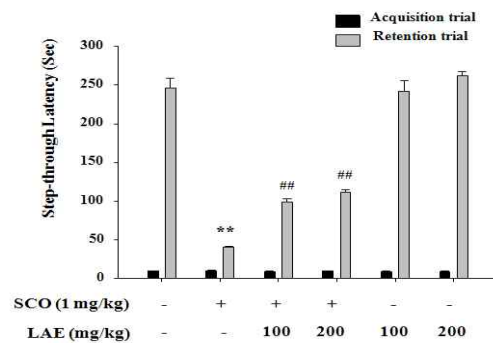


Fig. 3. Effect of LAE on the SCO-induced memory impairment in passive avoidance test. LAE (100, 200 mg/kg, p.o.) was administered 30 min before SCO treatment (1 mg/kg, i.p.). Memory deficit was induced by SCO 30 min before conducting passive avoidance test. At 24 h after acquisition trial, the retention trial was carried out for 300 s. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $**p < 0.01$  vs. vehicle-treated control group.  $##p < 0.01$  vs. SCO-treated model group.

4. 공포조건화 실험을 이용한 기억력 개선 효과

맥락조건화 반응 실험에서 스코폴라민에 의하여 기억력이 손상된 그룹(SCO)은 총 5분간의 측정 시간 중  $67 \pm 2.83$ 초 움직이지 않는데 비하여, 정상군(SHAM)은  $218.86 \pm 1.56$ 초로 3배 이상 시간동안 동결반응을 유지하였다(Fig. 4A). 한편, 龍眼肉을 동시에 경구투여 한 그룹(SCO + LAE)의 경우 동결반응이 100 mg/kg 용량에서는  $155.14 \pm 4.56$ 초, 200 mg/kg 용량에서는  $161.14 \pm 6.07$ 초로 용량-의존적 증가를 관찰 할 수 있었으며, 스코폴라민을 단독으로 투여한 실험군(SCO)보다 2배 이상 동결 반응이 유지됨을 확인 하였다(Fig. 4A). 단서 조건화 반응 실험 또한 맥락 조건화 반응 실험에서 마찬가지로, 스코폴라민에 의하여 기억력이 손상된 그룹(SCO)은  $73.71 \pm 2.48$ 초로 비교적 짧은 동결 시간을 보이는 반면, 정상군(SHAM)은  $221.86 \pm 5.41$ 초, 龍眼肉을 함께 투여한 약물군(SCO + LAE)의 경우 100 mg/kg 용량에서는  $160.57 \pm 2.17$ 초, 200 mg/kg의 용량에서는  $166.43 \pm 3.35$ 초의 동결시간이 유지 되어 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 4B).

5. 아세틸콜린 양 및 아세틸콜린 분해효소 활성에 미치는 효과

龍眼肉의 인지 및 기억력 증가 기전을 규명하기 위하여 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린

(acetylcholine)의 양, 생성 및 분해에 관여하는 효소, 관련 수용체 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. 스코폴라민을 투여하여 기억 장애를 일으킨 마우스의 경우 대뇌 피질 및 해마에서 아세틸콜린의 함량에는 큰 변화가 없었으나 龍眼肉(100 mg/kg 과 200 mg/kg)을 투여한 경우 대뇌 피질에서는 1.25배 및 1.3배, 해마에서는 1.1배 및 1.25배의 증가를 보였다(Fig. 5). 한편, 龍眼肉에 의한 아세틸콜린의 함량 증가는 Fig. 6에서 제시된 바와 같이 아세틸콜린에스터라제(acetylcholine esterase, AchE)의 활성 감소에 의한 것임을 Amplex Red Acetylcholine Assay로 확인할 수 있었다.

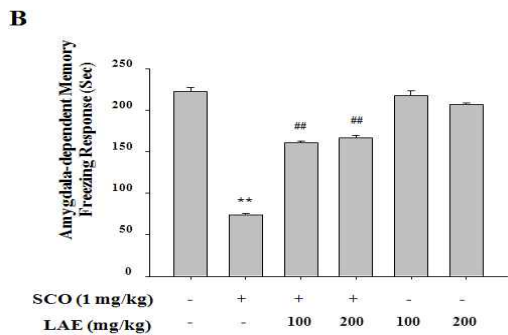
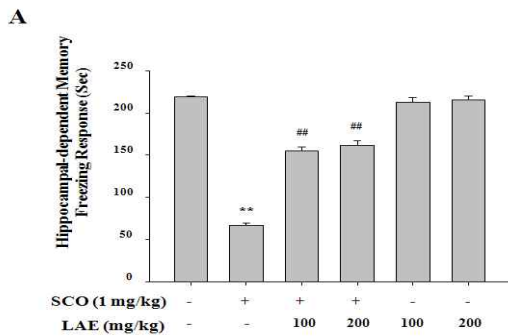


Fig. 4. Effect of LAE on the SCO-induced memory impairment in fear conditioning test. Mice were administered with LAE (100, 200 mg/kg, p.o.) or the same volume of vehicle 60 min prior to the fear conditioning test. SCO (1 mg/kg, i.p.) was injected 30 min after the LAE treatment. Contextual (A) and cued (B) fear conditioning tests were performed to measure the hippocampal-dependent and amygdala-dependent memory, respectively. Freezing response without any movement except breathing was monitored. All data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. \*\* $p$ <0.01 vs. vehicle-treated control group. ## $p$ <0.01 vs. SCO-treated model group.

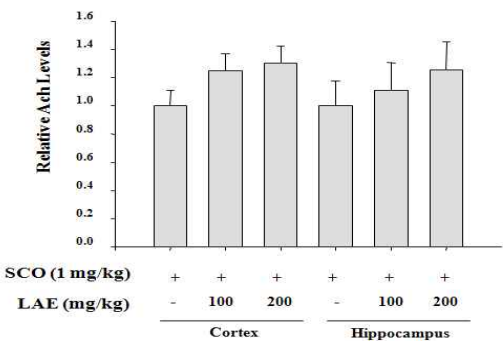


Fig. 5. Effect of LAE on the acetylcholine (Ach) levels in the cortex and hippocampus. Relative Ach levels were measured by Amplex Red Acetylcholine Assay Kit according to the experimental procedure described in the materials and methods. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3).

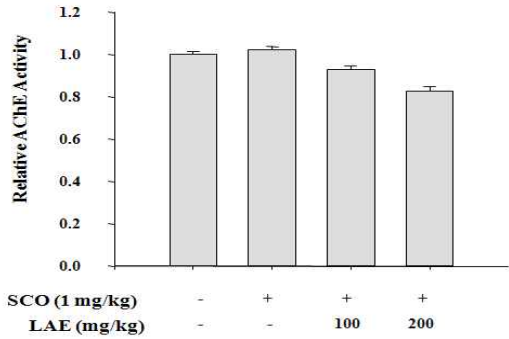


Fig. 6. Effect of LAE on the activity of acetylcholine esterase (AChE) in the cortex. Relative AChE activity was assessed and calculated by using Amplex Red Acetylcholine Assay Kit following the experimental procedure represented in the materials and methods. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n=3).

6. 아세틸콜린 대사 효소 및 수용체 발현에 대한 효과

아세틸콜린(acetylcholine, Ach)은 acetyl CoA와 콜린(choline)으로부터 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT)의 효소작용에 의해 합성되며, 반대로 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase, AChE)의 작용으로 아세테이트(acetate)와 콜린(choline)으로 분해된다. ChAT 및 AChE 효소의 mRNA 발현에 대한 龍眼肉의 효능을 RT-PCR로 측정된 결과 龍眼肉은 대뇌 피질에서 아세틸콜린을 합성 및 분해하는 효소의 발현에는 직접적인 영향을 주지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A). 한편, 시냅스에 존재하는 아세틸콜린은 아세틸콜린 수용체에 작용하여 세포내로 신호전달을 하게 되며, 특히 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptors : mAChRs)는 M1-M4의 4가지 형태가 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 그 중 특히 M1과 M2 형태의 수용체에 중점을 두어 실험을 진행하였으며, 결과 M1과 M2 형태 무스카린성 아세틸콜린 수용체(M1 mAChR 및 M2 mAChR)의 mRNA 발현은 龍眼肉(100 mg/kg, 200 mg/kg) 투여로 인하여 현저히 증가 되는 것을 확인하였다(Fig. 7B).

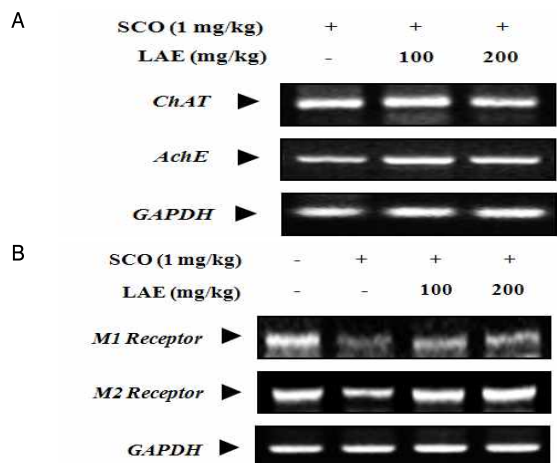


Fig. 7. Effect of LAE on the mRNA expression of acetylcholine metabolizing enzymes and receptors. The mRNA levels of enzymes involved in the synthesis and degradation of acetylcholine (A, choline acetyltransferase : ChAT and acetylcholine esterase : AchE) and muscarinic acetylcholine receptors (B, M1 and M2 types) were measured by RT-PCR using specific primers. Amplified DNA products were electrophoresed on the agarose gel and the intensity of the specific bands was recorded by gel documentation system.

7. 염증성 사이토카인 생성 및 신호전달에 대한 억제 효능

아세틸콜린 신경계 손상과 더불어 치매 유발 원인 중 대표적인 것이 염증반응으로 인한 세포사멸이다. 특히 그 중 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 치매 환자에 있어 그 수치가 증가되어 있는 대표적인 염증매개성 사이토카인(cytokine)으로 알려져 있다. 스크폴라민을 복강으로 투여한 경우 대뇌 피질에서 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현이 현저히 증가되었으며, 이는 龍眼肉을 경구투여 함으로써 특히 200 mg/kg 용량에서 효과적으로 억제 되었다(Fig. 8). 스크폴라민을 처리한 마우스의 대뇌 피질에서 p65 인산화 증가를 통하여 NF- $\kappa$ B가 활성화 되었으며, 이는 龍眼肉을 전처리 함으로써 효과적으로 감소 되었다(Fig. 9A). 한편, 龍眼肉에 의한 NF- $\kappa$ B 저해 효과는 상위 조절인자인 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)의 활성 억제에 의해 매개되는 것으로 사료 된다(Fig. 9B). 한편, 동일한 실험조건에서 또 다른 상위 인산화 효소인 p38의 활성화는 커다란 변화를 관찰 할 수 없었다(Fig. 9C).

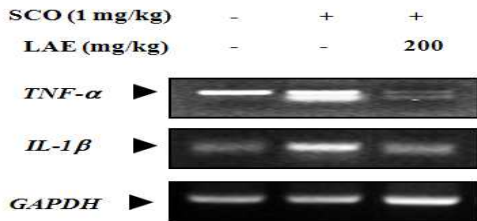


Fig. 8. Effect of LAE on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines. The mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the brain cortex treated with SCO in the presence or absence of LAE were examined by RT-PCR using specific primers following the protocol described in the materials and methods. GAPDH levels were examined for the equal amount of DNA loading.

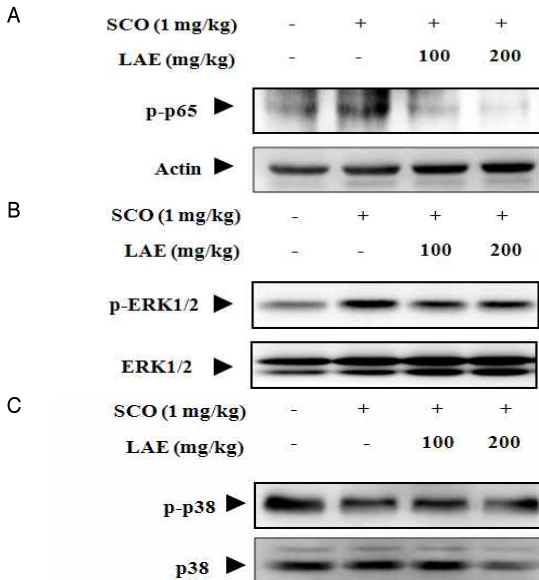


Fig. 9. Effect of LAE on the activation of NF- $\kappa$ B and upstream kinases. A. Activation of NF- $\kappa$ B via phosphorylation was assessed by Western blot analysis using specific antibody to phospho-p65 (p-p65), one of the subunits of NF- $\kappa$ B. B&C. Phosphorylation of ERK1/2 and p38 was determined by Western blot analysis using phosphorylated form-specific antibodies (anti-p-ERK1/2 and anti-p-p38 antibodies). The expression of ERK1/2 and p38 was examined to ensure no alteration in the levels of unphosphorylated total forms.

고 찰

치매 환자의 절반 이상은 알츠하이머병(Alzheimer' disease, AD)으로 알려져 있는데, AD는 1906년에 Alois Alzheimer에 의해 기술된 병으로 뇌세포가 점점 파괴되면서 악화되는 전형적인 퇴행성 뇌질환이다<sup>16)</sup>. 알츠하이머병은 60세 이후로는 나이가 들에 따라 발생 빈도가 점차 증가하기 때문에 노인 인구가 증가하고 있는 우리나라에서는 중대한 사회적 문제로 대두되고 있다<sup>17)</sup>. AD의 발생 기전에 대해서는 여러 가지 학설이 있는데, 대표적으로 preseniline(PS) 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 베타아밀로이드( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )가 과량으로 만들어지게 되고, 이 A $\beta$ 의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며<sup>18)</sup>, AD의 주요 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며<sup>19)</sup>, 특히 acetylchoine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylchoine을 분해하는 효소인 AchE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine의 대사를 측정하여 AD 환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다<sup>20)</sup>.

치매와 관련된 한의학적인 기록은 명대 張介賓의 저서인 『景岳全書·雜證模』<sup>6)</sup>에서 '痴獸'가 생기는 원인과 주요증상을 언급한 이후 『辨證奇問全書』<sup>7)</sup>에서는 '呆病'으로 기재하고 있으며, 치매의 주요 증상인 기억력 장애에 해당하는 '健忘'은 『黃帝內經·調經論』<sup>8)</sup>의 '喜忘'이라는 표현을 비롯하여 多忘, 好忘, 遺忘, 遂忘 등으로 기재되어<sup>9)</sup> 각종 한의서에서 중요하게 다루고 있다.

본 연구에서는 치매 환자의 삶의 질과 초기 치료를 위해서는 치매로 인한 기억력 손상을 개선하는 것이 중요하다는 사실에 착안하여, 항건망제와 기억력 개선제의 개발에 목표를 두고 한의학의 '健忘'이라는 관점에서 접근을 시도하였다.

健忘은 잠자기 어떤 일을 잊어버리고 心力을 다하여 생각하여도 생각이 나지 않으며 일을 함에 있어 有始無終하고 언어에 있어 앞뒤를 알지 못하는 등<sup>21)</sup>, 기억력 저하를 주요 증상으로 하는 하는 병증이다<sup>22)</sup>. 健忘의 형성은 心脾腎의 精氣의 소모로 腦髓가 공허해지고 精神작용이 약화되어 발생하는 것으로 보고 있는데<sup>23)</sup>, 靑의 林珮琴은 『類證治裁·健忘論治』<sup>24)</sup>에서 "健忘者, 陡然忘之, 盡力思索不來也. 夫人之神, 宅于心, 心之精依于腎, 而腦爲元神之府, 精水之海, 實記憶之所憑也."라 하였으며, 程國彭의 『醫學心悟』<sup>25)</sup>에서는 "腎主智, 腎虛則智不足, 故喜忘其前言. 又心藏神, 神明不充, 則遇事遺忘也. 健忘之症, 大概由于心腎不交, 法當補之, 歸脾湯·十補丸主之."고 하였다. 또한 『東醫寶鑑』<sup>26)</sup>에서는 "健忘者, 陟然而忘其事, 盡心力思量不來也. 主心脾二經, 蓋心之官則思, 脾之官亦主思. 此由思慮過多, 心傷則血耗散, 神不守舍, 脾傷則胃氣衰憊, 而慮愈深, 二者皆令人事卒然而忘也. 治法, 必先養其心血, 理其脾土, 以凝神定智之劑調理之"라고 하여 건망의 원인이 心, 脾의 병변과 관련이 있고 心血을 補陽하고 脾土를 다스려서 치료할 수 있다고 보고 있다. 心脾腎 三臟의 기능실조 외에도 痰濁이나 瘀血 등이 心神을 요란시키면 건망증을 일으킬

수 있어 腎精虧虛, 心腎不交, 心脾兩虛, 痰濁擾心, 瘀血攻心 등으로 구분하여 치료하고 있다<sup>10)</sup>.

龍眼肉(Longanae Arillus)은 無患子科(무환자나무과, Sapindaceae)에 속한 상록교목인 용안나무(*Euphoria longan* Steud.) 과실의 種皮(果肉)으로 性味는 平無毒하며 甘하다. 龍眼肉은 心脾 二經으로 들어가 補血益氣, 補心益智하고 安神의 효능이 있어 思慮過度나 勞傷心脾로 인한 健忘, 怔忡, 驚悸, 失眠 등에 사용되며<sup>13)</sup>, 歸脾湯, 壯元丸 등의 처방에 구성되어 기억력 증진을 목적으로 많이 사용되고 있다. 이러한 龍眼肉의 기억력 증진과 항건망 효능은 최근 문체시 되고 있는 알츠하이머병으로 인한 기억력 장애의 개선에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 龍眼肉의 인지능, 기억력 향상 및 항건망 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 스코폴라민으로 유도한 학습 및 기억력 손상에 대한 龍眼肉 열수 추출물(Longanae Arillus water extract, LAE)의 효능을 Y-미로(Y-maze), Morris 물-미로(Morris water-maze), 수동회피(passive avoidance), 공포 조건화(fear conditioning) 등 다양한 행동실험으로 검토하였다.

특히 스코폴라민은 무스카린성 아세틸콜린 수용체에 비특이적으로 작용하는 길항제로 콜린신경 신호전달을 방해하여 기억력 손상을 유발한다. 실제 일반적으로 콜린신경계 신호전달이 치매 환자의 뇌에서 현저히 감소되어 있어 기억력 손상 정도와 밀접히 관련되며, 따라서 아세틸콜린을 분해하는 효소를 억제하거나, 아세틸콜린의 전구체 또는 콜린 효능제를 사용하여 뇌 내 아세틸콜린 신경계 활성을 강화하는 방법 등이 인지 및 기억력 증가 약물 개발에 활용되어져 왔다.

C57BL/6 마우스에서 스코폴라민으로 유도된 기억력 손상은 龍眼肉 열수 추출물을 전처리 함으로써 현저히 억제되었으며, 이는 Y-미로 실험에서 자발적 변경행동력(spontaneous alteration %)의 증가, 물-미로 실험에서 평균 탈출잠복기(mean escape latency) 감소, 수동회피 실험에서 머무름 시간(step-through latency) 증가, 공포조건화 실험에서 동결반응 시간(freezing time) 증가로 확인 할 수 있었다.

Y-미로 실험에서 스코폴라민을 투여한 경우(SCO) 기억력이 손상되어 자발적 변경행동력이 정상군(SHAM) 보다 감소되었지만, 龍眼肉 열수 추출물을 경구 섭취함으로써(SCO + LAE) 증가되었다. 한편, 동일한 조건에서 龍眼肉은 각 가지에 들어간 전체 횡수 및 운동력에는 큰 영향을 주지 않았다. Morris 물-미로 실험에서 스코폴라민을 단독으로 투여한 경우(SCO) 5일간의 훈련기간 동안 숨겨진 도피대를 찾아가는데 걸린 평균탈출 시간이 정상군(SHAM)과 비교하여 높게 유지되었지만, 龍眼肉 열수 추출물을 경구 투여한 실험군(SCO + LAE)에서는 정상군과 거의 유사한 속도로 도피대를 찾아감을 확인 할 수 있었다. 수동회피실험에서 기억유지 시험 동안 스코폴라민을 단독으로 투여한 그룹(SCO)의 실험동물의 경우 기억력이 손상되어 전기충격이 주어진 공간에 들어가는데 걸린 시간이 정상군(SHAM)과 비교하여 감소되었지만 龍眼肉 열수 추출물을 경구 투여 받은 그룹(SCO + LAE)에서는 이러한 머무름 시간이 현저히 증가되었다. 마지막으로 공포조건화 실험에서 소리자극-전기충격으로 연합된 기억력

으로 인하여 소리자극 없이 동일한 공간에서의 동결반응과 소리 자극만에 의한 동결반응을 측정할 결과 스코폴라민(SCO)으로 인해 감소된 동결반응이 龍眼肉 열수 추출물 투여(SCO + LAE) 의해 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다.

알츠하이머형 치매 환자에 있어 아세틸콜린(acetylcholine)계, 글루타민산(glutamic acid)계와 신경펩타이드(neuropeptide)계에서의 기능저하가 일어나고 이로 인한 부작용들이 치매의 주된 원인이라고 추정되어 지고 있다<sup>27,28)</sup>. 그러므로 龍眼肉의 인지 능력 및 기억력 증가에 대한 분자기전을 규명하기 위하여 뇌 조직내 아세틸콜린의 양과 아세틸콜린을 합성 또는 분해하는 효소, 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. 치매 동물실험에서 일시적 기억장애 유발 물질로 많이 사용되어지는 스코폴라민은 콜린성 신경계 아형(subtypes) 중 무스카린성 수용체의 작용부위에 직접 결합하여 아세틸콜린의 양은 변화되지 않고 시냅스 간극에서 아세틸콜린이 수용체의 결합을 일시적으로 차단하여 기억과 학습에 손상을 일으키게 된다.

콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT)는 콜린(choline)과 아세틸 CoA (acetyl-CoA)간의 반응을 촉진하여 아세틸콜린의 합성에 관여하므로, ChAT의 기능 및 발현이 감소되어 있다는 것은 아세틸콜린의 합성이 감소가 되어 아세틸콜린이 관여하는 있는 기억, 학습, 수면 등에 영향을 미치게 됨을 의미한다. 또한 아세틸콜린에스테라제 (acetylcholine esterase, AchE)는 아세틸콜린의 가수분해에 관여하는 효소로 AchE의 활성 및 발현이 증가되는 것은 아세틸콜린의 양이 감소되어 기억 및 인지 기능이 저하 됨을 의미한다. 한편, 아세틸콜린 수용체의 결합을 차단하거나 발현을 감소시키면, 아세틸콜린의 양은 그대로 있게 되지만 기억에 중요한 역할의 아세틸콜린의 신호전달에 문제가 생겨 기억 손상을 유발하게 된다. 본 연구에서 특히 龍眼肉 열수 추출물은 대뇌 피질 부위에서 아세틸콜린을 합성하는 효소 ChAT 및 분해하는 효소 AchE의 발현에는 변화 없이 AchE의 활성을 증가시킴으로써 아세틸콜린 양을 증가시켰다. 더 나아가 龍眼肉 열수 추출물은 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 발현 또한 증가시켜 콜린 신경계 활성을 강화하였다.

최근 치매의 발병 및 진행과정에서 앞서 언급한 요소 이외에도 염증반응(inflammation)이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 역학적 조사에 따르면 비스테로이드성 항염증약(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 복용하고 있는 사람에게서 미세아교세포(microglia)의 활성화가 현저히 감소되어 있으며, AD의 발병율이 현저히 낮은 것으로 관찰되었다<sup>29,30)</sup>. 반대로 치매 환자의 경우 치매의 특징적인 지표인 노인반주변에 미세아교세포 및 성상세포(astrocyte)가 활성화 되고 보체(complement), acute phase protein ( $\alpha$ 1-chymotrypsin,  $\alpha$ 2-macroglobulin), 케모카인[chemokine : monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IP-10], 케모카인 수용체(chemokine receptor : CCR2, CCR3, CCR5), 염증매개성 사이토카인 [cytokine : interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6], 염증매개 효소 [inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX), matrix metalloproteinase



(MMP)], 흥분성 신경독성 물질 글루타메이트(glutamate)가 증가되었다<sup>31,32</sup>).

스코폴라민을 처리한 경우 대뇌피질 부위의 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현이 증가되었으며 이는 龍眼肉 열수 추출물을 경구 투여한 경우 억제되었다. 아세틸콜린은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6를 비롯한 다양한 염증성 사이토카인의 방출을 억제하는 기능을 가지며, 반대로 치매 환자의 경우 이러한 아세틸콜린의 수치가 감소하여 사이토카인의 생성이 증가되어 있다<sup>33,34</sup>. 지모로부터 분리한 사포닌 성분인 timosaponin AIII와 mangiferin의 경우 스코폴라민으로 유도한 학습 및 기억력 손상을 억제하였으며, 특히 아세틸콜린 분해 효소인 AchE 활성을 약화시켜 아세틸콜린의 수치를 증가시키고, 스코폴라민으로 인한 염증매개성 사이토카인 TNF- $\alpha$  또는 IL-1 $\beta$ 의 생성 또한 감소시키는 효능을 나타내었다<sup>35,36</sup>.

또 다른 연구에서는, 龍眼肉으로부터 초음파 추출한 다당류 성분이 라디칼 소거를 함으로써 항산화 기능을 나타내었으며, 더 나아가 지연성 과민반응, 대식세포의 포식작용, 비장세포의 증식 등을 억제하여 면역조절 기능을 가지는 것으로 보고되었다<sup>37</sup>. 프로안토시안인 풍부한 龍眼肉 추출물은 RAW 264.7 세포 모델에서 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 염증매개 효소 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현 및 염증매개 물질 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2의 생성을 억제하여 항염증 효능을 나타내었다<sup>38</sup>.

한편, 이러한 염증성 사이토카인의 발현에는 다양한 전사인자들이 작용하고 있으며, 그 중 대표적인 것이 NF- $\kappa$ B이다<sup>39</sup>. 일반적으로 NF- $\kappa$ B는 비활성화 상태에서는 I $\kappa$ B라는 억제성 단백질과 복합체를 이루어 세포질에 존재하고 있지만, 다양한 자극에 의하여 활성화 되는 경우 I $\kappa$ B가 인산화 및 분해되어 떨어져 나가면서 NF- $\kappa$ B dimer가 세포질에서 핵으로 이동하게 된다. 핵내로 들어온 NF- $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B binding site에 결합하여 염증성 사이토카인, 사이토카인 수용체, 염증 매개 효소, 세포부착단백질(cell adhesion molecule) 등의 발현을 증가시키게 된다. 한편 이러한 NF- $\kappa$ B는 Rel protein 종류인 Rel A (p65), c-Rel, Rel B, NF- $\kappa$ B1 (p50/105), NF- $\kappa$ B2 (p52/100)가 homodimer 또는 heterodimer를 이루어 존재하고 있으며 특히 p65가 인산화 되는 경우 활성화 되어 핵내로의 이동이 촉진된다<sup>40</sup>. 스코폴라민을 투여한 경우 p65의 인산화가 현저히 증가된 반면 이는 龍眼肉을 경구 섭취함으로써 감소되었다. 앞서 언급한 지모로부터 분리한 사포닌 성분인 timosaponin AIII와 mangiferin의 경우 또한 BV-2 microglia 세포에서 스코폴라민 또는 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 항염증 효능을 나타내었다<sup>35,36</sup>.

한편, NF- $\kappa$ B의 활성화 과정에서 특히 I $\kappa$ B의 인산화 및 분해와 p65의 인산화 과정은 다양한 상위 인산화 효소에 의해 매개되어 지는 것으로 알려져 있으며, 특히 MAPK pathway인 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)와 p38 MAPK가 대표적인 상위 조절자로 제시되고 있다<sup>41</sup>. 녹차 추출물 및 녹차의 아미노산 성분인 L-theanine의 경우 치매의 원인물질인 베타아밀로이드로 유도된 인지 및 기억력 손상을 효과적으로

억제하였으며, 이는 항산화 기능을 통한 ERK1/2의 인산화 및 이후 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제함으로써 매개되었다<sup>42,43</sup>. 본 연구에서 스코폴라민 복합 투여에 의해 대뇌 피질에서 ERK1/2의 인산화가 증가되었으며, 반대로 龍眼肉 추출물을 경구 투여한 그룹에서는 감소됨을 관찰 할 수 있었다. 한편, 동일한 조건에서 p38의 인산화에는 커다란 변화가 없었다.

## 결론

龍眼肉의 인지능, 기억력 향상 및 항건망 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 스코폴라민(scopolamine)으로 기억력 손상을 유도하고 龍眼肉의 기억력 손상 보호효과 및 기전을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

스코폴라민으로 유도한 건망증 실험동물 모델에서 龍眼肉 열수 추출물은 학습 및 기억력을 향상시켰으며 이는 다양한 행동 실험(Y-미로, Morris 물-미로, 수동회피, 공포조건화 실험)으로 확인 할 수 있었다. 龍眼肉 열수 추출물은 아세틸콜린 신경계와 관련되어 아세틸콜린을 분해하는 효소의 활성을 감소시켜 아세틸콜린 양을 증가시키고, 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 발현을 높이는 효능을 나타내었다. 龍眼肉 열수 추출물은 대표적인 염증매개 물질인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  등의 사이토카인 생성을 억제하여 항염증 효능을 나타내었으며, 이는 상위 인산화 효소 ERK1/2 및 전사인자 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써 매개되었다.

이상의 결과는 龍眼肉이 아세틸콜린 신경계를 강화시키고 항염증 효능을 동시에 가짐으로써 건망증과 치매를 비롯한 기억장애 질환의 예방과 치료에 다양하게 활용될 수 있음을 시사한다.

## 참고문헌

1. 이부영 역. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울, 일조각, pp 63-66, 1994.
2. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울, 현대의학서적사, pp 256-271, 327-330, 1992. : 이근후. 최신임상정신의학. 하나의학사, p 138, 1998.
3. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. San Diego, USA. Elsevier Saunders. pp 1386-1388, 2004.
4. 조추용, 최현자 역저. 치매 예방과 케어. 창지사, p 49, 2002.
5. Pakaski, M., Kalman, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanism in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 53(5):103-111, 2008.
6. 張介賓. 景岳全書. 서울, 한미의학, p 1549, 2006.
7. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 1990.
8. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, p 218, 1981.
9. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 파주, 집문당, 125: 311-316, 432-435, 451, 2005.
10. 中國中醫研究院. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京, 人民衛生出版社,

- pp 106-107, 2000.
11. 류기준, 김지형, 안건상, 이재균, 권승로. 최근 10년간 치매에 대한 한의학적 연구 동향 고찰. *동의신경정신과학회지* 18(3):135-145, 2007.
  12. 최성열, 김태현, 김상태, 김태현, 강형원, 류영수. 치매에 대한 최신 실험적 연구 동향 (2000년 이후 한의학 학술지를 중심으로). *동의신경정신과학회지* 19(1):125-146, 2008.
  13. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *본초학*. 서울, 영림사, p 642, 2004.
  14. 하연귀. 龍眼肉이 구속스트레스 생쥐 뇌의 Noepinephrine 함량에 미치는 영향. *경원대 석사학위논문*. 2002.
  15. 황선미. 龍眼肉과 백복신이 구속스트레스 생쥐의 뇌 부위별 serotonin 함량에 미치는 영향. *대구한의대 석사학위논문*. 2002.
  16. Small, G.W., Rabins, P.V., Barry, P.P., Buckholtz, N.S., DeKosky, S.T., Ferris, S.H., Finkel, S.I., Gwyther, L.P., Khachaturian, Z.S., Lebowitz, B.D., McRae, T.D., Morris, J.C., Oakley, F., Schneider, L.S., Streim, J.E., Sunderland, T., Teri, L.A., Tune, L.E. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. *JAMA* 278(16):1363-1371, 1997.
  17. 서순규. *성인병 노인병학*. 서울, 고려의학, pp 225-228, 1992.
  18. Buxbaum, J.D., Greengard, P. Regulation of APP processing by intra and intercellular signals. *Ann. NY Acad. Sci.* 17(777):327-331, 1996.
  19. Lee, M.C., Kim, D.L., Woo, Y.J., Kim, S.U., McGeer, P.L., Tai, T. Gangliosides expression in normal and alzheimer brain. *대한의학회*, 37(3):285-292, 2001.
  20. Baddeley, A.D., Bressi, S., Sala, S.D., Logie, R., Soinnler, H. The decline of working memory in Alzheimer' disease. *Brain* 114: 2521-2542, 1991.
  21. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울, 一中社, pp 229-230, 1994.
  22. 杜英杰. 中醫內科學. 四川, 四川科學技術出版社, pp 141-142, 1985.
  23. 동양학연구소. *동의내과학*. 서울, 여강출판사, pp 179-181, 1994.
  24. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. *한의신경정신과학*. 파주, 집문당, p 235, 2007.
  25. 程國彭. 醫學心悟. 경희대학교 한의과대학 제50기 졸업준비위원회. pp 478-499, 2002.
  26. 허 준. *동의보감*. 서울, 법민문화사, p 340, 2005.
  27. Pepeu, G., Giovannini, M.G. Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem. Biol. Interact.* 187: 403-408, 2010.
  28. Fuller, S., Münch, G., Steele, M. Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? *Expert. Rev. Neurother.* 9: 1585-1594, 2009.
  29. Varvel, N.H., Bhaskar, K., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Yang, Y., Lamb, B.T., Herrup, K. NSAIDs prevent, but do not reverse, neuronal cell cycle reentry in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 119: 3692-3702, 2009.
  30. Lee, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E., McGeer, P.L. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia* 58: 103-113, 2010.
  31. Flirski, M., Sobow, T. Biochemical markers and risk factors of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2: 47-64, 2005.
  32. Giovannini, M.G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Vannucchi, M.G., Rosi, S., Pepeu, G., Casamenti, F. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38APK pathway. *Neurobiol. Dis.* 11: 257-264, 2002.
  33. McGeer, E.G., McGeer, P.L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* 19: 355-361, 2010.
  34. Heneka, M.T., O'Banion, M.K., Terwel, D., Kummer, M.P. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 117: 919-947, 2010.
  35. Lee, B., Jung, K., Kim, D.H. Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93: 121-127, 2009.
  36. Jung, K., Lee, B., Han, S.J., Ryu, J.H., Kim, D.H. Mangiferin ameliorates scopolamine-induced learning deficits in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 242-246, 2009.
  37. Zhong, K., Wang, Q., He, Y., He, X. Evaluation of radicals scavenging, immunity-modulatory and antitumor activities of longan polysaccharides with ultrasonic extraction on in S180 tumor mice models. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 356-360, 2010.
  38. Ho, S.C., Hwang, L.S., Shen, Y.J., Lin, C.C. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10664-10670, 2007.
  39. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75: 639-653, 2004.
  40. Vallabhapurapu, S. and Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 693-733, 2009.
  41. Hwang, M.H., Damte, D., Lee, J.S., Gebru, E., Chang, Z.Q., Cheng, H., Jung, B.Y., Rhee, M.H., Park, S.C. Mycoplasma hypopneumoniae induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NF-κB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Vet. Res. Commun.* 35: 21-34, 2011.
  42. Lee, J.W., Lee, Y.K., Ban, J.O., Ha, T.Y., Yun, Y.P., Han,

- S.B., Oh, K.W., Hong, J.T. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits  $\beta$ -amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF- $\kappa$ B pathways in mice. *J. Nutr.* 139: 1987-1993, 2009.
43. Kim, T.I., Lee, Y.K., Park, S.G., Choi, I.S., Ban, J.O., Park, H.K., Nam, S.Y., Yun, Y.W., Han, S.B., Oh, K.W., Hong, J.T. L-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF- $\kappa$ B pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 1601-1610, 2009.