

도라지 추출물 연양갱이 β -amyloid에 의한 세포독성 및 Scopolamine에 의해 유도된 인지능 저하 동물 모델의 개선효과

오흥근, 김정훈, 신은혜, 강영례, 이봉근, 박상훈, 문대인, 권이성¹, 김영필¹, 최민휴¹, 김옥진^{2,3}, 박광현^{4*†}, 이학용^{*†}

(주)휴벳, ¹남영제약, ²원광대학교 생명자원과학대학 동물질병연구소, ³원광대학교 생명자원과학대학 동물자원개발 연구센터, ⁴남부대학교 한방제약개발학과

Improving Effects of Platycodon Extracts Jelly on β -amyloid-induced Cytotoxicity and Scopolamine-Induced Cognitive Impairment Animal Models

Hong-Geun Oh, Jung-Hoon Kim, Eun-Hye Shin, Young-Rye Kang, Bong-Gun Lee, Sang-Hoon Park, Dae-In Moon, Lee-Seong Kwon¹, Yong-Phill Kim¹, Min-Hyu Choi¹, Ok-Jin Kim^{2,3}, Kwang-Hyun Park^{4*†} and Hak-Yong Lee^{*†}

Huvet Co. Ltd., Iksan 570-749, Korea

¹Namyong Pharm, Jeonju 568-801, Korea

²Animal Disease Research Unit, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

³Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

⁴Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract - The aim of this study was to examine improving effect of Platycodon extracts (PE) and/or Platycodon extracts jelly (PEJ) on cognitive impairment *in vitro* and *in vivo*. PC12 (Pheochromocytoma) cells were pretreated with PE for 1hr and then incubated with 50 μ M amyloid β ($A\beta$)₂₅₋₃₅ for additional 48hr. Cell viability was assessed by WST-1. Animals for Morris water test and passive avoidance test were divided into normal, control and two Platycodon extracts treated groups that were named Normal (n=7), Control (0 mg/kg, n=7), PE (300 mg/kg, n=7), PEJ (10 g/kg, n=7). Cognitive impairment was induced by scopolamine (1 mg/kg/body weight, i.p.) in the three experimental groups but not the normal group. Pretreatment of PE (0.01-1 mg/mL) were not induced cytotoxicity but observed in high dose-treated group (5 and 10 mg/mL) in PC12 cells. Protective effects of PE against $A\beta$ -induced cytotoxicity were increased in dose dependent manner in PC12 cells. Administration of PE and PEJ were significantly reduced escape latency time on Morris water maze test and passive avoidance test in scopolamine-induced cognitive impairment animal model. These results suggest that Platycodon extracts and its related product available to ameliorative purpose for cognitive ability impairments.

Key words - Platycodon, Cognitive ability, Amyloid- β , Scopolamine, PC12 cells

서 언

도라지(*Platycodon grandiflorum* A. De Candolle)는 한

국, 일본 및 중국의 산간지방에서 널리 자생하며, 한방에서 약재로 사용되고, 일반식용으로도 널리 이용되고 있는 산 채 식품으로서 triterpenoid계 사포닌, 당질 및 섬유질을 함유하고 있다(Lee, 1975; Tada *et al.*, 1975). 이러한 사포닌은 동물실험에서 진해, 거담작용, 중추신경 억제작용, 급성 만성염, 항궤양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여

*교신저자(E-mail) : leeapf@hotmail.com (H.Y.L) and khpark@nambu.ac.kr (K.H.P)

[†]These authors contributed equally to this works.

혈압을 낮추는 혈당강화작용, 콜레스테롤 대사 개선작용, 항산화 및 항암효과 등이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 생약 재료로서 도라지는 동의보감 및 방약합편에 다양한 약리작용이 기록되었다(Akiyama *et al.*, 1972; Hong, 1975; Kim *et al.*, 1995; Lee, 1975; Lee *et al.*, 2004). 최근 도라지의 여러 가지 약리효과를 검증한 결과로 도라지의 소비량이 증가하면서 재배면적이 확대되고 있으며, 특히 도라지를 20년 이상 장기 재배하는 방법이 개발됨에 따라 다년생 도라지에 대한 각종 연구들이 활발히 진행되고 있다(Kim *et al.*, 1998; Shon *et al.*, 2001).

퇴행성 뇌질환의 하나인 치매는 가벼운 기억력의 장애부터 전반적인 인지능력의 장애를 나타내는 노인성 질환으로 오늘날의 노령화 사회에서 노인의 건강과 수명을 단축시키는 중요한 요인이다(Lee, 1975). 치매의 원인에는 다양한 가설들이 제시되고 있으나 노인성 치매는 주로 뇌혈관성과 알츠하이머(alzheimer's disease)이며, 노인성반(senile plaques)과 뇌신경섬유종(neurofibrillary tangles)을 주요 특징으로 한다(Choi, 2003). 노인성반의 주요 구성성분은 precursor protein(β -amyloid precursor protein, APP)으로부터 유도되는 β -amyloid(A β) protein 으로서 fibrillar 및 β -sheet 구조로 응집되는 경향이 있다(Selkoe, 1999; Tanzi *et al.*, 1993). 이러한 알츠하이머 병에는 많은 원인 가설들이 거론되고 있으며 그 중 유력한 가설로서 A β protein 의 과도한 축적을 들 수 있는데(Price *et al.*, 1998) A β protein의 과도한 축적은 자연 세포 사멸 기전(apoptosis pathway)를 활성화시키고(Selkoe, 1991; Harada and Sugimoto, 2000) free radical을 유도하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포를 지속적으로 파괴시켜(Yan *et al.*, 1999; Goodman and Mattson, 1994) 인지능 및 기억능력을 점진적으로 상실하게 함으로써 지속적인 neurodegeneration을 유도한다(Behl *et al.*, 1992; Hardy, 1997). 뇌의 A β protein의 축적은 acetylcholine의 합성을 저해시킴으로서(Selkoe, 2000) 뇌신경세포의 콜린성 신경전달물질의 결핍을 초래하고 이는 대뇌의 기억 및 인지능 장애를 유발할 수 있다고 보고된바 있다(Pederson *et al.*, 1996; Talesa, 2001). 퇴행성 신경질환의 대표적인 치료법으로는 항산화제 처리, 세포이식 및 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시 되고 있지만 여러가지 위험 부담이 있어 적합한 치료제가 없는 것이 현실이다. 이에 신경세포보호 효과를 가지며 뛰어난 항산화 작용을 하는 천연자원의 개발이 요구되고 있다.

최근 많은 연구들을 통해 다양한 식품소재들로부터 건강 증진 및 질병예방 효과가 밝혀지면서 소비자들은 식품을 생명유지 및 영양소 공급을 위한 1차적 기능을 넘어 생체 내에서 DNA 손상, 암 유발, 노화 등 다양한 질병의 원인과 관련성이 있는 free radical 에 의한 손상을 방지함으로써 생체를 보호하는 중요한 기능성에 주목하고 있다. 이와 더불어 한 가지 질환에만 작용하는 의약품 보다는 식용 가능한 안전한 성분으로 구성되어 장기 복용이 가능한 것으로서, 인지능을 개선 시켜주는 동시에 신경세포의 파괴를 지연시킬 수 있는 성분을 확보하려는 시도가 계속 되고 있다. 현재 도라지의 경우 분말, 청, 즙, 환의 가공식품형태로 시중에 유통되고 있으며 분말 형태가 활용도가 높고, 소비자들이 많이 찾는 경향이 있어 본 연구에서도 도라지 분말을 이용하여 실험하였다. 이러한 도라지에 대한 과학적 검증이 특히 인지능 개선에 대한 과학적 검증이 필요한 실정이다. 최근에는 에탄올로 유도된 기억력 장애 모델 동물(Choi *et al.*, 2008) 및 기억상실 모델 마우스(Moon *et al.*, 2010)를 이용한 도라지의 추출물의 효능에 관한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 PC12 세포주를 이용하여 도라지 추출물의 세포독성 및 A β 독성에 대한 보호효과를 관찰하고자 하였다. 또한 SD rats에서 도라지 추출물과 도라지 연양갱을 4주간 투여 후 scopolamine에 의해 유도된 인지능 저하 모델에서 모리스 수중미로와 수동회피를 측정함으로써 도라지 추출물이 인지능 개선에 효과가 있는지 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

도라지는 남영제약(Jeonju, Korea)에서 제공받았으며, 열수 추출(10 kg/100 L, 110 $^{\circ}$ C, 12 시간) 하였다. 추출 후 1.5 kgf/cm² 압력으로 필터크기 50, 10, 5 μ m 순으로 여과하여 살균(95 $^{\circ}$ C, 30 분)하였으며, 11.5 brix까지 농축하였다. 건조는 LAB Spray (주)한텍엔지니어링, Gyunggi, Korea; 온도: 110 - 195 $^{\circ}$ C, 건조시간: 10 시간 공압: 4.3 kg/cm³)을 이용하여 분무 건조하였다.

도라지 추출물 연양갱(Platycodon extract jelly; PEJ)는 원료 저장 및 선별, 세척, 불리기, 삶기, 물양금 제조, 졸임, 충전, 살균 냉각, 포장 단계를 거쳐 시제품을 생산하였다. 도라지 연양갱의 성분은 팔랑금 49.9%, polyglycitol syrup

23.9%, 백설탕 21.9%, 도라지 추출물 3%, 한천 1.3%로 구성되었다.

세포배양 및 생존을 검사

한국세포주은행에서 분양받은 PC12 세포(pheochromocytoma; 크롬친화성세포종)는 10% Fetal bovine serum 및 penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640을 이용하여 배양하였다. Poly-D-lysine을 코팅한 plate에 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

세포 생존을 검사는 PC12 세포는 96 well plate에 5×10^4 cells/well을 90 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 WST-1(Daeil Lab service, Seoul, Korea) 용액을 10 μ L씩 첨가하여 1 시간 동안 배양한 다음 96 well plater reader(Molecular devices, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

A β (β -amyloid₂₅₋₃₅, American Peptide Company, CA, USA)에 의한 PC12 세포의 세포독성 유발효과는 PBS에서 일주일간 응집 시킨 A β 를 5, 10, 20, 40, 50 μ M를 농도별 첨가하여 48 시간 동안 배양하여 흡광도를 측정하였다.

도라지 추출물에 의한 PC12 세포의 세포독성 유발효과는 추출물을 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 5, 10 mg/mL을 농도별로 첨가하여 24, 48 시간 동안 배양하여 흡광도를 측정하였다.

도라지 추출물의 PC12 세포 보호효과는 도라지 추출물 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도를 1 시간 전처리 후 세포 독성을 유발하기 위하여 50 μ M의 A β ₂₅₋₃₅를 처리, 48 시간 동안 배양하여 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = (\text{AT}-\text{AB})/(\text{AC}-\text{AB}) \times 100$$

(AB; absorbance of blank,

AC; absorbance of control,

AT; absorbance of tested extract solution)

실험동물

Specific-pathogen free(SPF) 상태의 6주령 수컷 Sprague-Dawley rats 28마리를 (주)샘타코(Gyeonggi, Korea)로부터 구입하여 1주일 동안 순화 사육한 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이는 일반 고형사료(Samtako, Gyeonggi, Korea)

를 자유섭취 시켰으며, 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 소음 60 phone이하, 조명시간 08:00 - 20:00(1일 12 시간), 조도 150 - 300 Lux, 환기는 시간당 10 - 12회의 환경을 유지하였다. 본 연구에 사용된 동물실험에 관련된 모든 실험과정과 절차는 원광대학교 동물실험윤리위원회의 사전심사와 윤리 규정을 준수하여 수행되었다(Approval No. WKU12-51).

군 설정 및 시료투여

인지능 개선 평가(SD rat, n = 7/group)를 위하여 다음과 같이 군 분리를 하였다. 정상군(Normal; 정상군), 대조군(Contol; vehicle), 도라지 추출물(PE; 300 mg/kg), 도라지 추출물 연양액(PEJ 10 g/kg; 도라지 추출물 300 mg/kg 함유)으로 총 4군을 각각 임의배정 하였으며, 각 군은 시료를 정해진 농도로 강제 경구투여(1회/일) 하였다.

Morris 수중미로시험(Morris water maze test)

실험동물의 공간기억을 평가하기 위해 수중미로시험을 이용하였다. 수중미로시험은(Morris, 1984) 원형풀장(직경: 150 cm, 높이: 65 cm)에 물을 50 cm를 채우고, 도피대(높이: 45 cm, 직경: 10 cm)를 보이지 않게 하기위하여 수면에 스티로폼(Styrofoam)을 넣었으며 수온은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 을 유지하였다. 인지능 훈련은 3주간 실시하였으며, 하루 2번씩 일주일에 5일간 반복하여 인지적응훈련을 수행하였다. 실험동물이 도피대에 도달하면 10 초 동안 도피대에 머물도록 하였으며, 120 초 안에 도피대를 찾지 못할 경우에는 10 초 동안 도피대에 머물도록 하여 도피대를 기억하도록 하였다. 수중미로시험은 20 분 간격으로 반복하였으며, 실험 측정은 도피대를 찾아가는 시간(escape latency)을 기록하는 probe test를 실시하였다. 인지능 검사 시에는 정상군을 제외한 모든 군에 인지능저해제인 scopolamine을 복강투여(1 mg/kg/body weight) 하였다. 4주간 도라지 추출물(300 mg/kg/body weight) 과 도라지 추출물 연양액(10 g/kg/body weight, 도라지 추출물 300mg에 해당)을 투여 후 4주차에 인지능 평가를 실시하였다.

수동회피시험(passive avoidance test)

수동회피 훈련은 Morris 수중미로시험 종료 후 5주차에 3회/1일/3일 동안 진행하였다. 수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이며 수많은 연구자들이 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되며 본 실험에서는

LeDoux의 방법(LeDoux, 1993a)을 응용하여 시행하였다. 실험시작 90 분 전에 실험동물을 행동관실 옮기고 약물을 투여하였다. 인지능 검사 시에는 정상군을 제외한 모든 군에 인지능저해제(scopolamine)를 복강투여(1 mg/kg/body weight) 하였다. 어두운 방과 밝은 방의 크기는 각각 가로(25 cm), 세로(20 cm), 높이(30 cm)로 제작하였으며 어두운 방의 전기 자극은(순간 전압:500 volt)을 주었으며 밝은 방은 빛을 주었다. 어두운 방에 실험동물을 넣고 전기 자극을 줌으로써 어두운 방에 대한 통증을 인식시켰으며, 수동회피 측정은 어두운 방에 실험동물을 넣고 통증에 대한 기억에 의해 길로틴문(gillotin door)을 네 발이 모두 나가는 시간을 측정하였다. 당일에는 어두운 방에 먹이를 주었으며, 전기 자극은 주지 않고 밝은 방으로 이동시간을 측정하였다. LeDoux의 보고(LeDoux, 1993b)에서는 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억력향상을 나타내나, 본 연구에서는 어두운 방에서 오는데 걸리는 시간이 짧을수록 수동회피의 학습과 기억력향상을 나타낸다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다. 인지능 검사 시에는 정상군을 제외한 모든 군에 인지능저해제인 scopolamine을 복강투여(1 mg/kg/body weight) 하였다. 4주간 도라지 추출물과 도라지 추출물 연양액을 투여 후 5주차에 인지능 평가를 실시하였다.

통계처리

실험결과와 그룹 간 유의성 검정은 One-way ANOVA Duncan 사후검정 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다(SPSS V12, USA).

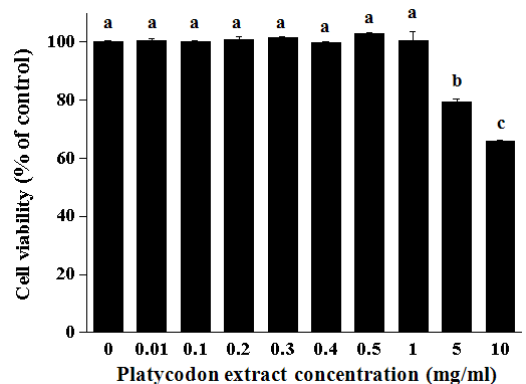
결과 및 고찰

도라지 추출물의 세포독성 및 amyloid-β 에 대한 보호효과

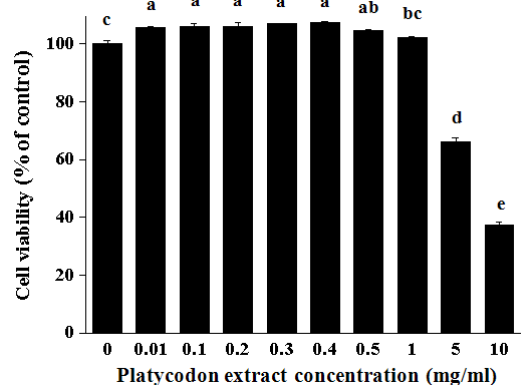
도라지 추출물이 PC12 세포의 독성을 관찰하기 위하여 농도 및 시간 의존적으로 비교하였다. 도라지 추출물의 농도는 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 5, 10 mg/mL을 24 시간 및 48 시간 동안 처리하여 배양하였다(Fig. 1). 도라지 추출물 0 - 1 mg/mL을 처리 후 24 시간 동안의 세포생존율은 각각 $100.00 \pm 0.45\%$, $100.49 \pm 0.83\%$, $100.13 \pm 0.48\%$, $100.81 \pm 0.87\%$, $101.58 \pm 0.39\%$, $99.82 \pm 0.27\%$, $102.91 \pm 0.25\%$, $100.53 \pm 3.02\%$ 로 도라지 추출물의 독성은 없었

다(Fig. 1A). 그러나 도라지 추출물 5, 10 mg/mL 농도에서는 각각 $79.49 \pm 0.76\%$ 과 $65.79 \pm 0.39\%$ 로 세포 독성이 관찰되었다($p < 0.05$). 이와 같은 방법으로 도라지 추출물 0.01 - 0.5 mg/mL을 처리 후 48 시간 동안의 세포 생존율은 각각 $105.65 \pm 0.38\%$, $105.87 \pm 1.23\%$, $105.87 \pm 1.54\%$, $106.88 \pm 0.29\%$, $107.38 \pm 0.25\%$, $104.75 \pm 0.28\%$ 로 대조군($100.00 \pm 1.29\%$)에 비하여 증가하였으며($p < 0.05$), 1 mg/mL($102.30 \pm 0.28\%$)은 증가하는 경향이 관찰되었다(Fig. 1B). 그러나 5 mg/mL($66.19 \pm 0.28\%$)와 10 mg/mL($37.38 \pm 0.96\%$)의 세포생존율은 대조군에 비하여 유의하게 감소하여 세포 독성이 관찰되었다($p < 0.05$).

또한 도라지 추출물을 23 brix로 농축 후 분무건조와 본 연구에 사용된 11.5 brix로 농축 후 분무 건조한 추출물의



(A)



(B)

Fig. 1. Effect of cell viability on Platycodon extract (PE) treatment for 24hr (A) and 48hr (B) in pheochromocytoma (PC12) cell line.

^{a,b,c,d,e} Values in the row with different superscripts are significantly different, $p < 0.05$. Data are shown as the mean \pm SE (n = 4).

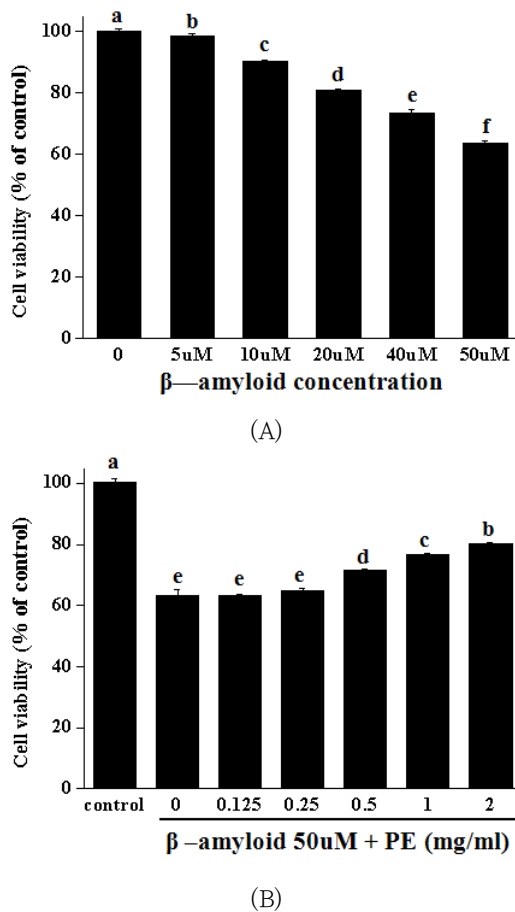


Fig. 2. Effect of cell viability on $A\beta$ treatment for 48hr after with pretreatment of Platycodon extract (PE) (B) or without (A) for 1hr by dose dependent manner in pheochromocytoma (PC12) cell line.

^{a,b,c,d,e,f}Values in the row with different superscripts are significantly different, $p < 0.05$. Data are shown as the mean \pm SE (n = 4).

세포독성은 위의 결과와 유사하게 관찰되었으며, 도라지 추출물을 11 brix 및 23 brix로 농축 후 동결건조한 도라지 추출물에서의 세포독성도 유사한 결과를 관찰하였다(data not shown).

PC-12 세포에서 $A\beta$ 에 의한 세포독성을 관찰하기 위하여 $A\beta$ 를 5, 10, 20, 40, 50 μ M의 농도를 처리하여 48 시간 동안의 세포 생존율을 관찰하였으며, $A\beta$ 를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율에 대한 비율로 나타내었다. $A\beta$ 에 대한 세포 생존율은 5-50 μ M이 각각 $98.43 \pm 0.79\%$, $90.35 \pm 0.39\%$, $80.98 \pm 0.32\%$, $73.52 \pm 0.94\%$, $63.63 \pm 0.71\%$ 로 모든 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 2A, $p < 0.05$). 따라서 $A\beta$ 에 의한 PC12 세포에 대한 보호효과는 세포 생존

율이 $63.63 \pm 0.71\%$ 로 관찰된 50 μ M $A\beta$ 를 처리하였다(Fig. 2B). $A\beta$ 만을 처리한 군의 세포 생존율은 $63.09 \pm 1.97\%$ 으로 대조군(con)에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). $A\beta$ 와 도라지 추출물 0.125 mg/mL과 0.25 mg/mL을 1 시간 전 처리한(pretreatment) 군의 세포생존율은 $63.38 \pm 0.29\%$ 와 $64.97 \pm 0.41\%$ 로 $A\beta$ 에 의한 세포 보호효과는 없었으나, 0.5, 1, 2 mg/mL의 세포생존율은 각각 $71.65 \pm 0.30\%$, $76.70 \pm 0.40\%$, $80.05 \pm 0.33\%$ 로 $A\beta$ 에 의한 세포 보호효과는 유의적으로 관찰되었다($p < 0.05$).

$A\beta$ 를 주성분으로 하는 노인반의 축적은 Alzheimer disease와 같은 인지능력 저하를 시키는 가장 주된 증상이며, 인지능력 저하 개시와 진행에 있어 $A\beta$ 가 기여함을 보여주는 많은 증거가 제시되어왔다(Bayer *et al.*, 2001). 따라서 $A\beta$ 에 의한 신경세포손상과 세포독성의 본질을 이해하는 것이 Alzheimer disease와 같은 인지능력 저하를 예방 및 치료를 위해 매우 중요하다. $A\beta$ 의 세포독성에 관한 많은 연구들이 진행되어 왔으며, 본 연구에서도 $A\beta$ 에 의한 세포 독성을 억제함으로써 인지능 개선에 대한 영향을 관찰하였다. 도라지에 대한 세포 독성을 24 시간과 48 시간에서 각각 5 mg/mL과 10 mg/mL에서 확인하였으며, 따라서 도라지 추출물의 농도를 0.125 - 2 mg/mL로 설정하였다(Fig. 1) $A\beta$ 에 대한 세포 보호효과는 도라지 추출물 0.5, 1, 2 mg/mL에서 유의하게 보호하였다(Fig. 2). 도라지에는 트리테르페노이드 사포닌(triterpenoid saponins)과 같은 사포닌이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Ebert and Kirch, 1998). 최근 Ji 등의 보고(Ji *et al.*, 2012)에 의하면 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 PC12 세포 독성이 triterpene saponins에 의해 보호되었다고 알려졌다. 따라서 본 연구에서는 도라지 추출물이 PC12 세포 독성이 없는 최적의 농도에서 $A\beta$ 에 대한 세포 독성을 억제함을 관찰하였다. 이러한 도라지 추출물이 $A\beta$ 의한 세포사멸의 감소는 인지능 개선에 도움을 줄 것으로 생각되며, 인지능 개선에 대한 도라지의 유효성분 확인과 기전 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

수중미로시험 및 수동회피시험의 기억력 회복 효과

인지능저해제(Scopolamine, 1 mg/kg, ip)를 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 도라지 추출물(PE) 및 도라지 추출물 연양갱(PEJ)을 4주간 강제경구 투여가 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수중미로시험 장치를 이용하여 확인하였다(Fig. 3).

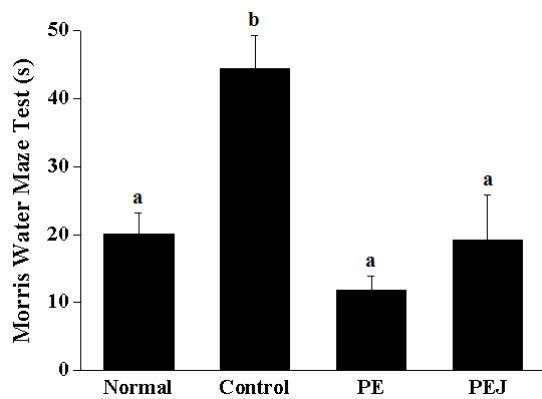


Fig. 3. Effect of the Platycodon extract (PE) and Platycodon extract jelly (PEJ) on the Morris water maze test in the Scopolamine-induced memory impairment model.

^{a,b}Values in the row with different superscripts are significantly different, $p < 0.05$. Data are shown as the mean \pm SE (n = 7).

인지능저해제의 투여에 의한 기억력 손상은 인지능저해제를 투여한 대조군(Control)의 도피대 도달시간(escape latency)은 44.43 ± 4.81 초로 정상군(Normal)의 20.14 ± 3.02 초에 대하여 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). Morris 수중미로에서 도피대 도달시간 감소는 장기기억과 관련된 학습능력을 나타낸다. 치매유발 물질인 scopolamine 처리군은 도피대 도달시간이 감소하지 않아 장기기억(longterm memory)이 손상된 것을 알 수 있었다. 그러나 도라지 추출물(PE)과 도라지 추출물 연양갱(PEJ)을 4주간 경구 투여한 군의 도피대 도달시간은 각각 11.86 ± 1.99 초, 19.14 ± 6.63 초로 대조군에 비하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 특히 도라지 추출물 투여군은 정상군에 비해서도 도피대 도달시간이 감소하는 경향을 관찰하였다.

인지능저해제를 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 도라지 추출물(PE) 및 도라지 추출물 연양갱(PEJ)이 기억력 손상에 대한 억제 효과를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였다(Fig. 4).

인지능저해제의 투여에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 인지능저해제를 투여군(Control)은 전기충격이 있는 어두운 방에 나오는 시간이 34.50 ± 4.8 초로 정상군(Normal)의 14.16 ± 2.90 초에 대하여 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 이는 학습시험 시의 전기 충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 인지능 저해제에 의한 기억력 감퇴 모델의 구축을 증명한다. 도라지 추출물(PE)과 도라지

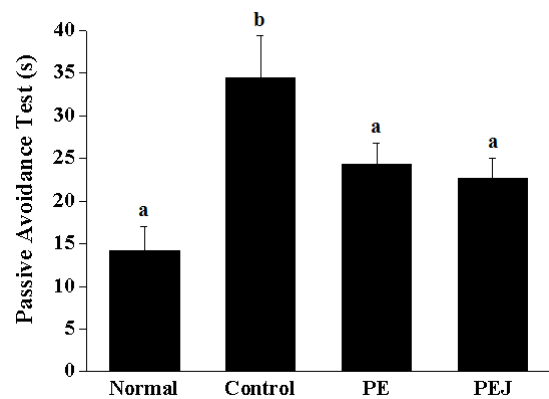


Fig. 4. Effect of the Platycodon extract (PE) and Platycodon extract jelly (PEJ) on the passive avoidance test in the Scopolamine-induced memory impairment model.

^{a,b}Values in the row with different superscripts are significantly different, $p < 0.05$. Data are shown as the mean \pm SE (n = 7).

추출물 연양갱(PEJ)을 4주간 경구 투여한 결과 각각 24.31 ± 2.47 초, 22.66 ± 2.42 초로 통계적으로 유의성 있게 어두운 방을 나오는 시간이 감소하였다($p < 0.05$).

도라지 추출물과 도라지 추출물 연양갱의 4주간 투여는 4일간의 인지훈련기간 동안 수중미로상의 도피대의 위치를 인지하고 반복되는 연속적인 훈련을 통해 공간 지각력을 확실하게 기억하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 도라지 추출물과 도라지 추출물 연양갱이 인지능저해제로 유도한 인지능 저해 동물모델에서 기억 개선효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 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(Myhrer, 2003; Blokland, 1995). 인지능저해제인 Scopolamine은 cholinergic 신경의 subtype 중 하나인 무스카린 수용체를 차단하는 약물로 아세틸콜린의 양은 변화시키지 않고 시냅스 간극에서 아세틸콜린이 수용체에 결합하는 것을 방해한다(Ebert and Kirch, 1998). 이는 중추신경계 cholinergic 신경의 손상에 의해 나타나는 현상과 유사한 기억력 감퇴를 나타내며 이 모델에서 효과가 있는 약물은 cholinergic 신경계를 경유하여 효능을 나타낼 것이라 생각할 수 있다. 따라서 도라지 추출물 경구섭취는 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선 및 인지능력을 향상시킬 수 있다고 생각된다. 최근 Yoo 등의 보고(Yoo *et al.*,

2008)에 의하면 인지능 장애 모델에서 4주간 100mg/kg의 도라지 추출물 투여는 해마(Hippocampus) 치상회(Dentate Gyrus)의 하과립층(Subgranular Zone)의 세포 증식인자인 BrdU 와 Ki67, 신경모세포(neuroblasts)의 분화 인자인 DCX (Doublecortin)이 유의하게 증가되었다고 보고되었다. 도라지에는 트리테르페노이드 사포닌, 폴리아세틸렌(polyacetyles), 다당류(polysaccharides), 페닐프로판노이드 에스테르(phenylpropanoid esters)가 함유되어 있으며, 이중 도라지에서 추출된 사포닌 분획은 기억력 개선 효과가 있는 것으로 보고되었다(Ebert and Kirch, 1998). 특히, 사포닌 성분 중 platycoside E는 기억력 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며(Choi *et al.*, 1995) platycosides 와 platycodin D를 신속하게 분리 정제할 수 있는 기술이 보고되고 있다(Ha *et al.*, 2010). Moon 등에 의하면(Moon *et al.*, 2010) 도라지의 에탄올 추출물은 scopolamine으로 유도된 기억력 장애 모델 동물의 인지능을 향상시킨 연구결과를 제시하였으며, 본 연구에서 사용한 도라지 물 추출물 및 도라지 추출물 연양갱과 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과들은 도라지는 다양한 추출 기술을 적용하여도 우수한 인지능 개선 효능을 보유하고 있음을 증명하고 있지만, 서로 다른 추출 방법에 따라 분리된 유효성분이 동일함을 의미하지는 않으므로 구체적인 성분 분석과 효능평가가 요구된다. 더구나 본 연구에서의 세포를 이용한 도라지 추출물의 독성 용량의 평가는(Fig. 1 and 2) 연양갱의 제조등과 같은 자원 식물의 산업적 활용 및 응용에 유용한 정보를 제공하였다.

신경 세포등 인지와 관련된 세포에의 A β 의 처리에 의한 세포 독성은 비가역적인 apoptotic 경로를 경유하는 것으로 보고된 경우가 있으며(Forloni *et al.*, 1993; Loo *et al.*, 1993), 또다른 문헌에서는 necrotic 세포 사멸에 더욱 민감하게 작용하는 것으로도(Koh *et al.*, 1990; Mattson *et al.*, 1992) 보고된 바 있다. A β 는 세포의 막, 미토콘드리아 및 기타 독성 단백질과 결합할 수 있어(Kakio *et al.*, 2004; Freir *et al.*, 2011; Spuch *et al.*, 2012) 세포에 따라 작용점이 다르며 약물을 이용한 표적의 규명이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서 관찰한 PC12 세포에서 도라지 추출물의 A β 가 유발하는 세포 독성 차단 기전을 규명하기 위해서는 세포수준 및 동물 모델에서의 병리생태학적인 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결론적으로 본 연구에서는 도라지 추출물은 낮은 독성을 가지고 있으며 A β 에 의한 세포 독성을 저감시킴을 확인하

였다. 또한 도라지 추출물과 도라지 추출물 연양갱을 4주간 강제 경구 투여 하여 수중미로시험 및 수동회피시험을 통하여 인지능 개선 평가를 하였으며, 탈출 시간등의 지표가 유의하게 개선되었다. 따라서 도라지 추출물 및 도라지 추출물 연양갱의 지속적인 섭취는 인지능 개선에 도움을 줄 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2011 지식경제부 전라북도 지역기반육성기술 개발사업(과제번호: 11기반003)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사를 드립니다.

적 요

본 연구에서는 도라지 추출물에 대한 세포 독성을 확인하였으며, A β 에 의한 PC12 세포 독성에 대한 보호효과를 관찰하였다. 또한 도라지 추출물과 도라지 추출물 연양갱을 4주간 강제 경구 투여하여 Morris 수중미로시험에서 도달지점까지의 도달시간이 도라지 추출물 및 도라지 추출물 연양갱 투여에 의해서 모두에서 유의하게 감소하였다. 이와 유사하게 수동회피시험에서도 자극이 있는 어두운 방을 나오는 시간이 도라지 추출물 및 도라지 추출물 연양갱 투여에 의해서 현저하게 감소하였다. 따라서 도라지 추출물 및 도라지 추출물 연양갱은 인지능 개선에 도움을 줄 것으로 생각된다.

인용문헌

- Akiyama, T., O. Tanaka and S. Shibata. 1972. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXX. Sapogenins of the roots of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. (1). Isolation of the sapogenins and the stereochemistry of polygalacic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 20:1945-1951.
- Bayer, T.A., O. Wirths, K. Majtenyi, T. Hartmann, G. Multhaup, K. Beyreuther and C. Czech. 2001. Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol.* 11:1-11.
- Behl, C., J.B. Davis, G.M. Cole and D. Schubert. 1992. Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:944-950.

- Blokland, A. 1995. Acetylcholin: a neurotransmitter for learning and memory-Brain research. *Brain Res. Rev.* 21:285-300.
- Choi, K.G. 2003. The long-term care and dementia policy in welfare states. *Soc. Welfare Policy* 17:55-75.
- Choi, Y.H., Y.S. Kim, S.J. Yeo, S.H. Roh, Y.C. Jeong, J.S. Kang and S.Y. Ryu. 1995. Ameliorating effect of balloon flower saponin on the ethanol-induced memory impairment in mice. *Phytother. Res.* 10:2394.
- Ebert, U. and W. Kirch. 1998. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest.* 28:944-949.
- Forloni, G, R. Chiesa, S. Smioldo, L. Verga, M. Salmona, F. Tagliavini and N. Angeretti. 1993. Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4:523-6.
- Freir, D.B., A.J. Nicoll, I. Klyubin, S. Panico, J.M. Mc Donald, E. Risse, E.A. Asante, M.A. Farrow, R.B. Sessions, H.R. Saibil, A.R. Clarke, M.J. Rowan, D.M. Walsh and J. Collinge. 2011. Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat. Commun.* 2:336
- Goodman, Y. and M.P. Mattson. 1994. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* 128:1-12.
- Ha, I.J., Y.W. Ha, M. Kang, J. Lee, D. Park and Y.S. Kim. 2010. Enzymatic transformation of platycosides and one-step separation of platycodin D by high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 33:1916-1922
- Harada, J. and M. Sugimoto. 2000. Activation of caspase-3 in β -amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 842:311-323.
- Hardy, J. 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20:154-159.
- Hong, M.W. 1975. Statistical analyses of *Platycodi radix* prescriptions. *Korean J. Pharmacog.* 19:177-188.
- Ji, D., Y. Wu, B. Zhang, C.F. Zhang and Z.L. Yang. 2012. Triterpene saponins from the roots of *Dipsacus asper* and their protective effects against the $A\beta(25-35)$ induced cytotoxicity in PC12 cells. *Fitoterapia* 83(5):843-848.
- Kakio, A., Y. Yano, D. Takai, Y. Kuroda, O. Matsumoto, Y. Kozutsumi and K. Matsuzaki. 2004. Interaction between amyloid beta-protein aggregates and membranes. *J. Pept. Sci.* 10:612-21.
- Kim, K.S., E. Osamu, I. Shinji and I. Hiroshige. 1995. Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41:485-491.
- Kim, Y.S., B.E. Lee, K.J. Kim, Y.T. Lee, K.B. Cho and Y.C. Chung. 1998. Antitumor and immunomodulatory activities of the *P. grandiflorum* cultivated for more than 20 years. *Yakhak Hoeji.* 42:382-387.
- Koh, J.Y., L.L. Yang and C.W. Cotman. 1990. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533:315-320.
- LeDoux, J.E. 1993a. Emotional memory system in the brain. *Behav. Brain Res.* 20:69-79.
- LeDoux, J.E. 1993b. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann. NY Acad. Sci.* 702:149-157.
- Lim, K.H. A medicinal Phytology (The details). Dong Myoung Sa, Seoul, Korea. p. 281, p. 1971.
- Lee, E.B. 1975. Pharmacological activities of crude platycodin. *J. Pharm. Soc. Korean* 19:164-176.
- Lee, J.Y., W.I. Hwang and S.T. Lim. 2004. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.* 93:409-415.
- Lee, S.I. 1981. Chinese pharmaceutics. Soo Seo Won, Seoul, Korea. p 129.
- Loo, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz and C.W. Cotman. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(17):7951-5.
- Mattso, M.P., B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg and R.E. Rydel. 1992. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12(2):376-389.
- Morris, R.G. 1984. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 11:47-60.
- Moon, M.K., J.Y. Ahn, S. Kim, S.Y. Ryu, Y.S. Kim and T.Y. Ha. 2010. Ethanol extract and saponin of *Platycodon grandiflorum* ameliorate scopolamine-induced amnesia in mice. *J. Med. Food.* 13:584-588.
- Myhrer, T. 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Rev.* 41:268-297.
- Pederson, W.A., M.A. Kloczewiak and J.K. Bluszajin. 1996. Amyloid beta-protein reduces acetylcholin synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8068-8071.

- Price, D.L., R.E. Tanzi, D.R. Borchelt and S.S. Sisodia. 1998. Alzheimer' disease: genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* 32:461-493.
- Choi, Y.H., Y.S. Kim, S.J. Yeo, S.H. Roh, Y.C. Jeong, J.S. Kang and S.Y. Ryu. 2008. Ameliorating effect of balloon flower saponin on the ethanol-induced memory impairment in mice. *Phytother Res.* 22:973-6
- Selkoe, D.J. 1991. The molecular pathology of Alzheimer' disease. *Neuron.* 6:487-498.
- Selkoe, D.J. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399:A23-A31.
- Selkoe, D.J. 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. NY Acad. Sci.* 924:17-25.
- Shon, M.Y., J.K. Seo, H.J. Kim and N.J. Sung. 2001. Chemical compositions and physiological activities of Doraji (*Platycodon grandiflorum*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30:717-720.
- Spuch, C., S. Ortolano and C. Navarro. 2012. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *J. Aging Res.* 2012: 324968
- Tada, A., Y. Kaneiwa, J. Shoji and S. Shibata. 1975. Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. *Chem. Pharm. Bull.* 23:2965-2972.
- Talesa, V.N. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.* 122:1961-1969.
- Tanzi, R.E., S. Gaston, A. Bush, D. Romano, W. Pettingell, J. Peppercorn, M. Paradis, S. Gurubhagavatula, B. Jenkins and W. Wasco. 1993. Genetic-heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer-disease. *Genetica* 91:255-263.
- Yan, X.Z., J.T. Qiao, Y. Dou and Z.D. Qiao. 1999. Beta-amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 92:177-184.
- Yoo, K.Y., O.K. Park, I.K. Hwang, H. Li, S.Y. Ryu, I.J. Kang, J.S. Yi, Y.S. Bae, J.S. Park, Y.S. Kim and M.H. Won. 2008. Induction of cell proliferation and neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus by aqueous extract from *Platycodon grandiflorum* in middle-aged mice. *Neuroscience Letters* 444:97-101.

(Received 1 February 2013 ; Revised 16 April 2013 ; Accepted 29 July 2013)