

증숙 더덕 추출물의 인지능력 개선 효과

원진배¹ · 윤보라¹ · 이지우¹ · 엄민례¹ · 고현정³ · 이현용⁴ · 박동식⁵ · 정희철⁶ · 정재윤⁶ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 생물소재공학과, ²강원대학교 생명공학연구소, ³강원대학교 약학대학,
⁴서원대학교 차학과(식품공학과), ⁵농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과, ⁶㈜뉴트리

Effect of Steamed *Codonopsis lanceolata* on Spatial Learning and Memory in Mice

Jin Bae Weon¹, Bo-Ra Yun¹, Jiwoo Lee¹, Min Rye Eom¹, Hyun-Jeong Ko³, Hyeon Yong Lee⁴,
Dong-Sik Park⁵, Hee-Chul Chung⁶, Jae Youn Chung⁶ and Choong Je Ma^{1,2*}

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Research Institute of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

⁴Department of Teacis, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

⁵Functional food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, Suwon 441-853, Korea

⁶Newtree CO., LTD. 11F Tech Center, SKnTechno Park, 190-1, Sunnam 462-120, Korea

Abstract – Alzheimer’s disease is progressive neurodegenerative disorder by the loss of memory and learning abilities. *Codonopsis lanceolata* (*C. lanceolata*) is traditional medicinal plant used for the treatment of inflammatory diseases. The aim of study was to evaluate the effect of steamed *C. lanceolata* on scopolamine-induced memory impairment in the Morris water maze test and passive avoidance test. In addition, this study investigated the neuroprotective effects of steamed *C. lanceolata* on glutamate-induced cell death in HT22 cells using MTT assay. The results showed that steamed *C. lanceolata* (500 mg/kg body weight, p.o.) reversed spatial memory impairment by scopolamine in Morris water maze test and passive avoidance test. Steamed *C. lanceolata* attenuated memory impairment by scopolamine compared with common *C. lanceolata*. In addition, administration of steamed *C. lanceolata* significantly also reduced cell death. We suggest that steaming process more improve cognitive enhancing and neuroprotective effect of *C. lanceolata* than common *C. lanceolata*.

Key words – *Codonopsis lanceolata*, Cognitive enhancing effect, Neuroprotective effect, Steaming process

최근 의학과 생명과학의 발달로 인구의 노령화가 증가함에 따라 퇴행성 질환에 대한 관심이 집중되고 있다. 대표적인 퇴행성 질환으로 기억력 장애를 일으키는 것을 치매라고 한다. 알츠하이머 병이 가장 일반적인 치매의 유형이며 사회적인 문제로 대두되고 있다.¹⁾ 알츠하이머 병은 인지능력 저하 및 언어장애를 통해 일상 생활에 장애를 일으키는 특징을 가지고 있다.²⁾ 알츠하이머 병의 발생 원인이 정확하게 밝혀지지 않았으며, 통일된 가설이 없다. 여러 원인이 동시에 일어날 수 있다. 보고된 알츠하이머 병의 발병 기전은 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포의 사멸, 신경세포의

amyloid beta protein로 구성된 senile plaque과 hyperphosphorylated tau protein로 구성된 neurofibrillary tangle의 축적 그리고 acetylcholinesterase(AchE)에 의한 신경 전달 물질인 acetylcholine(Ach)의 감소 등이 있다.³⁻⁶⁾ 현재 비타민 E와 셀레질린(Selegiline) 같은 항산화제나 AchE 억제제인 타크린(Tacrine)과 아리셉트(Aricept) 등이 치매 치료제로 사용되고 있다. 이들 치료제는 완벽하게 치매를 치료하는 것이 아니라 치매를 늦추거나 예방하는 정도의 효과를 나타낸다. 또한 일시적인 간독성, 위장관 장애 그리고 심장 서맥 유발 등의 부작용을 일으키기 때문에 새로운 치료제들을 개발하고 요구되고 있다.⁷⁻⁹⁾

천연물의 경우, 경험적으로 안전성과 유효성이 입증되었

*교신저자(E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-10-4344-7442

기 때문에 부작용이 적고 개발 기간과 비용을 절감할 수 있다. 최근 나팔꽃씨, 현호색, 참당귀 그리고 현삼 등 천연물을 이용한 치매 치료제 개발을 위해 연구가 진행 중이다.¹⁰⁾ 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과(Campanulaceae) 더덕속에 속하는 다년생 덩굴식물로, 사삼(沙蔘)이라고 한다. 예로부터 더덕은 두통이나 현기증 치료, 강장, 해열에 효과가 있다고 한다. 최근 연구에 따르면 더덕은 항산화 효과, 항장 활성화 증진 그리고 비장세포 증식능과 cytokine 분비 효과를 이용한 면역 활성화 등이 보고 되었다.¹¹⁻¹³⁾ 더덕의 주요 생리활성 성분은 대부분 triterpene saponin의 형태로 존재하는 saponin과 phenylpropanoid이고 saponin중 lancemaside A는 더덕에 가장 많이 들어 있는 주요 생리활성 성분이다.^{14,15)}

본 연구에서는 일반 더덕의 활성을 높이기 위해 증숙 과정을 거친 더덕 ethanol 추출물의 인지능 개선 효과와 뇌 신경 세포 보호 활성을 측정하였으며, 일반 더덕 ethanol 추출물과 활성을 비교하였다. 인지능 개선 효과를 측정하기 위해 Morris water maze test(수중 미로 실험)과 passive avoidance test(수동 회피 실험)을 진행하였으며, 뇌 신경 세포 보호 활성은 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 cell line 을 이용하여 측정하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료 - 세포 배양액으로 사용되는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL. Co.(Eggenstein, Germany)으로 부터 구입하였다. 세포 독성을 일으키는 glutamate와 positive control으로 사용되는 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(troxol), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), 치매 유도제인 scopolamine, carboxymethyl cellulose는 Sigma(St. Louis, U.S.A.)로 부터 구입하여 사용하였다. Donepezil은 삼진제약(Seoul, Korea)으로 부터 구입하여 사용하였다.

더덕 시료의 제조 - 본 연구에서 사용된 더덕은 강원도 횡성 지역에서 채취한 것을 사용하였고 대전대학교 서영배 교수님을 통해 식물분류학적 동정을 실시하였다. 증숙 더덕 제조하기 위해 더덕을 세정하여 이물질을 제거한 후 음건 조건하에서 20~30°C, 1~2일 건조하였다. 증숙 과정은 예전 연구를 바탕으로 페놀 화합물 및 활성 등을 고려하여 표준화된 방법을 이용하여 제조하였다.^{16,17)} 건조된 더덕을 마하스텝기(Daechang stainless, Korea)를 사용하여 90°C에서 12시간 증숙 한 후, 12시간 건조하였다. 이 증숙 건조 과정을 5번 반복하여 진행하였다. 일반 더덕과 증숙 더덕을 100 g 씩 8~10배수(w/w)의 70% 에탄올을 사용하여 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에서 80°C에서 24시간 추출하였다. 추출액은 회전식 감압농축기를 사용하여 농축시킨 후 동결

건조기를 통해 분말상태로 준비하여 실험에 사용하였다. 최종 수율은 12%로 측정되었다.

실험 동물 - ICR 마우스(4주령, 수컷)를 대한 바이오링크(충북 음성군, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 마우스는 사육실에서 온도는 22±2°C, 습도는 50±10%를 유지시키고, 명암은 12시간을 주기(09:00~21:00)로 조절하였고, 일주일 동안 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 적응기간 동안 사료와 물을 제한 없이 자유 공급하였다. 마우스는 대조군, scopolamine 투여군, donepezil 투여군, 농도 별 일반 더덕 추출물과 증숙 더덕 추출물 투여군으로 임의로 나누었고 각 군당 7마리씩 구성하였다.

약물 투여 - 수중 미로 실험과 수동 회피 실험 진행 120분 전에 0.5% CMC에 녹인 양성 대조군인 donepezil(1 mg/kg), 일반 더덕 추출물과 증숙 더덕 추출물(100, 300과 500 mg/kg)을 금속제 경구 투여용 존대를 이용하여 경구 투여 하였다. 더덕 추출물의 농도는 예전 연구를 참고하여 정하였다.^{18,19)} 대조군은 같은 량의 0.5% CMC만을 투여하였다. 동물 행동 실험 30분 전에 기억 손상을 유도하기 위한 생리 식염수에 녹인 scopolamine(1 mg/kg)을 피하 투여 하였다. 대조군은 같은 량의 생리식염수만을 투여하였다.

수중미로 실험(Morris Water Maze Test) - 인지능 개선 효과를 측정하기 위해 수중 미로 실험을 진행하였다. 수중 미로 실험은 공간 기억력 측정을 위해 보편적인 실험으로 Morris가 제시한 방법을 응용 하였다.²⁰⁾ 직경 90 cm와 높이 40 cm의 Water maze pool안에 20±1°C의 물을 채우고 흰 우유를 섞어 불투명하게 하여 platform이 보이지 않게 하였다. Pool을 4구역으로 정확히 나누고 그 중 한 구역의 중간에 platform(직경 10 cm, 높이 26 cm)를 수면아래 1 cm에 위치하도록 하였고 실험기간 동안 고정하였다. 4일 동안 trial 사이에 20분씩 간격을 두었고 2번 반복실험(trial 1과 trial 2)을 하였으며, 입수 지점은 매일 구역별 위치를 달리하였다. 실험 첫날은 적응 실험을 위해 60초 동안 platform 없이 수영을 하도록 하였다. 측정 실험은 2일째부터 진행하였으며, 마우스가 platform에 도달하면 10초 동안 platform에 머물게 하였다. 실험은 120초 동안 진행 하였고, platform을 찾지 못하면 실험을 중단하고 10초 동안 마우스를 platform에 올려놓고 위치를 기억 시킨 후 다음 실험을 진행한다. Escape latency time은 마우스가 입수 지점에서 platform을 찾아가는 시간을 기록하여 공간 기억 개선 능력 평가하였다. 6일째 platform을 제거한 상태에서 마우스를 1분 동안 수영하게 하였다. Probe test는 1분 동안 platform이 위치한 구역에서 수영한 시간을 측정(s)하여 기록하여 평가하였다.

수동회피 실험(Passive Avoidance Test) - 기억력 증진 효과를 측정하기 위해 수동회피 실험을 진행하였으며, 수동 회피 상자(GEMINITM Avoidance System, San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)를 통해 step-through

test를 실시하였다. 수동 회피 상자는 두 개의 상자가 있고 전기 충격을 가하기 위한 스테인레스 막대가 깔려 있다. 상자 사이에는 마우스가 이동할 수 있는 자동문이 설치되어 있다. 상자 적응을 위해 한쪽 어두운 상자에 1분간 머무르게 한 후 불빛과 소음을 일으키면 가운데 문이 열리고, 마우스가 회피 상자로 이동하게 한다. 마우스를 다시 어두운 상자에 넣은 후 20초 후에 다시 불빛과 소음을 일으킨다. 마우스가 회피 상자로 들어가고 2초 뒤 전기충격(0.1 mA/10 g body)을 준다. 24시간 후, 같은 방법을 통해 측정 실험을 진행한다. 마우스가 회피 박스로 이동하는 시간을 step through latency으로 측정하여 기억력을 평가한다. 불빛과 소음을 일으킨 후, 180초 동안 움직임이 없으면 실험을 중단하였다.

HT22 세포배양 및 뇌신경세포 보호 활성 측정 - MTT assay를 통해 증숙 발효 더덕의 뇌신경세포 보호 활성을 측정하였다. 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 cells는 서울대학교로부터 분양 받아 사용하였다. HT22 cells는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 5% CO₂와 37°C 조건 배양기 내에서 배양하였다.

뇌신경세포 보호 활성을 측정하기 위해 배양된 HT22 cells를 6.7×10⁴ cells/300 μl씩 48-well plate에 분주하여 배양하였다. 24시간 후, 증숙 발효 더덕 sample(100과 500 μg/ml), 50 μM Trolox(positive control)와 2 mM glutamate를 첨가한 후, 5% CO₂와 37°C 조건 배양기 내에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 처리한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 뇌세포 보호 활성은 relative protection(%)로 나타났다. 통계처리는 ANOVA test를 적용하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

페놀성 화합물 함량 측정 - HPLC를 이용해 증숙 더덕 추출물의 페놀성 화합물, gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeine 함량을 분석하였다. HPLC system은 Agilent 1260 series(Agilent technologies, California, USA)을 사용하였고, UV/VIS detector을 통해 측정하였다. 분석은 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250×4.60 mm i.d., 5 μm) column을 통해 35°C에서 실시하였다. Mobile phase는 10% acetonitrile with 0.1% formic acid (A)과 0.1% formic acid in 40% acetonitrile and 40% methanol (B)로 구성하였다. 분리능을 높이기 위해 gradient system(0-15 min, 95% A; 15-23 min, 60% A; 23-33 min, 60% A; 33-42 min, 0% A; 42-45 min, 95% A; 45-50 min, 95% A)을 사용하였으며, 유속은 1 ml/min로 설정하였다. UV/VIS detector의 파장은 280 nm에서 확인하였다.

총 페놀 함량 분석 - 더덕 추출물의 총 페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다. 더덕 추출물 1 ml에 증류수 3 ml과 Folin & Ciocalteu 시약을 첨가한 후, 5분간 반응시켰

다. 반응 용액에 10% NaOH 용액 1 ml을 가한 후, 실온에서 1시간 방치시킨 후 640 nm에서 UV-vis spectrophotometer를 통해 흡광도를 측정하였다.

통계처리 - 모든 실험 결과는 mean±SD로 나타내었고 통계처리는 SPSS 통계(IBM SPSS statistics 20)을 이용하였다. 수중 미로 실험의 escape latency(s)는 이원분석방법(two-way ANOVA)을 실시하였다. 수중 미로 실험의 the probe trial test, 수동 회피 실험 그리고 MTT assay 결과는 일원분석방법(one-way ANOVA)을 실시하였다. 각 결과의 유의성은 $p < 0.05$, 0.01 그리고 0.001의 수준으로 검정하였다.

결과 및 고찰

수중 미로 실험에서 증숙 더덕 추출물의 효과 - 공간 기억력 개선 효과를 측정하기 위해 수중 미로 실험을 실시하

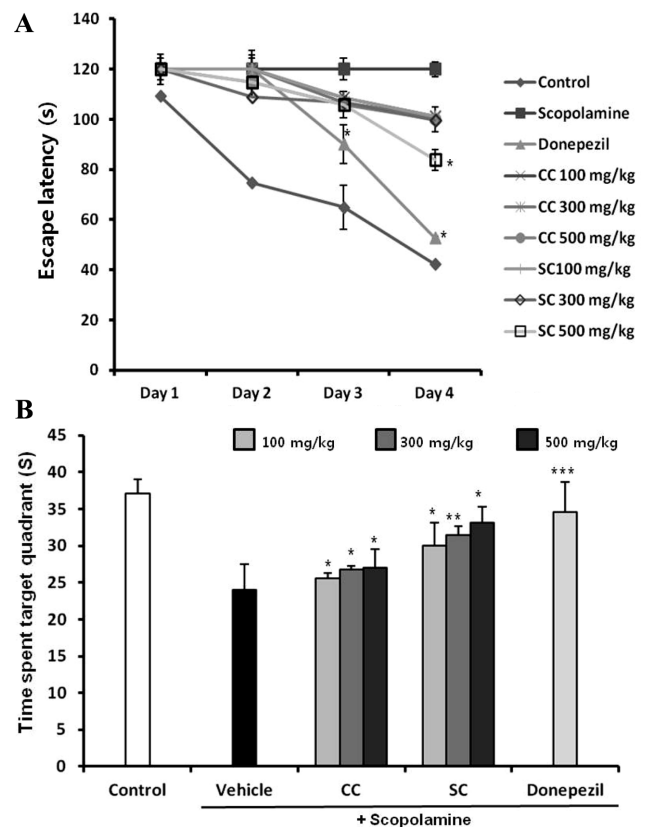


Fig. 1. The effect of steamed *C. lanceolata* extract (SC) and common *C. lanceolata* extract (CC) (100, 300 and 500 mg/kg) in the Morris water maze test. (A) The escape latency in trial sessions during 4 days. The values shown are the mean escape latency ± SD (n=7). * $p < 0.05$, significant in comparison to scopolamine treated group (vehicle). (B) The swimming time in the quadrant where the platform was once placed in the probe trial. The values shown are the mean escape latency ± SD (n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significant in comparison to scopolamine treated group (vehicle).

었다. Scopolamine은 기억력을 손상을 유도시키는데 사용되었다.²¹⁾ 실험 기간 동안 trial 1과 2의 평균 escape latency(s)를 통해 증숙 더덕 추출물의 효과를 확인하였다. 대조군은 실험 4일 동안 escape latency가 실험이 진행됨에 따라 감소하였다. Scopolamine 처리군은 실험 기간 동안 platform을 찾아가지 못하였다[F(1, 64)=2.93, $p<0.05$]. 증숙 발효 더덕 추출물 처리군(100과 300 mg/kg)은 scopolamine에 의해 증가된 escape latency를 3일째부터 감소하는 경향을 나타내었으며, 500 mg/kg의 증숙 더덕 추출물 처리군은 2일째부터 감소하였으며, 4일째 유의적으로 감소하였다[F(1, 64)=2.87, $p<0.05$] (Fig. 1A). Probe test에서 대조군은 platform이 설치된 구역을 37.1±1.9초 동안 머물렀고, scopolamine 처리군은 24.0±3.4초로 머무름 시간을 줄였다. 증숙 더덕 추출물(500 mg/kg)의 platform이 위치한 구역의 머무름 시간은 33.2±4.0초이며, scopolamine 처리군의 머무름시간을 유의적으로 증가시켰다[F(1, 8)=5.98, $p<0.05$] (Fig. 1B). 수중 미로 실험의 결과, 증숙 더덕 추출물은 scopolamine에 의해 유도된 기억력 손상을 회복시키는 효과를 나타내었다. 또한 일반 더덕 추출물 처리군과 비교한 결과, 증숙 공정이 더덕의 기억력 개선 효과를 높였다.

수동 회피 실험에서 증숙 더덕 추출물의 효과 - 수동 회피 실험의 마우스의 단순 기억력 증진 효과를 측정하기 위해 실시하였다. 대조군의 step-through latency는 176.0±3.4초를 나타내었고, scopolamine 투여군은(31.0±5.3초) 대조군에 비해 step-through latency가 감소되어 치매가 유발된 것을 확인할 수 있었다. 증숙 더덕 추출물 처리군의 경우, 100, 300 그리고 500 mg/kg에서 각각 42.7±2.5초 67.1±8.2초와 76.13±8.0초를 나타내어 scopolamine에 의해 감소된 step-through latency를 유의적으로 증가시켰다[F(1, 8)=5.31, $p<0.05$]. 증숙 더덕 추출물은 수동 회피 실험에서도 일반 더

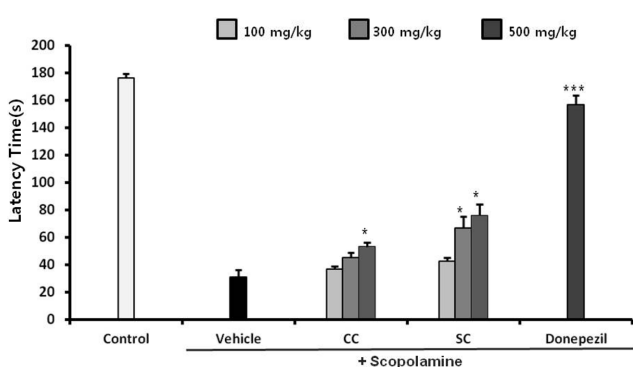


Fig. 2. Effect of steamed *C.lanceolata* extract (SC) and common *C.lanceolata* extract (CC) (100, 300 and 500 mg/kg) on scopolamine-induced memory impairment mice in passive avoidance test. The values shown the mean latency time (s) ± SD (n=7). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ compared with scopolamine group (vehicle).

덕 추출물보다 증가된 step-through latency를 나타내었다 (Fig. 2). 위의 결과를 바탕으로, 증숙 더덕 추출물은 scopolamine 처리군보다 유의적으로 증가하였음을 확인하여 기억력 개선 효과가 있음을 나타내었다.

증숙 더덕 추출물의 뇌신경세포 보호 활성 - 마우스 해마 유래 세포주 HT22 cell에서 glutamate에 의한 세포 사멸에 대한 증숙 더덕 추출물의 세포 보호 활성을 측정하였다. Glutamate는 산화적 스트레스를 통해 HT22 cell의 사멸을 일으킨다. 증숙 더덕 추출물은 500 µg/ml에서 relative protection(%)가 41.3±2.4%를 나타내었다[F(1, 4)=7.71, $p<0.05$]. 일반 더덕 추출물(31.8±5.1%)보다 증숙 더덕 추출물의 뇌신경세포 보호 활성이 높게 나타났다(Fig. 3).

증숙 더덕 추출물의 페놀성 화합물 함량 - 증숙 더덕 추출물의 페놀성 화합물 함량을 측정하기 위해 HPLC-DAD를 이용하였다(Fig. 4A). 증숙 더덕 추출물의 gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeic acid 함량을 분석하였고 일반 더덕 추출물과 비교하였다. 페놀성 화합물 중에 gallic acid(4,900 µg/g)이 가장 큰 함량을 나타내었다. 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, 4-coumaric acid, trans-ferulic acid 그리고 caffeic acid 함량은 각각 313 µg/g, 90 µg/g, 37 µg/g, 275 µg/g 그리고 11 µg/g을 나타내었다. Caffeic acid는 나타나지 않았다(Fig. 4B). 일반 더덕 추출물과 비교하여 gallic acid, vanillic acid 그리고 trans-ferulic acid의 함량이 증가하였다.

증숙 더덕 추출물의 총 페놀 함량 - 증숙 더덕 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과, 15.23 µg/ml의 함량을 나타내었다. 일반 더덕 추출물의 경우, 7.42 µg/ml의 함량을 나타내어, 증숙 과정을 통해 더덕 추출물의 총 페놀 함량이 증

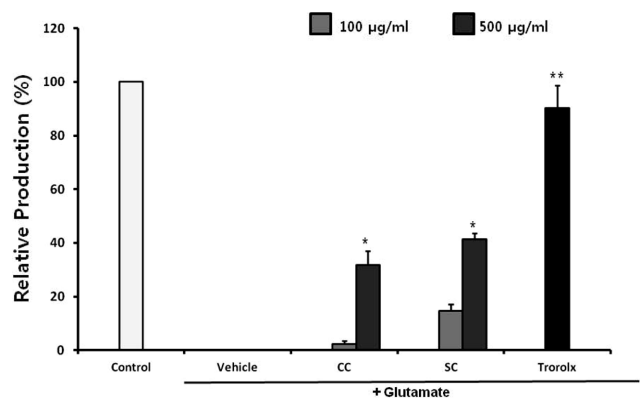


Fig. 3. The neuroprotective effects of steamed *C.lanceolata* extract (SC) and common *C.lanceolata* extract (CC) against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal HT22 cells. Each bar represents the Mean ± SD of three independent experiments. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. glutamate-injured cells (vehicle).

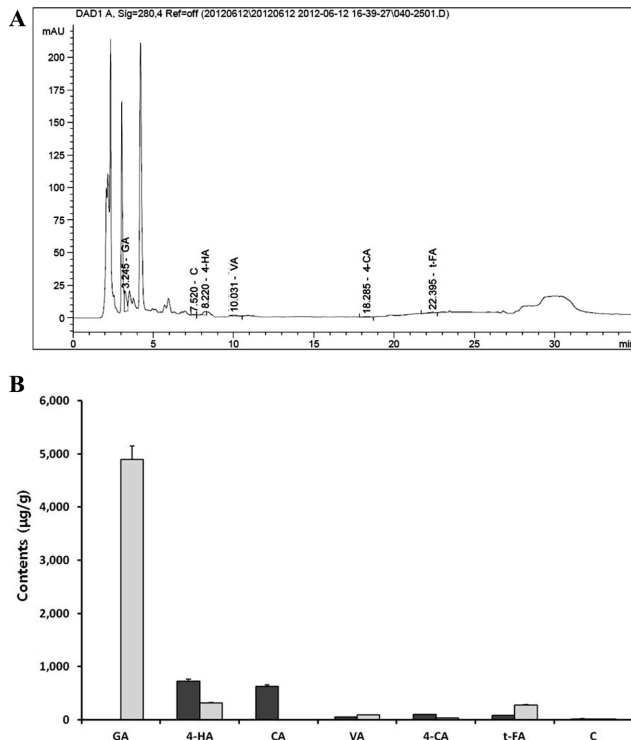


Fig. 4. HPLC chromatogram of 7 phenolic compounds in steamed *C.lanceolata* extract (A). (GA: Gallic acid, 4-HA: 4-hydroxybenzoic acid, CA: Caffeic acid, VA: Vanillic acid, 4-CA: 4-Coumaric acid, t-FA: *trans*-ferulic acid, C: Caffeine). Content of 7 phenolic compounds in steamed *C. lanceolata* extract compared with common *C. lanceolata* extract (B).

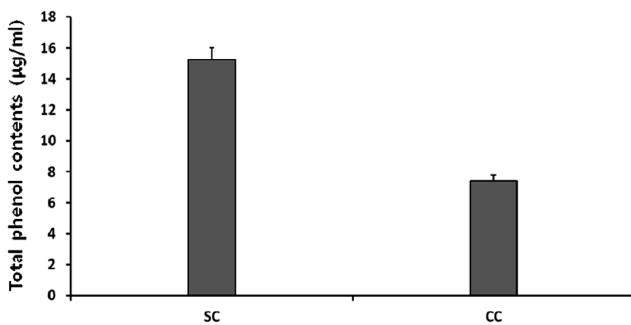


Fig. 5. Total phenol contents of steamed *C.lanceolata* extract. SC: steamed *C.lanceolata* extract; CC: common *C.lanceolata* extract.

가 된 것을 확인할 수 있었다. 페놀 화합물의 경우, 다양한 생물학적 효능을 나타내고 있어, 증숙 과정이 더덕의 생리 활성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 증숙 더덕 추출물의 기억력 개선 효과와 뇌 신경 세포 보호 활성을 측정 하였다. 기억력 개선 효과 측정

을 위해 가장 보편적인 행동 실험인 수중 미로 실험과 수동 회피 실험을 진행하였다. 수중 미로 실험은 공간 기억 능력을 평가하였고, 수동 회피 실험은 단순 기억 능력을 평가하는데 사용 되었다. 마우스의 기억력 손상은 muscarinic 수용체의 길항체인 scopolamine을 통해 유도하였다. Scopolamine은 신경전달물질인 Ach과 muscarinic receptor와 결합을 억제하여 기억력 및 인지능을 감퇴 시켰다.²²⁾ 수중 미로 실험에서 증숙 더덕 추출물은 실험 기간 동안 scopolamine에 의해 증가된 escape latency를 감소시켰으며, probe test에서도 platform이 위치한 구역의 머무름 시간이 scopolamine 투여군 보다 증가하였다. 이를 통해 증숙 더덕 추출물의 공간 기억력 개선 효과를 확인하였다. 또한, 수동 회피 실험에서도 증숙 더덕 추출물은 scopolamine 처리군에 비해 step-through latency를 유의적으로 증가시켜 단순 기억력 개선 효과를 나타내었다. 이와 같은 동물 행동 실험의 결과, 증숙 더덕 추출물은 scopolamine에 의해 기억력 손상을 일으킨 마우스 모델에서 활성을 나타내었으며, 대부분 scopolamine 행동 모델에서 활성을 나타낸 약물의 경우, 콜린성 신경계의 기능 저하와 관련이 있으며, positive control로 사용되어 활성을 나타낸 donepezil도 콜린성 신경계와 관련있는 대표적인 AchE 활성 억제제이다.^{23,24)} 따라서 증숙 더덕 추출물은 콜린성 신경계의 기능과 관련이 있을 것으로 사료된다.

뇌의 해마 부위는 기억과 학습에 대단히 중요한 역할을 수행한다. 뇌신경 세포 사멸은 기억력 및 인지능 기능 손상의 또 다른 원인 중 하나이다.³⁾ 따라서 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 cell을 이용하여 증숙 더덕 추출물의 신경 세포 보호 활성을 측정하였다. HT22 cell은 뇌신경 세포 보호 활성을 측정하기 위해 널리 사용되고 있는 *in vitro* model이다.²⁵⁾ 흥분성 신경 전달 물질인, glutamate는 신경 세포의 성장과 이동을 조절하고, 학습이나 기억에 관련된 뇌기능 수행에 중요한 역할을 한다. 높은 농도에서 산화적 스트레스를 일으켜 세포 사멸을 유도한다. 고농도의 glutamate는 세포막의 cystine을 억제하여 세포내 cysteine을 감소시킨다. 이는 세포내 glutathione의 양을 감소시켜 산화적 스트레스를 일으킨다.²⁶⁾ 또한, 세포내 칼슘이온(Ca^{2+})과 reactive oxygen species (ROS) 생성을 증가시켜 세포 사멸을 일으킨다.²⁷⁾

증숙 더덕 추출물은 HT22 cell에서 glutamate에 의해 유도된 세포 사멸에 대해 보호 하였다. 이를 통해 증숙 더덕 추출물의 뇌신경 세포 보호 활성이 기억력 개선과 관련이 있을 것으로 판단된다. HPLC 분석을 통해 증숙 더덕 추출물의 페놀성 화합물의 함량을 측정하였으며, 측정 결과, gallic acid가 가장 많이 포함되어 있었으며, gallic acid, vanillic acid 그리고 *trans*-ferulic acid가 일반 더덕에 비해 함량이 증가하였다. 세가지 화합물은 최근 연구에서 뇌신경세포 보호 활성과 AchE 억제 활성이 보고 되었으며, *trans*-ferulic

acid의 경우, 항산화 활성과 콜린성 기능 향상을 통해 기억력 및 학습 능력을 개선하였다.²⁸⁻³²⁾ 추가적으로 총 페놀 함량 또한 증숙 과정을 거친 더덕의 함량이 일반 더덕의 함량보다 높았다. 증숙을 통한 gallic acid, vanillic acid 그리고 trans-ferulic acid, 3가지 페놀성 화합물을 포함한 총 페놀 함량 증가는 일반 더덕 화합물의 활성을 향상 시킨 것을 판단되며, 세가지 화합물이 더덕 인지능 개선 활성의 기전 관련 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 증숙 더덕 추출물은 scopolamine으로 유도된 기억력 손상에 대해 인지능 개선 활성과 glutamate에 의한 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸에 대해 보호 활성을 나타내었다. 또한 증숙 공정은 더덕의 활성을 향상 시켜주는 것으로 확인 되었으며, 증숙 더덕의 활성은 콜린성 시스템과 항산화적 활성과 관련이 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Crapper, D. R. and DeBoni, U. (1978) Brain aging and Alzheimer's disease. *Can. Psychiatr. Assoc. J.* **23**: 229-233.
- Citron, M. (2002) Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat. Neurosci.* **5**: 1055-1057.
- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
- Brion, J. P. (1998) Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* **40**: 130-140.
- Collerton, D. (1986) Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neurosci.* **19**: 1-28.
- Coyle, J. T., Price, D. L. and DeLong, M. R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervations. *Science* **219**: 1184-1190.
- McGleenon, B. M., Dynan, K. B. and Passmore, A. P. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**: 471-480.
- Dawson, G. R. and Iversen, S. D. (1993) The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. *Behav. Brain Res.* **57**: 143-153.
- Ballard, C. G. (2002) Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur. Neurol.* **47**: 64-70.
- Dastmalchi, K., Damien, D. H. J., Vuorela, H. and Hiltunen, R. (2007) Plants as potential sources of drug development against Alzheimer's disease. *Int. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.* **1**: 83-104.
- Wang, L., Xu, M. L., Hu, J. H., Rasmussen, S. K. and Wang, M. H. (2011) *Codonopsis lanceolata* extract induces G0/G1 arrest and apoptosis in human colon tumor HT-29 cells--involvement of ROS generation and polyamine depletion. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 149-154.
- Ryu, H.-S. (2009) Effect of *Codonopsis lanceolata* Extracts on mouse IL-2, IFN-, IL-10 cytokine production by peritoneal macrophage and the ratio of IFN-, IL-10 cytokine. *Korean J. Food Nutr.* **22**: 69-74.
- Han, C., Li, L., Piao, K., Shen, Y. and Piao, Y. (1999) Experimental study on anti-oxygen and promoting intelligence development of *Codonopsis lanceolata* in old mice. *Zhong. Yao. Cai.* **22**: 136-138.
- Ushijima, M., Komoto, N., Sugizono, Y., Mizuno, I., Sumihiro, M., Ichikawa, M., Hayama, M., Kawahara, N., Nakane, T., Shiota, O., Sekita, S. and Kuroyanagi, M. (2008) Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 308-314.
- Li, J. P., Liang, Z. M. and Yuan, Z. (2007) Triterpenoid saponins and anti-inflammatory activity of *Codonopsis lanceolata*. *Pharmazie.* **62**: 463-466.
- Kim, J. S., Choi, W. S., Chung, J. Y., Chung, H. C. and Lee, H. Y. (2013) Enhancement of cosmeceutical activity from *Codonopsis lanceolata* extracts by stepwise steaming process. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **21**: 204-212.
- Song, C. H., Seo, Y. C., Choi, W. Y., Lee, C. G., Kim, D. U., Chung, J. Y., Chung, H. C., Park, D. S., Ma, C. J. and Lee, H. Y. (2012) Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **20**: 238-244.
- Park, S. J., Park, D. S., Kim, S. S., He, X., Ahn, J. H., Yoon, W. B. and Lee, H. Y. (2010) The effect of fermented *Codonopsis lanceolata* on the memory impairment of mice. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **39**: 1691-1694.
- Weon, J. B., Lee, B. H., Yun, B. -R., Lee, J., Lee, H. Y., Park, D. S., Chung, H. C., Chung, J. Y. and Ma, C. J. (2013) Memory enhancing effect of *Codonopsis lanceolata* by high hydrostatic pressure process and fermentation. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**: 41-46.
- Morris, R. (1984) Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in rats. *J. Neurosci. Methods.* **11**: 47-60.
- Ebert, U. and Kirch, W. (1998) Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**: 944-949.
- Izquierdo, I. (1989) Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**(5): 175-177.
- Klinkenberg, I. and Blokland, A. (2010) The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**: 1307-1350.

24. Rodrigues Simoes, M. C., Dias Viegas, F. P., Moreira, M. S., Freitas Silva Md, Riquiel, M. M., da Rosa, P. M., Castelli, M. R., Dos Santos, M. H., Soares, M. G. and Viegas, C. (2014) Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease.
25. Liu, J., Li, L. and Suo, W. Z. (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* **84**: 267-271.
26. Fukui, M., Song, J. H., Choi, J., Choi, H. J. and Zhu, B.T. (2009) Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur. J. Pharmacol.* **617**: 1-11.
27. Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L. and Coyle, J. T. (1989) Glutamate toxicity in neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **2**: 1547-1558.
28. Yena, G.-C., Duhb, P.-D. and Tsaia, H.-L. (200) Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* **79**: 307-313.
29. Kumar, S., Prahalthan, P. and Raja, B. (2011) Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. *Redox Rep.* **16**: 208-215.
30. Ban, J. Y., Nguyen, H. T., Lee, H. J., Cho, S. O., Ju, H. S., Kim, J. Y., Bae, K., Song, K. S. and Seong, Y. H. (2008) Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae radix* on amyloid beta protein (25--35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 149-153.
31. Weon, J. B., Kim, C. Y., Yang, H. J. and Ma, C. J. (2012) Neuroprotective compounds isolated from *Cynanchum paniculatum*. *Arch. Pharm. Res.* **35**: 617-621.
32. Luo, Y., Zhao, H. P., Zhang, J., Wang, J., Yang, W. L., Yang, M. and Liao, Z. G. (2012) Effect of ferulic acid on learning and memory impairments of vascular dementia rats and its mechanism of action. *Yao. Xue. Xue. Bao.* **47**: 256-260.

(2014. 1. 15 접수; 2014. 1. 29 심사; 2014. 2. 25 게재확정)