

부처손 추출물의 치매개선 효과 및 기전탐색

추순주¹ · 허진선² · 손기호^{1*}
¹경성대학교 약학과, ²주동남의화학연구원

Selaginella tamariscina Extract Improves Scopolamine-induced Learning and Memory Difcits in Rats

Soon-Ju Chu¹, Jin-Sun Heo² and Kie-ho Sohn^{1*}

¹Department of Pharmacology, Kyungseong University, Busan 48434, Korea
²Pharm-Steril R&D Center, Southeast Medi-Chem Institue., Busan 48287, Korea

Abstract – We investigated the effect of *Selaginella tamariscina* extract on the learning and memory impairments in scopolamine-induced (5 mg/kg, i.p.) dementia rats. Rats treated with oral tacrin (20 mg/kg, p.o.) as positive control group and *S. tamariscina* extract 100, 200mg/kg, p. o. (SME 100, SME 200) as experimental group had significantly reduced scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test. The acetylcholine content were paralleled the results of the behavior experiment. The acetylcholine contents of the experimental groups (SME 200 group) was higher than that of control group. We also evaluated expression of VAChT, vesicular acetylcholine transporter. SME was significantly increased VAChT expression on hippocampus of scopolamine-induced dementia rats. We suggest that *S. tamariscina* might exert a significantly neuro-protective effect on cognitive impairment.

Key words – *Selaginella tamariscina*, Scopolamine, Antioxidant, Cholinergic enzymes, VAChT

인지손상은 가벼운 인지손상에서부터 치매까지 그 범위가 다양한데 노인인구의 급속한 증가와 더불어 더 많은 수의 노인들이 인지손상을 경험할 것으로 예측된다.

전 세계적으로 알츠하이머 치매에 걸린 사람들은 2006년에 26.6백 만 명으로 추산되고 있으며, 2050년에는 출현율이 4배 증가함으로써 85명 중 1명이 알츠하이머 치매가 발생할 것으로 예측된다.¹⁾ 한국의 경우도 치매노인이 급속하게 증가할 것으로 예측되고 있는데 2050년에는 213만명에 이를 것으로 예상된다.²⁾ 인지손상이 있는 노인의 증가는 노인 장기요양보험 급여비 등 건강보호 급여비의 증가, 시설 입소율 증가, 가족의 부양으로 인한 사회적 비용 증가 등을 초래함으로써 개인 및 가족과 사회 전체에 큰 부담으로 작용하고 있다.

Alzheimer's disease 환자의 뇌는 여러 종류의 신경손상이 일어난다. 특히 콜린성 신경의 손상이 가장 심각하며 이는 학습능력, 기억력, 인지력의 저하와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.³⁾ 뇌조직의 콜린계의 활성 감소가 기억력

저하의 중요한 원인 중의 하나로,⁴⁾ 뇌조직의 신경세포에서 choline과 acetyl Co A는 acetyl-transferase에 의해 acetylcholine으로 되고 acetylcholine(Ach)은 acetylcholinesterase (AChE)에 의해 acetate와 choline으로 분해되는 과정에서 계속적인 AChE의 작용으로 Ach의 양이 감소 시 기억력 저하가 일어난다.⁵⁾ 항 무스카린성 효과가 있는 scopolamine은 muscarinic acetylcholine receptor, 특히 M1 receptor의 길항제로서 작용한다. Scopolamine은 free radical에 의해 해마 조직을 손상시켜 Ach의 합성을 저해함과 동시에 M1 receptor 길항작용을 일으켜 치매를 발생시킨다. 이런 특성 때문에 scopolamine은 동물시험에서 기억력 저하 유도약물로 많이 사용되고 있다.^{6,7)}

현재까지 치매약물로는 acetylcholine agonist의 목적으로 acetylcholinesterase 억제제인 tacrin, donepezil, rivastigmine, galatamine등이 알츠하이머병의 치료제로 개발되어 왔으나,^{8,9)} 각 약물의 장기 복용에 따라 부작용이 상당히 많은 것으로 보고되었다. 우선 1세대 cholinesterase-inhibitor인 tacrin의 경우 1993년 알츠하이머 치료제로 최초 승인을 받았으나, 복용환자의 40%가 간 독성이 생겨 사용이 중단되

*교신저자(E-mail): khosohn@ks.ac.kr
(Tel): +82-51-663-4887

었다. 이후 제 2세대 cholinesterase-inhibitor인 donepezil, rivastigmine, galatamine는 오심, 구토, 불면증, 체중감소 등 상당한 부작용이 보고되고 있다.

본 연구는 치매 치료의 부작용을 감소시키며, 치료효과는 증대시키는 목적으로 천연물에 집중하였고. 그 결과 이전부터 민간에서 주로 사용해온 부처손에 주목하였다. 부처손은 일찍이 부터손, 부처손, 보처손 등으로 기재된 바 있으며, 부처나 보처(부처 좌우에 자리하는 보살)의 손(手)이란 의미로, 한방에서는 주먹 쥔 것 같은 잣나무를 닮았다고 권백(卷柏)이라 일컫는다. 부처손은 성엽란문, 부처손과 부처손속에 속하는 산지암벽에 자생하는 상록성 여러해살이 풀로 예로부터 민간에서는 정신안정작용, 중양 예방과 치유, 신장 기능 향상 및 결석, 천식, 기관지 질환, 방사선 치료의 부작용에 사용되어 왔으며 생 것은 파혈, 볶은 것은 지혈에 쓰였으며, 혈액순환이 잘되게 하여 월경통이나 타박상에 쓰였고 부정거사 효과가 있는 것으로 알려져 왔다.¹⁰⁾

부처손의 연구현황을 살펴보면 Kim등은¹¹⁾ 부처손이 AchE 억제하는 것으로 언급하였으며, Nguyen등은¹²⁾ 부처손 추출물에서 분리한 biflavonoids가 당 흡수에 긍정적인 영향을 한다고 발표하였다. 또한 Yang 등은¹³⁾ 부처손이 조골세포의 p38와 Akt signaling pathway 불활성화시키는 MMP-2와 MMP-9 분비를 감소하는데 도움을 주는 것으로 보고하고 있으며, Hsin등은¹⁴⁾ 부처손 추출물이 인간 유래 인두암세포 활성을 저해시킨다고 보고하였다.

부처손의 성분은 biflavonoid를 분석한 논문이 대부분이었으며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 특히 amentoflavone을 부처손의 유효성분으로 설정한 논문이 많았다.^{18,19)} Amentoflavone은 PC-12 신경세포에서 베타아밀로이드를 억제하며,²⁰⁾ 해마조직에서 항면역, 항산화 효과 및 세포사멸에 억제 작용이 있는 것으로 보고하였다.²¹⁾

본 연구자는 앞선 연구들을 종합하여 scopolamine으로 치매 유발한 흰쥐에 부처손 메탄올 추출물이 미치는 효과에 대해 살펴보았다. 부처손 추출물을 4주간 경구투여 하였을

때, 인지능력 및 뇌 조직에서 해마조직의 형태 및 Ach 수송인자인 VAChT 단백질 발현 및 면역염색을 통해 발현을 확인 함으로서 치매 개선효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 조제 - 본 실험에 사용한 부처손(*Selaginella tamariscina* (P. Beauv). Spring)은 제천한방약초로부터 2014년 07월 구매하여 경성대학교 약학대학 손기호교수가 정확하게 감정한 후 음건하여 사용하였다. 확증표본(IKS시료-2014-07-01)은 (주)동남의화학연구원 표본실에 보관하였다. 부처손 500 g을 3회 메탄올 추출하여 여과하고 rotary evaporator (EYELA, Italia)로 감압 농축한 후 동결건조 한 결과 약 7.52%의 수율을 얻었다.

실험동물 - 실험동물(효창사이언스(주), 대구, 한국)은 고형 사료와 물을 자유공급 하면서 (주)동남의화학연구원 동물사에서 일정한 조건(온도: 22±1°C, 습도: 55±3%, 명암: 12 시간 light/ dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후, 체중 200±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성흰쥐를 사용하였다. 실험시간 전 24 시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00~12:00) 내에서 처치하였다. 기억손상 유발을 위해 인지시험 30분전에 대조군과 시료물질 투여군에 scopolamine hydrobromide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)를 5 mg/kg용량으로 복강 투여하였다. 실험 군은 각 군당 10마리씩 6군으로 나누어 실험하였다(Table I). 앞서 발표된 논문을 통해 확인한 부처손 메탄올 추출물에서 amentoflavone을 (주)동남의화학연구원에서 분석한 결과, 1860.228 mg/L로 나타났다(분석자료 미첨부). 시료군은 부처손 추출물을 체중 당 100 mg/kg, 200 mg/kg이 되도록 4주간 경구투여하였으며, amentoflavone의 경우 부처손 분석결과 및 섭취용량을 고려하여 0.35 mg/kg으로 투여 용량을 설정하였다. 한편 positive control로 설정한 tacrin은 사람의 투여량을 동물무게로 환산

Table I. Experimental design of *Selaginella tamariscina* (P. Beauv). Spring in scopolamine-induced rat

| Group | | Treatment | | Rat number |
|-------|-----------------|-----------------|--|------------|
| 1 | N ¹⁾ | Saline 0.9% | Saline | 10 |
| 2 | C ¹⁾ | Scopolamine | | 10 |
| 3 | P ¹⁾ | 5 mg/kg (i..p). | Tacrin(20 mg/kg, p.o.) | 10 |
| 4 | SME 100 | | <i>Selaginella tamariscina</i> methanol extract 100 mg/kg treatment(p.o.) | 10 |
| 5 | SME 200 | | <i>Selaginella tamariscina</i> methanol extract 200 mg/kg treatment(p.o.) | 10 |
| 6 | Amento | | Amentoflavone 0.35 mg/kg treatment(p.o.) | 10 |

¹⁾N: Normal, C: Control, P: positive control

하여 투여하였다.

사료는 실험동물용 고품사료(효창사이언스㈜, 대구, 한국)를 사용하였으며 음수는 자유 섭취시켰다. 해부 전 24시간 동안에는 물만 주고 절식하였다. 이때 효소활성의 일중변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에 처치하였다. 본 연구는 (주)동남의화학연구원 동물실험위원회 (Southeast Medi-Chem. Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다(윤리승인번호: IKSE-14-07).

행동실험

(1) 수중미로실험

수중미로실험은 Morris의 방법²²⁾에 따라 디자인하였다. 수중미로측정 장치는 공간학습 및 기억력을 측정하는 장비로써 지름이 140 cm, 높이가 45 cm인 원형수조 안에 물을 약 70% 채우고 우유를 넣어 안이 들여다보지 않도록 하였다. 지름이 15 cm, 높이가 35 cm인 원형 플랫폼을 수면 아래 1.5 cm가 되도록 물 높이를 조절하였으며, 물의 온도는 21~25°C가 되도록 하였다. 미로주위를 어둡게 하고 50 W 빛을 비추주고 video camera로 monitor 하였다(Fig. 1).

- Training trial: 흰쥐를 수조에 넣어서 플랫폼에 도달하는 시간을 90초 동안 학습시켰다. 흰쥐가 90초 내에 플랫폼을 찾지 못하면 꺼내어 플랫폼에 올려놓고 15초 동안 방치한 후, 30초 뒤에 흰쥐를 수조에 넣고 플랫폼에 도달하는 시간을 기록하였다. 1일 2회씩(오전, 오후로 나누어 실시) 4일 동안 training trial 을 실시하며 흰쥐가 15초 내에 플랫폼에 도달하게 되면 training trial 이 완료된 것으로 간주하였다.

- Test trial: training이 완료된 흰쥐에 정상군을 제외한 control군, positive control군 및 각 시료군에 scopolamine을 복강 투여하여 치매를 유도시킨 뒤, escape time을 측정하

였다. 1일 2회씩 3일 동안 측정하였으며, 측정방법은 training trial 방법과 동일하며 최대 측정시간은 60 초로 하였다.

(2) 수동회피시험

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법¹²⁾에 따라 측정하였다. 부처손 추출물의 기억력 손상 예방 효과를 알아보기 위하여 scopolamine 5 mg/kg 투여 30 분 후 수동회피시험을 실시하였다.

측정기기는 shuttle box(50×15×40 cm, electric grid floor, Ugo, Italy)를 이용하였으며, 상자는 칸막이 문(connecting guillotine door; 10×10 cm)으로 반이 나누어져 25×15 cm의 방을 이루고 있으며, 각방을 20 W 전구로 조명할 수 있도록 하였다. 본 실험은 소음이 60 dB 이하이고, 조명을 어렵게 한 방에서 실험을 하였다. 칸막이로 나누어진 방 2개중 한쪽(방 A)에 흰쥐를 넣고 1500 Lux의 조명을 켜면서 칸막이를 열어 주었으며, 흰쥐가 방안을 여기저기 살피다가 조명이 없는 건너편 방(방 B)으로 들어가게 될 때 자동적으로 칸막이가 닫히게 장치하였다. 불을 켜면서 칸막이가 열릴 때부터 칸막이가 닫힐 때까지의 잠재시간을 측정하였다. 학습시험(training trial)을 5 회 반복하여 흰쥐가 방 B로 넘어가면 불이 꺼진 상태에서 3 mA의 전류를 방밑의 stainless grid를 통해 3 초 동안 흘려 전기쇼크(foot-shock)을 가했으며, 어두운 방과 전기쇼크(foot-shock)과의 관계를 인식시켰다. 24 시간 후 문이 열려도 밝은 방에 머무는 시간, 즉 쇼크실 도달시간(step-through latency time: 머무름 시간)을 최대 300 초(cut-off time)까지 측정하였다(Fig. 2).

뇌조직의 아세틸콜린(Acetylcholine)함량 측정 - 아세틸콜린 함량 측정은 Hestrin의 방법¹³⁾에 의하여 alkaline hydroxylamine을 가진 σ-acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다. 뇌 균질액 50 μL를 1% hydroxylamine 50 μL를 첨가하여 혼합한 후 FeCl₃(10% in 0.1 N HCl) 500 μL를 첨가한 다음 흡광도(540 nm)를 측정하여 아세틸콜린 함량을

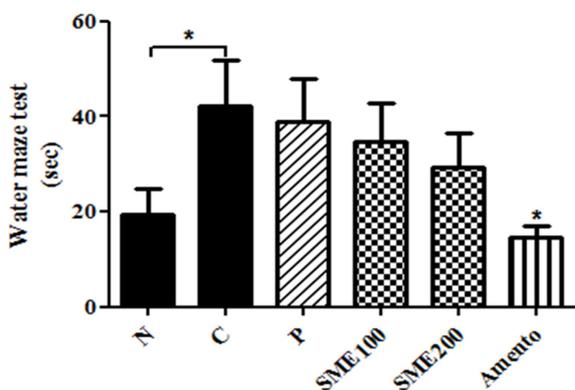


Fig. 1. Effect of SME on scopolamine-induced memory impairment mice in Morris water maze test of test trial session. 1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments, 2) **p*<0.05 vs. Control

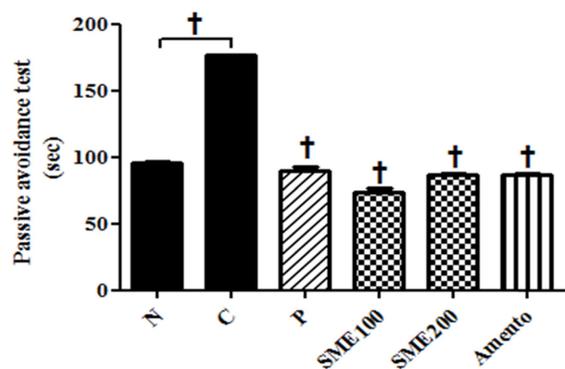


Fig. 2. Effect of SME on scopolamine-induced memory impairment mice in passive avoidance test. 1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments, 2) †*p*<0.001 vs. Control

측정하였다.

뇌 조직의 Lipid Peroxide(LPO) 함량의 측정 - Ohkawa 등의 방법¹⁴⁾을 변경하여 뇌 조직 1g당 10배 량의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 pre-incubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-butanol:pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 n-butanol:pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 뇌 조직 1g 당 malondi aldehyde nmole로 표시하였다.

단백질 정량 - 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis. Mo., USA)를 표준품으로 하여 측정하였다.

뇌조직의 Western Blot - 단백질 분석을 위해 조직을 PBS buffer 300 μ L를 넣은 후 homogenizer를 이용하여 조직을 파쇄한 후, 800 rpm 10 초 centrifuge하여 상층액만 사용하였다. 5000 rpm, 3 분간 centrifuge하여 상층액을 제거하고, PBS buffer 300 μ L를 넣고 cell을 풀어준 후 다시 5000 rpm, 3분간 centrifuge한 후 상층액을 제거한다. Cell lysis buffer 50 μ L를 넣고 30분간 ice incubation 한 뒤 14,000 rpm, 4°C, 20 min centrifuge한다. Bradford assay¹⁶⁾를 이용하여 단백질을 정량 한 후, 단백질의 SDS-PAGE (polyacryl amide gel electrophoresis)를 이용하여 size 별로 분리하였다. Semi-dry transfer system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 NC(nitro cellulose) membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 함유한 blocking buffer(0.5% skim milk, 1×PBST buffer)를 1시간 동안 처리하였다. 1×PBST buffer로 10 min, 3회 washing 후, Primary antibody인 Vesicular acetylcholine transporter(VAChT 1:3000, Cell Signaling technology)를 처리한 후 4°C overnight 반응시켜. 1×PBST buffer로 10 min, 3회 washing 한다. Western Blot detection kit(Biorad, hercules, USA)을 이용하여 membrane과 반응시킨 후 X-Ray film에 감광시켜 발현 정도를 관찰하였으며, GAPDH로 보정하여 비교하였다.

뇌 조직에서 면역조직화학 염색 - 적출한 뇌 조직의 깨끗이 행군 후, 10% formaline 용액에 고정하고 순차적 농도의 에탄올을 이용하여 탈수시킨 후, 투명과정을 거쳐 파라핀을 침투시켰다. 준비된 조직을 파라핀에 포매 하여 순차적으로 박절(4 μ m)하였다. IHC염색은 에이비온 CRO(서울, 한국)에 의뢰하여 진행하였으며 항체는(VAChT 1:3000, Cell Signaling Technology)로 염색 진행 하였다.

통계 분석 - 통계적 검정은 SPSS통계 프로그램을 이용하여 수행하였으며, $P < 0.05$ 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다. 각 항목에 대한 유의한 차이를 나타내는지

의 비교분석은 Student's t-test one-way ANOVA(Duncan's multiple range test)를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

수중미로실험 - 기억력이란 주어진 정보를 받아들여 뇌 속에 저장했다가 필요한 때에 끄집어내는 능력으로, 정보가 감각기관을 통하여 저장되는 감각기억, 현재의 정보들을 처리하는 짧은 기간 동안의 단기기억, 나중에 재생되도록 비교적 영구히 저장되는 장기기억으로 나눌 수 있다.¹⁾ 이중 장기 기억력 및 해마 의존적 공간학습 능력을 측정하기 위해 수중미로실험을 수행하였다.

하루 1번씩 4일간 인지 훈련을 하였고 본 실험은 scopolamine 5 mg/kg을 복강 투여 한 후 실험을 진행하였다 (Fig. 1). Scopolamine 투여 후 C군(scopolamine 투여 치매 유도군)의 경우, 수중미로상의 platform의 위치를 찾아가는 escape latency 시간이 N군대비하여 $p < 0.05$ 유의 수준으로 탈출시간이 길었다. 이는 scopolamine으로 기억 손상을 일으킨 많은 치매 모델 실험결과와²⁸⁾ 유사한 결과를 보여주어 장기기억(long-term memory) 손상이 발생된 것을 확인할 수 있었다. 한편 tacrin을 투여한 P군의 경우 scopolamine에 의한 기억손상이 다소 회복되었으며, 부처손 추출물을 처리한 SME 100, SME 200 투여 군에서도 기억손상이 회복하였으나 유의적인 결과는 아니었다. 한편 amentoflavone을 0.35 mg/kg 투여한 amento군에서 $p < 0.05$ 수준으로 유의적으로 인지능력이 개선한 것을 확인할 수 있었다. 종합하여 보면 4주간 부처손 추출물 투여는 장기기억력을 조절하기에는 amentoflavone에 비해 영향력이 적은 것으로 사료된다.

수동회피 실험 - Scopolamine(5 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 부처손 추출물이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 수동회피 측정 장치(shuttle box, Ugo, Italy)를 이용하여 확인하였다(Fig. 2).

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 해마에서 조건화된 기억과 변연계와 연관 있는 기억에 관한 영향을 측정하기 위해 주로 사용된다.²³⁾ 수중미로시험이 공간기억력 및 장기 기억력 정도를 측정하는 시험에 반하여 수동회피시험은 단기 기억력의 정도를 측정시험으로 알려져 있다. Scopolamine의 투여에 의한 기억력 손상여부를 확인한 결과, C군은 기억시험에서 latency time이 N군에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 이는 학습시험(training trial)시 전기 충격을 기억하지 못한 것으로 판단된다. 이에 비해 부처손 시료 처리군 모두 $p < 0.001$ 유의하게 latency time이 감소한 결과를 얻어, 부처손 추출물 4주 투여는 장기 기억력보다 단기 기억력 조절에 긍정적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

지질 과산화 함량에 미치는 영향 - MDA는 지질의 과산

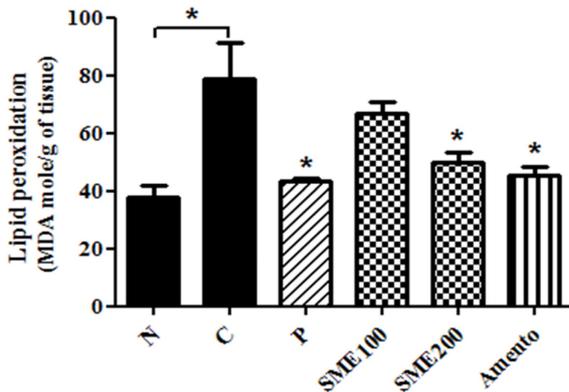


Fig. 3. Effect of SME in brain LPO of rats. 1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments, 2) * $p < 0.05$ vs. Control

화 정도를 측정하는 방법으로 활성산소에 의해 세포막을 형성하는 주성분인 지질에 과산화현상을 일으켜 인체 내 산화적 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ 치매를 유도한 C군에서 지질 과산화 정도가 78.87±24.52 MDA nmole/g of tissue로 가장 높게 나타났다. 이는 치매 환자의 혈관에서 지질 과산화와 항산화 효소의 활성을 확인한 논문 결과와²⁹⁾ 일치하였다. 특히 SME 200군의 경우 뇌 조직 중 지질 과산화 함량이 49.10±7.34 MDA nmole/g of tissue로 P군의 41.37±7.41 MDA nmole/g of tissue과 비슷한 수준으로 뇌 조직의 lipid peroxide의 함량이 감소하였으며, Amento군에서도 43.57±6.53 MDA nmole/g of tissue로 $p < 0.05$ 유의수준으로 관찰되었다(Fig. 3). 이는 부처손 추출물의 biflavonoid 계열의 항산화 성분이 scopolamine으로 인지능력이 손상된 뇌 조직에 직접적으로 작용하여, 산화 스트레스 방어 작용을 하여 결과적으로 뇌 조직의 지질 과산화 함량에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Acetylcholine 활성 확인 - Acetylcholine(Ach)은 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로 중추신경계의 콜린성 시스템과 관계가 깊으며, acetyl Co A와 choline acetyltransferase(ChAT)의 효소 작용으로 합성되며, acetylcholinesterase (AChE)의 작용으로 acetate와 choline으로 분해된다. 콜린성 신경계의 붕괴는 초기 알츠하이머 질환의 주요 원인으로 알려져 있다.³⁾ Scopolamine은 항 콜린성 제제로 시냅스에서 Ach의 활성을 감소시키는 약물로 기억손상을 일으켜 노인성 중추신경 장애와 관련된 연구에 많이 활용되는 약물이다.¹⁹⁾ Fig. 4는 4주간 부처손 추출물 투여 시 뇌 조직의 Ach 함량을 나타낸 결과이다. C군의 Ach 함량은 5.88±0.85 μmol/mg protein으로 N군의 8.55±1.60 μmol/mg protein에 비해 약 68% 농도가 감소하였다. 이것은 기억손상을 일으키는 scopolamine 투여 시 Ach 함량이 감소한다는 보고³¹⁾와 일치하였다. 한편 SME 100, SME 200투여군의 Ach 함

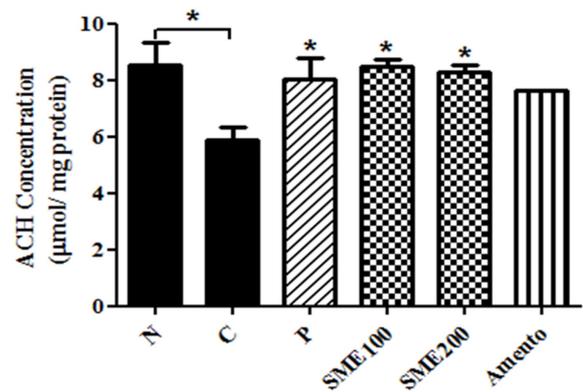


Fig. 4. Effect of SME on acetylcholine concentration. 1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments, 2) * $p < 0.05$ vs. Control, † $p < 0.001$ vs. Control

량은 각각 8.48±0.56 μmol/mg protein, 8.29±0.45 μmol/mg protein으로 $p < 0.05$ 수준으로 C군과 대비하여 유의적으로 Ach 함량이 증가함을 확인할 수 있었다. 노인성 치매에서 Ach 함량이 감소한다는 보고³⁾를 고려했을 때, 부처손 추출물 급여는 노인성 치매 예방에 큰 도움이 될 것이라 사료된다.

부처손 메탄올 추출물이 뇌 조직 VAcT Western Blot에 미치는 영향 - 신경전달물질들을 소포체 내로 흡수하여 저장하는 데는 소포 수송체 vesicular transporter가 필요한데, 이 중 잘 알려진 것은 소포 단가아민 수송체 vesicular monoamine transporter(VMAT)와 소포아세틸콜린 수송체 vesicular acetylcholine transporter(VAcT)이다. 소포아세틸콜린 수송체인 VAcT가 제대로 작동하지 못하게 되면 알

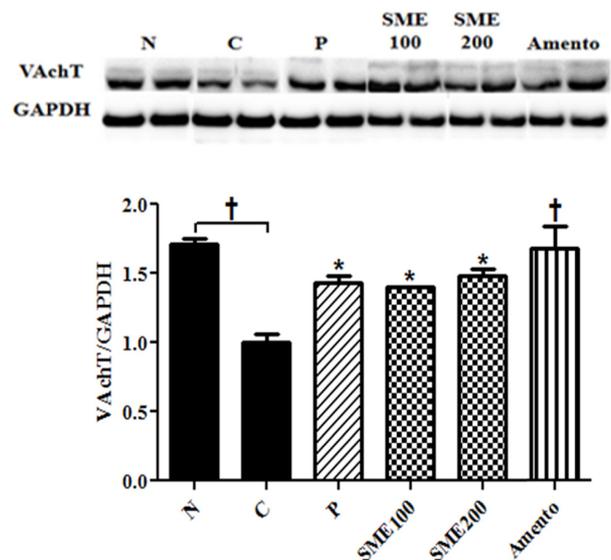


Fig. 5. Effect of SME on protein levels of VAcT. 1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments, 2) * $p < 0.05$ vs. Control, † $p < 0.001$ vs. Control

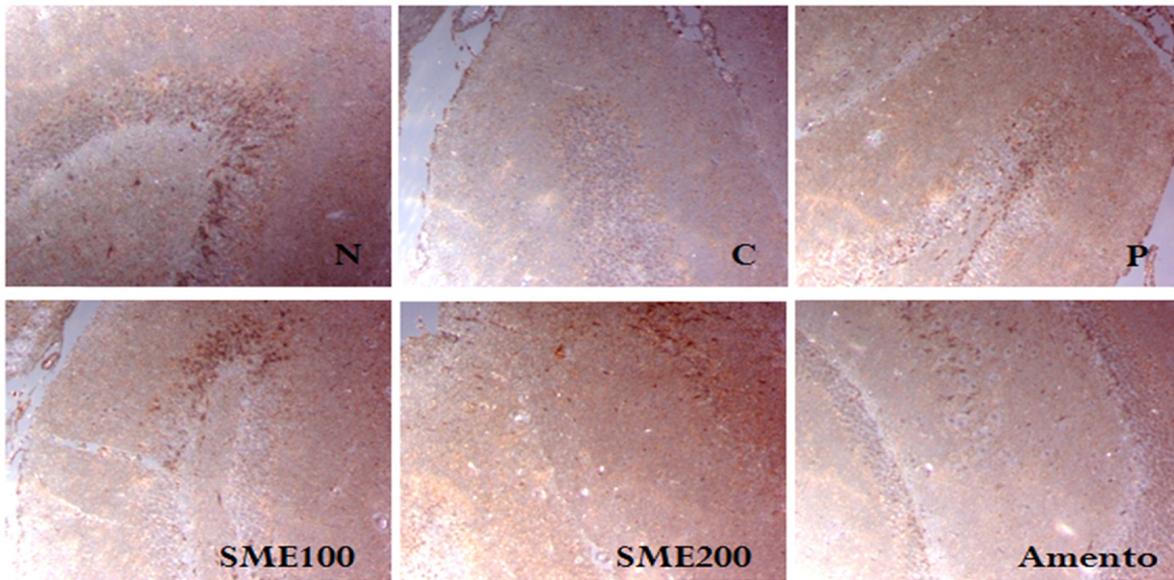


Fig. 6. Expression of VAcHT in brain (Immunohistochemistry, $\times 100$).

서 살펴본 Ach 생성이 저해되어 결과적으로 인지능력에도 문제를 일으키게 된다.³²⁾

Fig. 5는 scopolamine에 의해 손상된 뇌에 부처손 메탄올 추출물 4주간 급여가 VAcHT에 미치는 영향을 western blot 을 통해 살펴 본 결과이다. C군의 경우 치매로 인하여 VAcHT 단백질 발현이 감소하였으나, 부처손 시료투여(SME 100, SME 200 투여군)로 C군 대비하여 $p < 0.05$ 유의수준으로 VAcHT 발현량이 증가하였으며, Amento군의 경우 $p < 0.001$ 유의수준으로 VAcHT 발현량이 증가하였다. 이는 부처손의 4주간의 시료급여가 소포아세틸콜린 수용체인 VAcHT 효소 작용에 직접적으로 영향을 미친 것으로 해석되며, 결과적으로 Ach 농도에도 영향을 주는 것으로 해석된다.

부처손 메탄올 추출물이 뇌 조직 VAcHT면역화학염색에 미치는 영향 - Ach수송역할을 하는 VAcHT 면역염색 결과 (Fig. 6), C군은 scopolamine에 의해 VAcHT 항체가 손상되어 CA3 hippocampal neuron 및 뇌조직 전반적으로 면역염색결과 단백질 발현이 되지 않고, 해마 조직이 손상된 것을 관찰할 수 있었다. 한편 4주간의 부처손 메탄올 추출물 투여로 인하여 SME 100, SME 200투여군은 tacrin 투여한 P 군과 유사한 수준으로 단백질 발현 및 면역염색 결과가 나타났으며 이는 Fig. 5의 VAcHT 단백질 발현 결과와도 유사한 경향을 보였다.

결 론

부처손 추출물의 4주간 투여는 scopolamine으로 인지능력이 손상된 뇌 조직에 직접적으로 작용하여, 산화 스트레

스 방어 작용을 통해 특히 단기 기억을 조절하며, 뇌 조직 중 Ach 함량 조절 및 이들의 수송역할을 하는 VAcHT 단백질 발현을 조절하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 cholinergic system 기전에 긍정적인 영향을 미쳐 향후 치매 치료제로서 가능성이 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Rocca, W. A., Petersen, R. C., Knopman, D. S., Hebert, L. E., Evans, D. A., Hall, K. S., Ga, o S., Unverzagt, F. W., Langa, K. M., Larson, E. B. and White, L. R. (2011) Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dement* 7: 80-93.
2. 조맹제, 김기웅, 김명희, 김문두, 김봉조, 김신겸, 김정란 (2008) 치매 노인 유병률 조사, 보건복지가족부, 서울, 한국.
3. Bartus, R. T., Dean, R. L. 3rd., Beer, B. and Lippa, A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414.
4. Chang, J. S., Lee, B. S. and Kyung, Y. G. (1992) Changes in γ -amino butyric acid(GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of an aerobically treated green tea leaves. *J. Korean Food Sci. Technol.* 24: 315-319.
5. Choi, W. H., Um, M. Y., Ahn, J. Y., Kim, S. R., Kang, M. H. and Ha, T. Y. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity and protective effect against cytotoxicity of perilla seed methanol extract. *J. Korean Food Sci. Technol.* 36: 1026-1031.
6. Davies, P. and Maloney, A. J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403.

7. Dawson, G. R., Bentley, G., Draper, F., Rycroft, W., Iversen, S. D. and Pagella, P. G. (1991) The behavioral effects of hepatic physostigmine: a new cholinesterase inhibitor, interests of long term and working memory in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**: 865-871.
8. Rogers, S. L., Doody, R. S., Mohs, R. C., and Friedhoff, L. T. (1998) Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Arch. Intern. Med.* **158**: 1021-1031.
9. Rosler, M. A., R. Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., Dal-Bianco, P., Stahelin, H. B., Hartman, R. and Gharabawi, M. (1999) Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ.* **318(7184)**: 633-638.
10. 조태동 (2011) 한국의 허브, 대원사, 서울.
11. Kim, J. H., Cho, C. W., Tai, B. H., Yang, S. Y., Choi, G. S., Kang, J. S. and Kim, Y. H. (2015) Soluble epoxide hydrolase inhibitory activity of selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina*. *Molecules* **20**: 21405-21414.
12. Nguyen, P. H., Ji, D. J., Han, Y. R., Choi, J. S. Rhyu, D. Y., Min, B. S. and Woo, M. H. (2015) Selaginellin and biflavonoids as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Selaginella tamariscina* and their glucose uptake stimulatory effects. *Bioorg. Med. Chem.* **23**: 3730-3737.
13. Hsin, C. H., Wu, B. C., Chuang, C. Y., Yang, S. F., Hsieh, Y. H., Ho, H. Y., Lin, H. P., Chen, M. K. and Lin, C. W. (2013) *Selaginella tamariscina* extract suppresses TPA-induced invasion and metastasis through inhibition of MMP-9 in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells. *BMC Complementary & Alternative Medicine* **13**: 234.
14. Yang, J. S., Lin, C. W., Hsieh, Y. S., Cheng, H. L., Leu, K. H., Yang, S. F. and Lu, K. S. (2013) *Selaginella tamariscina*(Beauv.) processes antimetastatic effects on human osteosarcoma cells by decreasing MMP-2 and MMP-9 secretions via p38 and Akt signaling pathways. *Food Chem. Toxicol.* **59**: 801-807.
15. Cao, Y., Wu, Y., Zhou, X., Qian, F., Fan, H. and Wang, Q. (2012) Simultaneous determination of seleginellins and flavonoids in *Selaginella tamariscina* and *S. pulvinata* by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **37**: 1254-1258.
16. Zhang, G. G., Jing, Y., Zhang, H. M., Ma, E.L., Guan, J., Xue, F. N., Liu, H. X. and Sun, X. Y. (2012) Isolation and cytotoxic activity of selaginellin derivative and biflavonoids from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med.* **78**: 390-392.
17. Zhang, Y. X., Li, Q. Y., Yan, L. L. and Shi, Y. (2011) Structural characterization and identification of flavonoids in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **25**: 2173-2186.
18. Jung, H. J., Park, K., Lee, I. S., Kim, H. S., Yeo, S. H., Woo, E. R. and Lee, D. G. (2007) S-phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1969-1971.
19. Lee, S. H., Oh, W. H., Kim, B. Y., Ahn, S. C., Kang, D.O., Shin, D. I., Kim, J., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. (1996) Inhibition of phospholipase C gamma 1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med.* **62**: 293-296.
20. Sasaki, H., Kitoh, Y., Tsukada, M., Miki, K., Koyama, K., Juliawaty, L. D., Hakim, E. H., Takahashi, K. and Kinoshita, K. (2015) Inhibitory activities of biflavonoids against amyloid- β peptide 42 cytotoxicity in PC-12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**: 2831-2833.
21. Zhang, Z., Sun, T., Niu, J. G., He, Z. Q., Liu, Y. and Wang, F. (2015) Amentoflavone protects hippocampal neurons: anti-inflammatory, antioxidative and anti apoptotic effects. *Neural. Regen. Res.* **14**: 969-978.
22. Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. NeuroSci. Methods* **11**: 47-60.
23. Van der Zee, E. A., Biemans, B. A. M., Gerkema, M. P. and Daan, S. (2004) Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor-immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neuro. Sci. Res.* **78**: 508-519.
24. Hestrin, S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **180**: 249-261.
25. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.
26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
27. Kruger, N. J. (1994) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* **32**: 9-15
28. Bartus, R. T. (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**: 495-529.
29. Casado, A., Encarnación López-Fernández, M., Concepción Casado, M. and de La Torre, R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem. Res.*, **33**: 450-458.
30. Woolf, N. J. (1997) A possible role for cholinergic neurons of the basal forebrain and pontomesencephalon in consciousness. *Conscious Cong.* **6**: 574-596.
31. Wesnes, K. A., Simpson, P. M., White, L., Pinker S., Jertz, G., Murphy, M. and Siegfried, K. (1991) Cholinesterase inhibition in the scopolamine model of dementia. *Ann. N. Y.*

- Acad. Sci.* **640**: 268-271.
32. Palmer, D., Creighton, S., Prado, V. F., Prado, M. A., Choleris, E. and Winters, B. D. (2016) Mice deficient for striatal vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) display impaired short-term but normal long-term object recognition memory. *Behav. Brain Res.* **311**: 267-278.
33. Ho, Y. S., and Crapo, J. D. (1988). Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS. Lett.* **229**: 256-260.
- (2016. 07. 19 접수; 2016. 08.31 심사;
2016. 12. 12 게재확정)