

합환피의 인지 및 기억력 개선 효과에 대한 연구

기지에 · 홍승헌 · 박진한^{1*}

원광대학교 한약학과, 1: 대구한의대학교 바이오산업융합학부

Effect of Albizziae Cortex Water Extract on Cognition and Memory Impairments

Ji Ye Kee, Seung Heon Hong, Jin Han Park^{1*}

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University,
1: Division of Bio-technology and Convergence, Daegu Haany University

The aim of this study was to investigate the effects of the water extract of Albizziae Cortex (AC) on the learning and memory impairments. AC was administered to normal mouse and scopolamine-injected amnesia mouse model. Passive avoidance test, Y-maze test, and Morris water maze test were conducted to confirm the cognitive-enhancing activities of AC. Acetylcholinesterase (AChE) activity and acetylcholine (ACh) content were measured after oral administration of AC. On the passive avoidance test, AC (200 mg/kg) significantly increased latency time and recovered scopolamine-impaired learning and memory in mice. In addition, AC (200 mg/kg) reduced Exploration time in target quadrant and reversed the scopolamine-induced cognitive impairments in the Y-maze test. Moreover, AC (200 mg/kg) increased exploration time in target quadrant and improved scopolamine-reduced escape latencies in the Morris water maze test. These effects were presented by regulatory effects of AC on AChE activity and ACh content. Taken together, AC increases cognitive-enhancing activities and ameliorates scopolamine-induced learning and memory impairment. AC might be a potential agent for prevention and treatment of amnesia and dementia.

keywords : Albizziae Cortex, Scopolamine, Acetylcholine, Cognition, Memory

서 론

인간에게 기억력은 사회적으로 학습량이 많은 청소년에서부터 노화가 진행되는 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이다. 생활의 수준 개선, 현대의학의 발달 등으로 평균 수명과 기대 수명이 높아지면서 노인 인구 비율이 급증하고 있으며, 이에 따라 노인성 질환 유병률 또한 증가하고 있다. 특히, 치매는 기억력 저하뿐만 아니라 학습 및 언어능력, 사고, 이해, 계산과 판단력을 포함하는 기능의 장애를 초래하여 환자의 사회생활 가능 여부에 영향을 주기 때문에 중대한 문제가 되고 있다¹⁾. 치매는 크게 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia) 및 기타 질환에 의한 치매로 나뉘는데, 전체 치매 환자의 50-60%가 알츠하이머병에 의한 것으로 알려져 있다^{2,3)}.

알츠하이머성 치매는 가장 흔한 퇴행성 질환으로 뇌신경 세포가 변성되어 탈락함에 따라 뇌세포 소실에 의한 전반적인 뇌 위축 증상이 나타난다⁴⁾. 이에 따라 콜린성 신경세포의 퇴화로 인하여 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 부족으로 기억력 및 인지능력

이 저하되며, acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase (AChE)의 활성에 의하여 ACh 함량이 감소하면서 병증이 심화되는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 뇌에서의 ACh의 함량을 증가시키는 ACh 합성 전구체, AChE inhibitor 등이 개발되어 왔으나, 일시적으로 ACh의 양을 높이기 때문에 효과가 미약하고 간독성, 위장관 장애, 심장 서맥 유발, 식욕감소 등과 같은 심각한 부작용 때문에 사용이 제한적인 상태이다⁶⁾. 현재까지 치매 치료제로 개발된 tacrine, donepezil, rivastigmine 등은 AChE 억제제로 임상에서 사용되고 있으나, 뇌신경 손상을 주는 등의 부작용이 나타나기도 한다⁷⁾. 아울러 직접 뇌세포의 재생이나 뇌세포 손상의 역제는 어려운 점이 많기 때문에 효과적으로 인지 및 기억력을 개선시키는 천연물을 개발하는 것은 치매 환자의 증상 개선에 의미가 있다. 그러므로 예방 및 치료를 위해서는 부작용이 거의 발생하지 않으면서, 원인을 치료하여 병증을 개선시키는 새로운 후보물질을 찾아서 개발하려는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 대표적으로 인삼, 은행엽, 석창포, 원지 등의 단일 약물과 귀비탕, 정지환, 장원환 등의 처방이 많이 사용되고 있다⁸⁾. 하지만 천연물을 이용한 기억력

* Corresponding author

Jin Han Park, Division of Bio-technology and Convergence, Daegu Haany University, 285-10, Eobongji-gil, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

E-mail : jinhan@dhu.ac.kr Tel : +82-53-819-1324

Received : 2017/07/05 Revised : 2017/10/20 Accepted : 2017/10/25

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.10.31.5.270

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

개선제들은 대부분 합성 의약품인 AChE 억제제보다 효과가 약하기 때문에 아직 더 많은 개발이 이루어져야 한다⁹⁾.

한의학에서 기억력 손상은 健忘이며 善忘, 喜忘, 多忘, 好忘 등으로도 기록되어 있다. 치매는 痴獸, 呆病 등의 용어로 표현되어 있으며 病因은 七情損傷, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 心腎不交, 瘀血攻心 등으로 알려져 있다. 이러한 질환은 大補氣血, 調心補腎, 化痰開竅시키는 약재를 사용하여 치료한다¹⁰⁾. 최근 여러 종류의 질환 모델을 사용하여 한약의 효능을 밝혀내는 연구가 증가하고 있는데¹¹⁾, 이는 천연물 유래의 한약이 상대적으로 부작용이 적어서 단독 또는 보조 치료제로 사용할 수 있기 때문이다.

본 연구에서 사용한 합환피(Albizia Cortex)는 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽소과목인 자귀나무의 樹皮를 건조한 것으로 性은 平無毒하고 味는 甘하다. 安神解鬱, 活血止痛, 消癰腫, 續筋骨 등의 효능으로 心神不安, 憂鬱, 不眠, 健忘, 肺癰, 癰腫, 瘰癧, 筋骨折傷 등을 치료하는데 활용되고 있다¹²⁾. 합환피의 효능을 살펴보았을 때 치매의 주요 특징인 기억력 장애는 健忘에서 치료법을 찾아볼 수 있다. 합환피에 대한 실험 연구 보고로는 이 등의 지방세포 분화 억제 효과¹³⁾, 박 등의 백혈병 세포에 대한 세포자멸사 유도 및 세포주기 억제 효과¹⁴⁾, 이 등의 지질과산화 억제 효과¹⁵⁾ 등이 있으나, 인지 기능 개선에 대한 합환피의 효능에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 합환피 물추출물의 인지 및 기억력 개선 효과를 약물 단독 또는 scopolamine으로 유도된 기억력 손상 모델을 이용하여 확인하였고, 유의적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 준비

본 실험에 사용한 합환피는 (주)옴니허브에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 합환피를 증류수로 2회 세척하고 분쇄한 후, 합환피 무게의 10배 부피만큼 물을 가한 후 100°C에서 4시간 동안 전탕한 뒤 여과하였다. 추출이 완료된 다음 Whatman (No. 1) filter paper로 여과하고, 이를 rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기(Eyela, model FDU-2000, Japan)에서 건조한 뒤 얻어진 분말을 실험에 사용하였다 (수득률: 13.7%).

2) 시험물질

본 실험에 사용한 scopolamine과 tacrine (9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), (-) scopolamine hydrobromide, acetylthiocholine iodide and DTNB (5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid])는 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 나머지 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

2. 방법

1) 실험동물

모든 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 승인을 얻어

시행하였으며, 동물 관리 규정을 준수하였다(DHU 2016-079). 실험 동물은 수컷의 ICR mouse 5주령을 주식회사 오리엔트(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대학교 동물실에서 7일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 각 군당 10마리로 구성하였고, 온도 23 ± 3°C, 습도 50 ± 10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지하였다. 실험동물에게 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2) 수동회피시험(Passive avoidance test)

수동회피시험은 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 실험으로 본 실험에서는 LeDoux의 방법¹⁶⁾을 응용하여 시행하였다. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 약물투여는 합환피 추출물 및 tacrine은 10% Tween 80에 녹인 후 경구 투여하였고 (5 ml/kg), 대조군에는 10% Tween 80을 같은 용량으로 경구 투여하였다. 경구 투여 30분 후에 증류수에 녹인 스코폴라민을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, 스코폴라민 투여 30분 후에 mouse를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문(gillotin door)을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다(Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 각 구획은 20 × 20 × 20 cm의 공간이다. 이때 길로틴문이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외시켰으며 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문 (gillotin door)이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 되는데 이 때 길로틴문(gillotin door)이 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다(학습시험; training trial). 학습시험(training trial)이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 합환피 추출물의 효과를 확인하고자 실시하였다(기억시험; test trial). 실험동물을 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 길로틴문(gillotin door)이 열리고 어두운 쪽으로 mouse의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 180초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다¹⁷⁾. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

3) Y-미로시험(Y-maze test)

약물 투여는 수동회피시험(passive avoidance test)에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로시험은 실험동물이 공간지각능력 및 단기 기억능력의 회복을 확인하는 시험으로 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있다. Y자 모양의 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm로 세 팔이 접하는 각도는 120°로 구성되어 있다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 제작되었다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation

behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산된다¹⁸⁾.

변경 행동력(%) = 실제변경(actual alternation) / 최고변경(maximum alternation) × 100 (최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

4) 수중미로시험(Morris water maze test)¹⁹⁾

Morris water maze를 통한 공간학습 및 인지력 개선에 대한 실험으로 기억력 관련 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있다. 본 maze의 재원은 지름 90cm, 높이 45cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6cm로 구성되어 있다. 실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1cm 밑에 설치하였다. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 maze를 4분원이 되도록 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, maze의 한 4분원에 플랫폼을 설치하였다. Morris water maze test는 6일 동안 진행하였다. 첫째 날에는 플랫폼을 설치하지 않고 각 마우스들이 물에 적응하기 위해 1분간 maze 안에서 자유롭게 수영하도록 하였다. 두 번째 날부터 5일째 되는 날까지는 매일 각각의 마우스가 1일 4회씩 1분 동안 10분 간격으로 maze에서 수영하도록 하였다. 두 번째 되는 날부터 5일째 되는 4일간 1회의 실험 방법은 이미 maze안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마쳤다. 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하였다. 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6일째 되는 날에는 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있던 위치에 마우스가 머문 시간을 측정하였다. 매일 첫 번째 입수 30분 전에 건망증 유발물질로 스코폴라민(scopolamine) 1 mg/kg을 복강으로 투여하였다. 모든 실험은 Ethovision program (Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

5) Acetylcholine 함량 및 Acetylcholinesterase 활성 억제 측정

각 처리군의 뇌 해마조직에서 acetylcholine의 측정은 alkaline hydroxylamine을 가진 o-acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다²⁰⁾. 96-well plate에 해마 조직 균질물 50 µL를 취하여 1% hydroxylamine(Sigma-Aldrich Co.) 50 µL를 첨가, 혼합한 후 HCl을 이용하여 pH를 1.2±0.2로 조절하여 FeCl₃(10% in 0.1 N HCl)을 500 µL 첨가한 후 혼합하고 530 nm에서 흡광도를 측정하여 acetylcholine의 활성(ng/mg protein)을 측정하였다. 해마 조직의 acetylcholinesterase의 측정은 96-well plate에 0.1 M Tris buffer, pH 8.0 (Trizma HCl+Trizma base)을 300 µL, 0.01 M dithionitrobenzoic acid(DTNB; Sigma-Aldrich Co.) 20 µL, 해마 조직 균질물 10 µL를 연속적으로 첨가하고 흡광도 측정 직전에 기질인 0.1 M acetylthiocholine chloride(Sigma-Aldrich Co.) 10 µL를 첨가하여 405 nm에서 흡광도 변화를 5분 동안 관찰하였다²¹⁾.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균값 ± 표준오차로 표시하였고, 실험 결과는 one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계처리 하

였다. 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여 p < 0.05 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

1. 합환피 물추출물의 수동회피실험(passive avoidance test)에서의 효과

정상 마우스에서 감금실험(retention trial) 시의 latency time이 75 ± 13.38초였으나 합환피 물추출물을 200 mg/kg 투여한 후 161 ± 22.72초로 유의적으로 증가하였다(Fig. 1A). Scopolamine 투여에 의하여 감금실험 시의 latency time이 64 ± 21.38초로 감소하는 기억력 손상마우스에 합환피 물추출물을 투여하였을 경우, 200 mg/kg의 농도에서 155 ± 20.37초로 latency time이 증가하였다. 이는 양성 대조군으로 사용된 THA의 투여 결과와 비슷한 것으로(161 ± 18.79초) 합환피 물추출물의 양호한 기억력 개선 효과를 나타낸다(Fig. 1B).

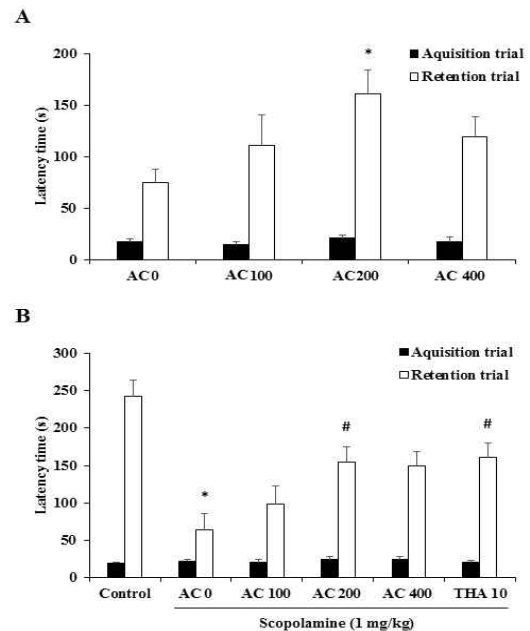


Fig. 1. Effects of Albizziae Cortex(AC) water extract on the passive avoidance test using normal mice (A) and scopolamine(1 mg/kg; i.p.)-induced memory impairment mice (B). AC: Albizziae Cortex water extract. THA: tacrine. AC (100, 200 or 400 mg/kg) or THA (10 mg/kg) were orally administered 1 h before the acquisition trial. Latency time was measured and the values shown the mean ± S.E.M (n = 10) * : p < 0.05 as compared with the control group, # : p < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

2. 합환피 물추출물의 Y-미로 시험에서의 효과

정상 마우스에 합환피 물추출물을 농도별로 투여하고 행동 변경률 점수(spontaneous alternation %)를 측정할 결과 200 mg/kg 농도에서 23% 정도로 유의성 있게 행동 변경률이 증가하는 결과를 나타내었다(Fig. 2A). 또한, scopolamine 처리에 의하여 30% 정도 감소된 행동 변경률이 합환피 물추출물 200 mg/kg, THA 투여에 의하여 각각 25%, 30% 정도 증가하였다(Fig. 2B). 미

로를 방문한 총 출입횟수(Total entry)는 합환피 물추출물만 농도별로 투여하였을 때와 (Fig. 2C), scopolamine을 처리하고 합환피 물추출물을 투여했을 경우 모두 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2D). 이는 합환피가 마우스의 일반적인 활동성 변화에 영향을 주지 않으며 학습 기억력 증가에 역할을 한 것으로 판단된다.

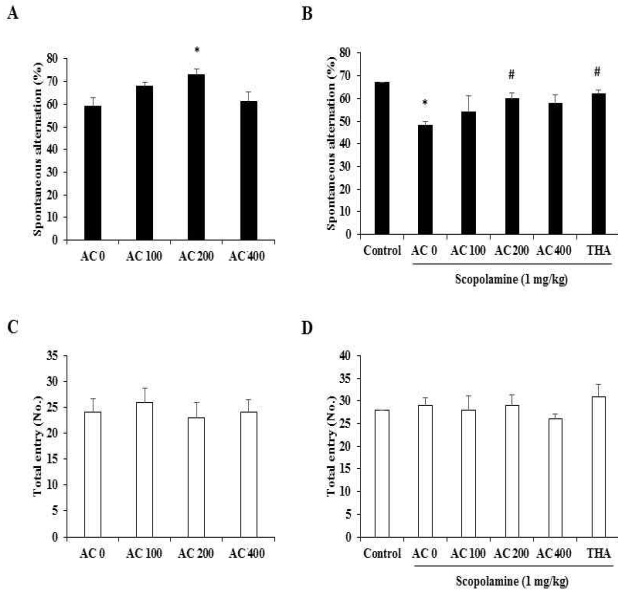


Fig. 2. Effect of Albizziae Cortex(AC) water extract on the Y-maze test using normal mice and scopolamine(1 mg/kg; i.p.)-induced memory impairment mice. Mice were treated with AC (100, 200 or 400 mg/kg) or THA (10 mg/kg) 1 h before the test. A and B: spontaneous alternation %, C and D: total entry (No.). The values shown the mean \pm S.E.M (n = 10) * : p < 0.05 as compared with the control group, # : p < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

3. 합환피 물추출물의 수중미로시험에서의 효과

정상 마우스에 learning trial을 4일째까지 실시를 하면 반복된 학습을 통하여 습득된 기억력으로 대부분의 마우스들이 보다 빠른 시간 내에 안전지대인 플랫폼에 도달하게 된다. 여기에 합환피 물추출물을 200 mg/kg을 투여하면 대조군보다 escape latency가 감소하였다(Fig. 3A). 인지기능에 손상을 유발하는 scopolamine을 처리한 경우 escape latency가 약 100초 정도로 증가하지만, 합환피 물추출물을 200 mg/kg로 투여함으로 인하여 약 50초 정도로 감소되어 인지기능이 회복됨을 알 수 있었다(Fig. 3B). 수중미로시험 마지막 날에는 기억력 검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 실시하고, 총 시간 중 플랫폼에 있었던 4분면에 머무는 시간을 측정하였다. 정상 마우스에 합환피 물추출물만 투여한 경우 47 \pm 5.53초로 대조군의 35 \pm 1.97초에 비하여 머무는 시간이 유의적으로 증가하였다(Fig. 3C). 또한, scopolamine을 처리한 마우스에 합환피 물추출물을 투여하였을 때 scopolamine에 의하여 감소된 체류시간이 합환피 물추출물 (200 mg/kg) 투여에 의하여 양성 대조군인 THA 투여군과 비슷한 수준으로 증가하였다(Fig. 3D).

4. Acetylcholinesterase 활성 억제 및 acetylcholine 함량에 대

한 합환피 물추출물의 효과

Acetylcholine(Ach)은 중추신경계의 콜린성 시스템과 매우 관련성이 높으면서 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질 중 하나이다. 콜린성 시스템은 학습능력과 기억력 등에 있어 중요한 역할을 담당하는 뇌의 신경 전달물질계에서 중요한 시스템이다. 이러한 콜린성 신경 손상은 학습능력 및 기억력 감퇴를 유발하여 알츠하이머병의 주요 원인 중 하나라고 알려져 있다. Ach은 acetylcholinesterase (AChE)의 활성을 통하여 acetic acid와 choline으로 분해되는데 이러한 ACh 함량의 감소는 인지능력 저하와 연관되어 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 AChE의 활성을 억제하여 Ach의 함량을 높이는 방법으로 저하된 인지기능 및 기억력을 증가시키는 치료방법이 이용되고 있다.

대조군에서의 AchE 활성은 0.35 \pm 0.02 U/mg protein인데 비하여 scopolamine을 처리하게 되면 0.49 \pm 0.04 U/mg protein로 증가한다. 합환피 물추출물군은 0.42 \pm 0.03 U/mg protein, 양성 대조군인 THA군은 0.38 \pm 0.03 U/mg protein으로 각각 scopolamine군보다 15%, 23% 정도 유의적으로 활성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한, Ach 함량은 대조군이 33.4 \pm 0.64 μ mole/mg protein으로 scopolamine에 의하여 26.7 \pm 1.21 μ mole/mg protein로 감소하지만 합환피 물추출물 투여에 의하여 32.8 \pm 1.36 μ mole/mg protein로 유의적으로 증가하였다(Fig. 4B). 이는 양성 대조군인 THA에 의하여 28.9 \pm 1.14 μ mole/mg protein로 증가하는 것에 비하여 훨씬 더 높은 수치인 것을 고려하였을 때, 합환피가 Ach 함량 유지에 있어서는 더 효과적인 것으로 사료된다.

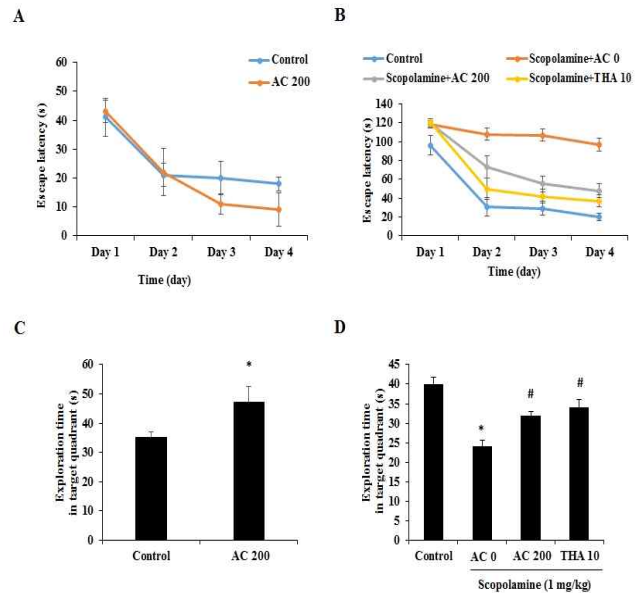


Fig. 3. Effect of the Albizziae Cortex(AC) water extract on the Morris water maze test using normal mice and scopolamine(1 mg/kg; i.p.)-induced memory impairment mice. Mice were orally administered with AC (200 mg/kg) or THA (10 mg/kg) 1 h before each training trial sessions. A and B: escape latency, C and D: exploration time in target quadrant. The values shown the mean \pm S.E.M (n = 10) * : p < 0.05 as compared with the control group, # : p < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

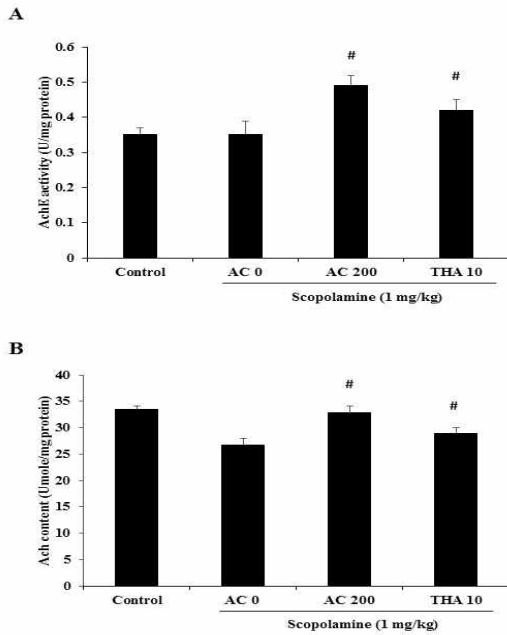


Fig. 4. Effect of Albizziae Cortex(AC) water extract on AchE activity and Ach content in the brain of scopolamine(1 mg/kg; i.p.)-induced memory impairment mice. A: AchE activity, B: Ach content. The values shown the mean \pm S.E.M (n = 10) # : p < 0.05 as compared with the control group.

고찰

본 연구에서는 합환피의 인지 능력 및 기억력 향상에 대한 효과를 확인하기 위하여 정상 마우스 및 scopolamine을 처리한 기억력 손상 마우스 모델을 이용하여 행동 실험을 실시하였다. 행동 실험으로는 전기 자극을 주는 수동회피실험과 Y-미로실험, 수중미로실험을 수행하였고, 이를 통해 합환피 물추출물이 유의적으로 인지 및 기억력을 향상시킨다는 사실을 관찰하였다.

수동회피실험은 어두운 곳을 선호하는 마우스의 성질을 이용하여 working memory ability를 측정하는 가장 대표적인 방법으로 단순기억에 대한 약물의 효과를 검증할 때 사용되는 실험이다²²⁾. 합환피 물추출물은 정상 마우스에서 latency time을 유의적으로 증가시켰고, scopolamine이 처리된 기억력 감퇴 마우스에서도 retention trial에서 유의성 있게 latency time을 회복시켰다.

Y-미로실험은 작업 기억을 바탕으로 이루어지는 학습능력을 알아보는 공간기억과제이다. 작업 기억은 정보가 처리되고 있는 동안에 그것을 유지하는 기억을 말하는 것으로, 이는 단기기억을 가리킨다²³⁾. Y-미로 실험에서 정상 마우스에 합환피 물추출물을 투여한 군은 유의적으로 행동 변경력(spontaneous alternation %)을 증가시켰고, scopolamine을 처리한 기억력 손상 모델에서도 scopolamine에 의하여 감소된 행동 변경력을 다시 회복시켰다. 두 경우 모두 total entry에는 유의적인 변화가 없는 것으로 볼 때, 이러한 결과는 합환피는 운동성에는 영향을 주지 않으면서 단기 기억력 및 공간인지 능력을 개선시킨다는 것을 의미한다.

Morris 수중미로는 해마 의존성 공간인지능력과 기억력을 검사하는 장치로, 학습을 실시하고 24시간 이후에 수행되기 때문에

마우스가 하루 동안 학습했던 내용을 잘 기억하고 있는지를 확인하는 실험에 사용된다. 마우스를 사용하는 실험에서 24시간은 상당히 긴 시간으로 이는 곧 장기기억을 측정하는 것이다²⁴⁾. 4일 동안 실시되는 획득시행 결과 탈출 잠복기(escape latency)의 감소와 실험 4일째의 exploration time in target quadrant는 학습 능력과 공간 기억력의 향상을 의미한다. 정상 마우스에 합환피 물추출물을 투여한 경우 3, 4일째 escape latency time이 대조군에 비하여 50% 정도 감소하였다. exploration time in target quadrant는 35초에서 47초 정도로 30% 수준으로 증가하였다. 이를 통해 합환피 물추출물이 학습 능력 및 기억력 개선 효과에 관련이 있을 것으로 보인다.

기억력과 관련된 주요한 신경계는 cholinergic 신경계로 알려져 있다.²⁵⁾ 뇌에서 AChE의 활성이 증가하여 Ach 함량이 감소되거나, Ach와 cholinergic 신경계에 있는 muscarine 수용체와의 결합이 억제되면 정보 전달이 차단되면서 기억력과 학습 능력이 감소된다²⁶⁾. Muscarine 수용체 길항제인 scopolamine은 Ach와 muscarine 수용체의 결합을 억제하는 원리로 기억력 손상을 일으키며, 실제로 정상인이나 치매 환자에게 투여하였을 경우 기억력에 장애가 유발되거나 심화되는 양상을 보인다²⁰⁾. 이러한 이유로 scopolamine은 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 알아보기 위하여 동물 모델을 확립할 경우에 주로 사용된다. Scopolamine은 cholinergic 신경 수용체 중 하나인 muscarine 수용체에 대한 길항제이기 때문에 이 모델에서 효과가 있는 약물은 cholinergic 신경계를 경유하여 효능을 나타낼 것이라 생각할 수 있다.

전체적으로 합환피 물추출물은 수동회피실험, Y-미로실험, 수중미로실험에서 양성대조군인 THA와 비슷한 양상으로 기억력을 향상시켰으며, scopolamine에 의한 Ach 함량 저하를 THA 투여군보다 더 효과적으로 회복시켰다. 또한, scopolamine에 의한 기억력 손상 마우스에서 뿐만 아니라 정상 마우스에서도 인지 및 학습 능력, 기억력을 증진시키는 효과를 나타냈다. 합환피 물추출물은 AChE 활성을 억제하는 경로와 cholinergic 신경계 둘 다를 활성화시킴으로써 기억력을 향상시키는 기전을 갖는 것으로 추측된다.

이러한 결과들로부터 본 연구는 합환피는 치매와 같은 기억력 감퇴와 관련된 증상을 가지고 있는 환자들뿐만 아니라 정상인들에게도 효과를 보일 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 이를 통하여 관련 질환에 대하여 부작용이 적은 예방 및 치료제로 개발할 수 있는 후보물질이라고 사료된다. 향후, 합환피 물추출물의 인지 및 기억력 개선 작용에 대한 자세한 기전 탐색과 유효성분에 대한 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다고 판단된다.

결론

본 연구에서는 합환피의 물 추출물의 인지 능력 및 기억력 개선 효과를 조사하기 위하여 약물의 단독투여 또는 scopolamine으로 유도된 건망증 모델을 이용하였다. 수동회피시험(passive avoidance test)과 Morris 수중미로시험(Morris water maze test), Y-미로 시험(Y-maze test)를 수행하고 acetylcholinesterase 활성 억제 및 acetylcholine 함량을 측정하

여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

수동회피실험(Passive avoidance test)에서는 합환피 물추출물의 단회투여로 인하여 latency time이 대조군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 스코폴라민으로 유도한 건망증 마우스 모델을 사용한 수동회피실험에서도 latency time이 길어졌다는 것은 합환피 물추출물이 정상인의 인지기능 및 기억력 개선 증상뿐만 아니라 치매 치료 및 예방에서도 유효한 효과가 있는 것이라는 사실을 의미한다.

Y-미로 시험(Y-maze test)에서 합환피 물추출물 (200 mg/kg) 투여는 spontaneous alternation을 유의적으로 증가시켰으며, 또한 스코폴라민 투여에 의하여 감소하는 spontaneous alternation을 유의성 있게 회복시키는 것으로 볼 때 학습 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다.

Morris 수중미로시험에서 스코폴라민으로 증가된 escape latency는 4일 동안의 반복 학습과 합환피 물추출물 투여를 통하여 양성 대조군인 THA 그룹과 비슷한 양상으로 감소하였다. 또한, 합환피 물추출물만을 투여했을 때 exploration time in target quadrant이 증가하였고, 스코폴라민 투여로 인하여 감소된 시간을 다시 증가시킴으로써 학습 기억능력이 회복되는 것을 관찰하였다. 이를 통해 합환피의 물 추출물은 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 동물 모델에서 장기기억 개선효과를 나타내는 것으로 판단된다.

콜린성 신경계에 작용하는 아세틸콜린 함량과 이를 분해하는 효소 (AChE)의 활성을 측정한 결과, 합환피 물추출물 투여는 스코폴라민으로 유도되는 AChE의 활성을 유의적으로 저해하고 스코폴라민으로 감소되는 Ach의 함량을 회복시키는 것으로 관찰되었다.

본 연구를 통해 합환피 물추출물이 정상 상태의 마우스에서 단회 경구 투여 시 기억력을 강화시킬 뿐만 아니라 scopolamine으로 유도된 건망증 모델에서도 기억력 개선효과를 나타내는 것을 확인할 수 있어, 향후 기억력 감퇴 개선 및 증진제 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Oh SG. Neurotransmitters and brain disease. Shinilbooks. 2005:345-64.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. JAMA. 1989;262:2551-6.
- Nordberg A. Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. Acta Neurologica Scandinavica. 1996;168:87-92.
- Lemiere JJ, Van D, Dorn R. Treatment of Alzheimer's disease: an evaluation of cholinergic approach. Acta Neurol. Belg. 1999;99:96-106.
- Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology. 1999;52:691-9.
- Dawson GR, Iversen SD. The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. Behavioural Brain Research. 199. 57:143-53.
- Summers WK, Tachiki KH, Kling A. Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease. A clinical update and recent pharmacologic studies. Eur Neurol. 1989;29:28-32.
- Kim JM, Kim DH, Park SJ, Jung JW, Ryu JH. Memory Enhancing Properties of the Ethanolic Extract of Black Sesame and its Ameliorating Properties on Memory Impairments in Mice. Kor. J. Pharmacogn. 2010;41(3):196-203
- Howes MJ, Perry NS, Houghton PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Phytother. Res. 2003;7:1-18
- Yao NL. Zhong Yi Zheng Zhuang Jian Bie Zhen Duan Xue, Ren Min Wei Sheng Chu Ban She. 2000:106-7.
- Oriental pharmacology textbook compilation committee. Oriental pharmacology. Shinilbooks. 2005:29-41.
- Shin MK. Clinical Traditional Herbalogy. Yonunglimsa. 2002:647-8
- Lee SH, Lee YR, Ryu DG, Kim HR, Kim MS, Kim BS, Kwon KB. Inhibitory Effects of Albizziae Cortex Extracts on Adipocyte Differentiation. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2016;30:447-51.
- Park YJ, Jung WC, Jeong DY, Lee YU, Lee I, Lee KS, Jeon BH, Sung KK, Moon BS. Effects of the Water Extract from Albizzia julibrissin on Apoptosis and Cell Cycle Progression in the Human Leukemic Jurkat Cells. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2003;17:1383-92.
- Lee SW, Kang BS. Inhibition Effects of Albizzia julibrissin water extract on Lipid peroxidation in Benzo(a)pyrene - Treated Mice. Journal of the institute oriental medicine. 2001;3:107-16.
- LeDoux JE. Emotional memory system in the brain. Behav Brain Res. 1993;20:58(1-2):69-79.
- LeDoux JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. Ann N Y Acad Sci. 1993;702:149-57
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 1984;11(1):47-60.
- Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous

- alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carboline. *Psychopharmacology*. 1998;94(4):491-5.
20. Vincent D, Segonzac G, Vincent MC. Colorimetric determination of acetylcholine by the Hestrin hydroxylamine reaction and its application in pharmacy. *Ann Pharm Fr*. 1958;16:179-185.
21. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
22. Bae HS, Shim IS. Establishment of functionality evaluation system for learning and memory of health functional food. 2003:664-54.
23. Tanabe F, Miyasaka N, Kubota T, Aso T. Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spatial memory. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 2004;51:89-98.
24. Gong DY, Choi YS. Development of New Analytical Method Evaluating Working Memory on Y Maze. 2016;26:234-40.
25. Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Barin Res. Rev*. 1995;21:285-300
26. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;8000:1403.