



홍화씨와 흰민들레 복합물의 Scopolamine 유도 기억력 손상에 대한 보호 효과

김지현¹ · Mei Tong He² · 김민조³ · 박찬흠⁴ · 이재양⁵ · 신유수⁶ · 조은주^{7†}

Protective Effects of Combination of *Carthamus tinctorius* L. Seed and *Taraxacum coreanum* on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Ji Hyun Kim¹, Mei Tong He², Min Jo Kim³, Chan Hum Park⁴, Jae Yang Lee⁵, Yu Su Shin⁶ and Eun Ju Cho^{7†}

ABSTRACT

Received: 2020 March 18
1st Revised: 2020 April 7
2nd Revised: 2020 April 16
3rd Revised: 2020 April 20
Accepted: 2020 April 20

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: Alzheimer’s disease (AD) is caused by various factors, such as cholinergic dysfunction, regulation of neurotrophic factor expression, and accumulation of amyloid-beta. We investigated whether or not a combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* (CT) has a protective effect on scopolamine-induced memory impairment in a mouse model. **Methods and Results:** Mice were orally pretreated with CT (50, 100 and 200 mg/kg/day) for 14 days, and scopolamine (1 mg/kg/day) was injected intraperitoneally before subjecting them to behavior tests. CT-administered mice showed better novel object recognition and working memory ability than scopolamine-treated control mice. In T-maze and Morris water maze tests, CT (100 and 200 mg/kg/day) significantly increased space perceptive ability and occupancy to the target quadrant, respectively. In addition, 100 and 200 mg/kg/day of CT attenuated cholinergic dysfunction through inhibition of butyryl cholinesterase in brain tissue. Furthermore, CT-administered mice showed higher cyclic adenosine monophosphate-response element-binding protein (CREB) levels and lower amyloid precursor protein (APP) levels compared to scopolamine-treated control mice. **Conclusions:** CT improved scopolamine-induced memory impairment through inhibition of cholinergic dysfunction, up-regulation of CREB, and down-regulation of APP. Therefore, CT could be a useful therapeutic agent for AD with protective effects on cognitive impairment.

Key Words: *Carthamus tinctorius* L., *Taraxacum coreanum*, Cognition, Memory, Scopolamine

서 언

전 세계적으로 생활 수준향상 및 의학기술의 발달에 따른 인구의 고령화로 인해 알츠하이머 질환 (Alzheimer’s disease, AD)을 비롯한 신경퇴행성 질환 발병률이 증가하고 있다 (Lane *et al.*, 2018). AD는 치매 발병률의 가장 많은 비율을 차지하며, 기억력, 인지능력, 사고능력, 학습능력, 언어 및 판단력 저하 등의 임상적 증상을 나타낸다 (Hampel *et al.*, 2018;

Lane *et al.*, 2018). AD는 콜린성 기능 장애 (cholinergic dysfunction), 아밀로이드 베타 (amyloid beta, Aβ) plaque의 축적, 산화적 스트레스, 신경염증반응 등의 다양한 원인으로 인해 발병하는 것으로 알려져 있다 (Agostinho *et al.*, 2010; Hampel *et al.*, 2018). 따라서 다양한 기전의 조절을 통한 AD 예방 및 치료에 관한 소재 개발이 필요한 실정이다. 뇌에서 아세틸콜린에스테라제 (acetylcholinesterase), 부틸릴 콜린에스테라제 (butyrylcholinesterase) 등의 콜린에스테라제 효

†Corresponding author: (Phone) +82-51-510-2837 (E-mail) ejcho@pusan.ac.kr

¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소 연수 연구원 / Post-doc, Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea.

²부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소 박사 과정생 / Ph. D. Student, Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea.

³토야마의과약과대학 연구원 / Researcher, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-8555, Japan.

⁴(주)참선진녹즙 책임 연구원 / Researcher, Farmdeu Inc., Jincheon 27865, Korea.

⁵(주)인산가 기업부설 인산생명과학연구소 연구소장 / Research Director, Insan Life Science Research Institute, Insan Inc., Hamyang 50022, Korea.

⁶농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 농업 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

⁷부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소 교수 / Professor, Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea.

소 활성의 증가는 신경전달물질인 아세틸콜린 (acetylcholine) 을 콜린 (choline)과 아세틸 CoA (acetyl CoA)로 분해시켜 콜린성 기능 장애를 유도하며, 이는 기억력 및 인지기능 손상에 영향을 미친다 (Darvesh *et al.*, 2003; Hampel *et al.*, 2018). 또한 cAMP-response element-binding protein (CREB)의 인산화에 의해 발현되는 brain-derived neurotrophin factor (BDNF)는 뇌의 신경영양인자 (neurotrophic factor)로써, 시냅스 가소성 조절, 신경돌기 성장 등과 관련되어 기억력 및 인지기능 형성에 중요한 역할을 하며, 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein)로부터 amyloidogenic pathway에 의해 분리되어 생성된 A β 는 AD의 대표적인 조직병리학적원인으로 알려져 있다 (Hardy and Higgins, 1992; Lee *et al.*, 2014b; Khallaf *et al.*, 2017).

스코폴라민 (scopolamine)은 뇌에서 콜린성 기능 장애, A β 축적, 산화적 스트레스 등을 유도하여 기억력 손상을 유도하는 것으로 보고됨에 따라, 스코폴라민을 투여한 동물 모델은 대표적인 기억력 손상 동물 모델로써 AD 예방 및 치료를 위한 소재의 기억력 개선 효능 평가 및 메커니즘 규명 연구에 이용되고 있다 (Ebert and Kirch, 1998; Botton *et al.*, 2010).

홍화씨와 흰민들레는 각각 콜린성 기능장애에 대한 개선 효능과 산화적 스트레스 개선을 통한 기억력 향상 효과가 보고되었는데, 홍화씨 (*Carthamus tinctorius* L. seed)는 음식과 의약품으로 널리 사용되며, 항암, 항산화, 항염증 등의 효능이 있는 것으로 보고된 소재로써 (Choi *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019a; Nimrouzi *et al.*, 2020), 특히 홍화씨 추출물은 기억력 손상 동물모델에서 콜린성 기능 장애와 산화적 스트레스 개선을 통한 기억력 개선 효능이 보고되었다 (Choi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

흰민들레 (*Taraxacum coreanum*)는 한방에서 간장, 해열, 이뇨 등의 약용재료로 사용되어 온 국내 자생식물로써, A β 유도 AD 동물 모델에서 산화적 스트레스 개선을 통한 인지기능 향상 효능과 A β 유도 신경독성에 대한 염증반응 조절을 통한 신경세포 보호 효능이 보고되었다 (Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014a).

AD의 발병원인이 다양하고 복잡함에 따라, 최근 AD 예방 및 치료를 위한 소재 개발에 있어서, multi-target 조절을 통한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 기억력 손상을 유도한 동물 모델에서 2 개 이상의 천연물 유래 식품소재가 함유된 추출물 투여군은 단일 추출물 투여군에 비해 더욱 우수한 기억력 개선 효과를 나타내었다 (Kim *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019b). 선행연구를 통해 스코폴라민 유도 기억력 손상 동물모델에서 홍화씨와 흰민들레 2 : 8, 5 : 5, 8 : 2 각 비율별 복합물의 기억력 개선 효과를 확인하였을 때, 5 : 5 비율에서 우수한 기억력 개선 효과를 나타내었다 (data not

shown). 그러나 5 : 5 복합물의 농도별 기억력 개선 효과와 작용 메커니즘 규명에 관한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 스코폴라민 유도 기억력 손상 동물모델에서 홍화씨와 흰민들레 5 : 5 복합물의 물체인지실험, 수동회피실험, T-maze test, Morris water maze test를 통한 행동실험과 뇌 조직에서의 콜린성 기능 장애, CREB-BDNF signaling 및 amyloidogenic pathway에 미치는 영향을 확인하고자 한다. 홍화씨와 흰민들레 5 : 5 복합물의 기억력 개선 효과 및 작용 기전에 대해 알아봄으로써, 홍화씨와 흰민들레 5 : 5 복합물의 기억력 개선용 건강기능식품의 개발 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 홍화씨 (*Carthamus tinctorius* L. seed)와 흰민들레 (*Taraxacum coreanum*) 복합 추출물 시료는 대용량의 분쇄, 추출, 농축, 건조의 과정을 통해 만들어진 것에서 그 일부를 이용하였다. 건조 상태인 흰민들레 (생산지: 강원도 양구군)와 홍화씨 (생산지: 전남 고흥군) 각각 50 kg 을 분쇄한 다음, 5 : 5 비율로 혼합하여 추출용 여과포에 10 kg 씩 나누어 담았다. 이어서, 여과포의 매듭 상태를 확인 후 추출탱크에 넣고, 정제수를 추출내용물의 20 배수만큼 첨가하였다.

추출용매에 여과포들이 완전히 침지된 상태에서 추출탱크를 밀폐시키고 용매를 순환시키면서 가열 추출을 시작하였다. 완전 밀폐된 탱크에서의 추출과정은 90°C에서 8 시간 동안 진행하였다. 추출이 끝난 다음 추출액을 200 mesh 필터가 부착된 여과라인을 통과시켜서 농축탱크로 이송하여 농축을 하였다. 농축탱크의 온도를 60°C로 설정하고 진공펌프로 추출액이 15 내지 16 배수가 되도록 농축한 다음, 시료를 회수하여 동결건조를 하였다. 동결건조과정은 건조용 트레이 (tray)에 최대 용량의 50% 정도로 추출농축액을 분주해서 동결건조기에 투입하였다. 그리고 설정된 동결건조 프로그램에 따라 48 시간 동안 동결건조를 진행하여 시험용 홍화씨와 흰민들레 복합 추출물을 만들어 본 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 기억력 손상 유도

본 실험에서 사용된 ICR mouse (5 주령, 28 g - 31 g, 수컷)는 오리엔트바이오 (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 실험기간 중 mouse는 동물 실험실에서 12 시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였고, 온도 (20 ± 2°C)와 습도 (50 ± 10%)를 일정하게 유지시키고, 물과 식이는 자유롭게 공급하였다.

1 주일간 적응시킨 뒤, 군 당 평균체중이 동일하도록 총 6 개의 군으로 나누었다. 실험동물은 정상군 (normal), 스코폴라

민 처리군 (control), 스코폴라민 처리 후 홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물을 각각 50, 100, 200 mg/kg/day 농도로 투여한 군 (CT50, CT100, CT200), 스코폴라민 처리 후 donepezil을 투여한 군 (DO)의 총 6 군으로 나누어 실험을 진행하였다. Positive control로 사용한 donepezil은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

기억력 손상을 위한 스코폴라민은 1 mg/kg의 농도로 행동 실험 30 분 전 복강투여하였다. 기억력 손상을 유도하지 않은 normal군은 생리식염수 (0.9% NaCl)를 복강투여하였다. 정수물에 녹인 홍화씨 흰민들레 복합물과 donepezil은 존대를 이용하여 14 일간 경구투여하였으며, normal군과 control군은 정수물을 경구투여하였다. 경구투여 기간 14 일 중 종료 전 8 일 동안 물체인지실험, T-maze test, Morris water maze test의 3 가지 행동실험을 연속적으로 실시하였다. 수동회피를 위한 기억력 개선 효과 확인을 위해, 경구투여 기간 14 일 중 종료 전 2 일 동안 수동회피실험을 실시하였다. 행동실험 종료 후, 모든 실험동물은 CO₂ 가스를 이용하여 안락사 시켰으며 이후 즉시 채혈하고 생리식염수를 이용하여 장기를 관류한 뒤, 뇌 조직을 적출하여 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

본 실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다 (승인번호: PNU 2018-2013, 2019-2394).

3. 물체인지실험 (Novel object recognition test)

물체인지상자는 외부가 보이지 않는 흑색 아크릴로 제작하여 실험에 사용하였다. 첫째 날에는 두 개의 모양과 크기가 같은 물체 (A, A')를 상자 안에 고정시킨 후 mouse를 상자의 중심에서 출발시켜 10 분간 자유롭게 물체를 탐색하도록 하였다.

24 시간 후에는 두 개의 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꾼 후 (A, B) mouse를 동일하게 배치시킨 뒤, 10 분간 기존 물체 (old object, A)와 새로운 물체 (new object, B)에 탐색한 횟수를 측정하였다. 물체인지능력 (%)은 전체 물체를 만진 횟수와 기존물체, 새로운 물체를 만진 횟수를 기록하여 산출하였다 (Bevins and Besheer, 2006).

4. 수동회피실험 (Passive avoidance test)

수동회피실험은 차단 문으로 나뉘어진 두 개의 챔버로 구성된 상자에서 진행하였다. 한 챔버는 밀폐되지 않은 밝은 공간으로 구성하였고, 다른 챔버는 빛을 차단하여 어두운 공간으로 구성하였다. 또한 바닥에 스테인리스 스틸 막대로 전기충격판을 설치하였다. Mouse를 밝은 챔버에 배치 시, mouse는 주변을 살피다가 어두운 챔버로 들어가게 되는 데 이 때 어두운 챔버에 mouse가 들어가면 차단 문이 자동으로 닫히고 전기충격 (0.8 mA, 3 s)이 가해지도록 수동회피상자를 구성하였다.

첫째 날에는 mouse를 밀폐되지 않은 밝은 챔버에 배치하고, 1 분간 어두운 챔버에 들어가는 시간을 기록하였다. 24 시간 뒤, retention trial에서는 mouse를 동일하게 배치시키고 5 분간 자유롭게 수동회피상자를 탐색하도록 하였고, 밝은 챔버에 머무르는 시간을 측정하였다 (LeDoux, 1993).

5. T-maze test

T-maze 상자는 외부가 보이지 않는 흑색 아크릴로 시작 부분, 왼쪽 통로, 오른쪽 통로로 구성하였으며, 오른쪽 통로는 분리 가능한 차단 문을 설치하여 실험을 진행하였다.

첫째 날에는 mouse를 T-maze 상자의 시작 부분에 배치하고 오른쪽 통로 차단 문을 이용하여 오른쪽 통로를 차단하여 10 분간 자유롭게 탐색하도록 하였다. 24 시간 후에는 차단 문을 제거하여 mouse를 동일하게 배치시킨 뒤, 10 분간 왼쪽 통로 (old route)와 오른쪽 통로 (new route)에 들어간 횟수를 측정하였다. 공간지각능력 (%)은 전체 통로에 들어간 횟수와 좌우 통로에 들어간 횟수를 기록하여 산출하였다 (Montgomery, 1952).

6. Morris water maze test

Morris water maze에 사용된 수조는 무작위로 4 부분으로 나누어 각각의 위치에 서로 다른 표식을 붙였다. 실험 기간 중 물의 온도는 22±2°C로 유지시켰으며, 물에 잘 녹으며 독성이 없는 흰색 물감을 타서 mouse가 도피대를 찾을 수 없도록 물을 불투명하게 유지시켰다. 한 사분면의 중앙에 눈에 보이지 않는 도피대를 수면 아래 1 cm에 위치시켰다. 훈련 기간 동안 도피대의 위치를 변화시키지 않았으며, 수조의 각 사분면의 벽에 4 개의 서로 다른 표식을 부착하여 도피대를 찾아가도록 하는 시각적 공간 단서 (visual clue)를 제공하였다.

훈련기간은 3 일 동안 4 시간 간격으로 3 회씩 실시되었다. 훈련 기간 동안 mouse를 임의의 시작점에서 수조에 넣어 60 초 동안 자유롭게 숨겨진 도피대를 찾을 수 있도록 했고, 시간을 기록하였다. 도피대를 찾으면 보상으로 도피대에서 15 초 동안 휴식을 허용하였고, 60 초 이내에 도피대를 찾지 못한 경우 mouse를 도피대로 유도하여 15 초 동안 도피대가 있던 사분면의 공간 단서를 인지시켜 도피대의 위치를 인식시켰다.

훈련이 완료된 4 일째에는 3 가지 test를 실시하였다. 첫째 test는 이전과 같은 방법으로 실험을 수행하여 숨겨진 도피대를 찾아가는 시간을 기록하였고, 두번째 test는 도피대를 제거하고 도피대가 있던 사분면에 머문 시간을 측정하였다. 마지막 test는 물을 투명하게 하고 노출된 도피대에 도달하는 시간을 기록하였다 (Morris, 1984).

7. Western blot analysis

뇌 조직은 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 뒤,

radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer를 첨가하여 4 °C, 12,000 rpm에서 30 분간 원심분리 시켜 상층액을 분리시켰다. 상층액은 Bradford법을 이용한 Bio Rad assay kit (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 정량하여 western blot에 사용할 시료를 제조하였다 (Bradford, 1976).

각 시료는 10% sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel에서 전기 영동하여 분리하고, membrane에 transfer하여 5% skim milk에서 1 시간 동안 blocking 하였다. 이 후 phosphate buffered saline with tween 20 (PBST)로 세척 후 희석한 1 차 항체와 over night 반응시켰다.

본 실험에서는 아세틸콜린에스테라제 (sc-373901, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 부틸콜린에스테라제 (sc-377403, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), BDNF (ab108319, Abcam plc., Cambridge, UK), phospho-CREB (ser133) (#9198S, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA), beta-actin (#8457S, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) 등의 1 차 항체를 사용하였다. 이 후 PBST로 세척 후 2 차 항체로 사용한 anti-rabbit IgG, HRP (#7074S, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) 및 anti-mouse IgG, HRP (#sc-373901, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 PBST에 희석하여 상온에서 반응시켰다. 1 시간 뒤, enhanced chemiluminescence (ECL) solution과 반응시켜 Chemiluminescence Image System (Davinch-K Co., Ltd., Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

단백질 발현양은 ATTO Densitograph software (ATTO Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 정량화하였으며, beta-actin 대비 비율을 이용하여 정량화 하였다. 각 단백질 발현양은 normal군 대비로 수치를 이용하여 산출하였다.

8. 통계분석

각 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 각 결과로부터 analysis of variance (ANOVA)를 구한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 각 군의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

AD 치료를 위한 약물에는 donepezil, tacrine, rivastigmine 등이 개발되어 있으며, 이들은 모두 아세틸콜린에스테라제 활성을 억제시켜 기억력 손상에 대한 개선 효과를 나타낸다 (Kumar *et al.*, 2015). 그러나 이들 치료제가 인체에서간 독

성, 구토, 메스꺼움, 설사 등의 독성과 부작용을 나타내는 것으로 보고됨에 따라, 독성과 부작용이 적은 천연식물을 이용한 항 치매 기능성 소재 개발이 활발히 이루어지고 있다 (Kumar *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2017). 특히 AD는 다양하고 복잡한 원인으로 발병됨에 따라, 다방면적으로 AD를 예방 및 치료할 수 있는 소재 개발에 대한 관심이 높다 (Iqbal *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017).

최근 연구에 의하면, trimethyltin으로 인지능 손상을 유도한 동물모델에서 한국산 홍삼 (Korean red ginseng)과 칩 (Pueraria montana) 복합물의 투여는 단일 추출물 투여군에 비해 인지능 개선 효과가 우수하였으며, 이는 뇌 내 콜린성 기능 장애와 산화적 스트레스 개선에 의한 것임이 보고되었다 (Seo *et al.*, 2018). 또한, 식품 소재인 대추 (Ziziphus jujuba) 씨와 더덕 (Codonopsis lanceolata) 복합물은 단일 추출물에 비해 스코폴라민 유도 기억력 손상 동물모델에서 뇌 내 PKA-ERK-CREB pathway 활성화를 통한 기억력 개선 효과가 우수한 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2018). 이와 같이 단일 추출물 투여군에 비해, 복합 추출물 투여군에서 기억력 및 인지능 손상에 대한 개선에 대한 시너지 효과가 보고됨에 따라, 복합추출물 투여로 AD 예방 및 치료에 대한 소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

스코폴라민은 항 콜린 약물체제의 일종으로 muscarinic acetylcholine receptor 중에서 특히 M1 receptor의 길항제로 작용한다 (Ebert and Kirch, 1998). 뇌에서 스코폴라민은 아세틸콜린에스테라제 활성을 증가시켜 아세틸콜린을 분해하여 단기 기억력 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Botton *et al.*, 2010). 뿐만 아니라, 스코폴라민을 주입한 동물 모델의 뇌에서 CREB-BDNF pathway 억제, A β plaque 축적, 산화적 스트레스, 신경염증 등을 통한 기억력 손상이 보고되었다 (Bihagi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014b). 따라서 스코폴라민 유도 기억력 손상 동물모델은 치매 예방 및 치료에 관한 연구에 주로 이용되고 있다 (Botton *et al.*, 2010).

홍화씨 (Carthamus tinctorius L. seed)는 kaempferol, acacetin, carthatin A, carthatin B, *N*-(*p*-coumaroyl)serotonin, *N*-(feruloyl) serotonin 등의 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있으며, 특히 홍화씨 활성성분 중 serotonin은 뇌에서 신경전달물질과 호르몬에 관여하는 것으로 보고되었다 (McEntee and Crook, 1991; Koyama *et al.*, 2006). 흰민들레 (Taraxacum coreanum)는 국내 자생식물 중의 일종으로 항산화 및 항염증 활성이 우수한 luteolin, chlorogenic acid, chicoric acid 등의 생리활성 성분을 함유하고 있다 (Mok *et al.*, 2011; Chon, 2012; Lee *et al.*, 2012). 흰민들레의 이들 생리활성 성분은 뇌에서 amyloidogenesis 억제 및 항염증 등의 효능으로 기억력 개선 효능을 나타내어 AD 개선 소재로서의 가능성이 보고된 바 있다 (Kwon, 2017; Liu *et al.*, 2017a).

사전연구를 통해 스코폴라민 유도 기억력 손상 동물모델에서 홍화씨, 흰민들레 단일 추출물 투여군과 홍화씨 흰민들레의 2 : 8, 5 : 5, 8 : 2의 비율로 제조한 복합물을 각각 경구투여 후, 기억력 개선 효능을 살펴보았다. 홍화씨 흰민들레 복합물 5 : 5 비율은 2 : 8 복합물 투여군에 비해 공간인지 개선 효능이, 8 : 2 복합물 투여군에 비해 물체인지 개선 효능이 각각 높아 두 가지 행동실험 모두에서 기억력 개선 효능을 보였으며, 뇌 내 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 발현 억제를 통한 항염증 효능과 아세틸콜린에스테라제 활성 억제를 통한 콜린성 기능 장애 개선 효능이 우수함을 확인하였다 (data not shown). 또한, 홍화씨 흰민들레 2 : 8, 5 : 5, 8 : 2 비율의 복합물 수율을 측정 시 각각 34.00%, 26.33%, 16.00%임을 확인하여, 기억력 개선 효능과 추출 수율 등을 종합하여 보았을 때 추후 기억력 개선용 소재 개발 시 5 : 5 비율 복합물이 가장 적합한 것으로 사료된다.

선행연구에서 단일 추출물 및 각 비율별 복합물을 100 mg/kg/day의 농도로 투여하여 실험을 진행하였으나, 홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물의 농도별 기억력 개선 효능에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 50, 100, 200 mg/kg/day의 농도 별 홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물의 스코폴라민 유도 기억력 손상에 대한 개선 효과와 작용 메커니즘을 규명하여, 기억력 개선 효능이 우수한 최적의 농도를 확인하고자 한다.

물체인지실험은 새로운 환경에 노출된 mouse의 자연적인 탐구능력을 기반으로 물체인지능력을 평가하는 실험으로, test day에 기존 물체를 새로운 물체로 대체하였을 때 일반적으로 mouse는 새로운 물체에 대해 더 많은 호기심을 가져 새로운 물체를 탐지하는 횟수가 증가한다 (Bevins and Besheer, 2006). 반면, 스코폴라민으로 기억력이 손상된 mouse는 기존 물체와 새로운 물체 간 탐지횟수에 큰 차이를 나타내지 않는다 (Koyama *et al.*, 2006).

본 연구에서 기억력 손상을 유도한 control군은 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 기존 물체와 새로운 물체를 인식하는데 유의한 차이를 나타내지 않아 물체인지능력 손상을 확인하였다 (Fig. 1). 반면, 홍화씨 흰민들레 복합물과 치매치료제인 donepezil을 각각 투여한 군에서 유의적으로 기존 물체에 비해 새로운 물체를 탐지하는 횟수가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 홍화씨 흰민들레 복합물의 투여는 스코폴라민으로 손상된 물체인지능력에 대한 개선 효과를 나타냄을 확인하였다.

수동회피실험은 어두운 곳을 선호하는 mouse의 특성을 이용한 대표적인 기억력 측정을 위한 행동실험의 일종으로, 전기 자극을 기억하는 시간을 측정하여 mouse의 기억력을 평가하는 방법이다 (LeDoux, 1993).

본 연구에서 스코폴라민을 투여한 control군은 밝은 챔버에

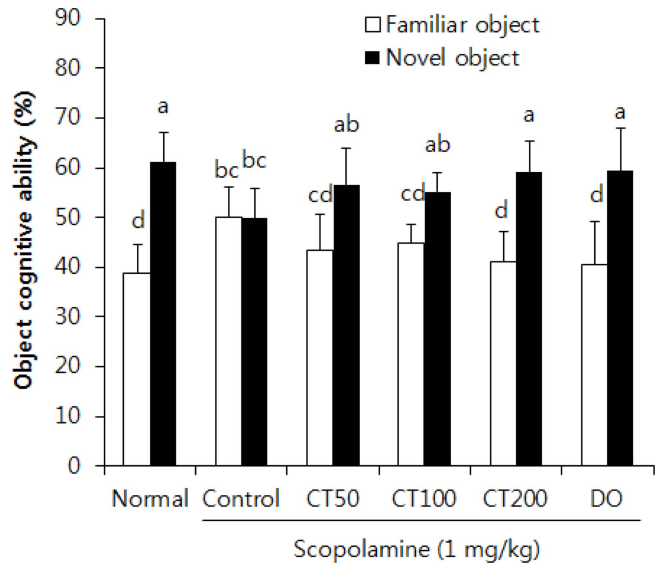


Fig. 1. Effect of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on object recognition impairment in the novel object recognition test. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). Values are means \pm SD. ^{a-d}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

서의 체류시간이 normal군에 비해 유의적으로 감소하였으므로, 이는 그 전날 전기충격을 기억하지 못해 수동회피에 필요한 기억력 손상을 확인하였다 (Fig. 2). 홍화씨 흰민들레 복합물 및 donepezil 투여군의 밝은 챔버에서의 체류시간을 측정 한 결과, control군에 비해 체류시간이 증가함을 확인하였으나 통계적 유의성은 없었다.

T-maze 실험은 mouse의 공간 인지능력을 평가하는 방법 중의 일종으로, 새로운 공간에 호기심이 많은 mouse의 자연적 행동에 의존하여 새로운 공간을 탐지하는 횟수를 측정하는 실험이다 (Montgomery, 1952).

본 연구에서 스코폴라민으로 기억력 손상을 유도한 control군은 기존 route에 비해 새로운 route를 탐색하는데 있어 유의한 차이를 나타내지 않아 공간인지능력의 손상을 확인하였다 (Fig. 3). 반면 홍화씨 흰민들레 복합물 100 mg/kg, 200 mg/kg 농도 투여군과 donepezil 투여군은 유의적으로 기존 route에 비해 새로운 route를 탐색하는 비율이 높아, 공간인지능력 개선 효과를 확인하였다.

Morris water maze test는 mouse의 학습기억력을 평가하는 대표적인 실험방법으로, 수조의 사분면에 있는 공간단서를 이

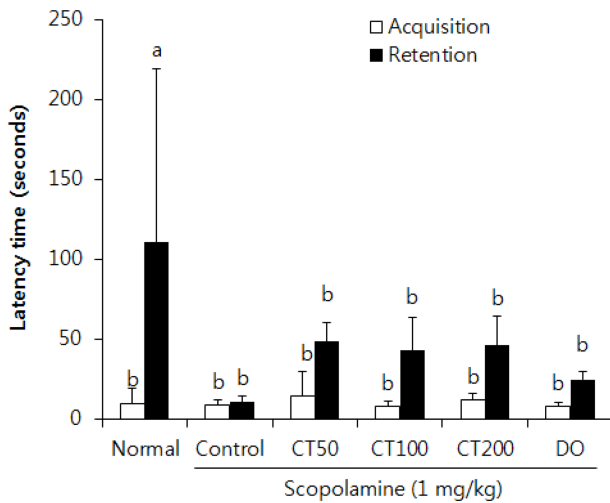


Fig. 2. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on working memory deficit induced by scopolamine in the passive avoidance test. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). Values are means \pm SD. ^{a-b}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

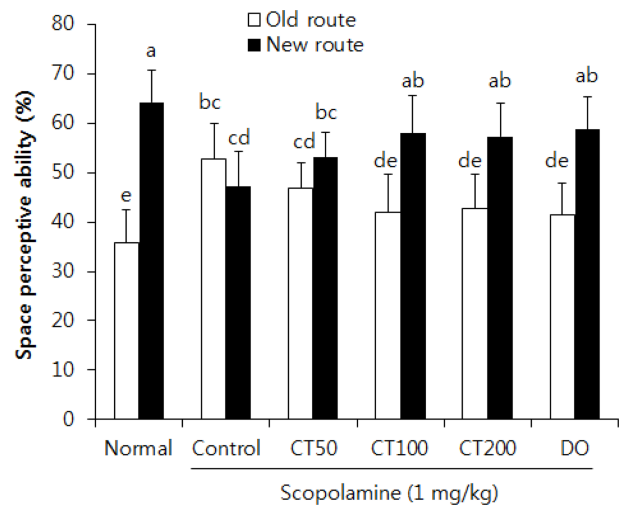


Fig. 3. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on spatial impairment induced by scopolamine in the T-maze test. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). Values are means \pm SD. ^{a-e}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

용하여 도피대가 있던 사분면을 기억하여 도피대를 찾아가는 실험이다 (Morris, 1984).

본 연구에서 3 일간 훈련을 통해 도피대 위치를 인식시킨 뒤, test day에 도피대를 치운 후 도피대가 있던 사분면에 머무는 시간을 측정하였다. 스코폴라민으로 손상을 유도한 control군은 normal군에 비해 유의적으로 도피대가 있던 사분면에 머무는 시간이 감소하였다 (Fig. 4). 반면, 홍화씨 흰민들레 복합물 100 mg/kg, 200 mg/kg 농도 투여군과 donepezil 투여군은 유의적으로 도피대가 있던 사분면에 머무는 시간이 증가하여 학습기억력 개선 효과를 확인하였다.

뇌에서 콜린과 아세틸 CoA는 acetyl-transferase에 의해 아세틸콜린으로 합성되고, 합성된 아세틸콜린은 기억력 및 인지 능력에 중요한 신경전달물질로 작용한다 (Hampel *et al.*, 2018). 반면 치매 환자의 경우, 뇌에서 아세틸콜린에스테라제와 부틸틸콜린에스테라제의 활성 증가 및 아세틸콜린 양의 감소로 기억력 저하가 일어나는 것으로 보고되었다 (Greig *et al.*, 2002; Darvesh *et al.*, 2003). 스코폴라민으로 손상을 유도한 *in vivo* 동물 모델의 뇌에서 아세틸콜린에스테라제와 부틸틸콜린에스테라제 활성 증가를 나타내어 콜린성 기능 장애를 통해 기억력 손상을 나타냄이 보고되었다 (Sun *et al.*, 2019).

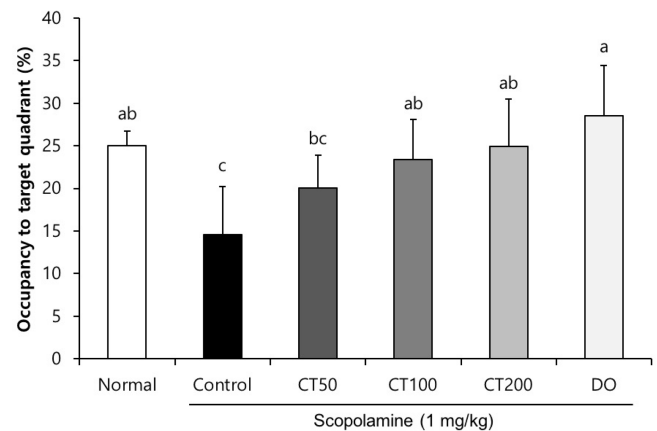


Fig. 4. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on learning and memory impairments induced by scopolamine in the Morris water maze test. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). Values are means \pm SD. ^{a-c}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

뇌 조직에서 아세틸콜린에스테라제와 부틸콜린에스테라제 발현량을 측정된 결과 (Fig. 5), 스코폴라민을 처리한 control 군은 normal군에 비해 이들 단백질 발현이 증가하여 콜린성 기능 장애가 유도됨을 확인하였다. 반면, 홍화씨 흰민들레 복합물 투여군의 경우, 아세틸콜린에스테라제의 활성에는 유의한 차이를 보이지 않았으나 부틸콜린에스테라제 활성은

control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 따라서 홍화씨 흰민들레 복합물 투여군은 부틸콜린에스테라제 활성 감소를 통해 콜린성 기능 장애 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

스코폴라민의 투여는 콜린성 기능 장애 뿐만 아니라, 중추 신경계에 직접적으로 관여하는 BDNF와 CREB 발현 감소에

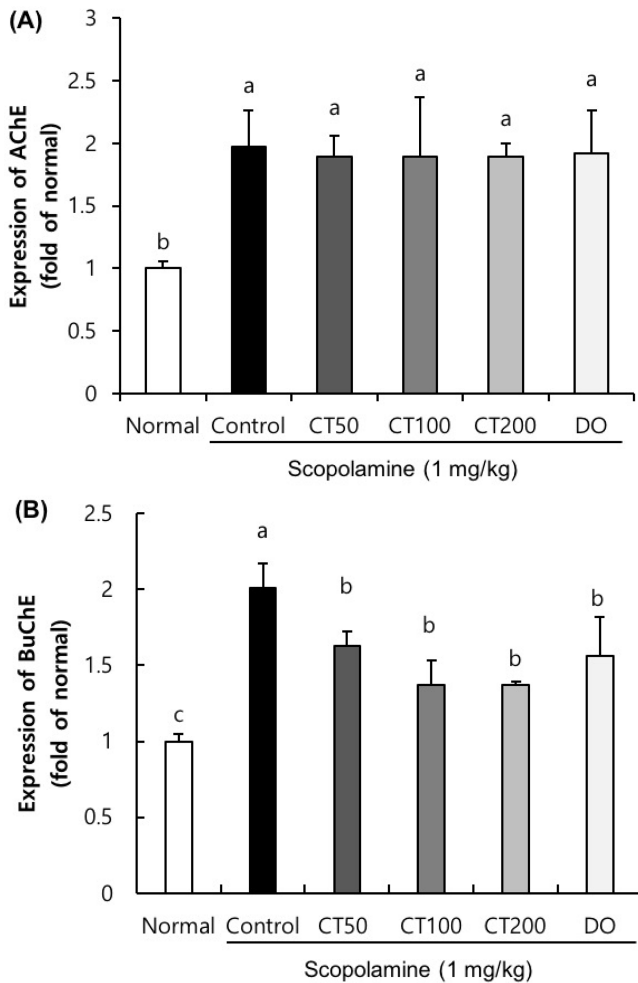


Fig. 5. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on protein expressions of acetylcholinesterase (A) and butyrylcholinesterase (B) in scopolamine-induced mice. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). AChE, acetylcholinesterase; BuChE, butyrylcholinesterase. Values are means \pm SD. ^{a-c}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

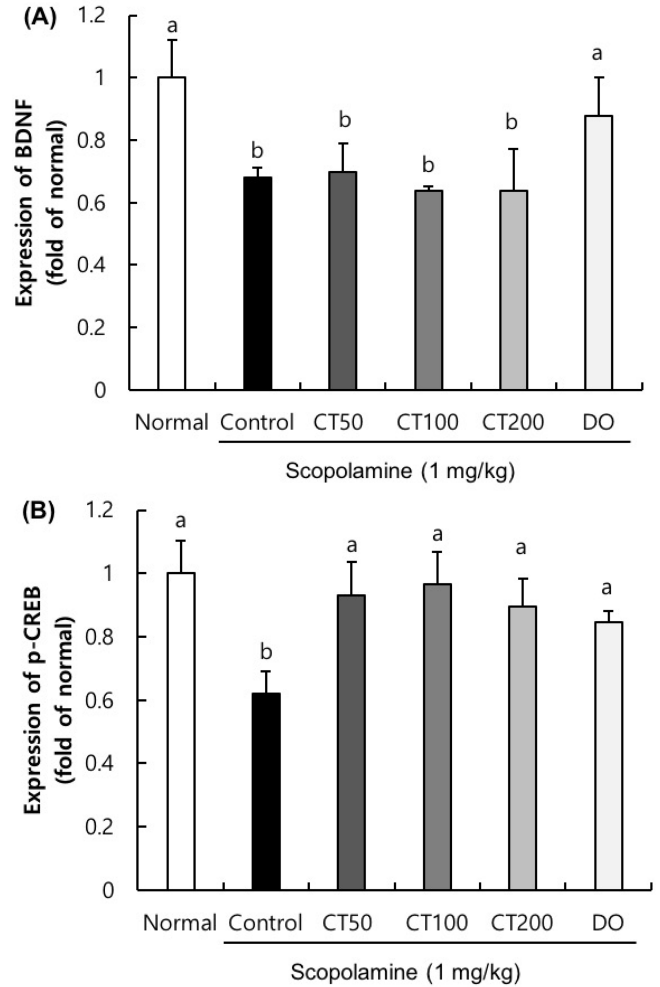


Fig. 6. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on protein expressions of BDNF (A) and p-CREB (B) in scopolamine-induced mice. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). BDNF, brain-derived neurotrophin factor; p-CREB, phospho-cAMP-response element-binding protein. Values are means \pm SD. ^{a-b}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

도 관여하는 것으로 보고되었다 (Lee *et al.*, 2014b). 뇌 조직에서 BDNF와 CREB는 장기기억력 형성에 중요한 역할을 하며, AD 환자의 뇌에서 이들 인자의 발현이 감소됨이 보고되었다 (Lee *et al.*, 2014b; Pláteník *et al.*, 2014).

뇌 조직에서 BDNF와 CREB 단백질 발현을 측정된 결과 (Fig. 6), control군은 normal군에 비해 스코폴라민으로 인해 BDNF 및 CREB 단백질 발현이 유의적으로 감소함을 확인하였다. 홍화씨 흰민들레 복합물 투여군의 경우, BDNF의 활성화는 control군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, p-CREB 단백질 발현을 유의적으로 증가시킴을 확인하였다. 이전 연구에 의하면 CREB의 인산화는 BDNF의 발현을 유도할 뿐만 아니라, 단기기억에서 장기기억으로 변환되는 시냅스 가소성과 뇌 내 칼슘 항상성 조절 등에 관여하며 AD와 같은 신경퇴행성 환자의 경우 뇌에서 CREB의 인산화가 감소됨이 보고되었다 (Saura and Valero, 2011).

Aβ는 39 개에서 43 개의 amino acid peptide로 뇌에서 Aβ plaque의 응집은 대표적인 AD의 조직병리학적 특징으로 알려져 있다 (Hardy and Higgins, 1992). Aβ는 아밀로이드 전구체 단백질로부터 β-, γ-secretase에 의해 분리되어 생성되며, Aβ를 생성하는 이들 기전은 amyloidogenic pathway로 알려져 있다 (Hardy and Higgins, 1992). 또한 스코폴라민으로 기억력 손상을 유도한 동물 모델의 뇌에서 Aβ 단백질 발현 증가로 인해 기억력 손상이 유도됨이 보고되었다 (Bihagi *et al.*, 2012).

본 연구에서 amyloidogenic pathway에 미치는 영향을 확인하기 위해 뇌 조직에서 아밀로이드 전구체 단백질 발현을 측정된 결과, control군은 normal군에 비해 아밀로이드 전구체 단백질 발현이 증가함을 확인하였다. 반면 홍화씨 흰민들레 복합물 100 mg/kg, 200 mg/kg 농도 투여군의 경우 스코폴라민으로 증가한 아밀로이드 전구체 단백질 발현을 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 7). 따라서 홍화씨 흰민들레 복합물 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군은 아밀로이드 전구체 단백질 발현 억제를 통해 Aβ 생성 억제에 관여할 것으로 사료된다.

홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물의 HPLC 분석을 통해 지표성분을 확인한 결과, N-(feruloyl) serotonin (0.405 mg/g)과 chicoric acid (2.297 mg/g)를 지표성분으로 함유함을 확인하였다 (data not shown). 이전 연구에 의하면 N-(feruloyl) serotonin은 Aβ 생성에 관여하는 β-secretase 활성을 억제하는 것으로 보고되었으며, 뇌에서 신경전달물질 역할을 하는 serotonin의 유도체로 작용하여 신경 보호 효능이 있는 것으로 사료된다 (Takahashi and Miyazawa, 2011). Serotonin은 신경세포의 primary cilia length 조절을 통한 인지능 개선 효능이 보고되었으며, 신경세포에서 SIRT-1, SIRT-2, Hsp 70, HO 등의 발현 조절을 통해 Aβ로 인한 신경독성에 대한 신경세포 보호 효과가 보고되었다 (Hu *et al.*, 2017; Hornedo-Ortega

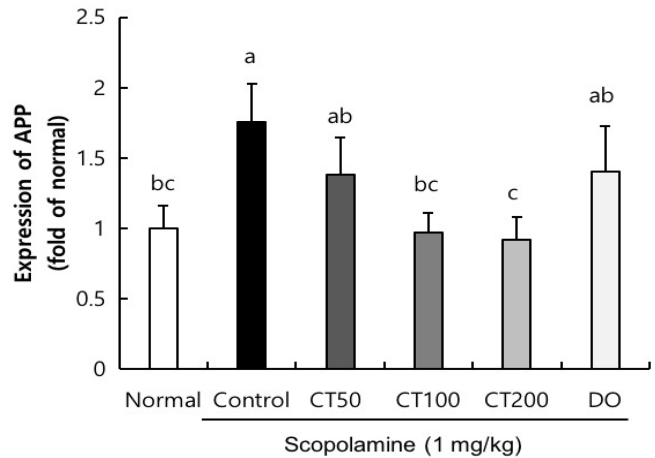


Fig. 7. Effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on protein expressions of amyloid precursor protein in scopolamine-induced mice. Normal; 0.9% NaCl injection + oral administration of water, Control; scopolamine injection + oral administration of water, CT50; scopolamine injection + oral administration of CT (50 mg/kg/day), CT100; scopolamine injection + oral administration of CT (100 mg/kg/day), CT200; scopolamine injection + oral administration of CT (200 mg/kg/day), DO; scopolamine injection + oral administration of donepezil (5 mg/kg/day). APP, amyloid precursor protein. Values are means ± SD. ^{a-c}The letters represent the significant differences among the groups ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

et al., 2018). 또한 폴리페놀류의 일종인 chicoric acid는 기억력 손상이 유도된 동물 모델의 뇌 조직에서 염증성 cytokine 억제를 통한 항염증 활성화, Keap1/Nrf2 pathway 조절을 통한 항산화 활성화, amyloidogenesis 억제 등을 통해 기억력 개선 효능을 나타냄이 보고되었다 (Liu *et al.*, 2017a, 2017b). 따라서 홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물의 기억력 개선 효능은 이들 지표성분의 활성화에 의한 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서 홍화씨 흰민들레 5 : 5 복합물은 부틸릴콜린에스테라제 활성 억제를 통한 콜린성 기능 장애 개선, CREB 인산화를 통한 시냅스 가소성 조절, 아밀로이드 전구체 단백질 발현 억제를 통한 amyloidogenic pathway 억제를 통해 기억력 개선 효과를 나타냄을 확인하였으며, 홍화씨 흰민들레 복합물은 AD 예방 및 치료를 위한 식품 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01312301)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Agostinho P, Cunha RA and Oliveira C.** (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*. 16:2766-2778.
- Bevins RA and Besheer J.** (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols*. 1:1306-1311.
- Bihaqi SW, Singh AP and Tiwari M.** (2012). Supplementation of *Convolvulus pluricaulis* attenuates scopolamine-induced increased tau and amyloid precursor protein(AβPP) expression in rat brain. *Indian Journal of Pharmacology*. 44:593-598.
- Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JBT and Porciúncula LO.** (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behavioural Brain Research*. 214:254-259.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Choi SH, Lee AY, Park CH, Shin YS and Cho EJ.** (2018). Protective effect of *Carthamus tinctorius* L. seed on oxidative stress and cognitive impairment induced by chronic alcohol consumption in mice. *Food Science and Biotechnology*. 27:1475-1484.
- Chon SU.** (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity of different *Taraxacum* species in Korea. *Korean Journal of Crop Science*. 57:51-59.
- Darvesh S, Hopkins DA and Geula C.** (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 4:131-138.
- Deng YH, Wang NN, Zou ZX, Zhang L, Xu KP, Chen AF, Cao DS and Tan GS.** (2017). Multi-target screening and experimental validation of natural products from selaginella plants against Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*. 8:539. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00539/full> (cited by 2020 Feb 20).
- Ebert U and Kirch W.** (1998). Scopolamine model of dementia: Electroencephalogram findings and cognitive performance. *European Journal of Clinical Investigation*. 28:944-949.
- Greig NH, Lahiri DK and Sambamurti K.** (2002). Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*. 14:77-91.
- Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ and Khachaturian ZS.** (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 141:1917-1933.
- Hardy JA and Higgins GA.** (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256:184-185.
- Hornedo-Ortega R, Da Costa G, Cerezo AB, Troncoso AM, Richard T and Garcia-Parrilla MC.** (2018). *In vitro* effects of serotonin, melatonin, and other related indole compounds on amyloid-β kinetics and neuroprotection. *Molecular Nutrition and Food Research*. 62:1700383. <https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700383> (cited by 2020 Jan 10).
- Hu L, Wang B and Zhang Y.** (2017). Serotonin 5-HT6 receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function. *Alzheimer's Research and Therapy*. 9:76. <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0304-4> (cited by 2020 Feb 9).
- Iqbal S, Balasubramanian ARK and Gunasekaran K.** (2016). Efficacy of flavonoids and xanthonoids on Alzheimer's through multiple targeting as evidenced by cross docking. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 3:1-12.
- Khallaf WAI, Messiha BAS, Abo-Youssef AMH and El-Sayed NS.** (2017). Protective effects of telmisartan and tempol on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and amyloidogenesis: Possible role of brain-derived neurotrophic factor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 95:850-860.
- Kim H, Lee HE, Jung IH, Jeon SJ, Zhang J, Kwon YB, Jang DS and Ryu JH.** (2018). The memory ameliorating effects of DHP1402, an herbal mixture, on cholinergic blockade-induced cognitive dysfunction in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 211:38-46.
- Kim JH, He MT, Kim MJ, Yang CY, Shin YS, Yokozawa T, Park CH and Cho EJ.** (2019). Safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seed attenuates memory impairment induced by scopolamine in mice *via* regulation of cholinergic dysfunction and oxidative stress. *Food and Function*. 10:3650-3659.
- Koyama N, Kuribayashi K, Seki T, Kobayashi K, Furuhashi Y, Suzuki K, Arisaka H, Nakano T, Amino Y and Ishii K.** (2006). Serotonin derivatives, major safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4970-4976.
- Kumar A, Singh A and Ekavali.** (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports*. 67:195-203.
- Kwon Y.** (2017). Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*. 95:39-43.
- Lane CA, Hardy J and Schott JM.** (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. 25:59-70.
- LeDoux JE.** (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural Brain Research*. 58:69-79.
- Lee AY, Choi JM, Lee S, Kim HY, Lee S and Cho EJ.** (2013). The protective effects of the ethyl acetate fraction and flavonoids from *Taraxacum coreanum* against oxidative stress in neuronal cells induced by hydrogen peroxide and amyloid beta. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 44:263-268.
- Lee AY, Yamabe N, Kang KS, Kim HY, Lee SH and Cho EJ.** (2014a). Cognition and memory function of *Taraxacum coreanum* in an *in vivo* amyloid-β-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Archives of Biological Sciences*. 66:1357-1366.
- Lee B, Sur BJ, Shim JG, Hahm DH and Lee HJ.** (2014b). Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment *via* activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14:338. <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/>

- 10.1186/1472-6882-14-338 (cited by 2020 Feb 7).
- Lee SH, Choi MJ, Choi JM, Lee SL, Kim HY and Cho EJ.** (2012). Flavonoids from *Taraxacum coreanum* protect from radical-induced oxidative damage. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6:5377-5384.
- Liu Q, Chen Y, Shen C, Xiao Y, Wang Y, Liu Z and Liu X.** (2017a). Chicoric acid supplementation prevents systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis *via* inhibition of NF- κ B. *FASEB Journal*. 31:1494-1507.
- Liu Q, Hu Y, Cao Y, Song G, Liu Z and Liu X.** (2017b). Chicoric acid ameliorates lipopolysaccharide-induced oxidative stress *via* promoting the Keap1/Nrf2 transcriptional signaling pathway in BV-2 microglial cells and mouse brain. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 65:338-347.
- McEntee WJ and Crook TH.** (1991). Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*. 103:143-149.
- Mok SY, Lee SL, Kim HM, Lee JM, Lee DG, Ahn YH, Park CG, Cho EJ and Lee SH.** (2011). Inhibition of rat lens aldose reductase by flavonoids from dandelion. *Natural Product Sciences*. 17:130-134.
- Montgomery KC.** (1952). A test of two explanations of spontaneous alternation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 45:287-293.
- Morris R.** (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 11:47-60.
- Nimrouzi M, Ruyvaran M, Zamani A, Nasiri K and Akbari A.** (2020). Oil and extract of safflower seed improve fructose induced metabolic syndrome through modulating the homeostasis of trace elements, TNF- α and fatty acids metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*. 254:112721. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119331113> (cited by 2019 May 20).
- Park CH, Kim MJ, Yang CY, Yokozawa T and Shin YS.** (2019a). Safflower seed extract synergizes the therapeutic effect of cisplatin and reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in human colorectal carcinoma RKO cells and RKO-transplanted mice. *Drug Discoveries and Therapeutics*. 13:328-334.
- Park EK, Ryu MJ, Kim NK, Bae MH, Seo Y, Kim JH, Yeo SB, Kanwal M, Choi CW, Heo JY and Jeong SY.** (2019b). Synergistic neuroprotective effect of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on neuronal cell death and scopolamine-induced cognitive impairment in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 20:4517. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4517> (cited by 2020 Feb 12).
- Pláteník J, Fišar Z, Buchal R, Jiráček R, Kitzlerová E, Zvěřová M and Raboch J.** (2014). GSK3 β , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 50:83-93.
- Saura CA and Valero J.** (2011). The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Reviews in the Neurosciences*. 22:153-169.
- Seo YM, Choi SJ, Park CK, Gim MC and Shin DH.** (2018). Synergistic effect of Korean red ginseng and *Pueraria montana* var. *lobata* against trimethyltin-induced cognitive impairment. *Food Science and Biotechnology*. 27:1193-1200.
- Sun K, Bai Y, Zhao R, Guo Z, Su X, Li P and Yang P.** (2019). Neuroprotective effects of matrine on scopolamine-induced amnesia *via* inhibition of AChE/BuChE and oxidative stress. *Metabolic Brain Disease*. 34:173-181.
- Takahashi T and Miyazawa M.** (2011). Serotonin derivatives as inhibitors of β -secretase(BACE 1). *Die Pharmazie*. 66:301-305.