

Scopolamine 유발 기억 손상 마우스에서 익모초의 효과

이지혜 · 김혜정 · 장귀영¹ · 서경혜¹ · 김미려² · 최윤희³ · 정지욱*

대구한의대학교 약리학연구소실, 1: 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, 2: 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 3: 원광디지털대학교 한방건강학과

Effect of *Leonurus japonicus* Houtt. on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Jihye Lee, Hye-Jeong Kim, Gwi Yeong Jang¹, Kyung Hye Seo¹, Mi Ryeo Kim², Yun Hee Choi³, Ji Wook Jung*

Department of Pharmacology, Daegu Haany University, 1: Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, 2: Department of Herbal Pharmacology, Daegu Haany University, 3: Department of Oriental Medicine & Healthcare, WonKwang Digital University

Cognitive impairment is symptoms of dementia, a degenerative brain disease that is drawing attention in a rapidly aging society. This study was conducted to investigate the improvement of cognitive function of *Leonurus japonicus* on scopolamine-induced memory impairment in mice and the effect and mechanism of memory recovery. In vivo studies were conducted on mice orally pretreated with *L. japonicus* in doses of 50, 100 and 200 mg/kg (p.o.) and scopolamine (1 mg/kg, i.p.) were injected 30 min before the behavioral task. Antioxidant activity was assessed by 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) assay and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay, and acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity evaluated by Ellman's method. In behavior studies showed that *L. japonicus* has an improved the memory of scopolamine-treated mice in Y-maze, passive avoidance and Morris water maze test. In addition, *L. japonicus* was also exerted free radical scavenging activity and inhibited acetyl cholinesterase activity. These results suggest that *L. japonicus* improves short-term and long-term memory in scopolamine-induced memory decline model and prevents scopolamine-induced memory impairments through in reduced oxidative stress and acetyl cholinesterase inhibition effect. Thus, *L. japonicus* is related to functional medicinal materials for prevention and treatment of human dementia patients.

keywords : Alzheimer's disease, Dementia, *Leonurus japonicas*, Memory, Scopolamine

서 론

현대 사회에서 기억력 및 인지기능 저하는 청소년에서부터 노년에 이르기 까지 중요한 관심대상이 되고 있으며 특히 의료 기술의 발달로 인한 수명연장으로 고령화가 급속도로 진행되면서 치매와 같은 퇴행성 질환 환자가 증가하고 이들에게 기억력 감퇴란 사회생활 여부를 결정짓는 중요한 요소다¹⁾. 치매는 주로 노년기에 많이 발병하며 치매를 유발하는 가장 흔한 질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)으로 초기 증상인 기억력 및 인지기능 저하는 해마 및 대뇌피질과 밀접하게 관련되어 있다²⁾. 이들의 손상으로 인해 발생하는 기억력 및 인지 기능 감퇴는 노화됨에 따라 발병률이 점진적으로 증가하고 전반적인 인지 기능 장애뿐 아니라 언어, 행동 장애 등이 나타나며 개인적으로나 사회적으로 정상적인 생활이 불가능하게 만든다.

세계보건기구에 따르면 2015년 전 세계적으로 4750만명이 AD를 겪고 있고 이 중 65세 이상의 환자 비율은 5년마다 2배가 된다고 밝혔다. AD는 아밀로이드 베타(amyloid beta, Aβ) 단백질이 세포 외 공간에 불용성 물질로 축적되어 형성되는 아밀로이드 플라크의 생성, 미세관을 안정화시키는 기능을 하는 타우 단백질(tau protein)의 과인산화 응집으로 이루어진 신경섬유다발성병변, 콜린성 신경전달 물질의 기능 저하 및 산화적 스트레스(oxidative stress) 등이 제시되어 왔으나 아직까지 명확한 병인이 규명되지 않았다³⁻⁶⁾.

뇌조직에서의 자유라디칼(free radical)에 의한 산화적 스트레스로 인해 활성산소(reactive oxygen species: ROS)가 신경세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산의 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포 자사 또는 괴사를 유도한다^{7,8)}. 신경세포의 손상이 지속되면 AD, 파킨슨병, 암 등과 같은 만성 질환이 발생된다. AD에서 구리, 철, 아연 이온의 과잉이 ROS의 생성을 촉진하

* Corresponding author

Ji Wook Jung, Department of Pharmacology, Daegu Haany University, 285-10, Eobongji-gil, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38578, Republic of Korea

·E-mail : jwjung@dhu.ac.kr ·Tel : +82-53-819-1337

·Received : 2019/11/19 ·Revised : 2020/02/17 ·Accepted : 2020/02/25

© 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.2020.04.34.2.81>

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

고⁹⁾ 산화적 스트레스가 미토콘드리아의 융합 및 분열, DNA의 돌연변이, 미토콘드리아 막의 탈분극 등을 유발한다¹⁰⁾. 특히 뇌는 지질의 함량이 많고, 에너지 요구가 많으며, 항산화제 함량이 적어 산화적 손상에 쉽게 노출되어 있다¹¹⁾.

현재 임상에서 사용되고 있는 약물은 대부분 콜린성 신경전달 기능을 강화시키는 acetylcholinesterase(AChE) 저해제로 미국식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)에 승인된 donepezil, tacrine, glantamine 등이 사용되고 있다¹²⁾. 그러나 모든 환자들이 치료효과를 보이지는 않으며 증상을 일시적으로 개선시킬 수 있으나 소화기계 장애나 간독성 및 심혈관계 등의 부작용과 병의 진행을 더디게 할 뿐 완치 할 수 없으므로 이를 극복할 수 있는 약물 개발에 대한 연구가 필요하다. 이러한 실정으로 예방 및 치료를 위해 부작용이 없고 자연에서 얻을 수 있는 천연 식물의 아세틸콜린저해제에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이며 대표적으로 인삼¹³⁻¹⁵⁾, 은행엽¹⁶⁾, 산사¹⁷⁾, 참당귀¹⁸⁾, 울피¹⁹⁾ 등 다양한 연구가 진행되고 있다.

인지기능 장애 유발에 주로 사용되는 무스카린성 콜린 수용체(muscarinic cholinergic receptor) 길항제인 scopolamine은 인지기능 및 항건망 효과를 검증하고자 하는 콜린성 기억력감퇴 동물 모델에 주로 이용되고 있는 약물로^{20,21)} 많은 연구에서 신경전달 물질인 아세틸콜린과 무스카린 수용체 간의 결합을 저해하여 일시적인 정보전달을 차단시킴으로써 인지기능을 손상시키고 dopamine 산화를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 동물모델에서의 기억력 개선 효과를 확인하고자 scopolamine으로 유도한 인지기능 손상 mouse 모델을 사용하였다.

익모초(益母草, *Leonurus japonicus* Houtt)²²⁾는 꿀풀과에 속하는 두해살이풀로 꽃이 피기 전 또는 꽃이 필 때 채취한 지상부로 특유한 냄새가 있으며 성질은 약간 서늘하며 맛은 쓰고 수렴성이 있으며 한국, 일본, 중국에 분포한다. 부인병에 많이 사용하는 대표적인 약재로 활혈조경(活血調經), 이뇨(利尿), 자궁수축(子宮收縮), 지혈, 강심 등의 효과로 고혈압, 신경쇠약, 월경과다, 생리통, 생리불순, 산후복통 등에 사용한다. 익모초의 지방간 감소 효과²³⁾, 항박테리아 효과²⁴⁾ 등에 대한 보고가 되었고, 성분은 280개 이상이 밝혀졌는데 대부분이 monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids, steroids, alkaloids, flavonoids와 phenylpropanoids이지만²⁵⁾ 생리활성에 대한 보고는 diterpenoids의 acetylcholinesterase 억제 효과²⁶⁾, alkaloid의 혈관생성 효과²⁷⁾가 보고 되었을 뿐 익모초 정유의 기억력 및 인지기능 개선에 대한 보고가 된 바가 없어 본 연구에서는 in vivo에서 그 효과를 확인하고자 수행하였다.

본 연구에서는 익모초 정유의 항산화 효과를 평가하고 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 모델을 이용하여 Y-미로 시험, 수동 회피 시험, 수중 미로 시험을 수행하였으며 AChE의 억제능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

4주령 수컷 ICR mouse를 대한바이오텍(Chungbuk, Korea)로부터 공급받아 1주일 동안 순화 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이와 물은 자유 섭취시켰으며 사육실 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 07:00-19:00(12시간 주기)로 환경을 유지하였다. 순화기를 거친 실험동물에게 시료인 익모초 또는 양성 대조군인 donepezil을 단회 경구 투여하고 30분 뒤 scopolamine 1 mg/kg를 복강 투여하여 실험동물의 기억을 손상시키고 30분 뒤 행동 실험을 진행하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행하였다(승인번호:DHU2019-044).

2) 익모초 정유

연구에 사용된 *L. japonicus*은 국내에서 생산된 것을 한국생약협회(Seoul, Korea)를 통해 검증 후 구입하여 사용하였다. *L. japonicus* 500 g에 hexane 5 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 침출시켰으며, 추출액은 여과지(Advantec No.2)로 여과하여 여액을 회수하고 걸러진 추재에 다시 동량의 용매를 가하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거하고 -20°C 에 보관하여 실험에 사용하였다(수득율:2.11%).

2. 실험방법

1) Solid-phase microextraction-gas chromatograph-mass spectrometry(SPME-GC-MS)를 이용한 향기 성분 분석

익모초 추출물의 향기성분 분석은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry, GCMS-QP2020, Shimadzu Co., Japan)를 이용하였으며, 시료로부터 휘발성 성분의 추출은 SPME(Solid phase microextraction, AOC-6000, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다. SPME는 65 μm -PDMS/DVB(Polydimethylsiloxane/divinylbenzene) fiber를 이용하여 60°C 에서 10분 동안 추출, 흡착하였다. GC-MS 분석은 HP-5MS 컬럼 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm , Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 80°C 에서 5분 동안 유지하고 240°C 까지 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 으로 승온 후 34분 동안 유지하였다. 정유 성분의 동정은 NIST 14 mass spectral library를 이용하였다.

2) DPPH radical 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 화학적으로 안정화된 자유 라디칼인 짙은 보라색의 DPPH를 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 각 시료를 증류수에 녹인 후 0.2 mM DPPH 용액과 100 μL 씩 동량으로 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성}(\%) = 100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100]$$

3) ABTS radical 소거능 측정

2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 라디칼 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와 반응시켜 짙은

청록색의 안정화된 ABTS 자유 라디칼을 생성하여 항산화 물질에 의해 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1(v:v)로 혼합하여 냉암소에서 12~16시간 반응시켜 ABTS+를 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도를 0.7 ± 0.03 으로 에탄올로 희석한 ABTS 기질 용액을 사용하였다. 각 시료를 증류수에 녹인 후 ABTS+ 용액과 100 μ L씩 동량으로 혼합하여 암실에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS 라디칼 소거활성(%) = $100 - [(시료\ 첨가구의\ 흡광도 / 무첨가구의\ 흡광도) \times 100]$

4) Y-미로(Y-maze) 시험

단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위한 방법으로 Y-maze test 실시하였다. 측정 장비는 세 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접히는 각도는 120°이다. 이 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있고, 세 개의 가지를 각각 A, B, C로 정한 뒤에 실험을 진행하였다. 실험동물을 넣고 8분 동안 각 가지에 실험동물의 꼬리까지 가지에 들어갈 때의 횡수와, 각 가지에 차례로 들어간 경우를 헤아려 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 세 가지 모두에 겹치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

변경 행동력(Spontaneous alteration, %) = $실제변경(actual\ alternation) / 최고변경(maximum\ alternation) \times 100$ (최고변경: 총 입장횟수-2)

5) 수동 회피(passive avoidance) 시험

해마의 조건화된 기억과 변연계와 관련 있는 기억에 관한 영향 및 working memory ability를 평가하기 위해 회피학습상자(JEING DO BIO&PLANT CO., LTD., Seoul, Korea)를 이용하여 실험을 하였다. 수동회피 상자는 어두운 방과 밝은 방으로 나누어져 있으며, 밝은 방에 실험동물을 넣으면 어두운 방으로 넘어가는데 그 순간 5초간 0.5 mA의 전기충격을 가한다. 전기충격을 가한 다음 날 실험동물을 밝은 방에 다시 넣었을 때 어두운 방에서의 전기충격을 기억하여 밝은 방에 머무르게 되는데, 이때 체류하는 시간(step-through latency)을 측정하여 기억력을 평가하였다.

6) 모리스 수중 미로(Morris water maze) 시험

해마 의존적 공간학습 및 장기 기억력 개선에 대한 실험으로 원형으로 된 지름 90 cm, 높이 45 cm의 수조의 사분면 한 구역에 지름 9 cm, 높이 25 cm의 도피대를 설치하고 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 깨끗한 물을 도피대 보다 1 cm 정도 위로 채운 뒤 실험 동물이 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간을 측정하였다. 원형 수조에서 4개의 표지판을 설치하여 4분면으로 나누어 입수하는 위치를 다르게 하여 하루 4번씩 반복하여 60초간 진행하였으며 실험 동물이 60초 안에 도피대를 찾으면 실험을 완료하였고 찾지 못한 경우 손으로 위치를 안내해주어 10초간 머무르게 하였다. 실험 마지막 날 도피대를 제거하고 학습능력을 측정하기 위해 60초간 도피대가 있었던 구역에

머무르는 시간을 측정하였고 모든 실험은 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

7) Acetylcholinesterase 활성 시험

AChE 활성 억제능을 확인하기 위해서 Ellman GL²⁸⁾ 등의 방법인 acetylthiocholine iodide(ASCh)를 기질로 사용한 비색분석법으로 실험하였다. 실험에 사용하지 않은 실험 동물을 경추 탈골 후 전체 뇌를 적출하여 차가운 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 8.0)를 이용하여 균질화하고, 12,500 rpm, 20분간 원심 분리 후 얻은 상층액을 이용하여 AChE 활성을 측정하는데 효소로 사용하였다. 시료와 양성 대조군으로 사용한 donepezil(Sigma-aldrich, USA)을 단계별 희석하여 사용하였다. Sodium phosphate buffer 134 μ L, 75 mM ASCh 1 μ L, 10 mM Ellman's 용액(5,5'-dithiobis- 2-nitrobenzoic acid) 5 μ L, 시료 또는 donepezil을 50 μ L 넣고 25°C에서 10분간 반응 후 효소원 10 μ L를 넣고 25°C에서 5분간 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 효소를 첨가하지 않고 sodium phosphate buffer를 첨가한 반응액을 사용하였고, ASCh를 첨가하지 않은 반응액으로 시료와 효소 활성용 시약간의 비특이적 반응이 일어나지 않았음을 확인하였다. 시료를 첨가하지 않은 반응액의 AChE의 활성도를 100%로 하였을 때 각 시료를 첨가한 반응액의 AChE 활성 저해도를 그래프로 나타내었다.

8) 통계 처리

본 연구의 모든 실험 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 산출하였다. 그룹 간 유의성 검정은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)를 실시하고 Newman-Keuls test에 의해 유의수준 $p < 0.05$ 이상에서 사후 검정을 실시하였다. 모든 결과는 mean \pm standard error of mean(SEM)으로 표시하였다.

결 과

1. SPME-GC-MS를 이용한 익모초 정유의 향기성분 분석

익모초 정유의 휘발성 성분을 GC-MS로 분석한 결과 주요 향기 성분은 caryophyllene, caryophyllene oxide 및 hexadecanoic acid 등으로 추정된다.

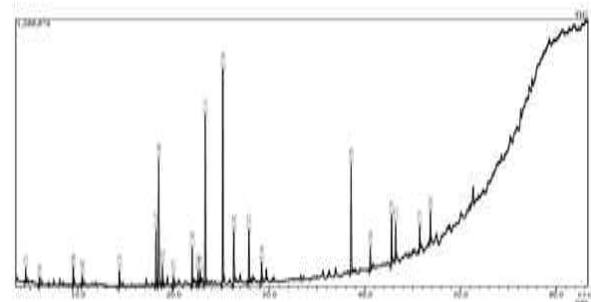


Fig. 1. GC-MS chromatogram (total ion current) of hexane extract from *L. japonicus*.

2. 익모초 정유의 항산화 활성

익모초 정유의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 및 10000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $2.6 \pm 0.2\%$, $6.6 \pm 0.3\%$, $13.2 \pm 0.3\%$, $27.1 \pm 0.7\%$, $43.4 \pm 0.9\%$ 및 $64.6 \pm 0.3\%$ 로 나타났고 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 100 $\mu\text{g/mL}$ 은 $97.9 \pm 0.1\%$ 로 나타났다(Fig. 2A). 또한 익모초 정유의 ABTS radical 소거능을 측정된 결과 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 및 10000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $5.6 \pm 0.9\%$, $10.2 \pm 0.1\%$, $18.1 \pm 0.5\%$, $30.7 \pm 1.1\%$, $38.9 \pm 3.1\%$ 및 $54.9 \pm 8.3\%$ 로 나타났고 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 100 $\mu\text{g/mL}$ 은 $99.0 \pm 0.1\%$ 로 나타났다(Fig. 2B).

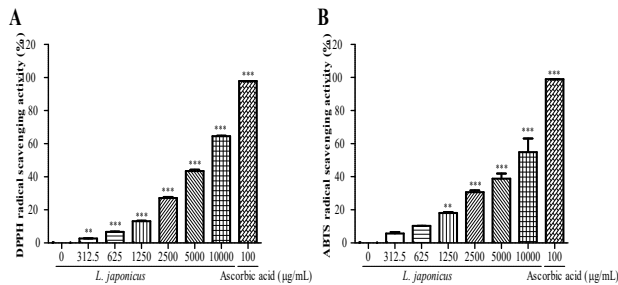


Fig. 2. Antioxidant activity of *L. japonicus*. A: DPPH radical scavenging activity. B: ABTS radical scavenging activity. Each value represents mean \pm SEM of triplicate measurements. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as compared with the blank group.

3. 익모초 정유의 Y-미로 시험에서의 효과

정상군인 NOR군의 변경 행동력은 $69.8 \pm 1.2\%$ 인 반면 scopolamine 투여한 CON군의 변경 행동력은 $49.1 \pm 2.3\%$ 로 감소하였다. 익모초 정유 50, 100 및 200 mg/kg 투여 후 scopolamine을 투여한 실험군에서는 $52.8 \pm 1.2\%$, $55.2 \pm 0.9\%$, $59.5 \pm 0.8\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 donepezil 투여군은 $66.9 \pm 0.5\%$ 로 나타났다(Fig. 3A). 또한, 모든 실험군에서 각 가지에 입장한 총 횟수가 군간 차이가 없었다(Fig. 3B).

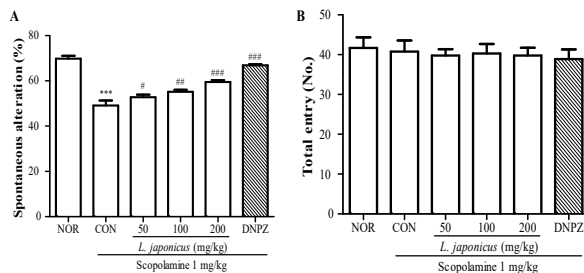


Fig. 3. Effect of *L. japonicus* on Y-maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were treated with *L. japonicus* 1 h before the test. A: spontaneous alteration %, B: total entry (No.). Data represent means \pm SEM (n=9). *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared with the CON group.

4. 익모초 정유의 수동 회피 시험에서의 효과

정상군인 NOR군의 밝은 방에 머무른 시간이 277.5 ± 13.9 초인

반면 scopolamine 투여한 CON군의 머무른 시간이 83.0 ± 4.2 초로 감소하였다. 익모초 정유 50, 100 및 200 mg/kg 투여 후 scopolamine을 투여한 실험군에서는 115.5 ± 7.5 초, 194.9 ± 5.7 초, 260.4 ± 10.4 초로 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 donepezil 투여군은 264.1 ± 12.1 초로 나타났다(Fig. 4).

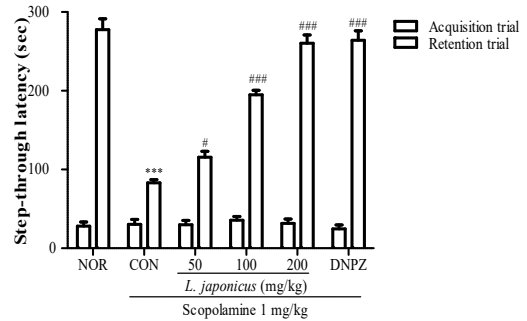


Fig. 4. Effect of *L. japonicus* on the passive avoidance test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. *L. japonicus* were orally administered 1 h before the acquisition trial. Latency time was measured and the values shown the mean \pm S.E.M (n=8). *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the CON group.

5. 익모초 정유의 수중 미로 시험에서의 효과

정상군인 NOR군이 실험이 진행됨에 따라 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간인 탈출 시간이 감소되는 것에 반하여 scopolamine 투여한 CON군의 탈출 시간은 변화가 없었다. 익모초 정유 200 mg/kg를 투여한 실험군은 실험이 진행됨에 따라 감소하였고, 양성대조군으로 사용한 donepezil 투여군 역시 실험이 진행됨에 따라 감소하였다(Fig. 5A). 도피대를 제거하고 수행한 probe test에서 NOR군은 도피대가 있었던 구역에서 머무른 시간이 17.9 ± 0.9 초인 반면 CON군은 14.0 ± 0.7 초로 감소하였고, 익모초 200 mg/kg 투여군에서 17.1 ± 0.9 초로 증가하였으며 donepezil 투여군에서도 17.2 ± 0.9 초로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5B).

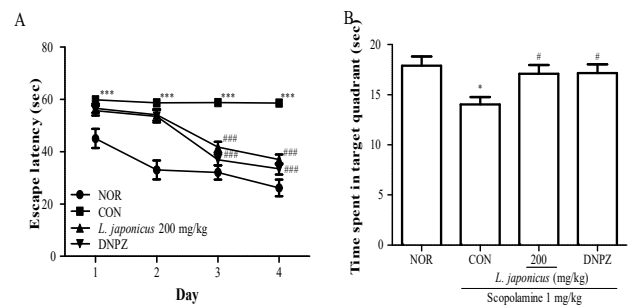


Fig. 5. Effect of *L. japonicus* on the Morris water maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were orally administered with *L. japonicus* 1 h before the training trial sessions. A: escape latency, B: exploration time in target quadrant. The values shown the mean \pm S.E.M (n=11-12). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the CON group.

6. 익모초 정유의 AChE 억제 효과

익모초 정유의 AChE를 억제하는 IC50값이 1.753 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 고, 양성대조군인 donepezil의 IC50값이 0.146 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

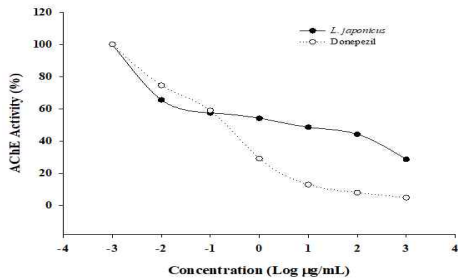


Fig. 6. Effects of *L. japonicus* on the AChE activity. AChE activity was normalized to control measurement. The data were made using GraphPad Prism. N=3 treatment replicates; three technical replicates were performed for each sample.

고찰

AD는 치매의 대부분을 차지하고 있는 퇴행성 뇌 질환으로 적절한 시기에 증상에 맞는 치료가 이루어진다면 환자 삶의 질이나 경제적, 사회적 부담을 경감시킬 수 있지만 현재 이를 완치시킬 수 있는 결정적 방법은 없으며 FDA에 승인된 약물들도 매우 제한적인 약효와 다양한 부작용을 가지고 있어 장기적인 치료 및 완치시킬 수 있는 효과적인 천연물을 활용한 신약 개발이 주목되고 있다. 많은 연구진이 전통의학에서 천연물에 대한 지식을 토대로 연구를 진행하고 있으며 본 연구에서는 천연 약용 자원 중 익모초 정유에서 caryophyllene, caryophyllene oxide, hexadecanoic acid 등을 추정하였고 이 성분은 허혈성 뇌질환 보호²⁹⁾, 항우울³⁰⁾, 기억 개선³¹⁾, 결장암 보호³²⁾, 에탄올 섭취 감소³³⁾ 등에 대한 효과가 보고되어 이를 포함하는 익모초 정유가 기억력 및 인지능력을 개선시킬 것이라 생각되었기에 scopolamine에 의한 기억력 감퇴에 미치는 영향 및 항산화와 AChE 억제 효과에 대해 조사하였다.

생체 내의 대사과정에서 발생하는 활성 산소종은 퇴행성 뇌 질환뿐만 아니라 염증, 암 등 다양한 질병의 원인 중 하나로 산화적 스트레스를 유발시켜 노화와 관련하여 체내 환경을 변화시키고 신경세포 및 단백질, 핵산의 변성을 유발한다. 익모초 정유의 항산화 활성 측정을 위해 대표적인 방법인 DPPH와 ABTS를 이용해 radical 소거능을 확인한 결과 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 비교하여 낮은 활성을 보였으나 익모초 정유의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 결과를 나타내어 항산화 효과로 산화적 스트레스를 개선할 것으로 확인되었다. 최근 라임³⁴⁾, 가시여지³⁵⁾, 셀러리³⁶⁾, 백합나무³⁷⁾ 등 많은 정유에서 항산화 효과를 비롯한 생리활성의 효과가 규명되고 있으나 국내 자생 식물의 정유에 대한 연구는 미비하고 익모초 정유가 다른 정유에 비하여 항산화 활성이 낮은 수준이지만 이는 자생 지역, 수확 시기, 추출 조건 등에 따른 차이로 생각된다.

기억력 및 인지 기능 개선을 평가하기 위하여 수행한 Y-미로 시험은 단기 기억을 평가하는 방법으로 자발적 변경 행동력으로 공간 작업 기억을 측정하는 결과 NOR군에 비하여 CON군에서 변경 행

동력이 감소되어 기억 손상 모델이 잘 확립된 것을 확인할 수 있었고, 익모초 정유 투여로 인하여 변경 행동력이 증가되어 기억력이 개선 되는 것을 확인할 수 있었으며 익모초 200 mg/kg에서 DNPZ군과 비슷한 수준으로 나타나는 것을 확인하였다. 이는 각 가지에 들어간 총 입장 횟수가 군간 유의한 차이가 없어 약물이 동물의 locomotor에 영향을 미치지 않고 인지 및 기억력을 개선시키는 것을 알 수 있었다. 또한 공포 자극으로 유도된 장기 기억을 수동 회피 시험을 통하여 측정하여 NOR군과 비교하여 CON군에서 체류 잠복기가 유의하게 감소하여 기억 손상 모델이 잘 확립된 것을 확인하였고, 익모초 정유 투여로 인하여 체류 잠복기가 증가되어 기억력이 농도 의존적으로 개선되는 것을 확인하였다. 이는 학습 기간에 진행된 체류 잠복기에서는 차이가 없어 약물이 환경에 영향을 미치지 않고 인지 및 기억력을 개선시키는 것을 알 수 있었다. 모리스 수중 미로 시험을 통해 공간 학습 및 장기 기억 개선 효과를 확인한 결과 모든 실험군이 학습을 진행할수록 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간이 감소하였으나 CON군에서는 그 시간이 첫날과 비슷한 수준으로 기억 손상 모델이 잘 작성되었고 익모초 정유 투여로 인한 기억 개선 효과 할 수 있었다. 실험 마지막 날 진행된 probe test에서 NOR군에 비하여 CON군이 도피대가 있었던 구역에서 머무른 시간이 감소하는 것으로 공간 지각력이 손상 받은 것을 확인할 수 있었고, 익모초 정유 투여군이 이를 개선시키는 것으로 확인할 수 있었다.

기억과 관련하여 cholinergic 신경계와 밀접하게 연관되어 있는데 AD에서는 cholinergic neuron의 소실, acetylcholine(ACh)이 부족으로 인하여 인지 및 기억력 장애가 야기된다. 따라서 임상에서는 ACh를 분해하는 AChE를 억제함으로써 ACh의 농도를 증가시켜 신경 전달을 회복시킴으로써 AD의 증상을 개선, 진행을 늦추고 있는 donepezil을 비롯한 약물들을 주로 사용하고 있다. Scopolamine은 비선택적 muscarinic acetylcholine receptor로 기억력 손상을 일으켜 이 모델에서 효과있는 약물이 AChE를 조절하는 효능을 나타내는데 ex vivo 실험을 통하여 익모초 정유 역시 AChE의 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 익모초의 지상부는 식품공전에 식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료에 포함되어있고 사용조건이 정해져 있지 않는 원료로 기존 AChE 약물과 비교하여 임상 적용하기에 안전할 것으로 판단된다.

이상의 결과로 보아 익모초 정유에는 항산화 효과와 AChE의 억제를 통하여 기억 및 인지 기능을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 익모초 정유는 AD의 예방 및 치료와 관련한 건강 기능 식품 또는 의약 원료 등 기능성 소재로 응용 가능성이 있는 소재로 사료된다.

결론

익모초 정유의 향기 성분을 분석하고, 항산화 효과 및 경구 투여가 scopolamine으로 유도한 기억력 및 인지 기능 감퇴 마우스 모델에서의 행동 변화, 뇌내 AChE 억제 효과에 미치는 영향에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

SPME-GC-MS를 측정하는 결과 향기 성분으로 caryophyllene,

caryophyllene oxide 및 hexadecanoic acid 등의 성분을 확인하였다.

익모초 정유의 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

익모초 정유가 Y-미로 시험에서 동물의 행동량 변화 없이 농도 의존적으로 자발적 변경 행동력이 증가하여 단기 기억을 개선시키는 것을 확인하였다.

익모초 정유가 수동 회피 시험에서 환경에 따른 영향 없이 농도 의존적으로 체류 잠복기가 증가하여 장기 기억을 개선시키는 것을 확인하였다.

익모초 정유가 수중 미로 시험에서 탈출 잠복기가 감소하였고 probe test에서 도파대가 있었던 구역에 머무른 시간이 증가하여 공간 학습 및 장기 기억을 개선시키는 것을 확인하였다.

익모초 정유의 AChE 억제 효과를 측정한 결과 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 토대로 익모초 정유가 scopolamine으로 유도한 기억력 및 인지 기능 감퇴 마우스 모델에서 항건망 효과가 있다고 생각되며 이러한 작용은 항산화 및 AChE 억제에 의한 것이라 생각된다. 따라서 익모초 정유가 알츠하이머 질환 치료 및 예방을 위한 기능성 소재로 응용 가능 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01389502)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

1. Park KY. The Effectiveness of Interventions for Individuals with Dementia: A Qualitative Meta-analysis. *The Journal of Occupational Therapy for the Aged and Dementia*. 2009;3(2):23-32.
2. Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev*. 2008;13(2):85-115.
3. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurorx*. 2004;1(2):213-25.
4. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003;2(10):605-13.
5. Karlawish J, Jack CR, Jr., Rocca WA, Snyder HM, Carrillo MC. Alzheimer's disease: The next frontier-Special Report 2017. *Alzheimers Dement*. 2017;13(4):374-80.
6. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol*. 2007;64(3):343-9.
7. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, et al. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):648-61.
8. Sung NY, Song H, Ahn DH, Yoo YC, Byun EB, Jang BS, et al. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Shell Ethanol Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016;45(7):958-65.
9. Lavado LK, Zhang MH, Patel K, Khan S, Patel UK. Biomarkers as Potential Predictors of the Neurodegenerative Decline in Alzheimer's Disease. *Cureus*. 2019;11(9):e5573.
10. Tabassum R, Jeong NY. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases. *Int J Med Sci*. 2019;16(10):1386-96.
11. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;360(1):201-5.
12. Kabir MT, Uddin MS, Begum MM, Thangapandian S, Rahman MS, Aleya L, et al. Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer Disease: Multitargeting Strategy based on Anti-Alzheimer's Drugs Repositioning. *Curr Pharm Des*. 2019; 25(33):3519-35.
13. Ryu S, Jeon H, Kim HY, Koo S, Kim S. Korean red ginseng promotes hippocampal neurogenesis in mice. *Neural Regen Res*. 2020;15(5):887-93.
14. Chen J, Li M, Qu D, Sun Y. Neuroprotective Effects of Red Ginseng Saponins in Scopolamine-Treated Rats and Activity Screening Based on Pharmacokinetics. *Molecules*. 2019;24(11):2136.
15. Yang Q, Lin J, Zhang H, Liu Y, Kan M, Xiu Z, et al. Ginsenoside Compound K Regulates Amyloid beta via the Nrf2/Keap1 Signaling Pathway in Mice with Scopolamine Hydrobromide-Induced Memory Impairments. *J Mol Neurosci*. 2019;67(1):62-71.
16. Singh SK, Srivastav S, Castellani RJ, Plascencia-Villa G, Perry G. Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*. 2019;16(3):666-74.
17. Lee J, Cho E, Kwon H, Jeon J, Jung CJ, Moon M, et al. The fruit of *Crataegus pinnatifida* ameliorates memory deficits in beta-amyloid protein-induced Alzheimer's disease mouse model. *J Ethnopharmacol*. 2019;243:112107.
18. Park SJ, Jung JM, Lee HE, Lee YW, Kim DH, Kim JM, et al. The memory ameliorating effects of INM-176, an ethanolic extract of *Angelica gigas*, against scopolamine-

- or Abeta(1-42)-induced cognitive dysfunction in mice. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2):611-20.
19. Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Choi SJ, et al. Antiamnesic effects of ethyl acetate fraction from chestnut (*Castanea crenata* var. *dulcis*) inner skin on Abeta(25-35)-induced cognitive deficits in mice. *J Med Food.* 2012;15(12):1051-6.
 20. Shabani S, Mirshekar MA. Diosmin is neuroprotective in a rat model of scopolamine-induced cognitive impairment. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1376-83.
 21. Ko YH, Kwon SH, Ma SX, Seo JY, Lee BR, Kim K, et al. The memory-enhancing effects of 7,8,4'-trihydroxyisoflavone, a major metabolite of daidzein, are associated with activation of the cholinergic system and BDNF signaling pathway in mice. *Brain Res Bull.* 2018;142:197-206.
 22. Shang X, Pan H, Wang X, He H, Li M. *Leonurus japonicus* Houtt.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol.* 2014;152(1):14-32.
 23. Lee MR, Park KI, Ma JY. *Leonurus japonicus* Houtt Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Free Fatty Acid-Induced HepG2 Cells and Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients.* 2017;10(1):20.
 24. Xiong L, Peng C, Zhou QM, Wan F, Xie XF, Guo L, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules.* 2013;18(1):963-73.
 25. Miao LL, Zhou QM, Peng C, Liu ZH, Xiong L. *Leonurus japonicus* (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: A comprehensive overview. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109060.
 26. Wu HK, Sun T, Zhao F, Zhang LP, Li G, Zhang J. New diterpenoids isolated from *Leonurus japonicus* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Chin J Nat Med.* 2017;15(11):860-4.
 27. He YL, Shi JY, Peng C, Hu LJ, Liu J, Zhou QM, et al. Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. *Fitoterapia.* 2018;128:36-42.
 28. Ilman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
 29. Tian X, Liu H, Xiang F, Xu L, Dong Z. beta-Caryophyllene protects against ischemic stroke by promoting polarization of microglia toward M2 phenotype via the TLR4 pathway. *Life Sci.* 2019;237:116915.
 30. de Oliveira DR, da Silva DM, Florentino IF, de Brito AF, Fajemiroye JO, da Silva DPB, et al. Monoamine Involvement in the Antidepressant-Like Effect of beta-Caryophyllene. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018;17(4):309-20.
 31. Lindsey LP, Daphney CM, Oppong-Damoah A, Uchakin PN, Abney SE, Uchakina ON, et al. The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, improves working memory and reduces circulating levels of specific proinflammatory cytokines in aged male mice. *Behav Brain Res.* 2019;372:112012.
 32. Ambroz M, Smatova M, Sadibolova M, Pospisilova E, Hadravská P, Kasparova M, et al. Sesquiterpenes alpha-humulene and beta-caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharm.* 2019;69(1):121-8.
 33. Oppong-Damoah A, Blough BE, Makriyannis A, Murnane KS. The sesquiterpene beta-caryophyllene oxide attenuates ethanol drinking and place conditioning in mice. *Heliyon.* 2019;5(6):e01915.
 34. Lin LY, Chuang CH, Chen HC, Yang KM. Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) Essential Oils: Volatile Compounds, Antioxidant Capacity, and Hypolipidemic Effect. *Foods.* 2019;8(9):398.
 35. Gyasi JN, Opoku R, Borquaye LS. Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Leaves and Fruit Pulp of *Annona muricata* L. (Soursop) from Ghana. *Biochem Res Int.* 2019;2019:4164576.
 36. Das S, Singh VK, Dwivedy AK, Chaudhari AK, Upadhyay N, Singh A, et al. Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. *Pestic Biochem Physiol.* 2019;160:102-11.
 37. Quassinti L, Maggi F, Ortolani F, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, et al. Exploring new applications of tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.): leaf essential oil as apoptotic agent for human glioblastoma. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(29):30485-97.