

면화자 정유의 기억력 손상 완화 효과

이지혜^{1#}, 정은미¹, 이은홍¹, 장귀영², 서경혜², 김미려³, 정지욱^{1*}

1 : 대구한의대학교 바이오산업대학 바이오산업융합학부, 2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부
3 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Gossypii Semen oil alleviates memory dysfunction in scopolamine-treated mice

Jihye Lee^{1#}, Eun Mi Jung¹, Eunhong Lee¹, Gwi Yeong Jang², Kyung Hye Seo²
Mi Ryeo Kim³, Ji Wook Jung^{1*}

1 : Division of Bio-technology and Convergence, College of Herbal Bio-Industry, Daegu Haany University,
2 : Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA,
3 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : *Gossypium arboreum* (cotton) is traditionally used to treat various health disorders. However, anti-amnesic effect of *G. arboreum* has not been reported. The objective of this study was to investigate in-vivo the anti-amnesic effects along with in vitro antioxidant and acetylcholinesterase (AChE) inhibition potential in *G. arboreum* seed essential oil.

Methods : The essential oil of *G. arboreum* obtained by solid phase microextraction (SPME) techniques were identified by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay were performed to determine the antioxidant activity at various concentrations (312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Y-maze, passive avoidance and Morris water maze tests were carried out to evaluate improved effect on scopolamine (1 mg/kg)-induced memory dysfunction at the dose level of 50, 100 and 200 mg/kg. Donepezil (5 mg/kg) was used as a positive drug control. We performed acetylcholinesterase (AChE) activity assay in ex vivo.

Results : Five volatile compounds were identified in *G. arboreum*. The assays of DPPH and ABTS revealed that *G. arboreum* increased antioxidant activity in a dose-dependent manner. *G. arboreum* ameliorated the percent of spontaneous alternation in the Y-maze test, shortened step-through latency in the passive avoidance test, and increased swimming time in the target zone in the Morris water maze test. In addition, *G. arboreum* inhibited the AChE activity.

Conclusions : Based on these findings, *G. arboreum* may aid in the prevention and treatment of learning and memory-deficit disorders through antioxidant and AChE inhibitory activities.

Key words : Scopolamine, Memory, Essential oil, Cotton seed, Gossypii Semen

I. 서 론

치매는 세계보건기구에 따르면 전 세계적으로 약 5천만 명이
치매를 겪고 있고 매년 1천만 명씩 증가하여 그 수가 2030년

*Corresponding author : Ji Wook Jung, Division of Bio-technology and Convergence, College of Herbal Bio-Industry, Daegu Haany University.

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

#First author : Jihye Lee, Division of Bio-technology and Convergence, College of Herbal Bio-Industry, Daegu Haany University.

· E-mail : lghlovely@naver.com

· Received : 01 Feb 2021

· Revised : 16 Feb 2021

· Accepted : 25 Mar 2021

에는 8천2백만 명에 도달할 것이라고 예상한다. 치매의 약 60 ~ 70%가 알츠하이머 병으로 뇌졸중 같은 뇌 손상이나 질병에 의해 발생하여 기억력, 사고력, 이해력, 언어, 행동 등을 변화시켜 일상생활을 어렵게 한다. 치매의 가장 큰 원인은 나이이지만 65세 전에 증상이 나타나는 경우도 9%에 해당되고 운동 습관, 음주, 흡연, 체중, 식이 등도 영향을 미치고, 발병 전의 성향과 질병에 따라 다른 방식으로 영향을 미쳐 심각하면 시간과 장소를 망각하고, 친한 사람들을 알아보기 힘들 뿐만 아니라 공격적 행동도 나타나게 된다¹⁾. 현재 치매 치료제의 대부분은 아세틸콜린에스테라아제 억제제로 치매의 진행을 지연시킬 뿐이고 부작용이 심각하여²⁾ 천연물을 이용한 소재들이 치매 치료를 위하여 계속해서 연구를 진행 중이다.

스코폴라민(scopolamine)은 비선택적 무스카린 콜린성 길항제로 멀미를 치료를 위한 경피 치료제로 생산한 첫 번째 약물이나 중추 신경 계통에서 주의력 및 감각/자극 구별, 운동 및 불안감에 대한 비특이적 효과와 더불어 동공 팽창과 같은 말초신경계에서 항콜린성 부작용을 유발한다³⁾. 또한 사람과 동물에서 건망증을 유도하여 다양한 행동 시험을 통하여 치매 치료제 개발에 사용하고 있다⁴⁻⁶⁾. 스코폴라민은 아세틸콜린에스테라아제 농도를 증가시키고 콜린성 신경전달 물질인 아세틸콜린의 수치를 감소시키며 산화적 스트레스를 유발시키고 체내 항산화 시스템에 영향을 미쳐⁷⁻⁹⁾ 천연물 유래 소재의 항산화능과 콜린 신경계와 관련한 기억력 개선 효과에 대한 연구에 사용하고 있다¹⁰⁾.

목화(木花, *Gossypium*)는 아욱과(Malvaceae)의 다년생 목본 또는 일년생 초본을 총칭하며 종자에 있는 털을 섬유로 사용하는 중요한 농작물로 널리 재배하며 면화(棉花), 초면(草棉)이라고도 한다¹¹⁾. 목화는 크게 아시아면이라고 불리는 인도면(*Gossypium arboreum*)과 초면(*Gossypium herbaceum*), 육지면(*Gossypium hirsutum*), 해도면(*Gossypium barbadense*) 총 4종이 재배되고 있는데 우리나라에는 14세기 중엽 고려말 공민왕 때 문익점이 중국에서부터 들여온 흰색 꽃이 피는 재래면인 아시아면이 널리 보급되었지만 1898년 일본 영사가 육지면을 도입하여 목포 면직시험장에서 재배에 성공한 후 보급되어 주로 재배하고 있으며¹²⁾, 약용으로는 *Gossypium indicum* 또는 기타 동속 근연식물을 사용한다. *Gossypium arboreum*은 *Gossypium indicum*과 동일종 또는 변종으로 취급하기도 하며¹³⁾ 씨를 면실자(棉實子), 면화자(棉花子), 목면자(木棉子)라 하고 辛熱小毒한 성미로 肝胃腎에 작용하여 補腎強腰, 止痛, 止血, 催乳 효능으로 崩漏, 腎虛腰痛, 胃寒疼痛, 乳少, 足膝無力를 치료하는데 사용되고 있다. 목화에 대한 연구는 항비만¹⁴⁾, 항당뇨¹⁵⁾ 효과가 보고 되었고, 뇌 질환과 관련하여 아세틸콜린에스테라아제 저해능¹⁶⁾, 기억력 개선 효능¹⁷⁾ 등이 목화에 대한 연구는 진행 되었지만 면화자에 대한 기억력 개선에 대한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구의 목적은 면화자 헥산(hexane) 추출물의 항산화능 및 알츠하이머병의 인지 및 기억력 개선능을 밝히고자 하는 것이며, 이를 위하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 확인하고 scopolamine으로 유도한 건망증 모델을 이용하여 Y-미로, 수동 회피 및 모리스 수중 미로 시험을 통하여 기억력 및 인지 기능 개선을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재

본 실험에 연구에 사용된 면화자(*Gossypii Semen*)는 국내에서 생산된 것을 한국생약협회(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Hexane 5 L에 약재 500 g을 넣고 상온에서 24 시간 동안 침출시켰으며, 추출액은 여과지(Advantec No.2)로 여과하여 여액을 회수하고 걸러진 추체에 다시 동량의 용매를 가하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출물은 30℃에서 감압 농축하여 용매를 제거하고 -20℃에 보관하여 실험에 사용하였다(수득율:12.61%).

2) 실험동물

4주령 수컷 ICR mouse를 대한바이오링크(Chungbuk, Korea)로부터 공급받아 1주일 동안 순화 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이와 물은 자유 섭취시켰으며 사육실 온도는 23 ± 1℃, 습도 50 ± 5%, 조명시간 07:00 ~ 19:00(12시간 주기)로 환경을 유지하였다. 순화 기간을 거친 실험 동물에게 행동 실험 1시간 전 면화자 50, 100 또는 200 mg/kg를 경구 투여하고 30분 뒤 scopolamine 1 mg/kg를 복강 투여하여 기억 손상을 유발하였다. Y-미로 시험과 수동 회피 시험은 약물을 단회 투여하였고, 모리스 수중 미로 시험은 매일 행동 실험 전 약물을 투여하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리규정을 준수하여 수행하였다(승인번호:DHU2019-042).

2. 실험 방법

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

면화자의 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℃에서 10분 동안 추출, 흡착하였다. GC-MS 분석은 HP-5MS 컬럼 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 80℃에서 5분 동안 유지하고 240℃까지 10℃/min으로 승온 후 34분 동안 유지하였다. 정유성분의 동정은 NIST 14 mass spectral library를 이용하였다.

2) DPPH 라디칼 소거 활성 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 μl씩 동량으로 혼합

하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

2,2'-azino-bis(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 기질용액을 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(%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

4) Y-미로 시험

단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위한 방법으로 Y-미로 시험을 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. 실험동물들을 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 걸치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적 식에 의해 계산하였다.

자발적 변경 행동력(Spontaneous alteration, %)

$$= \text{실제변경(actual alternation)} /$$

$$\text{최고변경(maximum alternation)} \times 100$$

$$(\text{최고변경} : \text{총 입장횟수} - 2)$$

5) 수동 회피 시험

해마의 조건화된 기억과 변연계와 관련 있는 기억에 관한 영향 및 working memory ability를 평가하기 위해 회피학습 상자((주)정도비앤피, 서울, 한국)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 가하였다. 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 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 GL 등¹⁸⁾의 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 원심분리 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 반응액을 AChE의 활성도를 100%로 하였을 때 각 시료를 첨가한 반응액의 AChE 활성 저해도를 그래프로 나타내었다.

8) 통계 분석

본 연구의 모든 실험 결과는 mean \pm standard error of mean(SEM)으로 표시하였으며, Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 일원배치분산분석을 실시하고 Newman-Keuls test로 사후 검증을 하였다. 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p-value < 0.05 미만일 때 유의하다고 나타내었다.

Ⅲ. 결 과

1. SPME-GC-MS를 이용한 면화자의 향기성분 분석

면화자 핵산 추출물의 휘발성 성분을 GC-MS로 분석하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 면화자 핵산 추출물의 주요 향기

성분은 γ -terpinene, cyclohexanone, ylangene, caryophyllene 및 cyclohexanol으로 추정된다.

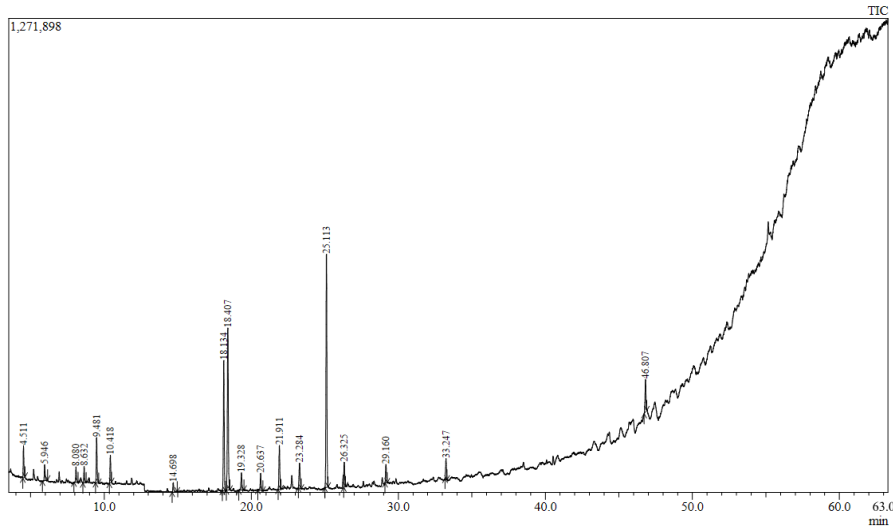


Fig. 1. GC-MS chromatogram (total ion current) of Gossypii Semen oil.

2. DPPH 라디칼 소거능 확인

면화자 핵산 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 $99.9 \pm 0.7\%$ 를 나타내었고, 면화자 핵산 추출물 132.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 $1.3 \pm 0.5\%$, $3.9 \pm 0.0\%$, $8.9 \pm 0.5\%$, $14.7 \pm 0.9\%$, $21.3 \pm 1.0\%$, $30.3 \pm 0.7\%$ 로 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 경향을 확인하였다.

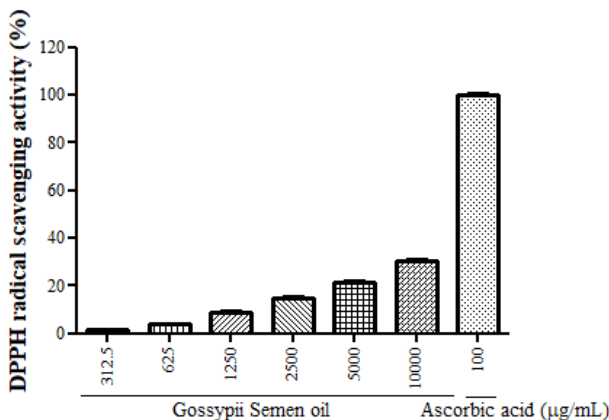


Fig. 2. DPPH free radical-scavenging activity of Gossypii Semen oil. The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of Gossypii Semen oil for 30 min. The values represent the mean \pm SEM for triplicate experiments.

3. ABTS 라디칼 소거능 확인

면화자 핵산 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 $99.9 \pm 0.2\%$ 를 나타내었고, 면화자 핵산 추출물 132.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 $2.7 \pm 0.8\%$, $4.2 \pm 0.6\%$, $7.1 \pm 0.5\%$, $10.9 \pm 0.5\%$, $14.3 \pm 0.8\%$, $23.4 \pm 1.2\%$ 로 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 경향을 확인하였다.

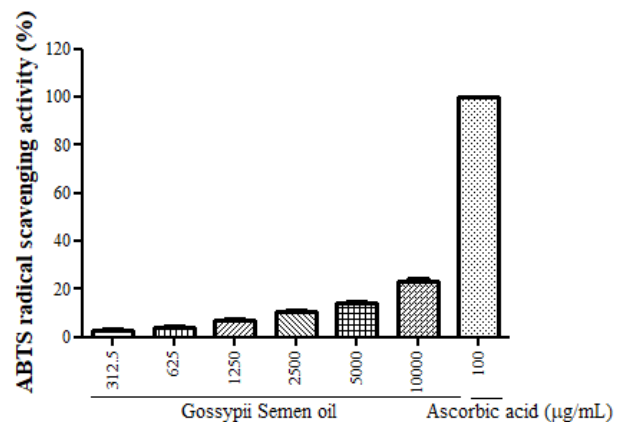


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of Gossypii Semen oil. The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of Gossypii Semen oil for 7 min. The values represent the mean \pm SEM for triplicate experiments.

4. Y-미로 시험을 통한 기억 개선 효과 확인

면화자 핵산 추출물의 단기 기억, 공간 학습과 관련하여 working memory 개선 효과를 확인하기 위하여 Y-미로 시험을 실시하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 자발적 변경 행동력에서 정상쥐인 NOR군은 77.7 ± 3.2%로 높게 나타난 반면 scopolamine을 주입한 CON군은 45.4 ± 3.7%로 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.001$). 이에 면화자 핵산 추출물 50, 100 또는 200 mg/kg를 투여하고 scopolamine을 주사한 실험군에서는 각각 55.8 ± 2.7%, 68.2 ± 4.1%, 78.2 ± 2.2%로 나타나 scopolamine에 의해 감소된 자발적 변경 행동력을 면화자 핵산 추출물 농도 의존적으로 증가시키는 경향을 확인하였다. 또한 각 가지에 들어간 총 입장횟수를 비교한 결과 모든 실험군간 유의한 차이가 없었다.

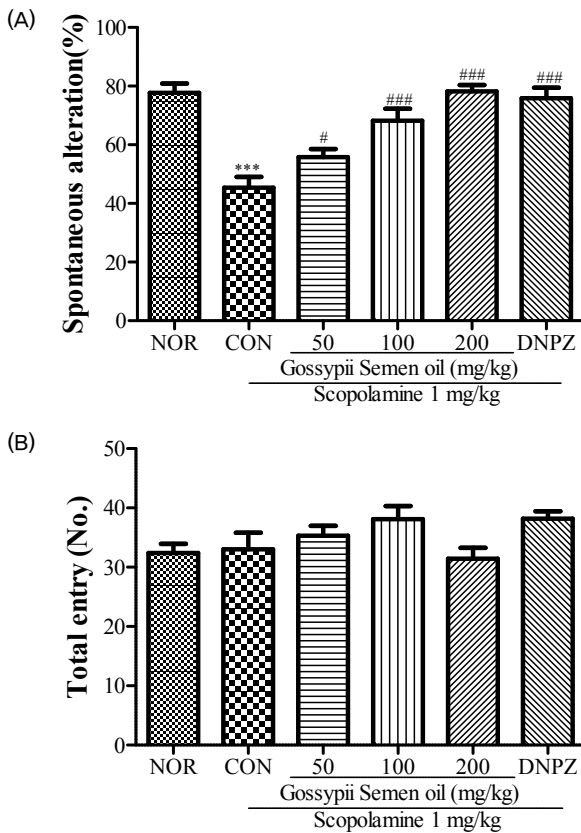


Fig. 4. Effect of Gossypii Semen oil on scopolamine-induced amnesia model mice in the Y-maze test. The spontaneous alteration (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data represent means ± S.E.M (n=10). *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the CON group.

5. 수동 회피 시험을 통한 기억 개선 효과 확인

면화자 핵산 추출물의 장기 기억과 관련하여 working memory 개선 효과를 확인하기 위하여 수동 회피 시험을 실시하여 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. Acquisition trial에서 어두운 방에 머무른 시간은 모든 실험군간 차이가 없었으나 retention trial에서 정상쥐인 NOR군의 어두운 방에 머무른

시간이 300.0 ± 0.0초인 반면 scopolamine을 주입한 CON군은 91.7 ± 11.4초로 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.001$). 이에 면화자 핵산 추출물 50, 100 또는 200 mg/kg를 투여하고 scopolamine을 주사한 실험군에서는 각각 137.3 ± 15.6초, 185.3 ± 19.2초, 241.8 ± 19.6초로 나타났고 양성대조군으로 donepezil을 투여하고 scopolamine을 주사한 DNPZ군은 286.0 ± 7.3초로 나타나 scopolamine에 의해 감소된 어두운 방에 머무른 시간을 면화자 핵산 추출물 농도 의존적으로 증가시키는 경향을 확인하였다.

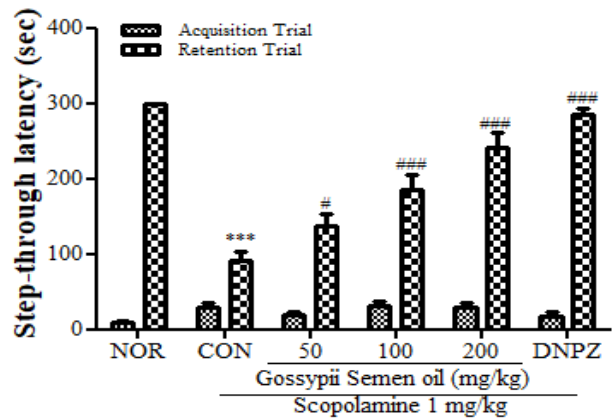


Fig. 5. Effect of Gossypii Semen oil on scopolamine-induced amnesia model in the passive avoidance test. Data represent means ± S.E.M (n=9). *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the CON group.

6. 모리스 수중 미로 시험을 통한 기억 개선 효과 확인

면화자 핵산 추출물의 장기 공간 기억과 관련하여 working memory 개선 효과를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 시험을 실시하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간은 scopolamine을 주입한 CON군은 첫날과 비슷한 수준인 반면 정상쥐인 NOR군은 학습이 진행됨에 따라 빨라지는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.001$). 앞선 실험에서 가장 효과가 좋았던 면화자 핵산 추출물 200 mg/kg를 투여하고 scopolamine을 주사한 실험군에서는 학습이 진행됨에 따라 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간이 짧아졌고 양성대조군으로 donepezil을 투여하고 scopolamine을 주사한 DNPZ군은 역시 그 시간이 짧아져 scopolamine에 의해 도피대를 찾아가는데 걸리는 긴 시간이 면화자 핵산 추출물 농도 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 6A). 도피대를 제거하고 도피대가 머무른 구역에서 헤엄친 시간을 측정된 결과 NOR군은 45.3 ± 6.1초인 반면 CON군은 29.4 ± 2.0초로 감소하였고 ($p < 0.05$) 면화자 핵산 추출물 200 mg/kg를 투여한 실험군은 42.2 ± 2.4초, DNPZ군은 44.2 ± 4.0초로 나타나 scopolamine에 의해 감소된 도피대가 머무른 구역에 헤엄친 시간이 면화자 핵산 추출물 농도 증가시키는 것을 확인하였다(Fig. 6B).

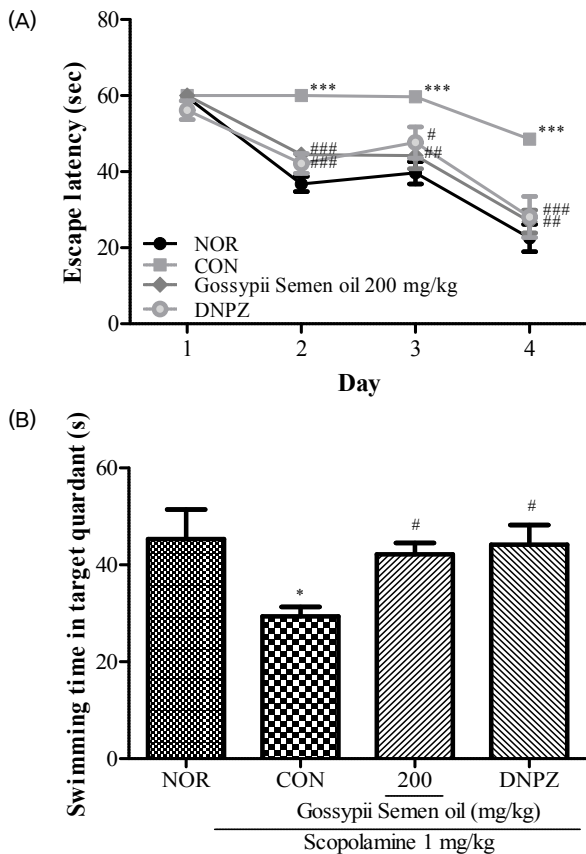


Fig. 6. Effect of Gossypii Semen oil on scopolamine-induced amnesia model in the Morris water maze test. Data represent means \pm S.E.M (n=6). *P < 0.05, ***P < 0.001 as compared with the NOR group, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 as compared with the CON group.

7. 아세틸콜린에스테라아제 활성 저해를 확인

면화자 핵산 추출물의 아세틸콜린에스테라아제의 활성 저해율을 측정하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 면화자 핵산 추출물의 아세틸콜린에스테라아제 IC50값은 0.9127 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고 donepezil의 IC50값은 0.1459 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다.

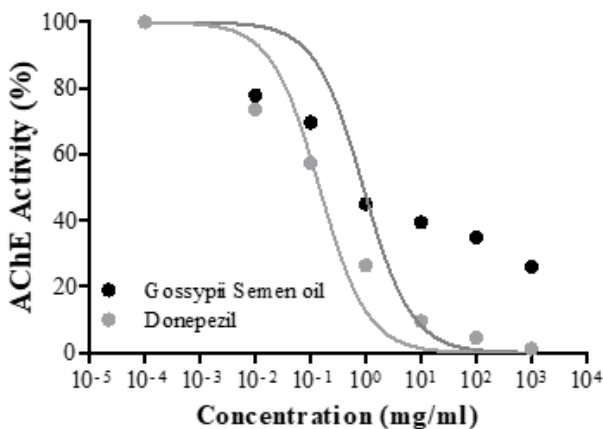


Fig. 7. Effects of Gossypii Semen oil on the AChE activity. AChE activity was normalized to control measurement. The data were made using GraphPad Prism. The values represent the mean \pm SEM for triplicate experiments.

IV. 고찰

『本草綱目』에 목면(木綿)은 풀과 비슷한 고종(古終)과 나무와 같은 고패(古貝) 두 가지의 종류가 있는데 열매 속 흰 면 속에 씨가 있다고 하였다¹⁹⁾. 『本草綱目拾遺』에 민간에서 면화(棉花)라 하는 것이 초면(草棉)이라 하였고, 면화자는 성질이 뜨거워 허한 것을 보해 주며, 허리를 따뜻하게 하여 손상된 곳을 치료한다고 하였다²⁰⁾. 한의학에서는 치매를 痴呆, 呆病, 文痴, 愚痴, 癡狂 등의 범주로 보고, 증상 관리에 대해 기술하고 있으며 치매에 대한 한의 평가도구 연구로 肝腎陰虛, 氣滯血瘀, 氣血兩虛, 火熱熾盛, 痰濁阻竅, 脾腎陽虛의 6가지 치매 변증지표를 확립하여 실제 임상에서 진단한 결과 肝腎陰虛의 환자 비율이 가장 높게 나타났다²¹⁾. 따라서 補腎하는 효능을 지닌 면화자가 향치매 효과를 나타내는지 본 연구를 수행하였다.

SPME는 식품과 환경, 화학 등 다양한 분야에 적용할 수 있는 분석 기법으로 시료를 추출하는데 간편하고 빠르며 용매가 필요 없어 재생산 가능한 이점이 있다. 또한 분석하는데 시료가 소량 필요하고 GC/MS와 연결하여 사용할 수 있어²²⁾ 휘발성이 있는 정유 성분 분석하는데 적합하다^{23,24)}. 본 연구에서 SPME-GC-MS를 통하여 면화자를 분석한 결과 추정되는 γ -terpinene, cyclohexanone, ylangene, caryophyllene 및 cyclohexanol은 식물에 존재하는 terpenoid류로 염증²⁵⁾, 항산화²⁶⁾, 항균작용²⁷⁾ 등 다양한 생리활성이 있다. 또한 목화의 씨앗은 유지 제조용 원료에 한하여 식용으로 사용 가능한 원료로 식품으로 등록되어 있고 linolenic acid, γ -linolenic acid이 풍부하여²⁸⁾ 영양학적으로도 우수한 소재이다.

항산화 활성을 측정하는데 대표적인 방법인 DPPH는 안정한 자유 라디칼로 보라색이 항산화제나 자유 라디칼과 반응하여 노란색으로 탈색되는 원리로 간단하게 측정할 수 있는 반면 ABTS는 potassium persulfate나 potassium permanganate와 같은 강력한 산화물질과 ABTS염이 반응하여 수용성의 ABTS가 생성되어 수소를 공유하는 항산화제에 의해 짙은색의 청록색이 무색으로 탈색되며 734 nm 파장에서 흡광도가 감소된다. ABTS는 수용성이나 유기 용매에 녹아 용매가 다른 시료나 pH가 다른 시료의 항산화능을 짧은 시간에 측정할 수 있는 장점이 있다²⁹⁾. 본 연구에서 132.5~10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 면화자를 분석한 결과 1.3~30.3%의 DPPH 라디칼 소거능과 2.7~23.4%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다. 이전 연구에서 목화 부위별 항산화능을 측정한 결과 다래껍질, 잎, 종자 순으로 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈고, 잎, 다래껍질, 종자 순으로 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다. 특히 종자 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 DPPH 라디칼 소거능이 86.04%, ABTS 라디칼 소거능이 74.03%를 나타냈는데³⁰⁾ 이는 70% 에탄올 추출물로 복령³¹⁾, 함초³²⁾, 섬애약쑥³³⁾ 등의 재배 기간, 재배 방법, 채취 시기, 가공방법 등에 따른 항산화능을 비롯한 이화학적 특성 차이가 보고된 것과 같은 이유로 항산화능 차이가 나타난 것으로 생각된다.

Scopolamine을 투여하여 건망증을 유도한 실험동물의 기억력을 평가하는 대표적인 행동실험인 Y-미로 시험에서 NOR군에 비하여 CON군의 자발적 변경 행동력이 41.5% 감소하였고 면화자 50, 100 및 200 mg/kg 투여한 실험군에서 농도 의존적으로 증가하여 면화자 200 mg/kg군과 양성대조군이

NOR군과 비슷한 수준을 나타냈다. 또한 수동 회피 시험에서 NOR군에 비하여 CON군의 retention trial이 69.4% 감소하였고 면화자 50, 100 및 200 mg/kg 투여한 실험군에서 농도 의존적으로 증가하였다. 가장 우수한 효능을 나타낸 면화자 200 mg/kg은 모리스 수중 미로 시험에서도 학습기간 동안 escape latency가 감소하였고 probe test에서도 NOR군에 비하여 CON군의 헤엄시간이 35.2% 감소하였으나 면화자 200 mg/kg군은 증가하여 DNPZ군과 비슷한 수준을 나타냈다. 이를 통하여 면화자가 scopolamine으로 유도한 건망증 모델에서 단기, 장기 및 공간 기억력을 개선시키는 것을 확인하였다. 최근 구상나무 잎³⁴⁾, 세이지³⁵⁾, 은반백리향³⁾, 로즈마리³⁶⁾, 라벤더³⁷⁾ 등 정유의 흡입 또는 투여로 기억력 개선 효과가 보고되었을 뿐만 아니라 우울³⁸⁾, 불안³⁹⁾ 등 정유의 뇌 질환 개선 연구가 진행되고 있는데 한약재인 면화자 정유의 기억력 개선 효능을 통하여 한의학적 적용 뿐만 아니라 실생활에 적용할 수 있을 것이라 생각된다.

아세틸콜린은 학습 및 기억과 연관되어 있는 중요한 신경 전달 물질로 FDA에서는 알츠하이머형 치매 약물로 AChE 저해제인 donepezil, rivastigmine, galantamine을 승인하고 있다. 따라서 많은 연구에서 아세틸콜린을 증가시키고 AChE를 감소시키는 약물을 개발하고 있다. 본 연구에서 면화자의 IC50값이 0.9127 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났고, 이전 연구에서 면화의 IC50값이 28.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 보고되었으며¹⁶⁾, 구성 성분인 cyclohexanone은 최초의 알츠하이머형 치매 치료제로 승인된 tacrine의 합성에 사용된다⁴⁰⁾. 따라서 면화자가 AChE를 저해함으로써 아세틸콜린 농도를 증가시켜 기억력을 개선시킬 수 있는 우수한 약재일 것이라 생각된다.

이상의 결과로 보아 면화자 정유는 항산화 효능을 가지고 scopolamine 유도 기억력 손상 동물 모델에서 단기 및 장기 기억력을 개선시키며 AChE 저해능을 나타냈다. 이를 통해 면화자는 기억력 감퇴와 관련한 건강 기능 식품 또는 의약 원료 등 기능성 소재로 응용 가능성이 있는 약물로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 면화자의 기억 개선 효과 및 기전을 알아보기 위하여 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 scopolamine으로 유도한 건망증 동물 모델에서 Y-미로, 수동 회피, 모리스 수중 미로 시험, 아세틸콜린에스테라아제 활성 저해능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면화자의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하였다.
2. 면화자는 Y-미로 시험에서 자발적 변경 행동력을 농도 의존적으로 증가시키고 총 입장횟수에는 영향을 미치지 않았다.
3. 면화자는 수동 회피 시험에서 step-through latency를 농도 의존적으로 증가시켰다.

4. 면화자는 모리스 수중 미로 시험에서 escape latency를 감소시키고, 도피대가 있었던 구역에서 헤엄치는 시간이 증가하였다.

5. 면화자는 아세틸콜린에스테라아제 IC50값이 0.9127 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

따라서 면화자는 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능, scopolamine 유도 건망증 모델의 기억력 개선 및 아세틸콜린에스테라아제 저해 효과를 나타내어 치매 질환 치료 및 예방을 위한 기능성 소재로 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

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

References

1. WHO 2019. Dementia; [accessed 2020 Sep 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
2. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2020;12:1179573520907397.
3. Volgin AD, Yakovlev OA, Demin KA, Alekseeva PA, Kyzar EJ, Collins C, et al. Understanding Central Nervous System Effects of Deliriant Hallucinogenic Drugs through Experimental Animal Models. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(1):143-54.
4. Brinza I, Abd-Alkhalek AM, El-Raey MA, Boiangiu RS, Eldahshan OA, Hritcu L. Ameliorative Effects of Rhoifolin in Scopolamine-Induced Amnesic Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(7):580.
5. Sathya S, Manogari BG, Thamaraiselvi K, Vaidevi S, Ruckmani K, Devi KP. Phytol loaded PLGA nanoparticles ameliorate scopolamine-induced cognitive dysfunction by attenuating cholinesterase activity, oxidative stress and apoptosis in Wistar rat. *Nutr Neurosci*. 2020:1-17.
6. Liao J, Nai Y, Feng L, Chen Y, Li M, Xu H. Walnut Oil Prevents Scopolamine-Induced Memory Dysfunction in a Mouse Model. *Molecules*. 2020;25(7).
7. Wang X, Zhang D, Song W, Cai CF, Zhou Z, Fu Q, et al. Neuroprotective effects of the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd extract on scopolamine-induced learning and memory impairments in mice. *Biomed Rep*. 2020;13(5):37.
8. Capatina L, Todirascu-Ciornea E, Napoli EM, Ruberto

- G, Hritcu L, Dumitru G. Thymus vulgaris Essential Oil Protects Zebrafish against Cognitive Dysfunction by Regulating Cholinergic and Antioxidants Systems. *Antioxidants* (Basel). 2020;9(11):1083.
9. Yadang FSA, Ngueze Y, Kom CW, Betote PHD, Mamat A, Tchokouaha LRY, et al. Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice: Neuroprotective Effects of *Carissa edulis* (Forssk.) Valh (Apocynaceae) Aqueous Extract. *Int J Alzheimers Dis*. 2020;2020:6372059.
 10. Kowalczyk J, Kurach L, Boguszewska-Czubara A, Skalicka-Wozniak K, Kruk-Slomka M, Kurzepa J, et al. Bergapten Improves Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice via Cholinergic and Antioxidative Mechanisms. *Front Neurosci*. 2020;14:730.
 11. Bio resource information service; Available from : <https://bris.go.kr/portal/resource/book/selectResourceBookDtlInfo.do?lfrMnno=KISTI0037X00369&gubun=2&siteGb=P&menuNo=200200>
 12. National institute of crop science; Available from : <https://www.nics.go.kr/bbs/view.do?m=100000153&bbsId=leaflet&bbsSn=9612>
 13. National institute of biological resources; Available from : https://species.nibr.go.kr/home/mainHome.do?cont_link=009&subMenu=009002&contCd=00902&ktsn=120000061019
 14. Uzzaman R, Ghaffar M. Anti-diabetic and hypolipidemic effects of extract from the seed of *Gossypium herbaceum* L. in Alloxan-induced diabetic rabbits. *Pak J Pharm Sci*. 2017;30(1):75-86.
 15. Yoo C. Antioxidant and Anti-Diabetes Inhibitory Activity of *Gossypium semen* Extracts . Daegu: Kyungpook National University; 2013.
 16. Zhao Y, Dou J, Wu T, Aisa HA. Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceum*. *Molecules*. 2013;18(1):951-62.
 17. Liu Y, Aisa HA, Ji C, Yang N, Zhu H, Zuo P. Effects of *Gossypium herbaceum* extract administration on the learning and memory function in the naturally aged rats: neuronal niche improvement. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(1):101-11.
 18. 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.
 19. Korea Institute of Oriental Medicine; 2015 [cited 21 Dec 2020]. Available from: https://mediclassics.kr/books/190/volume/43#content_1221
 20. Korea Institute of Oriental Medicine; 2015 [cited 21 Dec 2020]. Available from: https://mediclassics.kr/books/203/volume/5#content_43
 21. Lee DH. Analysis of Clinical Korean Medicine Studies on Dementia : Focused on Korean Literatures for 10 Years. *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*. 2020;24(1):37-48.
 22. Panighel A, Flamini R. Applications of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in the study of grape and wine volatile compounds. *Molecules*. 2014;19(12):21291-309.
 23. Xue J, Li H, Liu F, Jiang W, Hou F. Vortex-assisted matrix solid-liquid dispersive microextraction for the analysis of triazole fungicides in cotton seed and honeysuckle by gas chromatography. *Food Chem*. 2016;196:867-76.
 24. Kosma IS, Kontominas MG, Badeka AV. The Application of Chemometrics to Volatile Compound Analysis for the Recognition of Specific Markers for Cultivar Differentiation of Greek Virgin Olive Oil Samples. *Foods*. 2020;9(11):1672.
 25. Ramalho TR, Oliveira MT, Lima AL, Bezerra-Santos CR, Piuvezam MR. Gamma-Terpinene Modulates Acute Inflammatory Response in Mice. *Planta Med*. 2015;81(14):1248-54.
 26. Guo Y, Baschieri A, Amorati R, Valgimigli L. Synergic antioxidant activity of gamma-terpinene with phenols and polyphenols enabled by hydroperoxyl radicals. *Food Chem*. 2020:128468.
 27. Giweli A, Dzamic AM, Sokovic M, Ristic MS, Marin PD. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules*. 2012;17(5):4836-50.
 28. Gao L, Chen W, Xu X, Zhang J, Singh TK, Liu S, et al. Engineering Trienoic Fatty Acids into Cottonseed Oil Improves Low-Temperature Seed Germination, Plant Photosynthesis and Cotton Fiber Quality. *Plant Cell Physiol*. 2020;61(7):1335-47.
 29. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1131.
 30. Kang TK. Antioxidant Activities of Ethanolic Extracts from *Gossypium arboreum* L. *J Invest Cosmetol*. 2019;15(2):137-46.
 31. Kim JY, Lee HY, Jo WS, Park SC. Comparison of composition and antioxidant activity of *Poria cocos* Wolf cultivated in a mortuary and cemetery. *Journal of mushrooms*. 2018;16:111-7.
 32. Kim MS, Lee JN, Seong HJ, Kim DH, Sohn HY. Changes in the *in vitro* Antioxidant and Antithrombosis Activities of *Salicornia europaea* According to Harvest Time. *Journal of Life Science*.

- 2016;26:1033–40.
33. Choi MH, Kang JR, Sim HJ, Kang MJ, Seo WT, Bae WY, Shin JH. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of Sumaeyaksuk depending on harvest times and processing methods. *Korean journal of food preservation*. 2015;22:399–407.
 34. Kim K, Bu Y, Jeong S, Lim J, Kwon Y, Cha DS, et al. Memory-enhancing effect of a supercritical carbon dioxide fluid extract of the needles of *Abies koreana* on scopolamine-induced amnesia in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(8):1821–6.
 35. Perry NS, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol*. 2000;52(7):895–902.
 36. Capatina L, Boianiu RS, Dumitru G, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L, et al. *Rosmarinus officinalis* Essential Oil Improves Scopolamine-Induced Neurobehavioral Changes via Restoration of Cholinergic Function and Brain Antioxidant Status in Zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(1):62.
 37. Manganiello-Terra FA, Correa-Netto NF, Masukawa MY, Ruzzi A, Linardi A, Santos-Junior JG. Inhaled *Lavandula angustifolia* essential oil enhances extinction learning and inhibits memory updating in mice submitted to the contextual fear conditioning. *J Ethnopharmacol*. 2020;260:113048.
 38. Zhang Y, Long Y, Yu S, Li D, Yang M, Guan Y, et al. Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder. *Pharmacol Res*. 2020;164:105376.
 39. Zhang N, Yao L. Anxiolytic Effect of Essential Oils and Their Constituents: A Review. *J Agric Food Chem*. 2019;67(50):13790–808.
 40. Proctor GR, Harvey AL. Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 2000;7(3):295–302.