

에탄올 투여로 유도한 생쥐의 인지기능 손상에 대한 길경 추출물의 개선효능

김영섭 · 김정숙 · 최연희 · 서지희 · 이정원 · 김성기 · 강종성¹ · 이현선²

조영수³ · 노성환³ · 정영철⁴ · 심기환⁵ · 유시용

한국화학연구원, ¹충남대학교 약학대학, ²한국생명공학연구원, ³(주)장생도라지 중앙연구소,

⁴진주국제대학교 식품과학부, ⁵경상대학교 농업생명과학대학

Ameliorating Effect of the Root Extract from *Platycodon grandiflorum* on the Ethanol-induced Cognitive Impairment in Mice

Young Sup Kim, Jung Sook Kim, Yeon Hee Choi, Jee Hee Seo, Jung Won Lee, Seong-Kie Kim,

Jong Seong Kang¹, Hyun Sun Lee², Young Soo Cho³, Seong Hwan Roh³,

Young Chul Jeong⁴, Ki Hwan Shim⁵, and Shi Yong Ryu

Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

³JangSaeng Doraji Research Institute of Biotechnology, JangSaeng Doraji Co. Ltd., Jinju 660-833, Korea

⁴Division of Food Science, Jinju International University, Jinju 660-759, Korea

⁵Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract – The ameliorating effect of the MeOH extract of the root of *Platycodon grandiflorum* on the ethanol-induced cognitive dysfunction in mice was investigated. The total MeOH extract was divided into two fractions, saponin rich fraction and non-saponin fraction. The mice with repeated administration of the total MeOH extract and those with saponin rich fraction both showed a markedly prolonged latency time upon the step-through test (passive avoidance performance) performed after acute ethanol intoxication, while those with non-saponin rich fraction did not. The results suggest that the extracts from the root of *Platycodon grandiflorum* exert a beneficial effect on ethanol-induced memory impairment in mice and also suggest that these effects of the extracts might be ascribed to the saponin constituents.

Key words – *Platycodon grandiflorum*, cognitive dysfunction, memory, step-through test, passive avoidance performance

노인성치매(senile dementia)는 심한 뇌위축과 뇌세포의 손상으로 말미암아 기억력 및 각종 인지기능이 감퇴되고 추상적인 사고판단능력이 현격하게 저하되므로서 궁극적으로는 심각한 성격장애, 불면, 망상, 행동장애등의 증상을 나타내게 되는 대표적인 퇴행성 만성 뇌질환이다.

최근 각종 질병으로 인한 인간의 사망률을 조사한 역학연구보고에 따르면 노인성치매를 비롯한 퇴행성 뇌질환은 관상동맥질환, 악성종양에 이어 3위의 순서를 차지하고 있으며 현재 전 세계적으로 2,500만명 정도의 노령인구가 이들

질환에 시달리고 있다. 노인성치매의 발병율은 환자의 연령에 비례하여 급격히 증가하며 65세 이상 전체인구의 7.5%, 85세 이상 전체인구의 30%가 이 질병으로 고통을 받고 있다. 따라서 노인인구가 급속하게 증가하고 있는 오늘날의 상황을 감안하여 볼 때 노인성치매는 그 해결책이 하루속히 강구되어야 할 매우 시급한 과제라고 할 수 있다.¹⁾

그러나 노인성치매는 아직껏 질병의 정확한 원인이 제대로 규명되지 못하고 있는 까닭으로 항정신성약물(antipsychotics), 항우울제(antidepressant), 항불안제, 항경련제(anticonvulsant), 뇌기능개선제(nootropics), 신경전달물질의 대사에 관여하는 효소차단제(enzyme blocker), 칼슘차단제(Ca-blocker)등

*교신저자(E-mail) : syryu@krcit.re.kr
(FAX) : 042-860-7160

의 약제들을 환자의 상태에 따라 적절하게 처치하는 대중요법만이 최선의 방법으로 알려져 있다. 전술한 약제들 중 많은 약물들에 대하여는 치매 치료제로서의 활용가능성이 여러차례 연구 검토되어져 왔으나 대부분의 경우 성격장애, 불면, 망상, 행동장애 등 치매의 진행에 따라 발생하는 각종 병증에 대한 일시적인 완화효과만 일부분 인정이 되고 인지기능개선효과 등 치매에 대한 근본적인 치유효과를 보여주는 약물은 거의 전무한 실정이다. 최근 노인성치매로부터 유발되는 기억력상실, 학습력 저하 등 각종 인지기능장애는 주로 대뇌 기저부의 acetylcholine성 신경세포의 손상으로부터 기인된다는 연구가설에 의거하여 무스카린성 acetylcholine 수용체에 대한 효능제, acetylcholine 생성촉진제, acetylcholinesterase (AChE) 저해제 등 여러가지 작용기전에 따라 acetylcholine성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 많은 약물들이 연구개발되어 지고 있다.^{1,2)} 대표적인 사례로 노인성치매로 야기된 muscarine성 acetylcholine 수용체 M₁ subtype (mAChR-M₁)의 기능 저하를 향진시켜 줄 수 있는 효과적인 mAChR-M₁ 효능약(agonist)이 치매의 치료 혹은 병의 진행을 지연시켜줄 수 있으리라는 연구가설 하에 arecoline, oxotremoline 등 여러 가지 muscarine 효능약이 연구 개발되었으며,³⁻⁵⁾ 현재 mirameline, sabcomeline, xanomeline 등이 시판을 앞두고 있는 실정이다.^{6,7)}

mAChR-M₁ 효능약과 함께 노인성치매 개선제로 활발하게 연구 개발되어 지고 있는 분야는 AChE 저해제에 관한 연구로서 현재 시판되고 있는 tacrine (Cognex), rivastigmine (Exelon), donepezil (Aricept), galantamine (Reminil) 등의 약제들은 모두 acetylcholinesterase 저해효과를 약효의 근간으로 삼고 있다.

한편 본 연구진은 수년 전부터 생약재 등 각종 천연식물 자원으로부터 노인성치매로 유발된 각종 인지기능의 손상을 효과적으로 개선할 수 있는 천연의약품을 개발하고자 인지기능 손상과 관련된 mAChR-M₁, AChE, BChE(butyrylcholinesterase) 등 각종 약리학적 작용점을 조절하는 천연물에 대한 탐색연구를 수행하여왔다. 그 결과 생약의 추출물들을 대상으로 하여 mAChR-M₁에 대한 친화력⁸⁾ 및 AChE에 대한 저해효과⁹⁾를 검색하여 보고한 바 있다.

이와 같이 약리작용점을 대상으로 한 *in vitro* 실험과 병행하여 최근 본 연구진은 생쥐(mouse)를 실험동물로 사용한 수동회피실험(passive avoidance performance)을 통하여 노인성치매로부터 유발되는 기억력 감소, 학습력 저하 등의 인지기능 장애를 개선시키는 약리효능을 평가하는 동물실험방법을 확립하였으며 이 방법에 준하여 수종 생약추출물의 효능을 검색하여 본 결과 산조인(酸棗仁, *Zizyphi spinosi Semen*), 원지(遠志, *Polygalae Radix*), 길경(桔梗, *Platycodi*

Radix) 등의 생약재들이 우수한 인지기능장애 개선효능을 보여주고 있음을 알 수 있었다.¹⁰⁾

특히 길경의 MeOH 추출물 및 MeOH 추출물로부터 부분 정제된 사포닌 분획을 생쥐에 경구 투여한 결과 에탄올 투여로 유발된 인지기능 손상이 효과적으로 개선되고 있음을 관찰하였다.

폴초롱과(Campanulaceae)에 속하는 다년생식물 도라지(balloon flower, *Platycodon grandiflorum*)의 2-4년 산 뿌리는 우리나라, 일본, 중국 등 동북아시아에서 옛부터 식용 및 생약재(길경)로 널리 사용되고 있다. 또, 자연산 도라지의 경우 대개 그 수명이 3-4년쯤으로 알려져 있으나 최근 국내 연구진에 의해 20년 이상 생장이 가능한 도라지의 재배기술이 개발되었으며 이 기술을 통하여 생산되는 다년생 도라지를 이용한 각종 식품개발이 활발히 진행되고 있다.¹¹⁾ 길경의 함유성분으로는 inulin 및 fructo-oligosaccharide 등 탄수화물이 전체추출물의 95% 이상을 차지하고 있으며¹²⁾ 이외에 platycodigenin, polygalacic acid 등 2종의 oleanene계 triterpene을 기본 골격으로 한 platycodin D 등 20여종의 사포닌 종류들이 1-4% 함유되어 있다고 알려져 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 길경 및 길경사포닌의 약리효능으로는 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 항염증작용, 항궤양 및 위액분비억제작용, 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등 다양한 활성이 보고되어 있으며^{17,18)} 최근에는 간섬유화 억제활성 및 간경화 치료효능 등이 활발히 연구되어 지고 있다.^{19,20)}

재료 및 방법

실험약제의 조제 - 경동시장에서 구입한 국산 길경 600 g을 MeOH에 6일간 냉침시킨 후 감압 농축하여 MeOH extract 150 g을 얻었다(길경추출물). 이 MeOH extract를 1 L의 증류수에 현탁한 후 Diaion HP-20 column (Ø=5.0×100 cm)을 통과시키고 증류수 10 L로 세척하였으며 용출액과 세척액은 합하여 감압 농축하였다(비사포닌분획, 130 g). 이후 Diaion HP-20 column을 5 L의 85% MeOH로 거둬 용출시키고 용출액을 감압 농축하였다(사포닌분획, 9 g). 또 column을 5 L의 MeOH로 세척하고 세척액을 감압농축하였다(수득량 0.2 g). 이와 같은 방법으로 조제된 길경추출물, 사포닌분획 및 비사포닌분획을 각각 증류수에 현탁하여 투여약제로 사용하였다.¹⁵⁾

실험동물 및 실험약제의 투여 - 실험동물은 ICR계의 체중 19±1 g인 수컷의 생쥐를 대한바이오링크(충북 음성)로부터 구입하였다. 실험동물은 타 동물과 격리하여 수용하였으며 12시간 명암 주기(6:00부터 18:00 사이는 밝게 18:00

부터 익일 6:00까지는 어둡게 함)와 항온(24±1°C), 항습(55±5%) 조건 하에서 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 3-4일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물을 공시험(blank)군, 대조시험(control)군, 표준약물(standard)군, 길경추출물 투여군(2군), 사포닌분획 투여군(2군), 비사포닌분획 투여군(1군) 등 8군으로 나누었으며 각 군은 10마리씩으로 하였다. 공시험(blank)군, 대조시험(control)군은 약물 대신에 증류수를 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 투여하였다. 약물투여군은 길경추출물 투여군의 경우 길경추출물을 매회 20 mg/kg, 100 mg/kg씩, 사포닌분획 투여군은 길경사포닌분획을 매회 2 mg/kg, 10 mg/kg씩, 비사포닌분획 투여군은 길경 비사포닌분획을 매회 500 mg/kg씩 투여하였으며 표준약물(standard)군은 tacrine을 매회 10 mg/kg씩 투여하였다. 투여약제는 모두 증류수에 녹여 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 1일 1회 4일간 경구 투여하였다.

수동회피실험(step-through test) - 인지기능 손상에 대한 개선 효능은 팩스-30 셔틀박스 시스템(PACS-30, Columbus Co., OH, USA)을 사용한 수동회피실험을 통하여 평가하였다.¹⁰⁾

실험장치로 사용한 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH, USA)은 동일한 크기의 두 개의 방(15×15×22 cm)으로 구성되어 있으며, 방과 방 사이는 guillotine door (4×3.5 cm)가 설치된 칸막이로 차단되어 있다. 두 개의 방 중 한쪽의 방에는 강도 10 W의 조명을 비추어 밝게 하였으며 나머지 한쪽 방은 차광하여 어둡게 하였다. 어두운 쪽 방의 바닥에는 전기 쇼크를 줄 수 있는 grid를 설치하였다. 실험은 동일한 방법으로 learning trial(학습 훈련)과 memory acquisition test(기억력 시험)를 24시간 간격으로 진행하였으며 이들 실험은 모두 오후 6시 이후 시간대에 수행하였다. 즉 생쥐를 1시간 동안 암실에서 순응시킨 후 실험장치의 밝은 쪽 방에 넣고 30초가 경과한 뒤 guillotine door가 자동으로 열리도록 하였다. 생쥐가 반대쪽 어두운 방으로 옮겨가면 guillotine door가 자동으로 닫히면서 생쥐는 바닥으로부터 5초간 0.6 mA의 전기쇼크를 받게 하였다(학습훈련). 학습훈련 24시간 후 생쥐를 동일한 실험 장치의 밝은 쪽 방에 넣고 반대편 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간(latency)을 측정하였다(기억력 시험). 이때 5분이 경과한 경우에도 어두운 쪽 방으로 옮겨가지 않는 경우는 latency를 5분으로 하였으며 학습훈련 시 밝은 쪽 방에서 2분 이내에 반대편 방으로 옮겨가지 않는 생쥐는 실험에서 제외시켰다.

최종약물투여는 학습훈련 1시간 전에 종료하고 공시험(blank)군을 제외한 모든 시험군의 생쥐에게는 학습훈련 30분전에 3.0 g/kg 씩의 에탄올을 경구투여하였으며 공시험

(blank)군은 에탄올 대신 동량의 증류수를 경구 투여하였다.

통계처리 - 실험결과는 평균값±표준오차로 표시하였다. Student's *t*-test를 이용하여 유의성 여부를 검정하였다.

결과 및 고찰

학습훈련(learning trial)과 기억력시험(memory acquisition test)을 통하여 생쥐가 밝은 쪽 방에서 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간(latency)을 각 시험군 별로 측정하였으며 학습 훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 증가하는 정도를 지표로 하여 인지기능의 개선효과를 평가하였다(Fig. 1). 학습훈련 전 에탄올을 투여하지 않은 공시험(blank)군의 경우 실험동물들은 학습 훈련 시에는 모두 1분 이내의 latency를 보여주었으나 24시간이 경과한 후 실시한 기억력시험 시에는 모두 4-5분대의 latency를 기록하고 있어 학습훈련을 통하여 습득한 전기쇼크의 경험을 24시간이 경과한 후에도 잘 기억하고 있음을 알 수 있었다. 반면 학습훈련 전 에탄올을 투여한 대조시험(control)군의 경우에는 학습훈련 시에는 공시험군의 경우와 같이 모두 1분 이내의 latency를 보여 주고 있으나 기억력 시험 시에도 모두 1분 이내의 latency를 보이고 있어 학습훈련을 통한 전기쇼크의 기억을 24시간 이후에서는 모두 잊어버리고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐들의 경우 에탄올의 경구투여로 인지기능(기억력) 손상이 잘 유도되고 있음을 시사하고 있다.

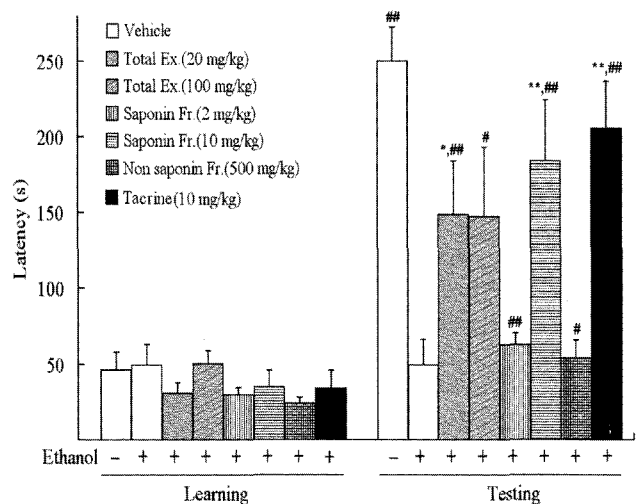


Fig. 1. Effects of extracts and fractions from Platycodon root on cognitive performance in ethanol-treated mice. Values represent the mean±S.E.M. of nine to ten mice. **p*<0.05 and ***p*<0.01 when compared with the vehicle group with ethanol administration in testing. #*p*<0.05 and ##*p*<0.01 when compared with the respective learning latency.

한편 길경추출물 투여군의 경우에는 투여량(20 mg/kg, 100 mg/kg)에 상관없이 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시에 밝은쪽 방으로부터 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간(latency)이 150초 정도로 대조시험(control)군의 경우에 비하여 약 3배 정도 증가하고 있어 에탄올 투여로 야기된 인지기능 손상이 상당부분 회복되고 있음을 알 수 있었다. 사포닌분획 투여군의 경우에는 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 약물투여량(2 mg/kg, 10 mg/kg)에 따라 투여용량 의존적으로 증가하였다. 특히 고용량(10 mg/kg)의 사포닌분획을 투여한 군의 경우에는 기억력 시험시 측정된 latency가 에탄올을 투여하지 않은 공시험군의 경우와 비슷한 수준(74%)으로 증가하였으며 대조약물로 사용한 tacrine(Cognex)에 버금가는 우수한 인지기능 개선효능을 보여주었다. 반면 고용량의 비사포닌분획(500 mg/kg)을 투여한 시험군의 경우에는 학습 훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 거의 변동이 없어 인지기능 개선효능이 미미한 것으로 사료된다.

이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐의 경우 길경의 MeOH 추출물을 반복 경구 투여하므로써 에탄올 투여로 유발된 인지기능(기억력) 손상이 효과적으로 개선되고 있음을 시사하고 있으며 이러한 길경추출물의 약리효능은 주로 추출물에 함유된 사포닌 성분들에 기인하고 있음을 암시하고 있다.

결 론

길경의 MeOH 추출물 및 MeOH 추출물로부터 분리한 사포닌 분획과 비사포닌 분획을 각각 1일 1회 4일간 반복 경구투여한 mouse를 대상으로 에탄올투여로 인지기능(기억력) 손상을 유도한 후 실시한 수동회피실험 결과 길경의 MeOH 추출물 및 사포닌 분획을 투여한 시험군은 유의성 있는 인지기능 개선효능을 나타낸 반면 비사포닌 분획을 투여한 시험군의 경우에는 뚜렷한 인지기능 개선효능이 관찰되지 못하였다. 따라서 길경의 MeOH 추출물의 반복 투여에 의한 인지기능 개선효능은 길경추출물에 함유된 사포닌 성분들에 기인하는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비지원(PF0320203-00)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Schroder, H., Giacobini, E., Struble, R. G., Luiten, P. G., Zilles, K., and Strosberg, A. D: (1991) Muscarinic cholinergic neurons in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* **27**(5): 631-636.
- Polinsky, R. J. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther.* **20**(4): 634-47.
- Messer, W. S. Jr., Rajeswaran, W. G., Cao, Y., Zhang, H. J., el-Assadi, A. A., Dockery, C., Liske, J., O'Brien, J., Williams, F. E., Huang, X. P., Wroblewski, M. E., Nagy, P. I., and Peseckis, S. M. (2000) Design and development of selective muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease: characterization of tetrahydropyrimidine derivatives and development of new approaches for improved affinity and selectivity for M₁ receptors. *Pharm. Acta Helv.* **74**(2): 135-140.
- Doody, R.S. (1999) Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontol.* **45**(Suppl 1): 23-32.
- Asthana, S., Greig, N. H., Holloway, H. W., Raffaele, K. C., Berardi, A., Schapiro, M. B., Rapoport, S. I., and Soncrant, T. T. (1996) Clinical pharmacokinetics of arecoline in subjects with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**(3): 276-282.
- Harries, M. H., Samson, N. A., Cilia, J., and Hunter, A. J. (1998) The profile of sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M1 receptor partial agonist, in the marmoset. *Br. J. Pharmacol.* **124**(2): 409-415.
- Shannon, H. E., Rasmussen, K., Bymaster, F. P., Hart, J. C., Peters, S. C., Swedberg, M. D., Jeppesen, L., Sheardown, M. J., Sauerberg, P., and Fink-Jensen, A. (2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* **42**(3): 249-59.
- Kim, Y. S., Kim, J. S., Kim, S. K., Heor, J. H., Lee, B. E., and Ryu, S. Y. (2001) Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR-M₁). *Kor. J. Pharmacogn.* **32**(3): 219-225.
- Kim, J. S., Kim, Y. S., Kim, S. K., Heor, J. H., Lee, B. H., Choi, B. W., Ryu, G. S., Park, E. K., Zee, O. P., and Ryu, S. Y. (2002) Inhibitory effects of some herbal extracts on the acetylcholinesterase (AChE) *in vitro*. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**(3): 211-218.
- Lee, S. C., Kim E. J., You, K. H., Kang, J. S., and Moon, Y. S. (1999) Effects of various nootropic candidates on the impaired acquisition of ethanol-treated rats in step-through test. *J. Ginseng Res.* **23**: 115-121.
- Lee, S. H. and Lee, Y. C. (1991) Method of cultivating the perennial balloonflower, Patent No. 100045791, Korea.

12. Oka, M., Ota, N., Mino, Y., Iwashita, T., and Komura, H. (1992) Studies on the conformational aspects of inulin oligomers. *Chem. Pharm. Bull.* **40**(5): 1203-1207.
13. Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T., and Yoshimura, Y. (1981) Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 1. Structure of prosapogenins. *J.C.S. Perkin 1*: 1928-1933.
14. Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T., and Yoshimura, Y. (1984) Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 2. Isolation and structures of new triterpene glycosides. *J.C.S. Perkin 1*: 661-668.
15. Saeki, T., Koike, K., and Nikaido, T. (1999) A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.* **65**: 428-431.
16. Nikaido, T., Koike, K., Mitsunagi, K. M., and Saeki, T. (1999) Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. *Chem. Pharm. Bull.* **47**(6): 903-904.
17. Kim, Y. P., Lee, E. B., Kim, S. Y., Li, D., Ban, H. S., Lim, S. S., Shin, K. H., and Ohuchi, K. (2001) Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.* **67**(4): 362-364.
18. Shin, C. Y., Lee, W. J., Lee, E. B., Choi, E. Y., and Ko, K. H. (2002) Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters. *Planta Med.* **68**(3): 221-5.
19. Lee, K. J. and Jeong, H. G. (2002) Protective effect of Platycodi radix on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **40**(4): 517-525.
20. Lee, K. J., Choi, C. Y., Chung, Y. C., Kim, Y. S., Ryu, S. Y., Roh, S. H., and Jeong, H. G. (2004) Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* **147**(3): 271-282.

(2004년 7월 20일 접수)