스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 복신의 보호 효과 및 작용기전 연구

제갈경환 · 박성준 · 김창열 · 이 찬 · 박종현 · 장정희*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of *Poria Cocos* on the Scopolamine-induced Memory Impairment and Its Underlying Molecular Mechanism

Kyoung Hwan Jegal, Sung Jun Park, Chang Yul Kim, Chan Lee, Jong Hyun Park, Jung Hee Jang*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

This study was performed to investigate the memory enhancing effect of *Poria cocos* Wolf (Hoelen cum radix) against scopolamine-induced amnesia in Sprague-Dawley (SD) rats. To induce amnesia, scopolamine (0.75 mg/kg) was intraperitonically injected into SD rats 30 min before starting behavior tests. We have conducted Morris water-maze and Y-maze tests to monitor learning and memory functions. *Poria cocos* effectively reversed scopolamine-induced memory impairment in SD rats which was represented by an improvement of mean escape latency in water-maze test and spontaneous alterations in Y-maze test. To elucidate possible molecule mechanism, we have measured mRNA as well as protein expression of acetylcholine esterase (AchE), choline acetyltransferase (ChAT), muscarinic acetylcholine receptor (mAchR), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) using RT-PCR and Western blot analysis, respectively. *Poria cocos* increased mRNA levels of ChAT and mAchR in rat hippocampus compared with those in the scopolamine-injected amnesic group. In addition, protein expression of ChAT and BDNF was also elevated by *Poria cocos* intake. Furthermore, as an upstrem regulator, the activation of cAMP response element-binding protein (CREB) was assessed by immunohistochemistry. In this immunohistochemical analysis, the phosphorylation of CREB (p-CREB) was reduced by scopolamine injection, which was restored back to control levels by administration of *Poria cocos*. These results suggest that *Poria cocos* may improve memory and cognitive deficit in amnesia and have therapeutic potentials through up-regulation of ChAT, mAchR, and BDNF, which seemed to be mediated by activation of CREB.

Key words : *Poria cocos* Wolf, memory and cognition, scopolamine, acetylcholine, BDNF, CREB

서 론

치매(痴呆)는 대표적인 만성 퇴행성 뇌질환으로, 최근 고령화가 급속히 진행됨에 따라 발병률 및 유병률이 점점 더 높아지고 있으며, 의학적, 사회적, 경제적으로 심각한 노인보건 현안으로 대두되고 있다. 치매는 발생 원인에 따라 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타 질환에 의한 치매로 분류되며, 특히 전체 치매 환자 중 50-60%가 알츠하이머병에 의한 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병 환자들은 일반적으로 지적능력, 감정 및 행동변화 등에서 임상적으로 뚜렷한 손상을 나타내며, 이후 방향감각의 상실, 기억손상, 실어증 등의 심각한 대뇌피질 기능장애 징후를 보이게 된다[1].

알츠하이머병의 연구결과 제시된 병리학적 기전으로, 우선 신경세포 외부에 베타아밀로이드(β-amyloid)라는 이상 단백질이 뇌 안에 축적되고, 그 후 신경세포 내부에 타우(tau) 단백질이 응집되어 시냅스의 손상을 가져오며, 궁극적으로 신경기능 부전 및 뇌세포 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다[2]. 또한, 알츠하이머병에서는 신경생화학적으로 해마와 측두엽의 콜린성 신경계 장해가 특히 현저하며, 이들 영역의 장해는 기억손상과 직 · 간접적

* 교신저자 : 장정희, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : pamy@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2256
· 접수 : 2010/03/06 · 수정 : 2010/03/29 · 채택 : 2010/04/08

으로 관련된다. 기저전뇌경로(basal forebrain pathway)의 콜린성 신경계의 생화학적 기능저하와 신경세포 소실은 알츠하이머병 연구자들이 일관되게 보고해온 사실이다[3]. 실제, 알츠하이머 환자에서는 해마와 대뇌피질에서 콜린 흡수(choline uptake)와 아세틸콜린 합성이 감소하는 것으로 확인 되었으며, 반대로 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholine esterase (AChE)의 발현은 높은 것으로 보고되고 있다[4]. 또한, 아세틸콜린을 합성하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도가 급격히 떨어지고 이는 해마에서 최대이며[5], 뇌에서 니코틴성 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(nicotinic and/or muscarinic acetylcholine receptor : nAchR and/or mAchR) 수가 감소된 것이 확인되었다[6]. 그러므로, 아세틸콜린 대사를 지표로 하는 항건망제 및 기억력 개선제의 개발은 알츠하이머 질환자의 삶의 질 향상과 초기 병증 개선 및 치료에 상당한 도움을 줄 수 있으며, 또한 기억인지력의 장애를 겪는 건망증 및 치매 환자에게도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

복신(茯神, Hoelen Cum Radix)은 소나무 뿌리에 기생하는 *Poria cocos* Wolf (*Pachyma hoelen* Rumphius)의 균핵으로 특히 松根을 싸고 있는 부위를 지칭하며, 寧心安神하는 효능이 뛰어나 心虛驚悸, 健忘, 失眠, 驚癎을 치료하는 데 쓰인다[7]. 복신이 구성 약재 중 하나로 쓰인 총명탕은 치매, 건망증에 대한 기억인지 개선효과[8,9], 알츠하이머병[10-12] 및 베타아밀로이드에 의한 세포독성[13] 보호 효능, 허혈성 뇌손상에서 인지장애 개선효과[14,15] 등 뇌기능저하에 대한 예방 및 치료효과가 있는 것으로 *in vitro* 세포 및 *in vivo* 동물실험을 통해 수차례 보고된 바가 있다.

따라서, 본 연구에서는 복신의 주치증상 중 건망에 중점을 두고 복신의 인지능, 기억력 향상 및 항건망 효과를 체계적으로 검토하고자, 스코폴라민(scopolamine)으로 기억력 손상을 유도한 실험동물을 사용하여 기억력을 측정하는 행동 실험으로 Y-미로(Y-maze)와 모리스 물-미로 (Morris water-maze) 실험을 실시하였다. 또한, 작용기전을 규명하기 위한 실험으로 아세틸콜린 가수분해 효소(acetylcholinesterase : AchE), 콜린 아세틸기 전이효소(choline acetyltransferase : ChAT), 무스카린성 아세틸콜린 수용체 (M1/M2 muscarinic acetylcholine receptor : mAchR), 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor : BDNF), 상위전사인자(cAMP response element-binding protein, CREB)의 활성 및 발현을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 실험동물

복신은 강원도 영월군 영월읍 덕호리에서 채취한 것을 세종약업사(대구)에서 구입하여 사료와 비슷한 크기로 곱게 분쇄하여 실험에 사용하였다. 기억 및 인지 장애를 일으키는 물질인 스코폴라민은 Sigma사(St. Louis, MO, 미국)의 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용된 실험동물은 효창사이언스(대구)에서 구입한 8주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat, SD rats)로 행동실험 실시 6일 전에 대구한의대학교 상동캠퍼스 사육실에서 하루의 적응시간을 가진 후 5일간 실험 전 처리기간을 두었다. 사육실의 온도는 22-24℃, 습도는 55-65%가 되도록 유지하였으며, 조명은 낮 12시간-밤 12시간 주기로 조절하였다. 실험동물은 정상군(Sham), 스코폴라민을 처리한 기억손상 유발군(SCO), 스코폴라민과 함께 복신을 섭취시킨 실험군(SCO + PC)의 3개 그룹으로 나누어 그룹당 9-11마리씩 배정하였다. 실험전 처리기간 및 행동실험 기간 동안의 약물투여는 가루 사료에 1 g/kg/day의 양으로 복신을 섞어 물과 함께 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 행동실험은 사료와 혼합된 복신을 모두 복용한 것이 확인 된 시점에 실시하였으며, 스코폴라민은 행동실험 30분 전에 0.75 mg/kg으로 복강투여 하였다.

2. 모리스 물-미로 실험(Morrs water-maze task)

물-미로 실험은 복신이 실험동물의 공간지각능력 및 단기, 장기 기억력의 회복(short and long-term memory recovery)에 도움을 주는지 측정하기 위한 실험이다. 실험장비는 원형의 수조(stainless steel, 지름 180 cm, 높이 60 cm)와 도피대(platform, 지름 12 cm), 도피대의 위치를 기억할 수 있는 네 개의 표지물로 이루어진다. 수조는 물(온도 22 ± 2℃)을 플랫폼 위 2 cm의 높이로 채우며, 랫트가 도피대에 앉으면 몸이 물 밖으로 나올 수 있도록 하였다. 물-미로 실험은 실험동물이 수조 주변의 표지물을 기억하여 도피대를 찾아가기 때문에 주변 환경의 변화가 없도록 표지물을 실험기간 동안 일정하게 유지하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 20초 이상 머무를 경우, 도피대를 찾아갈 때까지 소요되는 시간을 탈출잠복기(escape latency)로 하였으며, 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출잠복기(mean escape latency)로 하였다. 수조 위 천정에 카메라를 설치하여 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1, Noduls, 네덜란드)을 이용하여 탈출잠복기를 기록하였다. 실험은 5일 동안 매일 3회 실시하였으며, 이때 실험동물을 수조에 넣는 위치는 매회 순차적으로 달리하여 우연에 의해 도피대를 찾아가는 가능성을 최소화하였다. 만약, 실험동물이 90초 내에 도피대를 찾지 못하면 탈출잠복기를 90초로 하였으며, 실험동물이 도피대에 앉으면 20초간 두어 주변의 단서를 다시 기억할 수 있도록 하였다.

3. Y-미로 실험(Y‐maze task)

Y-미로 실험은 복신이 실험동물의 공간지각능력 및 단기 기억능력의 회복(short-term memory recovery)에 도움을 주는지를 알아보기 위한 실험이다. Y-미로 실험 장치는 검은 아크릴 판(가로 10 cm, 세로 41 cm, 높이 25 cm)으로 제작한 Y자 모양의 사방이 막힌 미로로 구성되어 있으며, 각 미로는 서로 120°의 일정한 각도로 배치되어 있다. 각각의 미로를 A, B, C 영역으로 정한 후 하나의 영역에 실험동물을 조심스럽게 놓고 8분간 자유롭게 움직이도록 한 다음, 실험동물이 들어간 영역을 천정에 설치한 카메라를 통해 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1)으로 관찰하여 기록하였다. 각 미로에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 변경행동력(spontaneous alteration, %)을 평가하였다. 세 곳의 다른 영역에 순차적으로 들어간 경우 1점(실제변경 : actual alteration, 즉

ABC, BCA, CAB 등의 순서)으로 인정하였다. 연속되게 들어가지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 따라서 % 변경행동력(% spontaneous alteration)은 다음과 같은 수식으로 계산하였다. % spontaneous alteration = 총 alteration 수/(총 입장 회수 - 2) x 100

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR은 아세틸콜린 가수분해 효소(acetylcholinesterase : AchE), 아세틸콜린 합성효소(choline acetyltransferase : ChAT), 무스카린성 아세틸콜린 수용체 (muscarinic acetylcholine receptor : mAchR)의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 시행하였다. mRNA는 TRI reagent (Molecular Research Center, OH, 미국)로 실험동물의 뇌 해마부위로부터 추출하였다. 분리한 mRNA는 M-MLV 역전사 효소(Promega, WI, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 42℃에서 1시간 동안 역전사 시켰다. cDNA의 증폭은 하기와 같은 합성 프라이머(primer)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA들은 ethydiumbromide로 염색된 1.5 % 아가로즈 젤(agarose gel)에서 전기영동 한 뒤 UV를 조사하여 gel documentation system(TCP-20.M, Vilber Lourmat, 프랑스)으로 관찰하였다. glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 동일한 실험 조건 확인을 위한 대조 지표로 사용하였다.

Gene		PCR primer sequences
M1 AchR	Forward	5′-CAG AAG TGG AGA TGC C-3′
	Reverse	5′-GAG CTT TTG GGA GGC TGC TT-3′
M2 AchR	Forward	5′-TGC TGT GGC CTC CAA TAT GA-3′
	Reverse	5′-TGA CCC GAC GAC CCA ACT-3′
AChE	Forward	5′-AGA AAA TAT TGC AGC CTT TG-3′
	Reverse	5′-CTG CAG GTC TTG AAA ATC TC-3′
ChAT	Forward	5′-AGG GTG ATC TGT TCA CTC AG-3′
	Reverse	5′-TCT TGT TGC CTG TCA TCA TA-3′
GAPDH	Forward	5′-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3′
	Reverse	5′-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3′

5. Western Blot analysis

Western blot은 아세틸콜린 합성효소 ChAT와 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 단백질 발현을 측정하기 위하여 시행하였다. 행동실험이 끝난 실험동물의 뇌에서 해마 부분을 분리하여, 차갑게 한 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, protease inhibitor cocktail)로 균질화(homogenation)하였다. 이후 4℃에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량을 BCA시약으로 정량 한 뒤, 30 μg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 겔을 PVDF membrane (Pall Corporation, 미국)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST [인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS), 0.1% Tween-20]로 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 일차항체를 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 10분간 3회 세척한 뒤 이차항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음 PBST용액으로 다시 10분간 3회 세척하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) 용액(Amersham Pharmacia Biotech., IL, 미국)을 사용하여 1분간 반응시킨 뒤 Chemiluminescent Immunoblotting Imaging (UVP, CA, 미국) 장비를 이용하여 촬영하였다.

6. 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

면역조직화학염색은 상위전사인자 p-CREB의 발현 양상을 측정하기 위하여 시행하였다. 행동실험이 끝난 실험동물을 엔토발(entobal, 50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 다음 4% 파라포름 알데히드(paraformaldehyde) 용액으로 전신관류 시켜서 고정시켰다. 뇌를 적출하여 고정액에 24시간 동안 담가두며(post-fixation), 이후 10%, 20% sucrose 용액에 12시간씩 각각 순차적으로 교환해 준 다음 30% sucrose 용액에서 3일간 보관하였다. 냉동절편은 냉동조직절편기(Cryotome, Leica CM1850 cryostat, 독일)를 사용하여 30 μm 두께로 자르며, 면역조직화학염색을 시행하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 자른 조직을 PBS로 10분간 2회 세척한 다음 2% Triton X-100에 5분, 0.6% H_2O_2에 5분간 반응시킨 후 PBS로 다시 10분간 2회 세척하여 3% bovine serum albumine으로 상온에서 30분간 blocking 하였다. 1% bovine serum albumin이 포함된 PBS에 1:250으로 희석한 일차항체를 4℃에서 24시간 동안 반응시키고, PBS로 10분간 3회 세척하였다. Biotinylation된 이차항체를 1시간 동안 실온에서 붙인 다음 다시 PBS로 10분간 3회 세척하고 avidin-biotin peroxidase complex로 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 이후 0.003% hydrogen peroxide를 포함한 0.02% 3,3′-diaminobenzidine 용액으로 10분간 실온에서 발색시켜 광학현미경(Labomed, CA, 미국)으로 관찰하였다.

7. 통계처리

실험결과의 통계 처리는 SPSS Version 16.0을 사용하였다. 실험결과는 평균 ± 표준오차(mean ± S.E.) 또는 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었다. 약물의 효과를 판단하기 위하여 일원배치 분산분석 (one way ANOVA)을 수행하였으며, 다중분석을 위하여 Turkey test를 사후검정으로 실시하였다. p값이 0.05이하일 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

1. 물-미로 실험으로 측정한 복신의 기억력 향상 효능

스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 복신의 효과를 검토하기 위하여, 공간지각능력 및 단기, 장기 기억력을 측정하는 물-미로 실험을 수행하였다. 스코폴라민은 아세틸콜린 수용체 길항제로 작용하여 기억력을 손상시키는 것으로 알려져 있다. 실험동물이 주변의 단서를 파악하여 숨겨진 도피대를 찾는데 걸리는 평균탈출시간(mean escape latency)을 지표로 기억력을 비교한 결과, 정상군(Sham)과 스코폴라민만 투여한 그룹(SCO)의 경

우 훈련 둘째, 넷째, 다섯째 날 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 1A). 정상군의 경우 훈련 기간이 길어질수록 도피대를 찾아가는 시간이 현저히 감소되었으며, 스코폴라민만 복강으로 투여한 그룹의 경우 훈련 기간과 관계없이 거의 도피대를 찾아가지 못하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1A). 한편, 복신을 함께 투여한 그룹(SCO + PC)은 스코폴라민만 단독으로 투여한 군에 비하여 평균탈출시간이 짧아져 정상군과 유사한 수준으로 감소되었다(Fig. 1A). 스코폴라민을 단독으로 투여한 그룹과 복신을 함께 투여한 그룹의 평균탈출시간은 넷째날 각각 71.83 ± 6.97초와 35.93 ± 6.09초로 36.90초의 차이를 보이고 있으며, 다섯째 날 역시 각각 67.90 ± 6.94초와 25.96 ± 3.28초로 41.94초의 차이를 보여 통계적으로 유의성 있는 기억력 향상 효과를 나타내었다(Fig. 1B). 특히, 정상군과 복신을 투여한 실험군의 경우 둘째 날 이후 안정화된 감소 그래프를 보여 이후 나흘간의 실험기간 동안 장기 기억을 형성함을 볼 수 있다. 각 그룹의 실험동물이 5일간의 훈련기간 동안 도피대를 찾아가는 대표적인 경로를 Fig. 1C에 훈련일수에 따라 배열하였다.

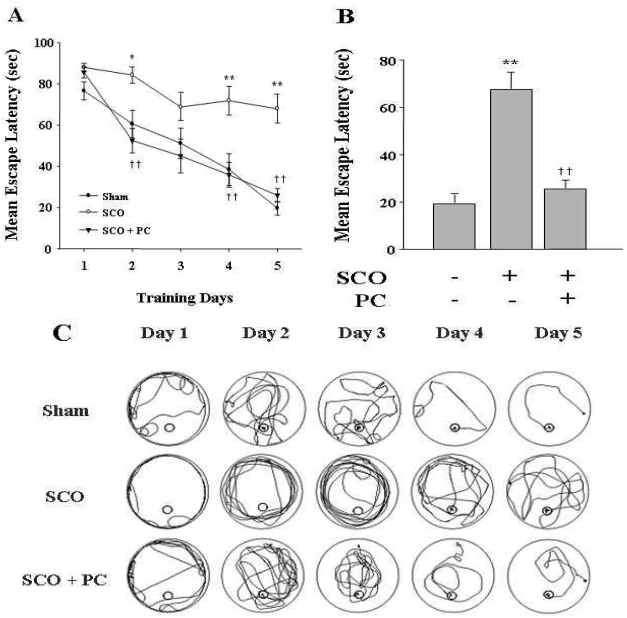

Fig. 1. Memory enhancing effect of *Poria cocos* on the Scopolamine-induced amnesia in SD rats as assessed by Morris water-maze test. A. Rats were given three trial each day for consecutive five days. The mean escape time taken to find the hidden platform was monitored and calculated. B. Long-term memory comparison among three groups on the last training day. The values are mean ± S.E.. The data were analyzed by One-way ANOVA followed by Turkey test as post-hoc analysis for the multiple comparison *p < 0.05, **p<0.01 : Sham group vs. SCO group, ++p < 0.01 : SCO group vs. SCO + PC group). C. The typical trace of swimming paths during five consecutive training days in the Morris water-maze test are represented.

2. Y-미로 실험으로 측정한 복신의 기억력 향상 효과

스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 복신의 효과를 검토하기 위한 또 다른 행동실험으로 Y-미로 실험을 수행하였다. 실험동물이 주변의 단서를 파악하여 순차적으로 미로를 들어가는 상대적 빈도를 측정한 변경 행동력 점수(spontaneous alteration %)에서 정상군(Sham), 스코폴라민만 단독으로 투여한 대조군(SCO), 스코폴라민과 복신을 동시에 투여한 실험군(SCO + PC) 사이에 통계적으로 유의한 차이를 관찰 할 수 있었다. 즉, 스코폴라민만 복강으로 투여한 그룹(SCO)의 경우 기억력이 손상되어 변경 행동력 점수가 평균 43.79 ± 3.76%인 반면 정상군(Sham)은 평균 74.15 ± 2.23%를 기록하였다(Fig. 2A). 한편, 복신을 함께 투여한 실험군(SCO + PC)의 경우 55.00 ± 0.98%를 기록하여, 스코폴라민 단독 투여군과 통계적으로 유의한 인지기억력 향상을 보여 주었다(Fig. 2A). 실험동물을 전반적인 움직임을 비교하기 위하여 미로를 방문한 총 횟수를 비교한 결과, 스코폴라민 단독 투여군은 정상군에 비하여 감소하는 경향을 보였으며, 복신을 투여한 실험군에서는 활동성이 상대적으로 증가되었다(Fig. 2B).

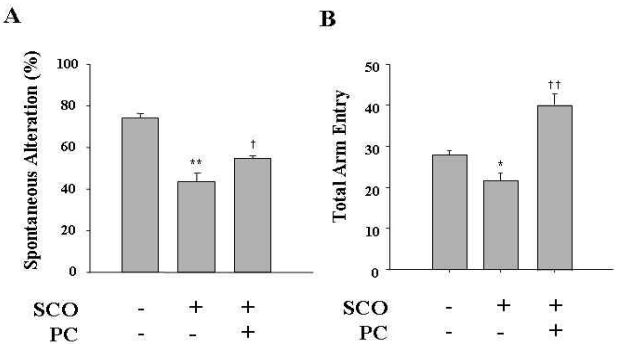

Fig. 2. Protective effect of *Poria cocos* on the memory impairment caused by scopolamine in SD rats as measured by Y-maze test. A. Spontaneous alteration (%) was calculated as follows. Spontaneous alteration (%) = total number of alteration / (total number of arm entry - 2) x 100. The values are mean ± S.E.. B. Total number of arm entry under the same experimental condition was represented as mean ± S.E.. The data were analyzed by One-way ANOVA followed by Turkey test as post-hoc analysis for the multiple comparison (*p < 0.05, **p<0.01 : Sham group vs. SCO group, +p < 0.05, ++p < 0.01 : SCO group vs. SCO + PC group).

3. 아세틸콜린관련 대사효소 및 수용체 발현

복신의 인지기억력 향상효과의 기전을 검토하기 위하여 기억과 학습에 있어 중심적인 역할을 담당하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 생성, 분해 및 작용에 영향을 줄 수 있는 가수분해효소, 전이효소를 비롯한 수용체의 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. 동물모델에서 기억력 감퇴 유발 물질로 통상적으로 쓰이는 스코폴라민은 콜린성 신경계 시냅스후부(postsynapse)에 있는 무스카린성 수용체(muscarinic receptor)의 작동부위에 직접 결합하여 아세틸콜린과 수용체의 결합을 경쟁적으로 차단한다. 이에 따라 정보전달을 일시적으로 차단함으로써 학습과 기억력을 손상시키게 된다. 행동실험을 마친 실험동물로부터 해마(hippocampus)를 분리하여 아세틸콜린의 가수분해에 관여하는 효소인 acetylcholinesterase (AchE)와 아세틸콜린의 합성에 관여하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT)의 mRNA 및 단백질 발현을 각각 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였다. 그 결과, 정상군과 스코폴라민을 단독으로 투여한 그룹에 비해 복신을 투여한 실험군에서 AchE의 mRNA 발현량이 감소되었으며, 반대로 ChAT의 mRNA 발현은 현저히 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3A). ChAT의 단백질 발현을 측정한 Western blot에

서도 동일한 양상을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이후 실험에서는 무스카린성 아세틸콜린 수용체인 M1 및 M2 수용체의 mRNA 발현에 대한 복신의 효과를 검토하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 스코폴라민을 처리함으로써 해마에서 M1/M2 수용체 mRNA 발현 자체는 각각 정상군과 비교하여 감소 경향을 보이거나 큰 변화가 없었으나, 복신을 투여한 실험군에서 그 양이 현저히 증가되었으며, 특히 M2 수용체에 대한 작용이 뚜렷하였다(Fig. 4).

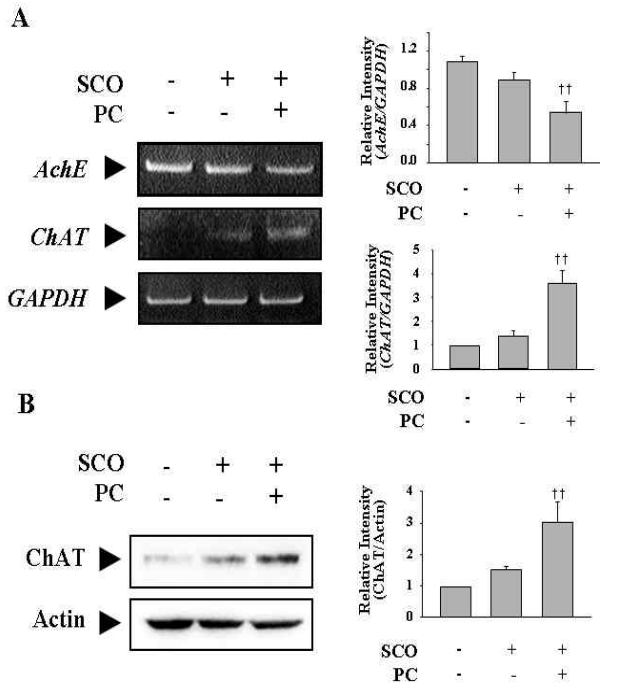

Fig. 3. Effect of Poria cocos on the mRNA and protein expression of AchE and ChAT. A. Effect of *Poria cocos* on the mRNA levels of AchE and ChAT in rat hippocampus. The mRNA expression was measured by RT-PCR using specific primers. GAPDH levels were compared for the equal loading control. B. Effect of *Poria cocos* on the protein levels of ChAT in rat hippocampus. Protein expression was measured by Western blot analysis using anti-ChAT specific antibody. Actin levels were compared for the confirmation of equal amount of protein loading in each group. Quantitative analysis of relative band intensity for AchE/GAPDH, ChAT/GAPDH, and ChAT/actin was represented on the right panel. The data are represented as mean ± S.D. (*p < 0.05, **p<0.01 : Sham group vs. SCO group, ++p < 0.01 : SCO group vs. SCO + PC group).

4. 신경영양인자 발현 및 상위 전사인자 활성화

복신이 인지기억력 향상효과를 갖는 또 다른 작용 기전으로 신경영양인자(neurotrophic factor) 중 BDNF의 발현 및 상위 전사인자 CREB의 활성을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. 단기간의 스코폴라민 투여로 인하여 BDNF의 단백질 발현에는 큰 영향이 없었지만, 복신을 투여함으로써 현저히 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 5A). 한편, 이러한 BDNF의 발현 조절에는 다양한 상위 전사인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 CREB가 주목을 받고 있다. CREB은 기억이나 시냅스 가소성(synaptic plasticity)과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자로, CREB의 활성화는 기억 형성 및 강화와 관련된 유전자의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 스코폴라민을 복강으로 투여하여 기억력을 손상시킴으로써 인산화된 CREB (p-CREB)의 양이 해마부위에서 현저히 감소하는데 반하여, 이는 복신을 투여함으로써 정상군과 유사한 수준으로 증가됨을 면역조직화학염색법을 통하여 관찰하였다(Fig. 5B).

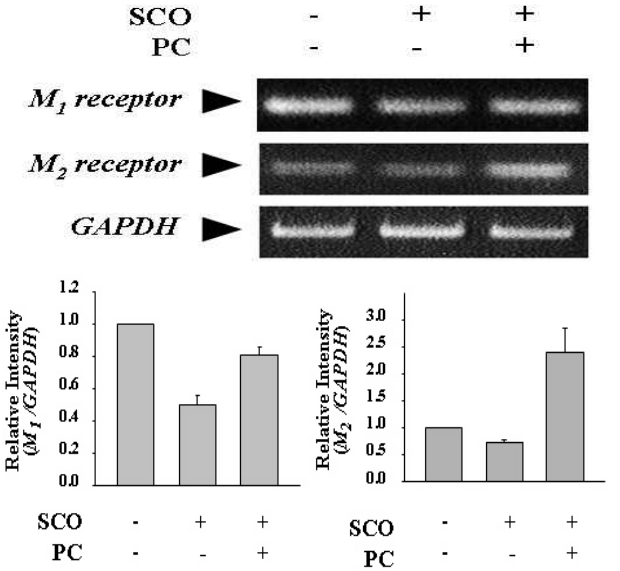

Fig. 4. Effect of Poria cocos on the mRNA levels of M1 and M2 receptors. The total mRNA isolated form rat hippocampus was amplified by RT-PCR using specific primers. Equal amount of mRNA loading was verified by comparing GAPDH levels. Quantitative analysis of relative band intensity for M1 receptor/GAPDH and M2 receptor/GAPDH was represented on the right panel. The data are represented as mean ± S.D. (**p<0.01 : Sham group vs. SCO group, ++p < 0.01 : SCO group vs. SCO + PC group).

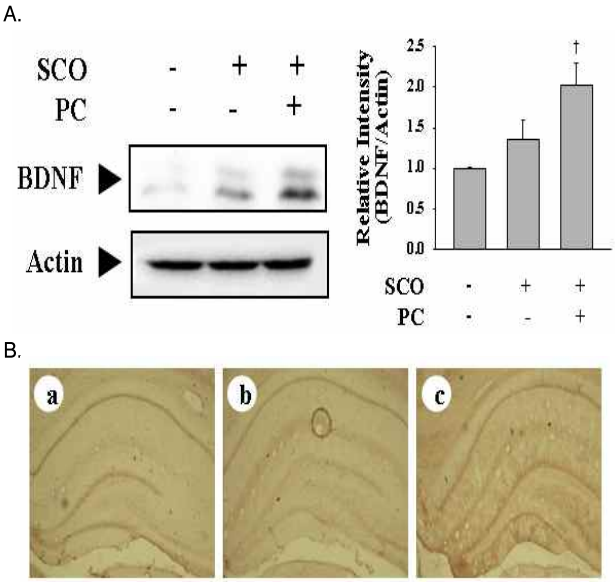

Fig. 5. Effect of *Poria cocos* on the expression of BDNF and activation of CREB. A. The protein levels of BDNF in rat hippocampus was measured by Western blot analysis using anti-BDNF specific antibody. Actin levels were assessed for the confirmation of equal amount of protein loading. Quantitative analysis of relative band intensity for BDNF/actin was represented on the right panel. The data are represented as mean ± S.D. (*p < 0.05, **p<0.01 : Sham group vs. SCO group, +p < 0.05 : SCO group vs. SCO + PC group). B. The activation of CREB via phosphorylation in rat hippocampus was analyzed by immunohistochemistry using anti-pCREB specific antibody. Representative images from each group are shown. a, sham group; b, scopolamine alone-treated group (SCO); c, scopolamine-injected group with Poria cocos intake (SCO + PC).

고찰 및 결론

복신의 인지 및 기억력 향상 효과를 관찰하기 위하여 스코폴라민으로 유도한 건망증 랫트 모델을 이용하여 실시한 행동실험(물-미로 및 Y-미로 실험)에서, 통계적으로 유의성 있는 복신의 인지 및 기억력 향상 효과를 관찰할 수 있었다. 물-미로 실험은 해마의존성 공간인지 기억력을 측정하기 위해 사용되며, 훈련 5일간에 걸친 평균탈출잠복기(mean escape latency)의 안정성은 장기 기억력의 형성으로, 매회 실시한 실험들의 탈출잠복기(escape latency)들 사이의 일정성은 단기 기억력의 형성으로 볼 수 있다[16]. 복신을 투여한 실험군의 경우 스코폴라민만을 단독으로 투여한 그룹과 비교해 볼 때, 넷째 날과 다섯째 날의 평균탈출잠복기가 각각 스코폴라민 투여군의 50%, 38% 수준으로 감소하여 정상군과 유사한 정도로 나타나 통계적으로 유의한 공간인지 기억력의 향상을 보였다. Y-미로 실험에서 나타난 변경행동력(spontaneous alteration %)은 주로 단기 공간인지 기억력 회복의 지표로 사용 된다[17]. 복신을 투여한 실험군의 경우 스코폴라민만 단독으로 투여한 그룹에 비해 변경행동력의 유의한 향상을 보였다.

한편, 이러한 복신의 인지기억력 향상효과는 콜린신경계 세포에서 아세틸콜린의 합성, 분해, 분비 및 아세틸콜린 수용체와 관련지어 그 기전을 생각해 볼 수 있다. 알츠하이머병에서의 콜린성신경계의 결손과 이로 인한 인지기억력 장해는 널리 알려진 사실이다. 아세틸콜린을 합성하는 효소인 ChAT의 활성은 기본적인 뇌기능의 수행하는데 있어 콜린신경계의 신경발달 및 활동과 관련하여 대단히 중요하다. 콜린성신경계 퇴행에서 ChAT의 활성 감소는 여러 연구를 통해 확인된 바 있으며, 이러한 활성저하는 특히 해마에서 최대이며, 최대 95% 수준까지 활성이 감소하는 것으로 보고되고 있다[5]. 따라서 ChAT의 증가에 의한 아세틸콜린 합성능의 향상은 인지기억력 장해 해소에 효과가 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 행동실험에 사용된 랫트의 뇌 해마조직에서 mRNA를 분리하여 ChAT에 대한 RT-PCR을 수행한 결과 복신을 투여한 실험군에서 유전자의 양이 증가함을 관찰하였으며, ChAT 단백질 발현을 Western blot으로 측정한 결과 또한 스코폴라민 단독 투여군 보다 복신을 함께 투여한 실험군에서 현저하게 증가한 것을 볼 수 있었다.

아세틸콜린을 분해하는 효소 AChE의 억제제는 현재 임상적으로 널리 사용되고 있는 약물이며, 이러한 AChE 억제작용은 6-12개월의 단기간의 인지능력 개선을 가져오는 것으로 알려져 있다. 또한, AChE 억제제를 투여함으로써 알츠하이머병 환자들은 기본적인 일상생활 기능수행 저하로 인한 요양기간을 단축할 수 있으며, 인지기능의 감퇴 속도를 저하시킬 수 있다[3]. AChE 억제제는 간접적으로 콜린신경 말단의 시냅스 공간에 아세틸콜린을 축적시켜, 내인성 아세틸콜린의 작용을 연장시킴으로써 중추적 콜린 활성을 증가시킨다. 기존의 인지기억력 개선을 위한 한약재의 AChE 억제능을 연구한 *in vitro* 실험에서, 복신의 메탄올 및 열수 추출물이 AChE 활성 억제 작용이 있음을 보고한 바 있다[18]. 본 연구에서도 행동실험을 마친 실험동물의 해마에서 mRNA를 분리하여 AchE에 대한 RT-PCR을 수행한 결과 스코폴라민만을 단독으로 투여한 그룹보다 복신을 함께 투여한 실험군에서 그 양이 일정수준 감소됨을 관찰 할 수 있었다. 따라서 복신의 AchE 억제능이 랫트의 행동실험에서 나타난 인지기억능 향상에 기여하였을 가능성을 고려해 볼 수 있다.

또한, 알츠하이머병에서는 아세틸콜린과 관련되어, AchE 활성화 및 ChAT 억제와 더불어 현저한 무스카린성 수용체의 감소가 관찰되었다[6]. 본 실험에서 사용된 스코폴라민은 무스카린성 수용체에 대한 경쟁적 길항제로써 인지기억력 장애를 나타내게 되며, 수용체의 아형에 대한 선택성은 없다[19]. M1 수용체는 콜린성 효과와 관련된 인지기억력에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 동물실험에서 M1 수용체 길항제인 pirenzepine이 공간 기억력에 심각한 손상을 주는 것으로 확인 되었으며[20], M1 수용체를 knockout 시킨 생쥐는 심각한 working memory 기능 손실을 보이는 것으로 관찰되었다[21]. M2 수용체 역시 기억형성에 중요한 역할을 담당하고 있다. M2 수용체를 knockout시킨 생쥐는 working memory에 심각한 손상을 보이며, 인지기억력과 관련된 해마의 콜린성 기능 조절 역시 장애를 보였다[22]. 따라서, M1 및 M2 수용체의 저하는 콜린성 효과와 관련한 인지 기억력에 심각한 손상을 주는 것으로 판단된다. 본 연구에서 행동실험을 마친 실험동물의 해마에서 mRNA를 분리하여 M1/M2 수용체에 대한 RT-PCR을 수행한 결과 스코폴라민만을 단독으로 투여한 그룹보다 복신을 함께 투여한 실험군에서 그 양이 증가됨을 관찰 할 수 있었다. 특히, 이러한 작용은 M2 수용체에서 탁월하였다.

따라서 랫트의 행동실험에서 나타난 복신의 인지기억력 향상효과는 복신의 뇌신경세포에서 ChAT 증가에 의한 아세틸콜린 합성 증가, AchE 억제에 의한 시냅스 연접에서 아세틸콜린의 작용연장 효과, M1/M2 수용체 증가 효과에 의한 콜린성신경계의 신호전달 강화에 기인한 것으로 사료된다. 특히, 아세틸콜린의 소포 유리에는 신경세포 말단부위에서 Ca^{2+}의 세포질내 유입으로 매개되는 것으로 알려져 있으며, 이전의 연구에서 복신의 열수추출물이 농도 의존적으로 해마의 신경세포에서 세포질 내 자유 Ca^{2+}의 농도를 증가시키는[23] 것을 미루어 볼 때 복신의 신경세포질 내 자유 Ca^{2+}의 농도증가는 아세틸콜린의 소포유리를 증가시킬 것으로 추정해 볼 수 있다.

이외에도, 복신의 인지기억력 향상효과의 기전은 신경영양인자(neurotrophic factor) 발현 증가, 상위 전사인자 조절의 관점에서도 생각 해 볼 수 있다. 그 중 BDNF는 중추신경계 특히 해마에서 높은 수준으로 발현되며, 신경세포의 성장과 생존을 조절하는 역할을 담당하는 신경영양인자로, 알츠하이머 환자의 경우 특히 해마 형성체에 BDNF mRNA 발현이 감소되는 것으로 보고되었다[24]. BDNF는 해마와 전뇌기저부의 콜린성 뉴런의 생존과 분화를 촉진시키며, 아세틸콜린의 합성과 관련된 효소의 활성을 증가시키고[25], 더 나아가 시냅스 가소성을 강화시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다[26]. 이러한 효과로 보아 BDNF의 부족이나 결핍이 인지기억능력에 장애를 초래할 것으로 추측할 수 있다. 본 연구에서 행동실험을 마친 실험동물의 해마에서 단백질을 분

리하여 BDNF의 발현을 Western blot으로 측정한 결과 복신을 투여한 실험군에서 그 양이 증가됨을 관찰 할 수 있었다. 따라서 복신의 투여가 BDNF의 발현을 증가시켜 인지기억력 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 추측할 수 있다.

단기 기억력의 형성은 뉴런에 이미 존재하는 단백질의 조절과 관계있으나, 장기 기억력의 형성은 새로운 mRNA와 단백질의 합성을 필요로 한다[27,28]. CREB은 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 부착되는 대표적인 전사인자로, CREB knockout 생쥐는 물-미로 실험에서 해마 의존성 공간인지 기억력에 장애를 보이는 것으로 보고되었다[29]. Mizuno 등은 radial arm maze를 이용한 공간인지학습을 통해 랫트의 해마에서 protein kinase A (PKA)와 p-CREB의 유의한 증가를 관찰하였으며, 이는 공간기억형성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다[30]. 본 연구에서 행동실험을 마친 실험동물의 뇌를 분리해 냉동조직절편을 제작하여 인산화를 통하여 활성화된 p-CREB의 발현을 조직면역화학염색법으로 측정한 결과, 스코폴라민만을 단독으로 투여한 그룹에서 감소된 p-CREB가 복신을 함께 투여한 실험군에서 현저히 증가됨을 관찰 할 수 있었다.

즉, 복신으로 유도된 CREB의 활성화는 인지기억력과 관계된 여러 유전자의 전사를 촉진하여, M1 및 M2 수용체의 수를 증가시키며, BDNF의 농도를 증가시켜 인지기억력을 향상시킬 수 있다. 또한, 복신이 신경 세포질 내 자유 Ca^{2+}의 농도를 증가시켜, 세포 내 여러 가지 신호 전달 체계를 활성화 시킴으로써 CREB의 인산화를 유도하여 핵으로 기억형성과 관련된 유전발현 신호를 전달할 수 있을 것으로 사료 된다[31]. 그러나 이러한 복신의 인지기억력 향상과 관련된 분자생물학적 작용기전의 명확한 상관관계의 규명을 위해서는 후속 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

결론적으로, 스코폴라민으로 유도한 건망증 랫트를 이용한 동물행동실험(물-미로, Y-미로 실험)에서 복신을 1 g/kg/day로 투여한 실험군은 유의성 있는 인지기억력의 향상을 보였으며, 이러한 복신의 인지기억력 향상효과는 아세틸콜린 대사와 관련되어 ChAT 및 M1/M2 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 mRNA 발현 증가, 상위 전사인자 CREB의 활성화를 통한 신경영양인자인 BDNF의 단백질 발현 증가에 기인한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터) 및 보건복지가족부 보건의료연구개발사업(A090663)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. San Diego, U.S.A., Elsevier Saunders. pp 1386-1388, 2004.
2. 이광우. 신경과학. 서울, 범문사, pp 369-370, 2005.
3. 대한정신의학회. 신경정신의학. 서울, 중앙문화사, pp 507-509, 2007.
4. Talesa, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev. 122(16):1961-1969, 2001.
5. Kasa, P., Rakonczay, Z., Gulya, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. Prog Nuurobiol. 52(6):511-535, 1997.
6. Pákáski, M., Kálmán, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 53(5):103-111, 2008.
7. 전국한의과대학 본초학공동교재 편저위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 345-346, 2007.
8. 김영욱, 송태원, 오민석. 총명탕이 건망유도백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 8(2):464-479, 1998.
9. 오영진, 김보경. 총명탕과 향부자총명탕의 추출물, 나노분말제형을 이용한 치매에 관한 연구. 동의신경정신과학회지 17(1):79-105, 2006.
10. 이승희, 이상룡, 정인철. 귀비총명탕 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(4):921-933, 2007.
11. 하수영, 이상룡, 정인철. 총명탕과 산사총명탕이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(1):59-78, 2006.
12. 박지운, 이상룡, 정인철. 총명탕과 목근피총명탕이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(1):37-57, 2006.
13. 국윤재, 최 혁, 김태헌, 강형원, 유영수. 베타아밀로이드 유도성 Neuro 2A 세포독성에 대한 총명탕의 효과. 동의생리병리학회지 18(5):1418-1425, 2004.
14. 김경윤, 이상영, 차대연, 이석진, 김계엽, 김행중, 정현우. 허혈성 뇌손상 백서에서 가감총명탕이 인지기능에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 22(3):556-561, 2008.
15. 안기영, 이성균, 이승희, 이재원, 신진봉, 송봉근, 이언정. 허혈유발 흰쥐에 있어서의 인지장애에 미치는 가감총명탕의 효과. 대한한의학회지 28(2):1-12, 2007.
16. Morris, R.G. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 11(1):47-60, 1984.
17. Olton, D.S., Papas, B.C. Spatial memory and hippocampal function. Neuropsychologia. 17(6):669-682, 1979.
18. Oh, M.H., Houghton, P.J., Whang, W.K., Cho, J.H. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. Phytomedicine. 11(6):544-548, 2004.
19. Blokland, A. Scopolamine-induced deficits in cognitive performance: A review of animal studies. Scopolamine Rev. pp 1-76, 2005.
20. Messer, W.S.Jr., Bohnett, M., Stibbe, J. Evidence for a preferential involvement of M1 muscarinic receptors in representational memory. Neurosci Lett. 116(1-2):184-189,

1990.

21. Anagnostaras, S.G., Murphy, G.G., Hamilton, S.E., Mitchell, S.L., Rahnama, N.P., Nathanson, N.M., Silva, A.J. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. Nat Neurosci. 6(1):51-58, 2003.
22. Seeger, T., Fedorova, I., Zheng. F., Miyakawa. T., Koustova. E., Gomeza. J., Basile. A.S., Alzheimer, C., Wess, J. M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. J Neurosci. 24(45):10117-10127, 2004.
23. Chen, W., An, W., Chu, J. Effect of water extract of Poria on cytosolic free calcium concentration in brain nerve cells of neonatal rats. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 18(5):293-295, 1998.
24. Murray, K.D., Gall, C.M., Jones, E.G., Isackson, P.J. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor and type Ⅱ calcium/calmodulin-dependent protein kinase messenger RNA expression in Alzheimer's disease. Neuroscience. 60(1):37-48, 1994.
25. Alderson, R.F., Alterman, A.L., Barde, Y.A., Lindsay, R.M. Brain-derived neurotrophic factor increses survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. Neuron. 5(3):297-306, 1990.
26. McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 22: 295-318, 1999.
27. Martin, K.C., Barad, M., Kandel, E.R. Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. Curr Opin Neurobiol. 10(5):587-592, 2000.
28. Kelleher III, R.J., Govindarajan, A., Tonegawa, S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. Neuron. 44(1):59-73, 2004.
29. Bourtchouladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. Cell. 79(1):59-68, 1994.
30. Mizuno, M., Yamada, K., Maekawa, N., Saito, K., Seishima, M., Nabeshima, T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. Behav Brain Res. 133(2):135-141, 2002.
31. West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E. Calcium regulation of neuronal gene expression. Proc Natl Acad Sci USA. 98(20):11024-11031, 2001.