

마우스에서 흑지마 에탄올 추출물의 기억력 증진 효과 및 기억력 감퇴에 대한 개선 효과

김종민¹ · 김동현¹ · 박세진¹ · 정지욱³ · 류종훈^{1,2,4*}

¹경희대학교 나노의약생명과학과, ²한약학과, ³대구한의대학교 한약재약리학과, ⁴경희동서약학연구소

Memory Enhancing Properties of the Ethanolic Extract of Black Sesame and its Ameliorating Properties on Memory Impairments in Mice

Jong Min Kim¹, Dong Hyun Kim¹, Se Jin Park¹, Ji Wook Jung³ and Jong Hoon Ryu^{1,2,4*}

¹Department of Life and Nanopharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University,
Hoeki-dong, Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701, Korea

²Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Hoeki-dong,
Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701, Korea

³Department of Herbal Medicinal Resource, College of Health and Welfare, Daegu Haany University,
Gyeongsan 712-715, Republic of Korea

⁴Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Hoeki-dong,
Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701, Korea

Abstract – Black sesame (*Sesami semen nigrum*) has been used to treat dizziness, earnoise, constipation in the traditional Chinese medicine. In the present study, we assessed memory enhancing properties of 70% ethanolic extract of black sesame (EBS70) and its ameliorating activities on learning and memory impairments induced by scopolamine. Drug-induced amnesia was made by scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.). Single EBS70 (200 mg/kg, p.o.) administration significantly enhanced cognitive function and attenuated scopolamine-induced cognitive impairments as determined by the passive avoidance and Y-maze tasks ($P<0.05$) and also reduced escape-latency on the Morris water maze task ($P<0.05$). In addition, EBS70 increased BDNF expression in hippocampus 4 h after its administration ($P<0.05$). These results suggest that EBS70 enhances learning and memory in normal state and attenuates amnesic state caused by cholinergic dysfunction.

Key words – Black sesame, memory, passive avoidance task, Y-maze task, Morris water maze task

과학의 발달로 인해 생활이 고차원화되고 의학의 발달로 인해 평균수명이 증가되는 현대 사회에서 인지기능과 기억력은 학습량이 큰 청소년에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이 되고 있다. 기억력의 저하는 현대 사회 활동에서 문제점을 일으키고, 치매와 같은 퇴행성 질환으로 발달하는 경우에는 사회 생활 자체를 불가능하게 할 수 있기 때문에 이에 대한 연구의 중요성은 날로 증대되고 있다. 치매는 기억력과 감각, 공간 및 지각능력이 감퇴되는 후천적 만성 퇴행성 질환으로서 혈관성 치매 (cerebrovascular dementia)와 알츠하이머성 치매 (Alzheimer's dementia)가 대표적이며, 65세 이상의 치매 환자에서는 50~60%가 알츠하

이머성 치매로 알려져 있다.^{1,2)}

이러한 기억력의 저하 및 알츠하이머성 치매는 콜린성 신경세포 퇴화에 의한 acetylcholine의 부족이 중요한 원인 중의 하나이며, 이러한 현상은 acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase (AChE)의 활성 증가로 더욱 심화된다.³⁾ 따라서 그 동안 tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine 등의 AChE 억제제가 알츠하이머 치료제로 개발되어 왔다.^{4,7)} 하지만 아직 직접 뇌세포를 재생시키거나 뇌세포 손상을 억제하기가 어렵기 때문에, 효과적인 인지기능 개선제를 개발하는 것은 치매 환자의 증상 호전 뿐만 아니라 정상인의 기억력 증진제로도 의미가 있다.

이러한 합성 약품을 통한 기억력 개선제 개발의 어려움으로 인해, 최근 천연물을 통한 인지기능 개선제의 검색과 개

*교신저자(E-mail): jhryu63@khu.ac.kr
(Tel): +82-2-961-9230

발이 주목받고 있다. 대표적으로 인삼, 은행엽, 세이지 추출물 등이 각광 받고 있으며, 이러한 천연 의약품들은 생산 비용의 저렴함과 적은 부작용으로 인해 많은 인기를 얻고 있다.^{8,9)} 하지만 천연물을 통한 기억력 개선제들은 대부분 합성 의약품인 AChE 억제제보다 효과가 약하기 때문에 아직도 많은 개발이 이루어져야 한다.¹⁰⁾

본 실험에 사용한 흑지마 (黑芝麻; *Sesami Semen Nigrum*)는 참깨과 (Pedaliaceae)에 속한 일년생 초목인 참깨 (*Sesamum indicum* L.)의 흑색 종자로, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 필수지방산 함량과 아미노산, 무기질, 토크페롤, β -sitosterol의 함량이 높을 뿐만 아니라, 주된 활성 성분인 sesaminol과 lignan glucosides의 경우 여러 세포 모델과 동물 실험 결과에서 t-butylhydroperoxide와 carbon tetrachloride 등의 화합물에 의한 산화적 손상을 억제하는 것으로 보고되어 있다.¹¹⁻¹³⁾ 또한, 상기 lignan 성분 중 sesaminol glucoside가 β -amyloid 단백질로 유도된 알츠하이머성 치매 모델에서 개선 효과가 있으며, 이를 포함하는 참깨 추출물이 노화축진 동물 모델에서 기억력 개선 효과가 있음이 보고된 바 있다.^{14,15)} 하지만 흑지마를 이용한 기억력 증강 효과, 또는 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서의 개선 효과에 대한 보고는 아직 이루어진 바 없기 때문에 이에 대한 효과를 *in vivo*에서 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

본 실험에서는 흑지마의 기억력 강화에 대한 효과를 수동회피 시험 (passive avoidance task)과 Y-미로 시험 (Y-maze task), 수중미로 시험 (Morris water maze task)을 통해 확인해 보고자 하였으며, 아울러 기억력 감퇴 또는 치매 모델에서의 기억력 개선 효과를 알아보기 위해 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델을 이용하여 같은 방법으로 실험하였다. 또한 흑지마의 기억력 증진효과의 기전을 알아보기 위해 western blot을 이용하여 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현양을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 수컷의 ICR 마우스 5주령을 주식회사 오리엔트 (경기도 성남시 중원구 상대원동)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 경희대학교 약학대학 동물실에서 7일간 적응시켰으며 적응기간 동안 동물실의 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 내외, 조명은 12시간 주기로 (07:30-19:30) 일정하게 유지 하였다. 실험동물은 적응 기간동안 사료와 물을 제한 없이 공급 받았다.

시료의 준비 - 본 실험에 사용한 흑지마는 경동시장 (서울)에서 구입하였다. 흑지마를 증류수로 2회 세척하고 분쇄한 후, 70% 에탄올을 흑지마 무게의 10배 부피만큼 가한 후 60°C 물중탕으로 추출하였다. 이를 농축하고 동결건조한

뒤 얻은 흑색 분말을 실험에 사용하였다 (수득률: 13%, 이하 EBS70이라고 함).

시험물질 - 본 실험에 사용한 scopolamine과 tacrine은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA.)의 제품을 사용하였으며, anti-BDNF 와 anti- β -actin 1차 항체, 그리고 peroxidase-conjugated anti-rabbit 2차 항체는 Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA) 에서 구입하였다. 나머지 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

수동회피 시험 (passive avoidance task) - EBS70 및 tacrine은 10% Tween 80에 녹인 후 경구 투여하였고 (5 ml/kg), 대조군에는 10% Tween 80을 같은 용량으로 경구 투여하였다. 경구 투여 60분 후에 행동 실험을 실시하였는데, 단 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델을 이용하여 실험 할 때에는 추가로 경구 투여 30분 후에 증류수에 녹인 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였다. 마우스를 조명을 비춘 밝은 쪽 방에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문 (guillotin door)을 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있게 하였다 (Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 각 방의 구획은 $20 \times 20 \times 20$ cm의 공간이다. 이때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 방으로 들어가지 않는 마우스는 실험에서 제외시켰다. 길로틴문이 열린 후 마우스가 어두운 방으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였으며 이를 학습 시험 (acquisition trial)이라고 정의하였다. 일단 마우스가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 기억력 증강 시험에서는 0.3 mA (scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델의 기억력 회복에 대해서는 0.5 mA)의 전기 자극을 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 하였으며 마우스가 이를 기억하도록 하였다.

학습 시험 (acquisition trial)이 끝난 지 24시간 후에 장기 기억에 미치는 EBS70의 효과를 확인하고자 수동회피 시험을 시행하였다. 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 방으로 마우스의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간 (latency time; 머무름 시간)을 600초까지 측정하였고, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서는 300초까지 측정하였다. 어두운 방으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다.¹⁶⁾

Y-미로 시험 (Y-maze task) - 약물 투여는 수동회피 시험 (passive avoidance task)에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로 시험에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지 (arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 팔이 접하는 각도는 120° 였다. 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성하였다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개

의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 (ABC, CAB, BCA; 실제 변경, actual alternation) 1점씩을 부여하였다. 변경 행동력 (alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.¹⁷⁾

$$\begin{aligned} & \text{변경 행동력 (\%)} \\ &= \text{실제변경 (actual alternation)} / \text{최고변경 (maximum} \\ & \quad \text{alternation)} \times 100 \\ & (\text{최고변경: 총 출입 횟수} - 2) \end{aligned}$$

수중미로 시험 (Morris water maze task) – 약물 투여는 수동회피 시험, Y-미로시험에서와 같은 방법으로 실시하였다. 수중미로 시험은 원형 pool (직경 90 cm, 높이 45 cm) 안에 물을 30 cm 높이로 채우고(23±2°C), 수조 4분면의 한 구획에 직경 10 cm의 도피대 (escape platform)를 수면아래 1 cm에 위치하도록 하고 검은색 식용색소를 풀어 도피대가 보이지 않게 하였다. 실험 첫날은 platform 없이 수조안에서 실험동물이 60초간 자유롭게 수영하도록 하였고, 4일 동안 매일 입수하는 사분면을 달리하여 기억력 증진 실험에서는 한 사분면당 1회씩, 최대 60초까지 (scopolamine 으로 유도시킨 기억력감퇴 모델에서는 최대 120초까지) 인지적응 훈련을 하였다. 실험동물이 platform에 도달하면 5초 동안 platform에 머물도록 하였으며, 최대 시간 안에 platform을 찾지 못할 경우에는 10초 동안 platform에 머물도록 하여 platform을 기억하도록 하였다. 실험 5일째에는 원형 pool에서 platform을 제거하고, 120초동안 그것을 찾게 하는 probe test를 실시하였다. 이 test에서는 원형 pool을 네 구역으로 나뉘었을 때, platform이 있던 사분면 안에서 머무는 시간 (exploring time in target quadrant)을 기록하였다.¹⁸⁾

Western blot analysis – EBS70이 BDNF의 발현에 미치는 시간대별 영향을 알아보기 위해, EBS70 (200 mg/kg) 투여 30분, 1시간, 2시간, 그리고 4시간 후에 마우스를 희생시켜 대뇌를 적출 후 해마를 분리하여 western blot sample을 얻었다. 이를 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml bacitracin, 10 µg/ml pepstatin, 15 µg/ml trypsin inhibitor, 50 mM NaF과 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4)에 넣고 균질화 하였다. 균질액은 10분간 얼음 속에 방치 후 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 단백질을 정량 후 사용하였다. 단백질의 정량은 Western blotting ECL kit (Amersham Co., England)를 사용하여 실시하였으며, 단백질 (30 µg)을 SDS-polyacrylamide gel (12%)에 reducing condition에서 전기 영동하였다. 단백질을 PVDF membrane에 transfer buffer [192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl (pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시켰다.

Blocking solution (5% skim milk)으로 3시간 동안 상온에서 blocking을 실시하고 이후 1:1000으로 희석한BDNF 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation하였다. Tris-buffered saline/ Tween 20로 10회 세척 후 1:2000으로 희석한 peroxidase-conjugated 2차 항체로 membrane을 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. 이후 chemiluminescence (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)으로 발광시켜 LAS-4000 mini (Fujifilm Lifescience USA, Stamford, CT)을 이용하여 분석하였다. 이후 20% glycine 용액으로 1시간 동안 상온에서 membrane을 stripping 한 후 1:2000으로 희석한 β-actin 항체를 이용하여 상기와 같은 방법으로 실시하였다.

통계처리 – 모든 실험 결과는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

EBS70의 수동회피 시험에서의 효과

EBS70 투여에 의한 정상 쥐에서의 기억력 강화 효과 여부와 scopolamine (1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델에서 EBS70이 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였다.

EBS70을 50, 100, 200 및 400 mg/kg의 용량으로 경구 단회 투여 했을 시 용량 의존적으로 latency time이 증가하였으며, 특히 200 mg/kg의 용량에서 대조군의 209% 수준으로 증가하는 것을 확인하였다 ($P < 0.05$, Fig. 1A).

한편 Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 모델 실험에서 scopolamine (1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의해 latency time이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다 ($P < 0.05$). 이는 학습시험 (acquisition trial)시의 전기 자극을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 scopolamine에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 판단되었다. 또한 EBS70의 50, 100, 200 및 400 mg/kg의 경구 단회 투여에 의하여 용량 의존적으로 latency time이 증가하였고, 200 mg/kg의 용량에서 scopolamine 단독 투여군의 241% 수준으로 회복하는 것을 확인하였다 ($P < 0.05$, Fig. 1B). 이것은 양성 대조군으로 사용한 tacrine (THA; 10 mg/kg, p.o.)이 scopolamine 단독 투여군의 276% 수준으로 latency time의 증가를 보여준 것에 크게 뒤지지 않는 개선 효과이다.

EBS70의 Y-미로 시험에서의 효과

정상 동물을 이용한 Y-미로 시험 결과, EBS70의 200 mg/kg 용량에서 spontaneous alternation이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 2A).

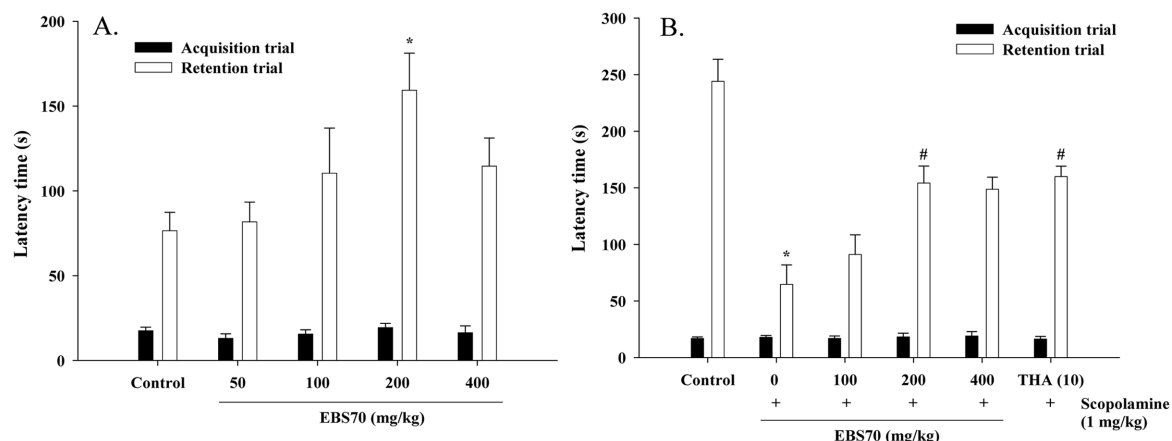


Fig. 1. Effects of EBS70 alone (A) and EBS70 with scopolamine (B) in the passive avoidance task. For the study of the effect of EBS70 alone, EBS70 (50, 100, 200 or 400 mg/kg) was administered 1 h before the acquisition trials. For the investigation of EBS70 on the scopolamine-induced memory deficit model, mice were treated with EBS70 (100, 200 or 400 mg/kg) or tacrine (10 mg/kg) 1 h before the acquisition trial. Memory impairment was induced by scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.), and acquisition trials were carried out 30 min after scopolamine treatment. At 24 h after acquisition trial, retention trial was carried out. Tacrine (THA) was used as positive control. Data represent means±S.E.M (n = 10) (* $P < 0.05$ versus vehicle-treated control group, # $P < 0.05$ versus the scopolamine treated group).

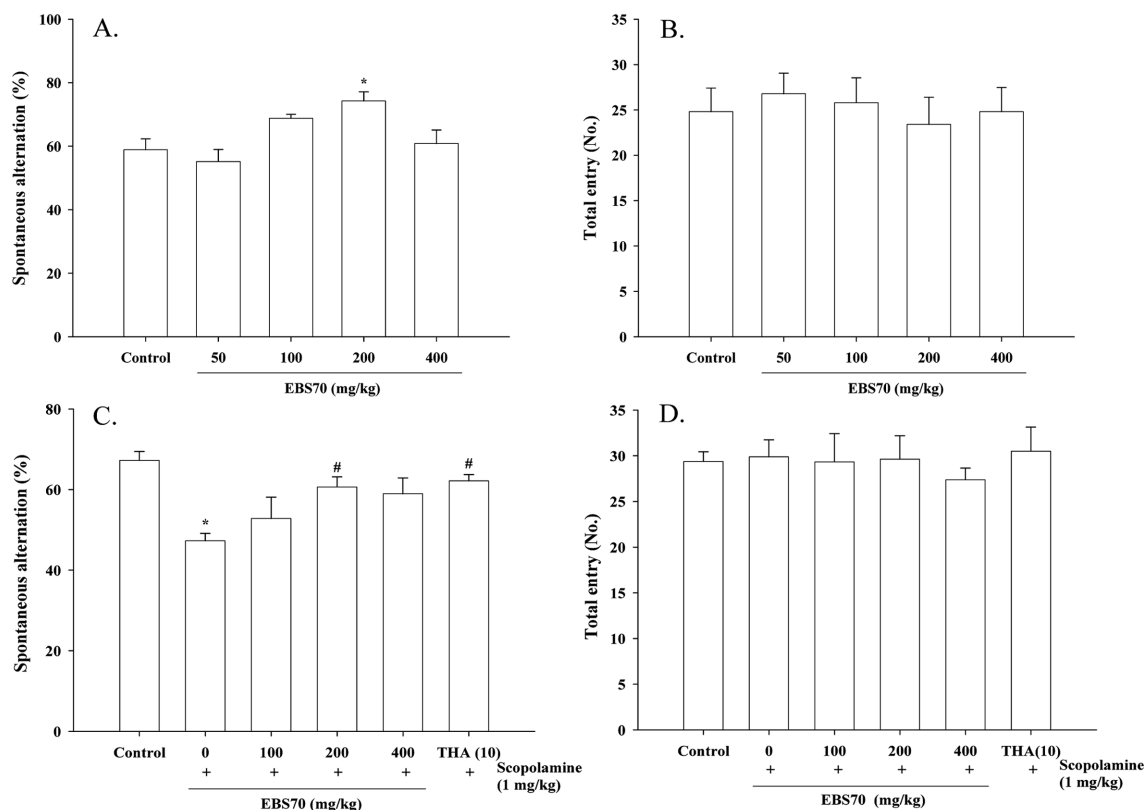


Fig. 2. Effects of EBS70 alone (A, B) and EBS70 with scopolamine (C, D) in the Y-maze task. For the study of the effect of EBS70 alone, EBS70 (50, 100, 200 or 400 mg/kg) was administered 1 h before the test. For the investigation of EBS70 on the scopolamine-induced memory deficit model, mice were treated with EBS70 (100, 200 or 400 mg/kg) or tacrine (10 mg/kg) 1 h before the test. Memory impairment was induced by scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.), and the test was carried out 30 min later. Spontaneous alternation behavior (A, C) and numbers of arm entries (B, D) during 8-min sessions were measured. Tacrine (THA) was used as positive control. Data represent means±S.E.M (n = 10) (* $P < 0.05$ versus the vehicle-treated control group, # $P < 0.05$ versus the scopolamine-treated group).

한편 scopolamine (1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의해 spontaneous alternation이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였고 ($P<0.05$), 반면 EBS70 (200 mg/kg)을 투여했을 때와 tacrine (10 mg/kg, p.o.)을 투여했을 때 모두 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다 ($P<0.05$, Fig. 2C). Spontaneous alternation이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미한다.¹⁷⁾ 반면 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 total entry에서는 변화가 없는 것으로 나타나 spontaneous alternation이 마우스의 활동성 변화에 의해 나타난 것이 아님을 알 수 있었다 (Fig. 2B 및 2D).

EBS70의 수중미로 시험에서의 효과

정상 동물에서 EBS70의 200 mg/kg 용량 투여군이 대조

군에 비해서 시험훈련 3일째부터 도피대를 찾아가는 시간 (escape latency)이 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$, Fig. 3A). 훈련5일째 도피대를 제거한 후 probe test를 시행한 결과 200 mg/kg의 용량으로 EBS70을 투여한 군이 target quadrant에 머무는 시간이 대조군에 비해서 유의성 있게 증가하였다 ($P<0.05$, Fig. 3B).

이러한 현상은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물 모델에서도 동일하게 관찰되었는데, 이 실험에서 scopolamine 처리군은 시험훈련 기간 동안 escape latency 시간이 대조군에 비해 증가하였으며, 반면에 EBS70과 tacrine 투여군은 escape latency 시간이 scopolamine 투여군에 비해서 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$, Fig. 3C). 훈련5일째 probe test에서는 scopolamine 투여군이 대조군에 비해 target quadrant에 머무는 시간이 유의성 있게 감소하였고, 반면 EBS70과

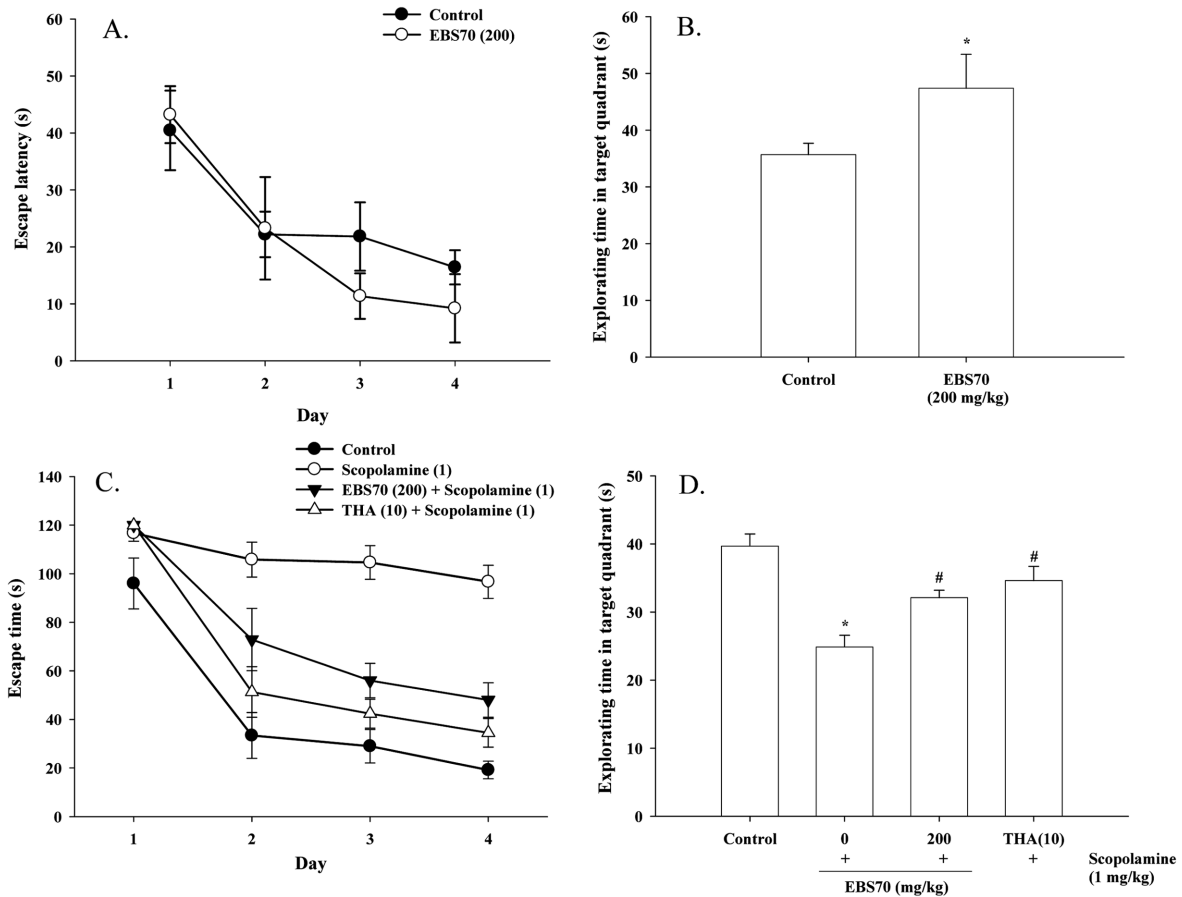


Fig. 3. Effects of EBS70 alone (A, B) and EBS70 with scopolamine (C, D) in Morris water maze task. Effect of EBS70 on performance during training trial sessions (A, C) and probe trial sessions (B, D) of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice. For the study of the effect of EBS70 alone, EBS70 (200 mg/kg) was administered 1 h before each training trial sessions. For the investigation of EBS70 on the scopolamine-induced memory deficit model, mice were treated with EBS70 (200 mg/kg) or tacrine (10 mg/kg) 1 h before each training trial sessions. Memory impairment was induced by scopolamine treatment (1 mg/kg, i.p.). The training trial and the probe trial sessions were conducted as described in Materials and Methods. Tacrine (THA) was used as positive control. Data represent means \pm S.E.M (n = 10) (* $P<0.05$ versus the vehicle-treated control group, # $P<0.05$ versus the scopolamine-treated group).

tacrine 투여군은 target quadrant에 머무는 시간이 scopolamine 투여군에 비해서 유의적으로 증가하였다 ($P<0.05$, Fig. 3D).

Morris water maze test에서 escape latency 감소는 장기 기억과 관련된 학습능력을 나타낸다.¹⁸⁾ 치매유발 물질인 scopolamine 투여군은 4일간의 반복시험으로 escape latency가 감소하지 않아 장기기억 (long-term memory)이 손상된 것을 알 수 있었다. 반면 EBS70 투여군에서는 scopolamine에 의한 기억손상이 개선되어 escape latency가 양성 대조군인 tacrine 투여군 수준으로 회복되었다. 도피대를 제거한 probe test에서 scopolamine 투여군에 비하여 tacrine 투여군은 33%, EBS70 투여군은 34% 수준으로 target quadrant에 머무는 시간이 증가하였기 때문에, EBS70 투여군은 4일간의 인지훈련기간 동안 수중미로 상의 platform 위치를 인지하고 반복되는 연속적인 훈련을 통해 공간 지각력을 확실하게 기억하고 있음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 볼 때 EBS70은 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 동물 모델에서 장기기억 개선효과가 뛰어난 것으로 생각된다.

EBS70의 해마에서 BDNF의 발현에 미치는 효과

EBS70이 기억력 증진에 미치는 효과의 기전을 알아보기 위해, 장기 기억과 가장 밀접한 연관이 있다고 알려져 있는 인자 중 하나인 BDNF의 발현에 미치는 EBS70의 효과를 알아보기 위해서 western blot analysis를 실시하였다.¹⁹⁾ 행동실험에서의 효과용량인 200 mg/kg의 EBS70을 마우스에게 투여하고 30분 후, 1시간 후, 2시간 후, 그리고 4시간 후 마우스를 희생시켜 western blot sample을 얻어 분석하였다. 실험 결과, EBS70 투여에 의해 BDNF의 발현양이 군간 유의적 차이를 나타내었으며, 특히 EBS70 투여 4시간 후의 BDNF 발현양은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 ($P<0.05$, Fig. 4).

본 실험을 통해 흑지마는 정상 상태의 마우스에서 단회 경구 투여했을 시 용량 의존적으로 기억력 강화 효과를 나타내고, scopolamine으로 유도된 건망증 모델에서도 역시 용량 의존적으로 기억력 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

기억력과 관련된 신경계는 cholinergic 신경계, glutamatergic 신경계, GABAergic 신경계, serotonergic 신경계, adrenergic 신경계 등이 알려져 있으나 특히 cholinergic 신경계가 주로 기억력과 관계가 있다고 알려져 있다.^{20,21)} Scopolamine은 cholinergic 신경 수용체 중 하나인 muscarine 수용체에 대한 길항제이기 때문에 이 모델에서 효과가 있는 약물은 cholinergic 신경계를 경유하여 효능을 나타낼 것이라 생각할 수 있다. 하지만 EBS70은 AChE활성의 억제 작용은 없는 것으로 나타났다 (data not shown). 따라서 흑지마의 기억력 강화 혹은 개선 작용은 AChE활성에 영향을 미치지 않

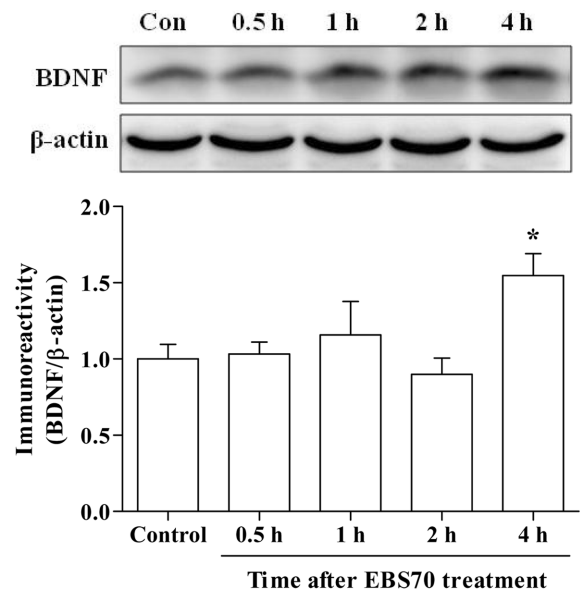


Fig. 4. Effects of EBS70 on the expression of BDNF as measured by western blot analysis. The photographs represent the temporal profiles of BDNF expression in the hippocampal tissue (0.5 h, 1 h, 2 h, or 4 h) after EBS70 treatment (200 mg/kg). The graph displays densitometric analysis of the expression ratio of BDNF/β-actin normalized to the control group (Con). Values are expressed as means±S.E.M. (n = 3/group).

는 경로를 통해서 cholinergic 신경계를 활성화시킴으로써 기억력을 향상시키는 기전을 갖는 것으로 추측된다.

한편, BDNF는 신경세포의 생존과 기능의 발달에 영향을 끼치는 neurotrophin의 한 종류로서, 신경세포의 생존 외에도 신경세포와 시냅스의 성장 및 분화를 촉진한다고 알려져 있다.^{22,23)} 뿐만 아니라 뇌 내에서 BDNF는 학습 및 기억 분야와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있는데, 특히 장기 기억의 저장과 널리 연구되고 있는 학습 및 기억의 세포 모델인 long-term potentiation의 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{19,24,25)} 본 연구에서 EBS70의 기억력 증진 효과의 기전을 알아보기 위해서 EBS70 투여 후 시간대별 BDNF의 발현양을 조사한 결과, 투여 후 4시간에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. EBS70의 투여에 의해 BDNF의 발현이 증가하기까지 약간의 시간이 걸리는 것은 BDNF가 대부분 extracellular signal regulated kinase 또는 cAMP-response element-binding protein과 같은 상위 신호 전달 인자들의 활성화를 통해 이루어지기 때문이라고 추측할 수 있다. 이러한 결과는 EBS70에 의한 기억력 증진 효과가 BDNF의 발현의 증가로 인한 것일 수 있음을 제시한다.

알츠하이머성 치매의 중요한 원인 중 하나로 주목받고 있는 β-amyloid (Aβ)에 의한 연쇄반응은, Aβ의 축적이 세포막 지질의 산화 및 손상, 염증반응, neurofibrillary tangle의 형성, 그리고 궁극적으로 세포사멸 프로그램 과정을 촉발하

여 신경세포의 손실을 초래한다는 것이다.²⁶⁾ 이 과정 중 염증반응의 발현으로 인해 활성화된 microglia가 분비하는 chemokine 및 cytokine들은 A β 의 생성을 가속화하고 신경세포의 사멸을 촉진하는데, 흑지마의 주성분 중 하나인 sesamin은 이러한 microglia의 활성화를 억제시킴으로써 알츠하이머성 치매의 진행을 예방하는 수단이 될 것이라고 여겨지고 있으며, 또 다른 성분인 sesaminol glucoside는 A β 로 유도된 알츠하이머 질환 모델에서 기억력 개선효과가 있음이 보고된 바 있다.^{15,27)}

이러한 점들로 미루어 볼 때, 기억력 감퇴에 대한 개선효과 및 증진 효과가 탁월한 흑지마를 인지기능 개선제 및 기억력 증진제로 개발할 수 있음을 시사한다.

인용문헌

- Evans, D. A., Funkenstein, H. H., Albert, M. S., Scherr, P. A., Cook, N. R., Chown, M. J., Hebert, L. E., Hennekens, C. H. and Taylor, J. O. (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* **262**: 2551-2556.
- Nordberg, A. (1996) Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* **168**: 87-92.
- Kuhl, D. E., Koeppe, R. A., Minoshima, S., Snyder, S. E., Ficaró, E. P., Foster, N. L., Frey, K. A. and Kilbourn, M. R. (1999) In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **52**: 691-699.
- Davis, K. L., Thal, L. J., Gamzu, E. R., Davis, C. S., Woolson, R. F., Gracon, S. I., Drachman, D. A., Schneider, L. S., Whitehouse, P. J. and Hoover, T. M., (1992) A double-blind placebo-controlled multicenter study of Tacrine for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **327**:1253-1259.
- Rogers, S. L., Farlow, M. R., Doody, R. S., Mohs, R. and Friedhoff, L. T. (1998) A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **50**: 136-145.
- Rosler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y. and Dal-Bianco, P. (1999) Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease, international randomized controlled trial. *BMJ* **318**: 633-638.
- Tariot, P. N., Solomon, P. R., Morris, J. C., Kershaw, P., Lilienfeld, S. and Ding, C. (2000) A 5-month, randomized, placebo-controlled Trial of galantamine in AD, Th Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* **54**: 2269-2276.
- Kennedy, D. O. and Scholey, A. B. (2003) Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **75**: 687-700.
- Kennedy, D. O. and Scholey, A. B. (2006) The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 4613-4623
- Howes, M. J., Perry, N. S. and Houghton, P. J. (2003) Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother. Res.* **17**: 1-18.
- Shim, Y. H., Cha, G. H. and Sin, J. W. (1995) Studies on the experimental cookery and the preservation of the Hukimja Dashik. *J. Nat. Sci. Inst. Seoul Woman's Univ.* **6**: 13-26.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S. (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.* **6**: 75-82.
- Shyu, Y. S. and Hwang, L. S. (2002) Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Res. Int.* **35**: 357-365.
- 대한민국 특허. 등록번호 10-0560175. 세사미놀 배당체 또는 이를 포함하는 참깨 추출물을 함유하는 치매 예방 및 치료용 기능성 식품 조성물.
- Um, M. Y., Ahn, J. Y., Kim, S., Kim, M. K. and Ha T, Y. (2009) Sesaminol glucosides protect β -amyloid peptide-induced cognitive deficits in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 1516-1520.
- LeDoux, J. E. (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* **58**: 69-79.
- Sarter, M., Bodewitz, G. and Stephens, D. N. (1988) Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology* **94**: 491-495.
- Morris, R. G. (1984) Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* **11**: 47-60.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I. and Medina, J. H. (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 2711-2716.
- Myhrer, T. (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **41**: 268-287.
- Blokland, A. (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **21**: 285-300.
- Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D. and Lindsay, R. M. (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* **374**: 450-453.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 677-736.
- Bramham, C. R. and Messaoudi, E. (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* **76**: 99-125.

25. Kuipers, S. D. and Bramham, C. R. (2006) Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **9**: 580-586.
26. Gotz, J., Chen, F., Van, Dorpe. J. and Nitsch, R. M. (2001) Formation of neurofibrillary tangle in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 Fibrills. *Science* **293**: 1446-1447.
27. McCarty, M. F. (2006) Toward prevention of alzheimers disease – Potential nutraceutical strategies for suppressing the production of amyloid beta peptides. *Med. Hypotheses* **67**: 682-697.

(2010. 8. 16 접수; 2010. 9. 5 심사; 2010. 9. 8 게재확정)