

발효에 의한 길경추출물의 인지기능 개선 효능

김태연[#], 신용욱^{*}

경남과학기술대학교 농학·한약자원학부

The Effect of Femented *Platycodon grandiflorum* on the Memory Impairment of Mice

Tae-Yeon Kim[#], Yong-Wook Shin^{*}

Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources,
Gyeongnam national University of Science and Technology, Jinju 660-758, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to characterize the effect of the Ethanol extracts of *Platycodon grandiflorum* and its permented production the learning and memory impairments induced by scopolamine.

Methods : The cognition-enhancing effect of *Platycodon grandiflorum* and its permented production were investigated using a passive avoidance test, the Morris water maze test and Y-maze test in mice. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (1 mg/kg, i.p.).

Results : The results showed that the Permented *Platycodon grandiflorum* extract-treated group (100 mg/kg, p.o.) and the tacrine-treated group (10 mg/kg, p.o.) significantly ameliorated scopolamine-induced amnesia based on the Passive avoidance Y-maze test and Water maze test. And these results are same manner in DPPH radical scavenger effect and Acetylcholinesterase inhibition effect.

Conclusions : These results suggest that 80% Ethanol extract of fermented *P. grandiflorum* showed significant anti-amnesic and cognitive-enhancing activities related to the memory processes, and these activities were parallel to treatment duration and dependent of the learning models.

Key words : *Platycodon grandiflorum*, Fermentation, Memory enhancing, scopolamine

서론

의학의 발전과 과학기술의 발달로 인해 인간의 수명이 증가되는 현대사회에서 인지기능과 기억력은 고령화된 사회에서 중요한 관심 대상이 되고 있다. 이러한 노령 인구의 증가는 새로운 사회의 문제로 대두되고 있으며, 노인성 질환에 대한 연구의 중요성은 더욱 강조되고 있다. 노인성 질환 중 관심이 집중되고 있는 질환인 치매(dementia)는 다양한 원인 질환에 의해 야기되는 기능저하를 특징으로 하는 증후군으로 기억력, 사고력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능 장애를 나타내며 전체노인의 약 8.5%에 달하고 있다^{1,2,3}. 치매(dementia)는 기억력과 감각, 공간 및 지각능력이 떨어지는 후천적 만성 퇴행성질환으로 혈

관성치매(cerebrovascular dementia)와 노인성 치매(Alzheimer type dementia)로 구분되는데, 그 중에서도 65세 이상의 치매 환자 중 50~60%가 알츠하이머형 치매로 알려졌다^{4,5}. 이러한 기억력의 저하 및 알츠하이머형 치매(Alzheimer's Disease-AD)는 뇌 안에서 뉴런(neuron)의 점차적인 퇴화와 손실이 특징인 연령과 관계된 신경퇴화 질병으로⁶ 콜린성 신경세포 퇴화에 의한 acetylcholine의 부족이 중요한 원인 중의 하나이며, 이러한 현상은 acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase (AChE)의 활성 증가로 더욱 심화된다⁷. 그 진행과정에서는 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변 실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증까지 나타

* 교신저자 : 신용욱, 경남 진주시 동진로 33번지 경남과학기술대학교 농학·한약자원학부 한약리학교실
· Tel : 055-751-3226 · Fax : 055-751-3229 · E-mail : ywsynn@gntech.ac.kr
제1저자 : 김태연, 경남 진주시 동진로 33번지 경남과학기술대학교 농학·한약자원학부 한약리학교실
· Tel : 055-751-3694 · Fax : 055-751-3229 · E-mail : kty3493@naver.com
· 접수 : 2013년 3월 6일 · 수정 : 2013년 3월 19일 · 채택 : 2013년 3월 21일

나게 된다. 알츠하이머병은 일반적으로 8~10년에 걸쳐 서서히 진행이 되며, 근본적인 치료방법은 아직 개발되지 않았지만 증상을 완화시키고 진행을 지연시킬 수 있는 대표적인 약물로 아세틸콜린 분해효소 억제제가 있는데, 이 계열의 약물은 병의 진행을 완전히 막을 수는 없으나 약 6개월에서 2년 정도 진행을 늦추는 효과가 있다. 이 약물은 알츠하이머병 환자 pharmaceuticals의 뇌에서 감소되어 있는 아세틸콜린이라는 신경전달물질의 양을 증가시킴으로써 작용하며 뇌손상이 심하지 않은 경도 및 중등도 환자에 보다 효과적이다. 현재까지 개발된 기억력 개선약물들에는 아세틸콜린 합성전구체 (acetylcholine precursor), 아세틸콜린 분해 억제제 (acetylcholine esterase inhibitor) 등이 있으나 효과가 미약하고 심각한 부작용 및 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다^{9,10}. 그러므로 부작용은 최소화되고 효능은 최대화하는 기억력 개선 및 치매 치료제를 찾아내고 효과를 입증하려는 연구 및 노력이 요구되는 실정이다.

도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)는 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 초롱꽃(Campanulaceae)과에 속하는 다년생 초본이다. 염증성 호흡기 질환 치료 및 식용으로 널리 사용되어져 오고 있으며, 국내 도라지 소비량은 연간 4,000 여 톤에 이르고 있으며 이중 약 10%가 생약재로 사용되고 나머지 90%는 식용으로 소비되고 있는 실정이다¹¹. 도라지의 함유성분으로는 inulin 및 fructo-oligosaccharide 등 탄수화물이 전체 추출물의 95% 이상을 차지하고 있으며¹², triterpenoid계 saponin과 당질 및 섬유질을 함유하고 있어 한방에서는 거담, 배농, 진해약, 편도선염 등에 사용되었으며¹³, 이외에도 항염증 작용, 중추신경 억제작용(진통, 해열 및 진정 작용), 혈압강하작용, 항콜린 작용, 항암작용 및 위산분배억제효과 등이 있음을 보고되어 있다¹⁴⁻¹⁷.

본 연구에서는 도라지 뿌리를 경상남도 사천에서 2월에 채취한 후 효모(*Saccharomyces cerevisiae* C-2)를 이용하여 시료를 조제하여 항산화 효과, 아세틸콜린 분해 효소 활성 측정, 그리고 기억력 감퇴에 대한 효과는 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델을 이용하여 수동회피시험(passive avoidance test) 및 Y-미로시험(Y-maze test), Morris 수중미로시험(Morris water maze test)을 이용한 행동 관찰시험을 통하여 발효에 따른 기억력 개선 작용에 대한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 도라지는 경상남도 사천에서 3년간 재배된 것을 2012년 2월에 채취하여 선별 후 깨끗이 세정하여 물기를 제거한 후 발효균주로서 효모(*Saccharomyces cerevisiae* C-2)를 중량 대비 5%로 접종하여 온도 37℃, 습도 75%를 유지하며 48시간 배양하였다. 발효의 확인은 48시간 배양한 시료에서 총균수를 측정하여 발효를 확인한 후 분석에 사용하였다. 발효도라지를 얻은 후, 세절하여 동결건조기(PVTF10AT, ILSIN, Suwon, Korea)를 사용하여 동결건조하였다.

2) 동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse 5주령을 주식회사 코아텍(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 경남과학기술대학교 동물실에서 7일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 각 군당 10마리로 구성하였고, 온도 23 ± 3℃, 습도 50 ± 10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 tacrine (9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), (-) scopolamine hydrobromide, acetylthiocholine iodide, DTNB (5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]), 는 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다. 본 실험에 사용되어진 기기로는 Rotary Evaporator (Eyela, Japan),

수동회피 상자(GEMINI™ Avoidance System, San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)

행동관찰은 Ethovision program (Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

2. 방법

1) DPPH 라디칼 소거활성

도라지 추출물의 항산화력을 측정하기 위해 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유기 소거능 측정 Blois법²⁰에 따라 Test sample을 메탄올에 희석시킨 희석용액 0.2ml에 4×10⁻⁴ M 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액 0.8ml를 가하여 10초간 혼합하고, 상온에서 30분간 방치 후 517nm에서 ELISA로 측정하였다. 대조군은 메탄올 0.2ml에 DPPH용액 0.8ml를 가한 후 상온에서 30분간 방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하는 것으로 하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

2) Acetylcholinesterase 저해력 측정

Acetylcholinesterase 활성은 Ellman's coupled enzyme assay법²¹을 변형하여 측정하였다. 즉, 20μl의 0.01M DTNB 와 300μl의 0.05M Tris-HCl (pH 8.0), Test Sample 10μl, Ach 10μl, 그리고 AchE 10μl를 microplate에 넣은 뒤 405nm에서 10분 동안 흡광도를 측정하였다. (Model Anthos 2020, Asys hitech GmbH, Austria) 효소활성은 1분 동안 흡광도 변화율에 대한 평균값을 계산하여 저해율을 측정하였다.

3) 수동회피시험(passive avoidance test)

수동회피시험 장치는 shuttle box (52,6 × 17,3 × 21,3 cm)의 크기로 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 길로틴문(Guillotine door; 8,9 × 8,9 cm)이 설치되어 있어 상하로 열고 닫을 수 있게 되어 있다. 우측방에는 매우 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였고, 좌측 방에는 빛이 전혀 들어오지 않게 하여 실험동물이 상대적으로 편안함을 느끼게 하였다. 수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 LeDoux²²⁾의 방법을 응용하여 시행하였다. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 약물투여는 발효도라지 추출물 및 tacrine은 10% Tween 80에 녹인 후 경구투여 하였고 (10mg/kg), 대조군에는 10% Tween 80을 같은 용량으로 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후, 식염수에 녹인 scopolamin을 1mg/kg의 용량으로 복강투여 하였고, scopolamin 투여 30분 후, mouse를 조명을 비춘 구획에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문을 열어두어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. 이때 길로틴문이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외시켰으며, mouse가 어두운 구획으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 되는데 이때 길로틴문이 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다(학습시험 ; training trial). 학습시험이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 발효도라지 추출물의 효과를 입증하고자 실시하였다(기억시험 ; test trial). 실험동물을 shuttle box에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 구획으로 mouse의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 180초까지 측정하였다. 어두운 구획으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

4) Y-미로시험(Y-maze test)

Y-미로시험은 단기기억형태의 순간 공간인지력을 평가하기 위한 방법으로 mouse를 이용하여 실험하였다. 약물 투여하는 수동회피시험에서와 같은 방법으로 미로시험 1시간 전에 발효도라지 추출물과 tacrine을 경구투여하고, scopolamine을 1mg/kg 용량으로 시험 30분 전에 복강투여한 후 미로시험을 실시하였다. 본 실험에 사용된 Y-미로시험 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42cm, 넓이는 3cm, 높이는 12cm이고 세 팔이 접하는 각도는 120° 이다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다(Fig. 2). 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 흰쥐가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)을 3가지 모두에 차례로 들어

가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산된다.

$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제 변경 (actual alternation)}}{\text{총 출입 횟수} - 2} \times 100$$

변경행동력은 단기기억회복의 측정지표로 사용되며 총 출입횟수는 활동성 변화를 나타낸다.

5) 수중미로 시험 (Morris water maze task)

실험동물의 공간기억을 평가하기 위해 mouse를 이용하였다. 수중미로 시험은 원형 수조(직경 150cm, 높이 65cm) 안에 물을 30cm 높이로 채우고 (23±2℃), 수조 4분면의 한 구획에 직경 10cm의 도피대(escape platform)를 수면아래 1cm에 위치하도록 하고 탈지분유를 풀어 받침대가 보이지 않게 하였다. 실험 첫날은 도피대 없이 수조안에서 실험동물이 60초간 자유롭게 수영하도록 하였고, 4일 동안 매일 입수하는 사분면을 달리하여 하루 2번씩 반복하여 인지적응 훈련을 수행하였다. 실험동물이 도피대에 도달하면 10초 동안 도피대에 머물도록 하였으며, 180초 안에 도피대를 찾지 못할 경우에는 10초 동안 도피대에 머물도록 하여 도피대를 기억하도록 하였다. 수중미로 시험은 20분 간격으로 반복하였으며, 실험 5일째에는 working memory를 측정하기 위하여 도피대를 제거하고 도피대를 찾아가는 시간(escape latency)을 기록하는 probe test를 실시하였다.

결 과

1. DPPH 라디칼 소거활성

도라지 건조방법에 따른 항산화 효과를 비교분석 하였다. 도라지의 항산화 효과 평가로 뇌신경보호를 통하여 기억력개선효과를 비교할 수 있는 기초자료로 사용하기 위해 기존 관행 건조법인 열풍건조(PR)와 발효를 위한 증자(Stem) 과정을 거친(SPR) 그리고 증자 후 효모균 주입을 통한 발효(Fermented) 공정을 거친 발효도라지(FPR)로 3가지 도라지를 이용하여 항산화 효과를 비교한 결과 항산화 50%를 나타내는 최소농도 IC50의 경우 관행의 열풍건조의 경우 14.72ug/ml를 나타내고 반면 발효도라지 추출물은 관행대비 38.5%가 개선된 최소 유효농도 9.05ug/ml를 나타내어 발효를 통하여 항산화력이 증강된 점을 알 수 있다.

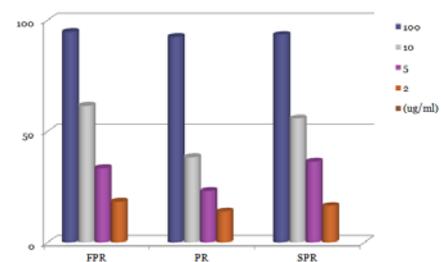


Fig. 1. Free radical scavenging activity of hot air dried platycodon root(PR) and fermented platycodon root(FPR) and steamed platycodon root(SPR).

2. Acetylcholinesterase(AChE) 저해력 측정

AChE 저해효과의 IC₅₀는 도라지 추출물(PR) 20,80 μ g/ml, 발효도라지 추출물(FPR) 14,29 μ g/ml로 발효도라지 AChE 저해효과가 31% 증가됨을 알 수 있었다.

Acetylcholinesterase(AChE)는 고등 척추동물 및 무척추동물의 신경계에 존재하는 신경세포 synapse에서 화학적 신호전달 물질인 acetyl-choline을 choline과 acetic acid로 가수 분해하는 효소이다. 한편, 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 즉, acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 악화된다고 알려져 있다. 따라서 이 효소를 제거하는 효능이 치매 예방 및 기억력 개선과 밀접한 관련이 있다. 이러한 효소 저해력을 측정할 결과 발효도라지의 acetylcholine 저해효과가 도라지 관행군에 비해 31% 증가됨을 알 수 있어서 도라지는 발효에 의해서 퇴행성으로 인한 기억력 감퇴에 도움을 줄 수 있을 것을 시사하였다.

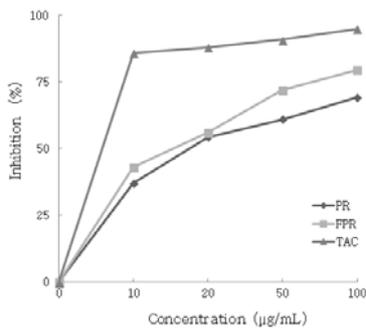


Fig. 2. Inhibitory effect of the platycodon root(PR), fermented platycodon root(FPR) extract on acetylcholinesterase activity are expressed as percentage inhibition of enzyme activity compared with the control medium.

3. 수동회피실험(Passive Avoidance Test)

Scopolamine(1mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 열풍건조도라지 (PR) 및 발효도라지 (FPR) 추출물 각각 50, 100mg/kg의 경구투여에 의하여 추출물이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였다. 기억력 개선 및 인지능력 향상에 사용 되고 있는 모델 중 하나인 수동회피실험인 passive avoidance test는 흔히 단순기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 어두운 곳을 선호하는 mouse의 특성을 이용한 것이다. 실험동물에 전기충격을 가하여 전기 자극을 기억하는 시간을 측정하는 방법으로 학습 및 기억능력을 측정하는 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험 (Passive avoidance test)에서 도라지추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인 할 수 있었다. 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 mouse의 수동회피실험에서 latency time이 길어졌다는 것은 발효도라지 추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억과 인지기능 감퇴 뿐만 아니라 치매 질환에서도 유효한 효과가 있을 것으

로 여겨진다. Fig. 4에서 제시한 바와 같이 발효도라지 추출물 100mg/kg로 투여한 군에서 양성대조약물로 사용 중인 tacrine의 retention time의 90%에 해당하는 결과를 나타내고 있다.

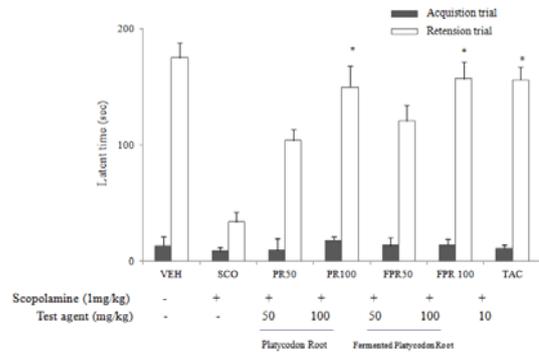


Fig. 3. Inhibitory effects of platycodon root(PR), fermented platycodon root(FPR) extract on scopolamine-induced memory impairment in mice in the passive avoidance test, mice were orally administrated PR, FPR 50, 100 ; TAC, tacrine (10mg/kg) all values are means \pm S.D.(n=6) *Significantly different from the control group (*P<0.05).

4. Y-미로시험

Y-maze test에서는 발효도라지 (FPR)의 에탄올 추출물 100mg/kg 투여군 (FPR100)은 대조군 (VEH)의 92%의 회복율이 나타났다.

Scopolamine(1mg/kg, I.p.)의 투여에 의해 spontaneous alternation이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고(P<0.05), 발효도라지 (FPR) 50mg/kg 투여군과 100mg/kg 투여군 그리고 tacrine(10mg/kg)을 투여했을 때 모두 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다 (P<0.05, Fig. 4), spontaneous alternation이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미한다.

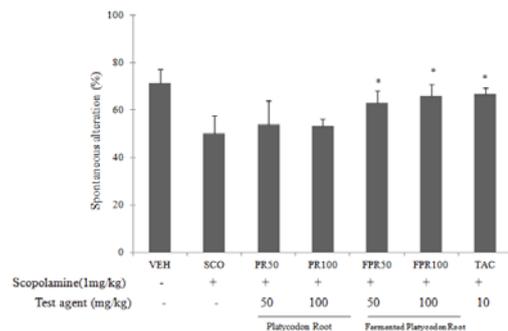


Fig 4. Inhibitory effects of platycodon root(PR), fermented platycodon root(FPR) extract on scopolamine-induced memory impairment in mice in the y-maze test, mice were orally administrated PR, FPR 50, 100; TAC, tacrine(10mg/kg) all values are means \pm S.D. (n=6) *Significantly different from the control group (*P<0.05).

5. 수중미로시험

Scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 mouse의 공간학습에 대한 열풍 건조도라지(PR) 및 발효도라지(FPR) 추출물의 효과는 morris water maze test를 실시하여 Fig. 6에 나타

내었다. 수중미로시험 (Water maze test)에서 발효도라지(FPR)의 에탄올 추출물 100mg/kg 투여군(FPR 100)은 대조군(VEH)의 68%의 회복율이 나타났다.

Morris water maze test에서 escape latency 감소는 장기기억과 관련된 학습능력을 나타낸다. 실험결과에서 치매유발 물질인 scopolamine 투여군은 4일간의 반복시험으로 escape latency가 감소하지 않아 장기기억 (long-term memory)이 손상된 것을 알 수 있었다. 반면에 발효도라지 추출물(FPR) 투여군에서는 3일째부터 tacrine 투여군과 함께 escape latency 시간이 scopolamine 투여군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.05$, Fig. 5). 수중미로 시험에서도 발효도라지 추출물 100mg/kg 투여군(FPR 100)은 4일째 기억검사를 시행한 결과 도피대에 있었던 4분원 머무는 시간이 scopolamine군에 대해 유의성 있게 증가하여 대조군(정상군, VEH)의 68%까지 회복되었음을 확인할 수 있었다.

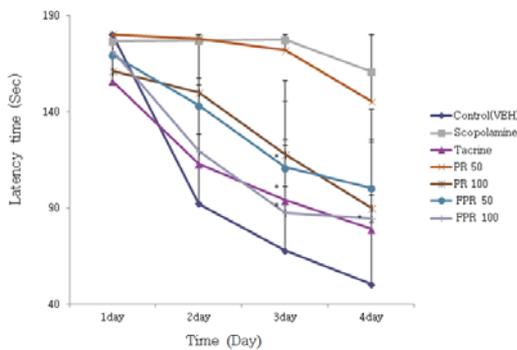


Fig 5. Inhibitory effects of platycodon root(PR), fermented platycodon root(FPR) extract on scopolamine induced memory impairment in mice in the Morris water maze test. mice were orally administrated PR, FPR 50, 100; TAC, tacrine(10mg/kg) all values are means \pm S.D. (n=6) * Significantly different from the control group (* $P < 0.05$).

고찰

식물의 열처리 가공은 식품의 저장수명을 연장시키고 품질을 향상시키기 위하여 사용되지만, 열처리 가공 중 열에 민감한 영양소의 파괴 및 활성물질의 손실 등의 문제점들이 발생되어 제한적으로 사용되고 있다. 그러나 최근 연구에서는 여러 식물에서 열처리한 경우 항산화 활성이 증가한다고 보고된 바^{13,14,21,30,31} 있고 또한 식물의 발효과정은 오래전부터 행해져온 가공공정의 일환으로 미생물작용을 통해 식물의 맛과 향을 개선하고 유효성분을 증진시키는 작용을 하며, 식물 유래 약재의 저장성을 개선하는 장점을 가진다¹². 따라서 본 연구에서는 포제법의 한 방법으로 도라지를 열처리후에 효모균을 이용하여 가공하는 발효법을 통하여 그에 따른 항산화력 및 scopolamine으로 유도된 기억감퇴 동물모델을 이용하여 인지 기능 개선 여부를 확인하고자 실시하였다. scopolamine 유도 기억상실 mouse의 인지능 회복 실험은 도라지를 이용한 실험은 수행되었지만, 발효 도라지를 이용한 실험은 수행되지 않았으므로, 본 실험에서는 도라지를 이용하여 발효도라지를 제조한 후 발효도라지의 건망증에 대한 효과를 scopolamine

으로 유도된 기억감퇴 동물모델을 이용하여 수동회피시험 (Passive avoidance test)과 Morris 수중미로시험(Morris water maze test) 및 Y미로 시험(Y-maze test)을 이용하여 행동학적 변화를 관찰하고 발효도라지의 기억력 개선 능력 여부를 확인하고자 하였다.

기억력과 관련된 신경계는 cholinergic 신경계, glutamatergic 신경계, GABAergic 신경계, serotonergic 신경계, adrenergic 신경계 등이 알려져 있고,^{23,5} 특히 cholinergic 신경세포의 퇴화에 따른 acetylcholin의 부족이 원인이라고 알려졌다³. 본 연구에서 활용한 scopolamine은 cholinergic muscarinic antagonist로서 콜린성 활성을 감소시키고, 기억과 학습능력을 손상시킨다는 보고에 의해 기억 및 학습 관련 인지기능의 평가를 위한 실험에 광범위하게 이용되고 있다.

본 실험에서는 scopolamine 으로 cholinergic 신경의 subtype 중 하나인 무스카린 수용체(mAChR)를 차단하여 아세틸콜린의 양은 변화시키지 않고 시냅스 간극에서 아세틸콜린이 수용체에 결합하는 것을 방해하여 실험모델을 작성하였다⁸.

해마와 전두피질의 ACh가 감소되면 일시적으로 감각운동 기능에 결함이 생기고 장기적으로는 수동적 회피학습(passive avoidance learning)과 미로 과제의 수행이 현저하게 불량해지는 행동적 변화가 수반²⁹ 되므로 전기 자극을 주는 수동회피실험을 수행하였으며 미로시험은 두 가지로 진행하였다. 미로시험에서도 y-maze 와 morris water maze 로 나뉘어서 실험한 것은, y-maze 는 공간기억과제이고 주로 작업 기억을 바탕으로 하는 학습능력을 알아보기 위한 것이다. 작업 기억이란 정보가 처리되고 있는 동안에 그것을 유지하는 기억을 말하는 것으로서, 보통 기억을 유지하는 시간이 짧기 때문에 단기 기억 (shortterm memory)이라고 한다. morris water maze 의 경우에는 학습시행을 실시한 24시간 이후에 이루어지기 때문에 동물이 미로상황에서 전날까지 학습했던 내용을 잘 기억하고 있어야 한다. 동물을 사용하는 기억 검사에서 24시간의 파지 기간은 상당히 긴 것이고 이러한 기억을 장기 기억(Long term memory)이라고 한다. 이에 본 연구에서는 도라지 추출물이 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는지를 검색하기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine 을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 passive avoidance test, morris water maze test 및 y-maze test 를 실시하였다. 치매 유도 동물모델 중 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험(passive avoidance test)에서 도라지 추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하여, 정상인 및 인지기능감퇴자인 치매 환자에서도 유효한 효과가 있을 것으로 여겨진다. 또한 공간의 학습과 기억을 검사하는 실험 장치로 사용되는 morris 수중미로 실험에서도 4일 동안 실시되는 획득시행에서 양성대조군인 tacrine 그룹과 비슷한 양상으로 공간 기억 능력의 향상이 관찰되었으며 또한 y-maze test에서도 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다.

결론

본 연구에서는 경남 사천시에 자생하는 3년근 도라지를 채취하여 생도라지, 발효도라지를 각각 80% EtOH에 추출한 추출물을 이용하여 기억력 개선효과와 이를 수반하는 항산화 효과를 측정한 실험으로 그 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 채취 후 건조방법에 따른 도라지 추출물의 항산화력을 DPPH로 측정한 결과 열풍건조도라지 추출물에 비해 발효도라지 추출물의 항산화 효과가 38.5% 증가됨을 알 수 있었다.
2. 신경전달물질 분해효소인 AChE 저해능을 같은 방법으로 비교하여 도라지 추출물의 기억력개선효과를 측정할 결과 AChE 저해효과는 열풍건조도라지 추출물에 비해 발효도라지 추출물이 31% 증가됨을 알 수 있었다.
3. 각 도라지 추출물의 학습, 기억능력 측정을 위해 실시한 수동회피시험 (Passive avoidance test)에서 발효도라지의 100mg/kg 투여군은 대조군의 90% 회복됨을 알 수 있었다.
4. 각 도라지 추출물 투여군의 공간지각력의 영향을 관찰하기 위해 실시한 Y미로 시험 (Y maze test)에서는 발효도라지의 100mg/kg 투여군은 대조군의 92% 회복됨을 알 수 있었다.
5. 각 도라지 추출물 투여군의 장기기억력의 영향을 관찰하기 위해 실시한 수중미로시험 (Water maze test)에서는 발효도라지의 100mg/kg 투여군은 대조군의 68% 회복됨을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 채취 후 가공방법 설정을 위한 실험에서 미생물 발효 후 건조한 도라지는 관건건조방법 대비 항산화 효과 및 기억력개선에 효과가 있음이 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 고품질 도라지 생산성 향상과 산업 화기술 개발과제의 지원에 의하여 이루어진 것이므로 이에 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Kim SH, Chung DK. Nootropic and Anti-amnesic Effect of PPA on scopolamine-induced Cognitive Impairment in Mice, *Journal of Oriental Neuropsychiatry*, 2011 : 185-99.
2. Kwak LC. *Illustrated Psychosurgery*. Cheil ui haksa, 1992 : 27-31.
3. Kim JH, Whang UW. *Oriental medicine Psychiatry*.

- Hyundai ui hak seo jeok sa, 1992 : 256-271, 327-30.
4. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported, *JAMA*, 1989 : 262, 2551-6.
5. Nordberg A. Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. *Acta Neurol. Scand Suppl*, 1996 : 168, 87-92.
6. Kopin IJ. Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. In, catecholamines, (Blachk, H and Muscholl E, eds.) *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Springer Verlag, Berlin, 1972 : 33, 271-82.
7. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer' disease. *Neurology*, 1999 ; 52 : 691-9.
8. Squire LR. Memory systems of the brain : a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, 2004 ; 82(3) : 171-7.
9. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol*, 1997 ; 74(3) : 225-41.
10. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. *J Neural Transm Suppl*, 2000 ; 59 : 231-42.
11. Yoo DS, Choi YH, Cha MR, Choi CW, Kim MR, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim EJ, Cho SW, Kim YS, Ryu SY, Kang JS. Variation of Saponin Content in the Decoctions of Platycodi Radix (II). *Kor J Pharmacogn*, 2010 ; 41(2) : 147-52.
12. Oka M, Ota N, Mino Y, Iwashita T, Komura H. Studies on the conformational aspects of inulinoligomers. *Chem Pharm Bull*, 1992 ; 40 : 1203-7.
13. Lee SI. *Chinese pharmaceuticals*. Soo Seo Won, Seoul, 1981 : 129.
14. Kubo M, Nagao T, Matsuda H, Namba K. Immune pharmacological studies on platycodi radix I : Effect on the phagocytosis in the mouse. *Shoyagaku Zasshi*, 1986 ; 40 : 367.
15. Sung NY, Lee SJ, Shin JH, Lee I,S, Chung YC. Effects of Platycodon grandiflorum extract on blood glucose and lipid composition in alloxan induced hyperglycemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1996 ; 25 : 986-92.
16. Kim YS, Lee BE, Kim KJ, Lee YT, Cho KB, Chung YC. Antitumor and immunomodulatory activities of the P.grandiflorum cultivated for more than 20 years. *Yakhak Hoeji*, 1998 ; 42L 382-7.
17. Kim KS, Ezaki O, Ikemoto S, Itakura H. Effects of Platycodon grandiflorum feeding on serum and

- liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J Nur Sci Vitamino*. 1995 ; 41 : 485-91.
20. Hwang DY, Chae KR, Kang TS, Hwang JH, Lim CH, Kang HK, Goo JS, Lee MR, Lim HJ, Min SH, Cho JY, Hong JT, Song CW, Park SG, Cho JS, Kim YK. Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2002 ; 16, 805-13.
21. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961 ; 7 : 88-95.
22. Ledoux JE. Emotional memory : in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 ; 702 : 149-57.
23. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carboline. *Psychopharmacology*. 1998 ; 94(4) : 491-5.
24. Morris RG. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth*. 1984 ; 11 : 47-60.
25. Park BK, Heo MY, Pak H, Kim HP. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase2 and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur. J. Pharmacol*. 2001 ; 425 : 153-8.
26. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Dayd J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem*. 2008 ; 109 : 709-21.
27. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. in vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999 ; 52(4) : 691-9.
28. Elrod K, Buccafusco J. An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1988 ; 27(1) : 15-21.
29. Rush DK. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav. Neural. Biol*. 1988 ; 50(3) : 255-74.
30. Nobili L, Sanniata WG. Cholinergic modulation, visual function and Alzheimer's dementia. *Vision Res*. 1997 ; 37(24) : 3559-71.
31. Walsh TJ, Tilson HA, DeHaven DL, Mailman RB, Fisher A, Hanin I. A cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial-arm maze deficits in the rat. *Brain Res*. 1984 ; 321(1) : 91-102.