

시판 초석잠 기원식물의 기억력개선효과 비교연구

이신우[#], 정태홍, 신용욱^{*}

경남과학기술대학교 농학·한약자원학부

A Comparative Study of Memory Improving Effects of *Stachys Rhizome* and *Lycopus Rhizome* on Scopolamine-induced Amnesia in mice

Shin Woo Lee[#], Tae-Hong Jung, 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 Ethanolic extract of *Stachys sieboldii* and *Lycopus lucidus* on the learning and memory impairments induced by scopolamine.

Methods : The genetic difference of *Stachys sieboldii* and *Lycopus lucidus* were observed with RAPD analysis. The cognition-enhancing effect of *Stachys sieboldii* and *Lycopus lucidus* was investigated using a passive avoidance test, Y-maze test and the Morris water maze test in mice. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (1 mg/kg, i.p.).

Results : As a result of RAPD analysis, *Stachys sieboldii* and *Lycopus lucidus* Radix was found to be genetically different and The results of learning memory analysis showed that *Stachys sieboldii* extract-treated group (500 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. These results suggest that *Stachys sieboldii* extract maybe a useful cognitive impairment treatment, and its beneficial effects are depending on the origin plants.

Conclusions : Commercially available *Stachys sieboldii* Radix consists of two original plant, one of them people misuse. To clarify the origin of the plant Memory tests were performed. These results suggest that 80% Ethanol extract of *Stachys sieboldii* showed significant anti-amnestic 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 : *Stachys sieboldii*, Memory enhancing, scopolamine

서론

고령화시대로 접어들면서 치매에 대한 사회적관심이 증대되고 있다. 특히 치매중에서도 환자의 절반 이상을 차지하는 것으로 알려진 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 진행성 퇴행성 뇌질환으로 알려져 있다. 알츠하이머병(Alzheimer's

disease, AD)은 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 (granulovascular degeneration) 등을 특징¹⁾으로 하며 환자의 뇌에서 아세틸콜린량 및 아세틸콜린을 합성하는 효소(choline acetyltransferase, ChAT), 아세틸콜린을 분해하는 효소인 아세틸콜린 에스테라제 (acetylcholine

*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 : 이신우, 경남 진주시 동진로 33번지 경남과학기술대학교 농학·한약자원학부 유전공학실험실

· Tel : 055-751-3227 · Fax: 055-751-3229 · E-mail : shinwlee@gntech.ac.kr

· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 13일 · 채택 : 2013년 9월 22일

esterase, AchE) 활성이 증가된 것이 확인^{2,3)} 되었다. 알츠하이머 환자의 해마와 대뇌피질에서 콜린(choline) 흡수와 아세틸콜린(acetylcholine) 합성이 감소하는 것으로 확인되었으며, 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholine esterase (AchE)의 발현은 높은 것으로 보고^{4,5)}되고 있으며 뇌에서 니코틴성 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체 (nicotinic and/or muscarinic acetylcholine receptor : nAChR and/or mAChR) 수가 감소된 것이 확인되었다³⁾. 따라서 선행연구를 통하여 치매의 예방, 증상 개선 및 학습기억력 증가를 위해 아세틸콜린이라는 신경 전달 물질의 분해를 막아주어 콜린 신경계를 활성화 시키고자 아세틸콜린 분해 효소 억제제 (acetylcholine esterase inhibitor)가 주로 개발되어져 오고 있으나, 이들 약물들은 인지 기능의 개선과 함께 장기간 복용 시 간독성 등 심각한 부작용이 동반하는 바, 질환의 특성상 장기간 복용이 불가피한 치매치료제로서의 한계가 있다고 볼 수 있다. 따라서 부작용이 없이 장기간 복용을 통한 예방의 효과를 가지는 한약재 또는 기능성식품을 이용한 적절한 치료가 치매 환자의 삶의 질은 물론 병증의 개선에 중요한 요소로 대두되고 있다.

한의학적으로는 痴獸, 呆病, 健忘⁶⁾ 등이 痴呆의 범주에 해당하는 것으로 볼 수 있는데, 치매의 주요 특징인 기억력 장애는 健忘에서 그 치료법을 찾아 볼 수 있다. 健忘은 善忘, 多忘, 好忘, 遺忘, 遂忘 등의 명칭으로 불려 왔다. 임상에서는 치매를 呆病이나 健忘에 근거하여 辨證施治하고 있는데 크게 腎陰虛, 心脾兩虛, 腎精虧虛, 脾腎陽虛 등의 虛症과 痰迷心竅, 瘀血, 內阻 등의 實症으로 구분⁷⁾ 하고 있으며 변증에 따라 세심탕, 환소단, 귀비탕, 칠복음 또는 육미지황탕 등의 처방을 빈용⁸⁾ 해 온 것으로 알려져 있다.

최근 민간에서 치매와 관련한 약용식물로서 초석잠에 대한 관심이 증대되고 있는 가운데 재배가 용이하여 재배면적도 증가되는 추세이다. 재배되고 있는 초석잠의 기원식물로는 크게 석잠풀과 쉽사리로 양분되고 있다. 먼저 석잠풀(*Stachys sieboldii* Miq)은 꿀풀과(Labiatae)의 석잠풀속(*Stachys* Linne)의 여러해살이 식물이다. 꿀풀과 석잠풀속의 식물은 우리나라에서는 우단석잠풀(*S. oblongifolia* Benth.), 석잠풀(*S. sieboldii* Miq), 개석잠풀(*S. japonica* var. *hispidula* (Hara)), 털석잠풀(*S. japonica* var. *villosa* (Kudo) Ohwi) 이 있다⁹⁾. 초석잠의 탄수화물은 올리고당의 일종인 Stachyose으로 인해 장내 유용균의 생육을 촉진하여 대장의 기능 촉진 및 장내미생물증식작용으로 인한 면역력의 강화, 배변작용개선 등의 작용을 가지는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 초석잠의 성분인 Acteoside 와 Stachyoside C 와 Phenylethanoid glycoside 등이 KCN으로 유도한 무산소증 동물모델의 치사율을 감소¹¹⁾시키는 것으로 보고되어 뇌허혈에 대한 보호작용에 대한 가능성이 있음을 시사하였으며 hyaluronidase 억제 활성¹²⁾도 있음이 보고되어 초석잠의 염증억제작용이 있음을 확인한 바 있고 초석잠의 줄기의 항산화활성 및 초석잠 줄기의 hexane 추출물의 항암활성¹³⁾이 있는 것으로 보고되어지고 있으며 초석잠의 괴경에서 분리된 acetoside 가 신장염 치료에 효과적¹⁴⁾이라고 보고된 바 있다.

다음으로 석잠풀보다 식물체가 큰 쉽사리가 있다. 쉽사리(*Lycopus lucidus* Trucz)는 여러해살이 풀로 땅위 줄기는 모가 지고 곧게 서며 마디에 털이 있고 잎은 마주나며 양면에

털이 없고 가장자리에 거칠고 날카로운 톱니가 있다. 꽃은 흰색으로 6~8월에 피며 열매는 9~10월에 맺는다. 지상부는 한약재로는 택란(澤蘭)이라 하여 그 효능이 行水消癰하여 부종의 개선에 쓰이며 活血化癥하여 말초순환을 개선시키고 산후의 어혈제거에 쓰이는 약재이다. 향약집성방에서는 쉽사리의 뿌리를 지순(地笋)이라 하였다¹⁵⁾. 쉽사리의 지상부로부터 페놀화합물로서의 rosmarinic acid, rosmarinic acid, ethyl rosmarinic acid, flavonoids, luteolin, luteolin-7-O-D-glucuronide methyl ester 을 분리하고 이들 성분의 항산화작용을 보고한 바 있다¹⁶⁾. 쉽사리 지상부에서 추출한 정유성분에서 thymol 과 caryophyllene 을 분리시키고, 흰쥐를 대상으로 정유의 이노효과를 보고¹⁷⁾하여 쉽사리의 전통적인 이노작용을 증명해 보인 바도 있으며 RBL-2H3 세포주에 대한 164종 식물의 탈과립 저해 활성을 검색하는 과정에서 쉽사리의 지상부의 항알레르기 작용이 있음을 보고¹⁸⁾된 바도 있다. 내분비계와 관련하여서는 쥐를 대상으로 Streptozotocin 으로 당뇨를 유발하여 투여한 쉽사리 메탄올 추출물의 Hexane 과 BuOH 투여군에서 혈당을 유의적으로 감소¹⁹⁾시켰다고 보고한 바 있다. 한편 쉽사리가 속한 *Lycopus* 식물은 항고나트륨 성질을 가지며 갑상선 자극호르몬 특히 티록신(T4)의 분비를 감소시키며 뇌하수체에서 프로락틴의 분비를 감소²⁰⁾시켜 임신, 수유시에 복용이 적합하지 않은 것으로 보고하여 사용에 주의를 환기시킨 바도 있다. 초석잠 메탄올 추출물의 Acetylcholine Esterase 억제효과²¹⁾에 대해 보고한 바는 있으나 초석잠의 기원식물로 유통되는 석잠풀과 쉽사리의 기억력개선효과를 비교한 바는 없으므로 이에 본 연구에서는 초석잠의 기원식물로 재배되는 석잠풀의 괴경과 쉽사리의 괴경을 채취한 후 RAPD 법으로 식물의 기원을 확인 한 뒤 시료를 조제하여 항산화효과²²⁾, 아세틸콜린 분해효소 활성측정^{23,24)}, 수동회피 실험²⁵⁾, Y자형 미로실험²⁶⁾, Morris 수조미로 실험²⁷⁾ 등을 통하여 시중 유통되는 초석잠의 기원식물에 따른 기억력개선작용의 차이를 규명하였기에 다음과 같이 결론을 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 초석잠의 괴근은 경남 산청군 시천면 일대에서 재배하는 석잠풀(*Stachys sieboldii* Miq.)과 같은 지역의 포장에서 격리재배한 쉽사리(*Lycopus lucidus* Trucz.)를 각각 2010년 11월 하순에 채취한 뒤 유전공학실험실에서 RAPD법을 이용하여 동정한 후, 각각 한약리학교실 표본실에 보관하고 있다 (No. JNUHMP -10-1101, 1102).

2) 시약

또한 본 실험에 사용한 tacrine (9-amino-1, 2, 3, 4-tetra- hydroacridine 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.

3) 검액의 조제

초석잡 추출물은 증류수로 2회 세척한 뒤 원재료의 10배의 80% 에탄올을 가하여 2시간 가열 추출하였다. 추출이 완료된 다음 Whatman (No. 1) filter paper로 감압여과하고, 이를 rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기(FD 5508, Ilshin Lab, Korea)에서 건조한 뒤 얻어진 분말을 밀폐하여 4℃ 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4) 동 물

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

2. RAPD PCR 분석

1) Genomic DNA 분리

PCR에 적합한 genomic DNA를 추출하기 위하여 DNA extraction kit(gene All, plant SV mini, korea)를 사용하였다.

먼저 초석잡 생피경을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 마쇄 한 다음 분말상태의 잎 100mg을 2ml tube에 넣고 PL 완충용액 800μl와 RNase 용액을 4μl 첨가한 후 마쇄한 가루와 vortexing 해 준 다음 65℃의 항온수조에서 30분간 반응시킨다. 시간 경과 후 PD 완충용액 280μl를 넣고 혼합한 다음 얼음에서 5분 동안 반응시킨 후 2ml 속에 있는 시료를 EasySep Filter Column으로 옮겨 13,000rpm으로 2분간 원심분리하고 EasySep Filter Column에 걸러진 시료를 BD 완충용액을 1.5배의 양으로 넣어 주고 가볍게 흔들여 용해한다. 혼합된 시료는 Gene All SV Column에 넣고 13,000rpm으로 30초 동안 원심분리한 후 빠져나온 용액은 버리고 CW 완충용액 700μl를 Gene All SV Column에 넣고 13,000rpm으로 30초 동안 원심분리 후 빠져 나온 용액은 버리고 다시 CW 완충용액 300μl를 Gene All SV Column에 넣고 13,000rpm으로 2분 동안 원심분리 후 Column을 새 1.5μl의 tube로 옮겨준다. DNA회수를 위하여 DNA elution buffer 50μl를 Column에 넣어 5분간 상온에서 반응시킨 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하고 회수된 DNA는 보관하여 PCR을 위한 주형 DNA로서 사용하였다.

2) RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction) 분석

유연관계를 확인하기 위해 10-mer random primer 를 이용하여 PCR을 수행하였다. Template DNA 3μl 와 10-mer random prime 2μl, 그 외 반응 혼합액(PCR premix 10μl ; 2X reaction buffer, 2mM dNTP, 4mM MgCl₂ , Taq polymerase), 멸균수 5μl 를 혼합하여 총 20 μl로 맞춘 후 94℃에서 5분간 pre-denature 한 후 94℃에

서 denature 30초, 32℃에서 annealing 1분, 72℃에서 extension 1분을 1cycle로 하여 35cycle 반복 후 72℃에서 10분간 post-extension, 4℃에서 반응을 종료한다.

3) DNA 전기영동(Electrophoresis)

전기영동을 위해 130ml의 0.5X TBE 용액에 0.5g의 agarose를 첨가하여 1%의 agarose gel을 만든다. 증폭된 PCR product 5μl와 6 X Loading buffer 동량의 5μl를 섞은 시료를 agarose gel에 분주한 후 110V의 전압으로 30분 동안 전기영동을 실시하여 DNA를 분리시키고 EtBr(Amresco, USA)이 희석되어 있는 용액에 Gel 을 15분 동안 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 사정을 촬영하였다. Molecular standard marker로는 100bp DNA ladder marker(Bioneer)를 10μl 사용하였다.

3. 항산화력 측정

초석잡 추출물의 항산화력을 측정기 위해 DPPH를 이용하였다. 즉, 1,1-Diphenyl-2-picrylhy dr -azy(DPPH) 자유기 소거능 측정 Blois법²²⁾에 따라 Test sample을 메탄올에 희석시킨 희석용액 0.2 mL에 4×10⁻⁴ M 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액 0.8 mL를 가하여 10초간 혼합하고, 상온에서 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 메탄올 0.2 mL에 DPPH용액 0.8 mL를 가한 후 상온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하는 것으로 하였다.

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

4. Acetylcholinesterase 저해력 측정

Acetylcholinesterase 활성은 Ellman's coupled enzyme assay²³⁾ 법을 인용하여 측정하였다. 즉, 125μl의 3mM DTNB 와 25μl의 15mM AchE 그리고 50μl의 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 와 검액 25μl를 microplate 에 넣은 뒤, 10분간 방치 후 25μl의 AChE (0.226U/ml)를 넣은 뒤 405nm에서 10분동안 흡광도를 측정하였다. (Model Anthos 2020, Asys hitech GmbH, Austria) 효소활성은 1분동안 흡광도 변화율에 대한 평균값을 계산하여 저해율을 측정하였다²⁴⁾.

5. 수동회피시험(passive avoidance test)

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 LeDoux²⁵⁾의 방법을 응용하여 시행하였다. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 약물투여는 초석잡 추출물 및 tacrine은 10% Tween 80에 녹인 후 경구 투여하였고 (5 ml/kg), 대

조균에는 10% Tween 80을 같은 용량으로 경구 투여하였다. 경구 투여 30분 후에 증류수에 녹인 스코폴라민을 1mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, 스코폴라민 투여 30분 후에 mouse를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문(gillotin door)을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다(Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 각 구획은 20 × 20 × 20 cm 의 공간이다. 이때 길로틴문이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 생쥐는 실험에서 제외시켰으며 일단 생쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문(gillotin door)이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 생쥐는 이를 기억하게 되는데 이 때 길로틴문(gillotin door)이 열린 후 생쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다(학습시험; training trial). 학습시험(training trial)이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 초석잡 80% 에탄올 추출물의 효과를 확인하고자 실시하였다(기억시험; test trial). 실험동물을 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 길로틴문(gillotin door)이 열리고 어두운 쪽으로 생쥐의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 180초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다²⁵⁾. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

6. Y-미로시험(Y-maze test)

약물 투여는 수동회피시험(passive avoidance test)에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로시험에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 팔이 접하는 각도는 120°이다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수식에 의해 계산 된다²⁶⁾.

$$\text{변경 행동력 (\%)} = \frac{\text{실제변경 (actual alternation)}}{\text{최고변경(maximum alternation: 총입장회수-2)}} \times 100$$

7. 수중미로 시험 (Morris water maze test)

약물 투여는 수동회피 시험, Y-미로시험에서와 같은 방법으로 실시하였다. 초석잡 에탄올추출물이 공간기억에 미치는 영향을 조사하기 위해 4일 동안 시험하였고 시험 30분전에 스코폴라민(1 mg/kg body weight)을 투여한 후에 수중미로 시험을 하였다. 수중미로 시험은 Morris²⁷⁾가 제시한 방법에 따라

다음과 같이 실시하였다. 실험장비는 원형의 수조(stainless steel, 지름 90 cm, 높이 45 cm), 도피대(지름 10 cm, 높이 30 cm, 수면아래 1cm 위치에 위치하고 검은색 식용색소를 풀어 보이지 않게 함) 및 도피대의 위치를 기억할 수 있는 4개의 표지물로 구성하였다. 수조는 물(온도 22±2°C)로 채웠고, 도피대는 전체 수조를 4등분한 것 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓았으며 도피대 상단이 수면 0.5 cm 밑에 위치하도록 하였다. 수중미로 시험은 실험동물이 수조 주변의 표지물을 기억하여 도피대를 찾아가기 때문에 주변 환경의 변화가 없도록 표지물을 실험기간 동안 일정하게 유지하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 10초 이상 머무는 경우 도피대를 찾아가지 소요되는 시간을 탈출잠복기(escape latency)로 하였으며, 이를 하루 2번 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출잠복기(mean escape latency)로 하였다. 실험은 1일 2회씩 4일간 연속적으로 실시하였고, 실험동물이 도피대를 180초 이내에 찾지 못하면 동물을 도피대에 10초간 두었다가 실험을 끝내고 탈출잠복기를 180초로 하였다.

8. 통계처리

실험결과는 mean±SD로 표시하였다. Control 값과 시로 처지군과의 유의성은 Student-Newman-Keuls test 와 ANOVA를 적용하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. RAPD 유연관계 분석

RAPD를 위하여 사용된 프라이머는 Table 1에서 요약한 바와 같이 5종류의 프라이머를 각각 사용하였으며 주어진 염기서열대로 디자인한 프라이머를 주문 제작하여 사용하였다.

Table 1. Nucleotide Sequence of Primers for RAPD

| Random Primer | Sequence(5'-3') |
|---------------|-----------------|
| HD 1 | CCA GAT GCA C |
| HD 2 | CCG AAT TCC C |
| HD 3 | ACC CGG TCA C |
| HD 4 | GGA GTA CTG G |
| HD 5 | AAC CCG GGA A |

초석잡과 쉽사리의 뿌리로부터 분리한 DNA와 상기한 프라이머를 사용하여 RAPD를 수행한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻어 본 실험에 사용한 5종류의 프라이머가 공히 2종류의 약초를 쉽게 구분할 수 있는 밴드의 다형성을 보였다. 다형성을 보이는 밴드들의 출현 빈도를 조사한 결과 HD2 프라이머를 사용하였을 경우에 100%의 다형성을 보여 가장 높게 나타났다. 그러나 석잠풀의 경우 주밴드가 2개 뿐이고 다른 약한 밴드는 다형성 분석에 이용하기가 어려운 실정이었다. 반면에 HD3의 경우 총 18개의 밴드를 생산하였으며 이중 석잠풀이 10개, 쉽사리가 8개로서 골고루 분포하였다. 또한 서로 다른 다형성을 보이는 밴드의 개수가 석잠풀이 8개, 쉽사리

리가 5개를 보여 전체 72%의 다형성을 나타내어 가장 좋은 프라이머로 확인되었다(Table 2). HD1은 석잠풀이 17개, 쉽사리가 8개의 밴드를 생산하였으나 밴드와 밴드사이의 경계가 분명하지 않아 데이터로 분석하기가 어려웠으며, HD4와 HD5의 경우에는 밴드의 수가 각각 1개 또는 3개로 개수가 너무 작고 연하여 다형성을 분석하기에는 부적합한 것으로 확인되었다.

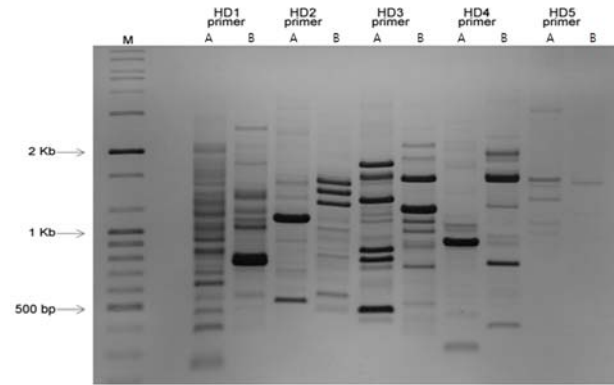


Fig. 1. DNA amplification patterns obtained by Random primer HD 1, 2, 3, 4, 5. A, *Stachys sieboldii* Miq. ; B, *Lycopus lucidus* Trucz

Table 2. Number of PCR products in nucleotide sequence of primers for RAPD

| HD | No. of Amplified DNA band | No. of Polymorphic bands | No. of monomorphic bands | | Poly-morphism (%) |
|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---|-------------------|
| | | | A | B | |
| HD 1 | 25 | 10 | 7 | 3 | 40 |
| HD 2 | 10 | 10 | 4 | 6 | 100 |
| HD 3 | 18 | 13 | 8 | 5 | 72 |
| HD 4 | 9 | 7 | 2 | 5 | 78 |

2. 항산화실험

초석잠의 기원식물로 유통중인 석잠풀(*Stachys sieboldii* Miq.) 쉽사리(*Lycopus lucidus* Trucz)의 80% EtOH 추출물의 항산화력을 평가하기 위해 실시한 DPPH 실험결과를 Table 3 에 제시하였다. 석잠풀 피경 추출물의 DPPH IC₅₀가 1.86 ± 8.7을 나타낸 반면 쉽사리의 피경추출물의 IC₅₀ 는 1.01 ± 6.8 로 나타나 쉽사리 피경의 항산화 효과가 석잠풀에 비해 85% 더 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. IC₅₀ value of Free radical scavenging activity and Acetylcholine Esterase inhibitory effects on Steam-dried *Stachys sieboldii* Miq., *Lycopus lucidus* Trucz Extracts

| Sample | IC ₅₀ (ug/ml) | |
|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| | DPPH assay | Acetylcholinesterase |
| <i>S. sieboldii</i> Ext. | 1.86 ± 8.7 | 4.61 ± 8.3 |
| <i>L. lucidus</i> Ext. | 1.01 ± 6.8 | 18.20 ± 6.4 |
| Ascorbic acid | 0.11 ± 1.3 | - |
| Tacrine | - | 3.10 ± 2.1 |

3. AchE 저해능 실험

Acetylcholinesterase 저해능 실험을 실시한 결과를 Table 3 의 오른쪽에 제시하였는데 이 실험법은 뇌 속의 신경전달 물질 중의 하나인 아세틸콜린의 분해를 가역적으로 억제하는 작용을 측정하여 치매예방약 개발에서 자주 이용되고 있다. 석잠풀 추출물의 AchE IC₅₀가 4.61 ± 8.3 로 나타났는데 비해 쉽사리 추출물의 AchE IC₅₀ 는 18.20 ± 6.4 로 나타나 석잠풀 추출물의 AchE 저해효과가 쉽사리에 비해 3.9 배 강력한 것으로 나타났다.

4. 수동회피실험(Passive Avoidance Test)

실험동물에 전기충격을 가하여 전기 자극을 기억하는 시간을 측정하는 방법으로 학습 및 기억능력을 측정하는 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 생쥐의 수동회피실험에서 latency time이 길어졌다는 것은 초석잠 추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억력과 인지기능감퇴 증상뿐 만 아니라 치매 질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 여겨진다. Fig. 2 에 제시한 바와 같이 석잠풀 피경 에탄올 500mg/kg 로 투여한 군에서 양성대조약물로 사용 중인 Tacrine 의 retention time 의 93%에 해당하는 82.9초의 결과를 나타내고 있다. 한편, Tacrine 10mg/kg 복강투여군의 Retention time 이 89.1초를 나타냈다. 이러한 결과는 상기의 AchE 저해능 실험결과와 같은 양상을 나타낸 것으로 보인다.

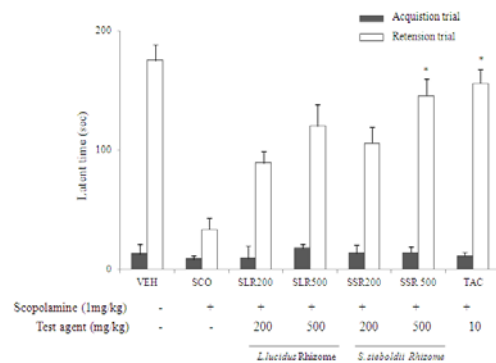


Fig. 2 Inhibitory effects of *Stachys sieboldii* Rhizome(SSR) and *Lycopus lucidus* Rhizome(SLR) extract on scopolamine -induced memory impairment in mice in the Passive avoidance test. Mice were orally administrated SSR,SLR 200 and 500mg/kg; TAC, tacrine (10mg/kg) All values are means ± S.D. (n=6) * Significantly different from the control group(* P<0.05)

5. Y-미로시험

미로시험에서도 Y-maze 와 morris water maze 로 나눠서 실험한 것은, Y-maze 는 공간기억과제이고 주로 작업기억을 바탕으로 하는 학습능력을 알아보기 위한 것이다. 작업 기억이란 정보가 처리되고 있는 동안에 그것을 유지하는 기억을 말하는 것으로서, 보통 기억을 유지하는 시간이 짧기 때문

에 단기기억(Shortterm memory)이라고 한다. Y-maze test에서는 초석잠의 기원식물별 에탄올 추출물 200mg/kg 경구 투여군과 추출물 500mg/kg 투여군의 결과를 제시하였다(Fig. 3). 석잠풀 500mg/kg 투여군에서 대조약물인 Tacrine의 88.2%의 회복력을 나타내었다.

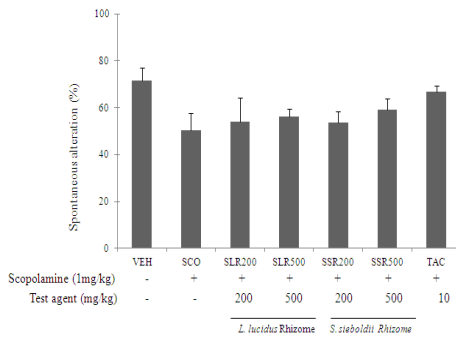


Fig. 3. Inhibitory effects of *Stachys sieboldii* Rhizome and *Lycopus lucidus* Rhizome extract on scopolamine-induced memory impairment in mice in the Y-maze test. Mice were orally administrated SSR,SLR 200 and 500mg/kg; TAC, tacrine (10mg/kg) All values are means \pm S.D. (n=6)

6. 수중미로시험

Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 180초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제 1일째 Control 군은 174.0 ± 2.7 초, scopolamine 투여군은 180.0 ± 0 초로 각 집단간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 Control군은 73.2 ± 8.3 초, scopolamine 투여군은 173.0 ± 1.7 초, scopolamine + 초석잠 추출물 투여군은 114.2 ± 5.3 초, scopolamine + tacrine 투여군은 110.8 ± 5.2 초로 집단간 유의성 있는 차이를 보였다($p < 0.05$). 이에 특정일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 Scopolamine 투여군에서 control 군에 비해 학습능력이 저하되었다. 공간의 학습과 장기기억을 측정하는 Morris 수중미로 시험에서도 4일 동안 실시되는 획득시험에서 96초를 나타내어 79초를 나타낸 양성대조군인 Tacrine 투여군의 80% 수준의 회복력을 나타내었다(Fig. 4).

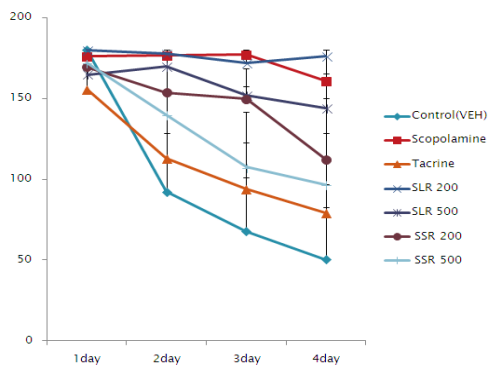


Fig. 4. Inhibitory effects *Stachys sieboldii* Rhizome and *Lycopus lucidus* Rhizome extract on scopolamine-induced memory impairment in mice in the Morris water maze test. Mice were orally administrated SSR, SLR 200 and 500mg/kg; TAC, tacrine (10mg/kg) All values are means \pm S.D. (n=6) * Significantly different from the control group (*P(0.05))

고찰

먼저, 이번 실험에 사용된 초석잠의 기원식물을 명확히 하기 위하여 RAPD법을 이용하여 유연관계를 확인한 결과 유전적으로 서로 상이한 식물임을 확인하였다. 한약재 기원식물의 정확한 검증 및 감별을 위해서 기원식물의 대조를 위해 사용한 RAPD 법은 분자생물학의 발전으로 식물체의 genomic DNA 분석이 품종판별, 품종변이, 식물계통분류 등에 널리 이용되어오고 있으며 이들 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석을 통해 기존의 방법보다 객관적인 방법으로 알려져 있다. 식물 유전자 분석에 의한 한약재감별에 관한 선행 연구로서의 방풍, 인삼, 당귀, 녹용등에 대해서 RAPD 및 RFLP 분석이 계통적으로 진행되어왔었고 중국에서도 RAPD 및 RFLP 법이 밀접한 근연관계의 종을 감별하는데 효과적인 방법으로 알려지고 있다²⁸⁾. RAPD 법으로 유연관계분석결과 약재명 초석잠으로 유통되는 두 식물 상호간의 72%에서 100%의 다형성을 나타내어 기원식물이 다름을 확인하였다.

한편, 호기성호흡을 하는 포유류 에서 산소분자 (O₂)를 이용한 산화환원의 결과 또는 외부에서의 방사선이나 화학물질 등의 노출에 의해 활성산소종이 생성, 축적되어 체내의 항산화 시스템의 기능을 저하 시키고 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발²⁹⁾한다. 치매의 원인물질인 베타아밀로이드의 경우 다양한 활성산소종을 생성하는 것으로 알려져 있으며, 역으로 인위적으로 항산화 성분 및 항산화 효소를 증가시킬 때 베타아밀로이드에 의한 세포독성이 감소되었다³⁰⁾. 고 보고 되어지는 것에서 볼 수 있듯이 이러한 산화적 스트레스 및 ROS는 신경 세포의 파괴와 기능이상을 초래하여 알츠하이머, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 신경 퇴행성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 이러한 산화적 스트레스 억제작용을 검토하기 위해서 DPPH 법을 이용하여 초석잠 기원식물 상호간의 항산화작용을 비교하여보았다.

부교감 신경의 활성을 매개하는 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, Ach)은 작용부위에서 신경의 흥분을 전달한 후 생리활성이 acetylcholinesterase(AchE)에 의해 매우 빨리 소실된다. AchE의 작용을 저해하는 약물들은 콜린수용체 부위에서 아세틸콜린의 축적을 일으켜 콜린수용체를 과다하게 흥분시켜 얻는 효과와 같은 결과를 초래한다. 치매증 치료제로 세계최초로 발매된 tacrine(tetrahydroaminoacridine)은 뇌 속의 신경전달물질중의 하나인 아세틸콜린의 분해를 가역적으로 억제하여 콜린신경의 퇴화로 인해 야기된 아세틸콜린의 부족을 채우는 효과를 가진다³²⁾. 따라서 초석잠 기원식물 상호간의 AchE 억제효과를 in vitro 에서 비교해본 결과 석잠풀 추출물의 저해효과가 쉽사리 추출물에 비해 3.9배 강한 것으로 나타났다.

건망증과 치매는 기억력에 문제가 생기는 것으로 증상은 비슷하지만 건망증은 시간적·공간적인 맥락에서 과거와 현재를 잇는 고리인 기억현상에 차질이 생긴 것으로 개선이 가능한 반면 치매는 단기기억뿐 아니라 기억력 전체가 심각하게 손상됨은 물론 판단력과 언어능력, 작업능력도 현격히 떨어지게 된다. 따라서 치매 모델에 효과가 있는 약물이라도 건망증 모델에서는 그 효능이 나타나지 않을 수 있다³³⁾. 학습과 기억은 뇌의 해마를 중심으로 한 연관부위에서 관여하며, 중추의

콜린성 신경전달계가 중요한 역할을 한다³⁴⁾. 콜린성 신경계 post synapse에 있는 무스카린성 수용체 길항제인 scopolamine은 presynapse에서 유리되는 신경전달 물질인 아세틸콜린과 무스카린성 수용체의 결합을 저해하여 정보전달을 일시적으로 차단함으로써 학습과 기억력을 손상시키게 되므로 학습과 기억력 증진효과를 검증하고자 하는 기억력 감퇴모델에 통상적으로 이용되고 있다³⁵⁾. 상기의 AchE 저해능 실험 결과가 시험관내에서의 기억력 개선효과의 평가실험이었다면 동물실험상의 기억력 개선효과를 평가하기 위해서 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 passive avoidance test를 실시하였다. 이는 흔히 단순기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다. 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 추출물의 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

동물실험의 내용을 종합하면 본 연구에서는 추출물이 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는지를 검색하기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 passive avoidance test, Y-maze test 및 Morris water maze test를 실시하였다. 치매 유도 동물모델 중 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험(Passive avoidance test)에서

석잠풀 추출물의 단회투여에서 대조약물인 Tacrine의 89.1초의 93%에 해당하는 82.9초를 나타내어 석잠풀 추출물이 단회투여에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하여, 정상인 및 인지기능감퇴자인 치매환자에서도 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.

본 연구의 결과를 종합하면 결론적으로, 초석잡 추출물은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효능을 가지는 식품소재라고 생각되며, 이러한 작용이 특히 콜린성 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다. 특히 이변실험에서는 약재의 기원식물에 대해 시사하는 바가 크다. 기원식물에 따른 기억력개선효과의 결과가 약초재배농가에 보급될 경우 농가소득 증대는 이를 이용한 다양한 제품들의 개발이 기대되어진다. 이를 위해서는 유효성분과 유효성분의 효율적인 추출을 위한 연구가 필요하며 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어야 할 필요성이 있다고 사료된다.

결론

본 연구에서는 시중에서 유통중인 초석잡(草石蠶)의 기원식물이 서로 상이한 2가지의 식물임에 착안하여 각각의 식물

의 약용부위를 채취하여 RAPD로 동정한 다음 80% 에탄올에 추출한 추출물을 이용하여 초석잡의 대표효능으로 알려진 기억력 개선효과와 이를 수반하는 항산화효과를 측정하는 실험으로 그 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 본 실험에 이용된 초석잡(草石蠶) 기원식물로 알려진 석잠풀(*Stachys sieboldii* Miq)과 쉽사리(*Lycopus lucidus* Trucz)의 동정을 위해 RAPD로 실시한 유연관계분석결과 상호간의 72%에서 100%의 다형성을 나타내어 초석잡으로 유통되는 기원식물이 서로 다름을 확인할 수 있었다.
2. 기원식물에 따른 초석잡 추출물의 항산화력을 DPPH로 측정한 결과 석잠풀 및 쉽사리 각각 양호한 항산화력을 나타내었으며 그 정도를 비교하면 석잠풀 추출물과 쉽사리 추출물의 IC50가 각각 1.86 과 1.01을 나타내어 쉽사리의 항산화력이 85% 더 우수한 것으로 나타났다.
3. 신경전달물질 분해효소인 AchE 저해능을 같은 방법으로 비교하여 초석잡의 기원식물별로 추출물의 기억력개선효과를 측정하는 결과 DPPH 결과와 달리 석잠풀 추출물의 저해효과가 쉽사리 추출물에 비해 3.9배 강한 것으로 나타났다.
4. 치매 유도 동물모델 중 대표적인 행동 실험 방법인 수동회피실험(Passive avoidance test)에서 석잠풀 추출물의 단회투여에서 대조약물인 Tacrine의 89.1초의 93%에 해당하는 82.9초를 나타내어 석잠풀 추출물이 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시킨 것으로 나타났다.
5. 초석잡 기원식물별 추출물 투여군의 공간 지각력에 영향을 관찰하기 위해 실시한 Y자형 미로 시험에서도 수동회피시험과 같이 석잠풀 추출물 500mg/kg 투여군에서 대조약물인 Tacrine의 88.2%의 회복력을 나타냈다.
6. 공간의 학습과 장기기억을 측정하는 Morris 수중미로 실험에서도 4일 동안 실시되는 획득시행에서 96초를 나타내어 79초를 나타낸 양성대조군인 Tacrine 투여군의 80% 수준의 회복력을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 기억력개선의 효과 측면에서의 초석잡의 기원식물은 석잠풀이 적합한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역연고산업육성사업(산청 동의보감촌 RIS사업)의 지원에 의하여 이루어진 것이므로 이에 사의를 표합니다.

References

1. Min SG. The Latest Psychiatry. Seoul : IlJoGak.

- 2006 : 203.
2. Frank B, Gupta S. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann Clin Psychiatry*. 2005 ; 17 : 269–86.
 3. Hermona S, Shlomo S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001 ; 2 : 294–302.
 4. Talesa VN. Acetylcholine esterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2001 ; 122 : 1961–9.
 5. Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 1997 ; 52 : 511–35.
 6. Hong WS. Sophisticated translation version, su wen in Yellow Emperor's internal classic. Seoul : The Institute of Oriental Medicine. 1981 : 218.
 7. Park SK, Lee HJ, Kim HT. An experimental study of drialental medicine on cure for dementia : the effect of Jowiseungcheongtang and Hyungbangjihwangtang on cure for aged rats. *J Oriental Neropsychiatry* 1998 ; 9(2) : 19–35.
 8. Lee DW, Shin GJ, Lee WC. A Comparative Consideration of Treatment on Dementia in Oriental and Occidental Medicine. *J Dong Guk Oriental Medicine*. 1995 ; 3 : 67–80.
 9. Lee CB. Illustrated flora of Korea. Seoul : Hyang Moon Sa. 1999 : 652.
 10. Yin J, Yang G, Wang S, Chen Y. Purification and determination of stachyose in Chinese artichoke (*Stachys Sieboldii* Miq.) by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Talanta*. 2006 ; 70 : 208–12.
 11. Yamahara G. Studies on the *Stachys sieboldii* Miq. II. Anti-anoxia action and the active constituents. *Med Mega*. 1990 ; 110 : 932–5.
 12. Takeda Y, Fujita T, Satoh T, Kakegawa H. On the glycoside constituents of *Stachys sieboldii* Miq. and their effects on hyarulonidase activity. *Yakugaku Zasshi*. 1985 ; 105 : 955–9.
 13. Ryu BH, Park BG, Song SK. Antitumor effects of the hexane extract of *Stachys sieboldii* Miq. *Kor J Biotechnol Bioeng*. 2002 ; 17 : 520–4.
 14. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Yagita H, Suzuki Y. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* Miq, may be a promising antinephritic agent. *Jpn J Pharmacol*. 1996 ; 70 : 157–68.
 15. Shin JH, Shin YW. Illustrated book of Medicinal herbs from Hyang Yak Jip Seong Bang. Daegu : KMU Press. 2006 : 123, 147.
 16. Woo ER, Piao MS. Antioxidative Constituents from *Lycopus lucidus* Arch. *Pharm Res*. 2004 ; 27 : 173–6.
 17. Shin SH, Sim Y, Kim YS, Chi HJ, Lee EB. Studies on Essential Oils of *Lycopus lucidus* Turcz. *Kor J Pharmacogn*. 1992 ; 23 : 29–33.
 18. Bak JP, Kim JB, Park JH, Yang YJ, Kim IS, Choung ES, Kang SC. Screening and Compound Isolation from Natural Plants for Anti-allergic Activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2011 ; 54 : 367–75.
 19. Kim MH. The antidiabetic properties of fractions of *Lycopus lucidus* Turcz in streptozotocin diabetic rats. *Korean J Soc Food Sci*. 2000 ; 16 : 644–51.
 20. Brinker ND. Inhibition of endocrine function by botanical agents. *J Naturopathic Med*. 1990 ; 1 : 10–5.
 21. Ryu BH, Kim SO. Effect of Methanol Extract of *Stachys sieboldii* MIQ on Acetylcholine Esterase and Monoamine Oxidase in Rat Brain. *Korean J Food Nutr*. 2004 ; 17(4) : 347–55.
 22. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199–200.
 23. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961 ; 7 : 88–95.
 24. Ingkaninan K, de Best CM, van der Heijden R, Hofte AJ, Karabatak B, Irth H, Tjaden UR, van der Greef J, Verpoorte R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *J Chromatogr A*. 2000 ; 872 : 61–73.
 25. LeDoux JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 ; 702 : 149–57.
 26. 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.
 27. Morris RG. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth*. 1984 ; 11 : 47–60.
 28. Choi HY, Kim DW, Kim DE, Suh YB, Ham IH. The Relative Identification of *C. officinale* and *L. chuanxiong* by PCR-Mediated Fingerprinting. *Kor J Herbology*. 2005 ; 20(4) : 151–61.
 29. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993 ; 262 : 689–95.
 30. Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sci*.

- 2011 ; 88 : 82-8.
31. Satoh T, Lipton SA. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. Trends Neurosci. 2007 ; 30 : 37-45.
 32. Jung SH. The development and application of enzyme inhibitors, seoul : Shinil Pub, 1997 : 7-11.
 33. Choi CH. The effect of Gardenia Jasminoides Extract and geniposide ameliorate learning and memory impairment. Daegu Haany University. 2008.
 34. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci 1999 ; 22 : 105-22.
 35. Tanabe F, Miyasaka N, Kubota T, Aso T. Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spatial memory. J Med Dent Sci, 2004 ; 51 : 89-98.