

β -Asarone이 Lipopolysaccharide에 의한 생쥐 해마의 염증성 사이토카인 발현과 학습 및 기억 장애에 미치는 영향

최문숙[#], 곽희준, 권기중, 황지모, 신정원, 손낙원^{*}

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

Effects of β -Asarone on Pro-Inflammatory Cytokines and Learning and Memory Impairment in Lipopolysaccharide-Treated Mice

Moon-Sook Choi[#], Hee-Jun Kwak, Ki-Jung Kweon,
Ji-Mo Hwang, Jung-Won Shin, Nak-Won Sohn^{*}

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : β -Asarone (BAS) is an active ingredient in *Acori Rhizoma*. This study investigated anti-neuroinflammatory and memory ameliorating effects of BAS in systemic lipopolysaccharide (LPS)-treated C57BL/6 mice.

Methods : BAS was administered orally at doses of 7.5, 15, and 30 mg/kg for 3 days prior to LPS (3 mg/kg, intraperitoneal) injection. Pro-inflammatory cytokine mRNA, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6, was measured in hippocampus tissue using real-time polymerase chain reaction at 4 h after the LPS injection. An ameliorating effect of 30 mg/kg BAS on learning and memory impairment in the LPS-treated mice was verified using the Morris water maze test.

Results : BAS significantly attenuated up-regulation of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA in hippocampus tissue of the LPS-treated mice. In acquisition training test, BAS improved learning performance of the LPS-treated mice with a significant decrease of escape latency to the platform. In memory retention test, BAS also ameliorated memory impairment of the LPS-treated mice with a significant increase of swimming time in zones neighboring to the platform, number of target heading, and memory score.

Conclusion : The results suggest that inhibition of pro-inflammatory cytokines and neuroinflammation in the hippocampus by BAS could be one of the mechanisms for BAS-mediated ameliorating effect on learning and memory impairment in LPS-treated mice.

Key words : β -Asarone, *Acori Rhizoma*, neuroinflammation, memory impairment, Morris water maze

서론

학습과 기억의 저장에 대한 신경생물학적 기전은 뇌 해마 부위에서 반복적 자극에 의해 장시간 유지되는 세포막전위의 증가 현상인 장기전위증강 (long-term potentiation, LTP) 과 새로운 신경연접의 생성에 관여하는 활동의존적 신경연접 가소성 (activity-dependent synaptic plasticity) 등으로 설

명하고 있다^{1,2)}. 한편으로 사이토카인은 다양한 세포들에서 분비되며 손상이나 감염에 대한 면역반응 조절과 세포간 신호 전달을 담당하는 물질이다. 중추신경계 내에서 생성 분비된 사이토카인은 수면, 섭식, 배란 등 다양한 중추신경계 작용에 관여하고 있으며³⁾, 나아가 학습과 기억 형성을 포함한 인지기 능에도 영향을 미친다⁴⁾. 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 등은 주로

*교신저자 : 손낙원, 경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 전자정보관 444호
· Tel : 031-201-2747 · Fax: 031-204-6832 · E-mail : sohnw@khu.ac.kr
#제1저자 : 최문숙, 경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 전자정보관 444호
· Tel : 031-201-2747 · Fax: 031-204-6832 · E-mail : nekk95@hanmail.net
· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 09일 · 채택 : 2013년 11월 12일

신경아교세포들에서 분비되어 신경세포의 손상과 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease, AD) 등 퇴행성 중추신경계질환의 매우 중요한 유발인자이다^{5,6)}. 특히 해마에서 증가된 염증성 사이토카인의 발현과 분비는 LTP 생성을 억제하여 학습과 기억의 장애를 유발한다고 하였다^{7,8)}.

β -Asarone은 石菖蒲 (Acori Rhizoma)의 대표적인 정유 성분 중 하나로 중추신경계에 대해 강력한 약리작용을 발휘한다고 하였으며⁹⁻¹¹⁾, 石菖蒲 역시 遠志, 人蔘, 茯苓 등과 배합하여 神志不清, 驚悸健忘 등의 뇌 인지기능 저하에 사용되어 왔다¹²⁾. 실험연구를 통해 β -Asarone은 beta-amyloid ($A\beta$)에 의한 신경세포 자연사 증가를 억제하는 효능이 있다고 하였다^{13,14)}. 최근에는 β -Asarone이 해마에 $A\beta$ 를 주입한 흰쥐에서 해마 신경세포의 자연사를 억제하는 기전에 의해 인지기능을 개선하였다는 보고가 있고¹⁵⁾, d-galactose와 aluminum chloride에 의한 AD모형 흰쥐에서 뇌혈류를 증가시키고 endothelin-1 발현을 억제하는 기전에 의해 공간기억력 장애를 개선하였다는 보고가 있다¹⁶⁾. 그러나 β -Asarone이 중추신경염증 (neuroinflammation)에 미치는 영향이나 그에 따른 염증성 사이토카인 증가와 학습과 기억 장애에 대한 영향이 보고된 바가 없었다.

그러므로 본 연구에서는 石菖蒲의 주성분 중 하나인 β -Asarone이 학습 및 기억 장애에 대한 개선 효능을 관찰하기 위해, 중추신경계 염증과 인지기능 장애를 유발하는 lipopolysaccharide (LPS)¹⁷⁾를 복강주사한 생쥐의 해마에서 염증유발사이토카인의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 Morris 수중미로 장치를 사용하여 β -Asarone이 LPS 처리된 생쥐의 학습 수행 및 기억 유지에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Korea)에서 구입한 25-28 g의 수컷 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 경희대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험에 사용한 생쥐는 온도 (21-23 °C), 습도 (40-60 %)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약물 및 시약

본 실험에 사용한 β -Asarone (*cis*-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxy-benzene, Fig. 1)과 lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* O55:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Real-time polymerase chain reaction (PCR)에 필요한 kit와 시약들은 Bio-Rad Korea Customer Service (Seoul, Korea)로부터 공급받았으며, 그 이외의 시약들은 전문제조회사의 실험실용 최고 품질의 시약을 구입하여 사용하였다.

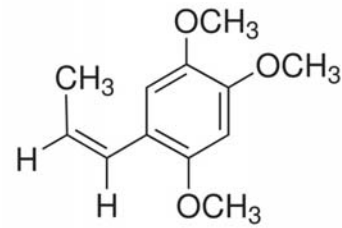


Fig. 1. Chemical structure of β -Asarone

2. 방법

1) 실험군의 구분

생쥐를 무작위로 5개 군으로 구분하였다. 정상군 (Normal)은 약물처리 없이 통상적으로 사육하였으며, 대조군 (LPS)은 생리식염수를 3일간 경구투여한 후 3일째, LPS의 복강주사에 의해 뇌조직의 염증성 사이토카인 발현을 유의하게 증가시킨 용량인 3 mg/kg을 복강주사 하였다¹⁷⁾. β -Asarone을 투여한 군은 투여용량에 따라 7.5 mg/kg 투여군 [LPS+BAS(7.5)], 15 mg/kg 투여군 [LPS+BAS(15)] 및 30 mg/kg 투여군 [LPS+BAS(30)]으로 구분하였으며, 각각의 용량을 생리식염수에 녹여 LPS의 복강주사 3일전부터 1일 1회 경구투여하고 3일째 경구투여 1시간 후에 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다. 염증성 사이토카인 mRNA의 real-time PCR 측정에는 LPS 복강주사 4시간 후에 실시하였으며 각 군 당 6마리씩 30마리의 실험동물이 사용되었다. Morris 수중미로 실험은 3일간의 학습 훈련과 4일째 기억유지 측정으로 총 4일간 실시하였으며, β -Asarone은 염증성 사이토카인 mRNA에 대한 가장 유효한 용량 한 가지에 대해 효능을 확인하였다. Morris 수중미로 실험에는 각 군 당 10마리씩 30마리, 총 60마리의 실험동물이 사용되었다.

2) 염증성 사이토카인 mRNA 측정

염증성 사이토카인 중 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현을 해마조직에서 정량적인 real-time PCR 방법으로 측정하였다. LPS 복강주사 4시간 후에 생쥐를 단두로 희생시키고 뇌를 적출하여 해마를 분리하였으며, 해마 조직으로부터 Trizol (Qiagen, Germany)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 이후 1 μ g의 total RNA와 Script cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 DNA로 역전사 하였으며, 정량적 real-time PCR은 CFX 96 REAL-TIME PCR Detection System (Bio-Rad, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, USA)와 preoptimized primer/probe mixture를 사용하여 측정하였다. Housekeeping gene으로는 β -actin을 사용하였으며, 측정에 사용된 gene의 primer sequence는 (1) TNF- α ; forward, 5'-TGA GAA GTT CCC AAA TGG C-3'; reverse, 5'-GCT ACA GGC TTG TCA CTC-3'; (2) IL-1 β ; forward, 5'-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3'; reverse, 5'-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'; (3) IL-6; forward, 5'-AGA CTT CAC AGA GGA TAC CA-3'; reverse, 5'-GCA TCA TCG TTG TTC ATA CA-3'; (4) β -actin; forward, 5'-TTT CCA GCC TTC CTT GGG TAT G-3';

reverse, 5'-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC-3' 과 같다. 이의 측정방법은 제조사의 사용설명서에 따랐으며, 각 시료로부터 측정된 mRNA 발현량은 Normal군의 측정치를 1로 하여 그 배수 (fold change)를 자료로 사용하였다.

3) Morris 수중미로 장치에 의한 학습 훈련

Morris 수중미로 장치는 원형 수조와 도피대 및 computerized video-tracking system (Panlab, Cornella, Spain)으로 구성되었다. 수조는 직경 100 cm, 높이 40 cm인 원통형 플라스크로 만들어졌으며, 도피대는 직경 10 cm, 높이 27 cm의 원통형으로 백색 아크릴로 만들었다. Video tracker는 수조 위 2.4 m에 설치된 CCD카메라와 컴퓨터로 구성되었으며, 실험동물의 행동양상 추적 및 분석은 SMART video tracking system (ver. 2.5; Panlab, Cornella, Spain)를 사용하였다. 수조에는 온도가 23±1 °C되는 물을 도피대가 0.5 cm 깊이로 잠기도록 27.5 cm 높이로 채웠으며, 1 kg의 탈지분유를 물에 풀어 도피대가 보이지 않도록 하였다. 수조의 주위에 각종 모형의 공간단서 (visual cue)들을 설치하였으며, 실험기간동안 실험대, 컴퓨터, 의자 등 실험실 내 환경 및 실험자의 위치 또한 일정하게 유지하였다. 수중미로는 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)의 사분면으로 나누어 구분하였으며, 이중 남서(SW) 사분면의 중심부에 도피대를 설치하였다.

수중미로 학습훈련은 생쥐들이 수조 속에서 자유롭게 수영하면서 스스로 숨겨진 도피대를 찾아 올라가도록 하였다. 스스로 도피대를 찾아낸 생쥐들은 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였으며, 도피대에 도달한 시간을 기록하였다. 60초 이내에 도피대를 스스로 찾아내지 못한 생쥐들은 실험자가 조심스럽게 도피대 쪽으로 유도한 다음 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였으며, 도피대에 도달한 시간은 60초로 기록하였다. 이러한 수중미로 학습 훈련을 생쥐 당 1일 8회 3일간 동일한 시간대에 실시하였으며, 매 수영 때마다 수조의 정중앙에서부터 생쥐의 머리를 N-E-S-W-N-E-S-W 방향으로 향하게 한 상태로 수영을 시작하게 하였다. 또한 매일 학습 훈련 2시간 전에 LPS+BAS군에는 β -Asarone 30 mg/kg을 경구투여 하였고 대조군에는 동량의 생리식염수를 경구투여 하였으며, 3일째에 학습훈련 1시간 전에 LPS군과 LPS+BAS(30)군 모두에 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다.

4) Morris 수중미로 장치에 의한 공간기억 유지 측정

수중미로실험 4일째, LPS를 복강주사한 24시간 후에, 공간기억 유지 검사를 실시하였다. 각 군의 생쥐들을 도피대가 제거된 동일한 수조에서 1회 60초간 자유롭게 수영하면서 도피대를 찾도록 하였으며, 그 수영 경로를 video tracker를 통해 궤적을 추적하여 컴퓨터 분석시스템에 저장하였다. 컴퓨터 분석시스템 상에서 수조의 공간을 도피대 위치를 중심으로 6개의 구역으로 나누고 각각의 구역에 아래와 같은 점수를 할당하였으며, 60초 동안의 수영 시간 중 각 구역을 수영한 시간을 별도로 계산하였다 (Fig. 2). 각 구역을 수영한 시간에 각 구역의 점수를 곱한 값을 합산하여 기억유지점수

(memory score)를 계산하였다. 이러한 분석 구역의 도안과 기억유지점수의 계산은 Smith 등¹⁸⁾의 실험방법을 변형하여 사용하였으며, 분석과 계산은 SMART video tracking system을 사용하였다.

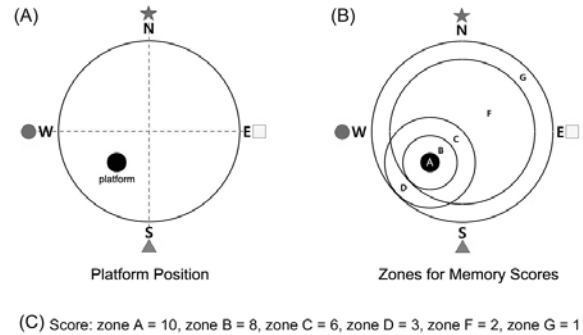


Fig. 2. Schematic diagram of platform position in the swimming pool and zones for memory scores in the retention test.

5) 통계처리

본 연구에서 제시된 자료들은 Mean±Standard error로 표시되었다. 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 LPS군과 LPS+BAS군들 사이에서 p<0.05 이상의 유의수준으로 검정하였으며, 수중미로 학습 훈련의 자료들은 one-way ANOVA 검증을 실시하였다.

결 과

1. 해마 조직의 염증성 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

염증성 사이토카인의 일종인 TNF- α mRNA 발현을 해마 조직에서 측정한 결과, Normal군의 1.3±0.2 배에 비해 LPS군은 79.3±4.9 배로 매우 현저한 증가를 나타내었다. 이에 비하여 β -Asarone을 용량별로 투여한 LPS+BAS(7.5)군은 51.2±10.1 배, LPS+BAS(15)군은 45.4±11.0 배, LPS+BAS(30)군은 32.3±9.8 배로 감소하여, LPS군에 비해 7.5 mg/kg과 15 mg/kg의 BAS군은 p<0.05, 30 mg/kg의 BAS군은 p<0.01의 유의성 있는 TNF- α mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 3-A). IL-1 β mRNA 발현은 Normal군의 1.0±0.2 배에 비해 LPS군은 57.8±10.2 배로 매우 현저한 증가를 나타내었다. 이에 비하여 β -Asarone을 용량별로 투여한 LPS+BAS(7.5)군은 43.8±12.3 배, LPS+BAS(15)군은 25.8±5.9 배, LPS+BAS(30)군은 20.8±4.4 배로 감소하여, LPS군에 비해 15 mg/kg의 BAS군은 p<0.05의 유의성, 30 mg/kg의 BAS군은 p<0.01의 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 3-B). 또한 IL-6 mRNA 발현 역시 Normal군의 1.1±0.2 배에 비해 LPS군은 41.0±3.1 배로 매우 현저한 증가를 나타내었으며, 이에 비하여 β -Asarone을 용량별로 투여한 LPS+BAS(7.5)군은 35.3±6.4 배, LPS+BAS(15)군은 29.0±4.9 배, LPS+BAS(30)군은 22.9±7.1 배로 감소하여, LPS군에 비해 30 mg/kg의 BAS군이 p<0.05의 유의성 있는 IL-6 mRNA 발현의 감소를

나타내었다 (Fig. 3-C).

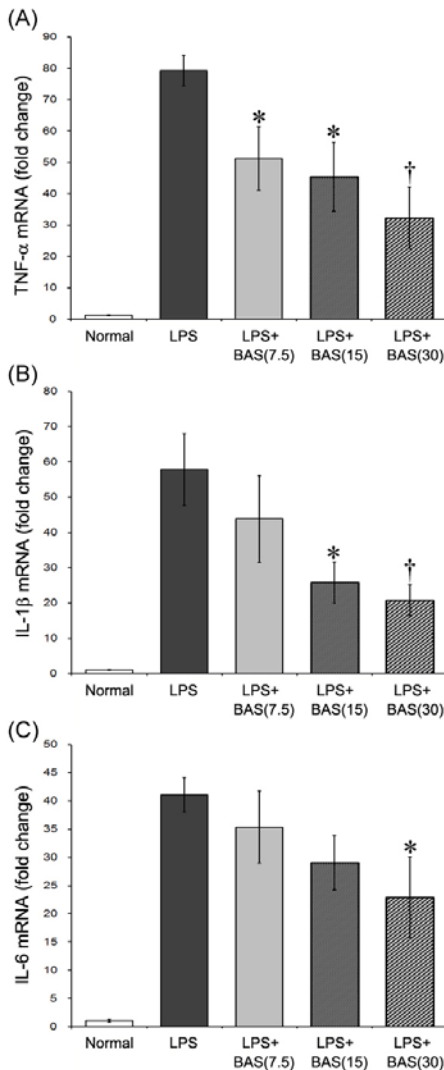


Fig. 3. Effects of β -Asarone on TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA expressions in the hippocampus tissue. LPS group showed the robust increases of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus tissue. β -Asarone significantly attenuated TNF- α mRNA at all three doses of 7.5, 15, and 30 mg/kg (A), IL-1 β mRNA at doses of 15 and 30 mg/kg (B), and IL-6 mRNA at a dose of 30 mg/kg (C) compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared between LPS and LPS+BAS groups (*, p<0.05; †, p<0.01).

2. 수중미로 학습 훈련에 미치는 영향

3일간의 수중미로 학습 훈련에서 도피대를 찾아 오르기까지의 회피시간 (escape latency)은 1일차에는 Normal군과 LPS군 및 LPS+BAS군 모두 1차 수영에서는 약 59.7 초에서 8차 수영에서 약 27.4 초로 짧아졌으며, 각 군 사이에 통계학적 차이는 없었다. 2일차에도 Normal군과 LPS군 및 LPS+BAS군 모두 1차 수영에서는 약 44.8 초에서 8차 수영에서 약 14.3 초로 짧아졌으며, 역시 각 군 사이에 통계학적 차이는 없었다. LPS를 주사한 3일차에는 Normal군이 1차에서부터 8차 수영까지 22.1 \pm 3.3 초, 15.4 \pm 5.3 초, 14.0 \pm 2.7

초, 10.6 \pm 1.7 초, 8.4 \pm 2.8 초, 9.9 \pm 1.5 초, 7.3 \pm 1.9 초 및 7.1 \pm 2.0 초로 짧아진 것에 비해 LPS군은 29.5 \pm 4.1 초, 25.3 \pm 4.8 초, 22.3 \pm 4.3 초, 22.9 \pm 3.5 초, 19.5 \pm 2.2 초, 19.2 \pm 1.7 초, 18.5 \pm 2.0 초 및 18.6 \pm 1.6 초로 Normal군에 비해 4차와 5차 수영에서는 p<0.01, 6차부터 8차 수영까지는 p<0.001의 유의성 있는 회피시간의 연장을 나타내었다. 이에 비해 β -Asarone (30 mg/kg)을 투여한 LPS+BAS군은 1차에서부터 8차 수영까지 31.0 \pm 7.3 초, 17.9 \pm 5.7 초, 16.6 \pm 5.4 초, 16.3 \pm 5.6 초, 16.1 \pm 3.8 초, 13.1 \pm 2.8 초, 12.4 \pm 2.0 초 및 11.8 \pm 2.2 초를 나타내어 LPS군에 비해 7차와 8차 수영에서 p<0.05의 유의성 있는 회피시간의 단축을 나타내었다 (Fig. 4). 각 군들의 8차례 훈련 전체에 대한 one-way ANOVA 검증 결과, 1일째는 $F_{2,21}=0.0138$, $p=0.9863$, 2일째는 $F_{2,21}=0.0069$, $p=0.9931$ 로 Normal, LPS 및 LPS+BAS군 사이에 차이가 없었다. 3일째에는 $F_{2,21}=7.8897$, $p=0.0028$ 로 3군 사이에 유의한 차이가 인정되었으며, Normal군과 LPS군 사이에는 $F_{1,14}=20.1905$, $p<0.001$ 로 매우 유의한 차이가 있었고, LPS군과 LPS+BAS군 사이에는 $F_{1,14}=3.8988$, $p=0.0684$ 로 유의한 차이가 없었다.

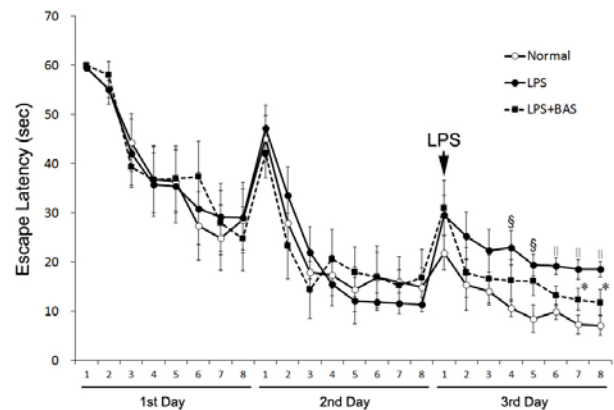


Fig. 4. Effect of β -Asarone on the escape latency to the platform in the Morris water maze. On 3rd day, LPS group exhibited a significant prolongation of the escape latency compared to the normal group. β -Asarone (LPS+BAS, 30 mg/kg) significantly reduced the escape latency on 7th and 8th trial of 3rd day compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=10 in each group). Statistical significances are compared between LPS and LPS+BAS groups (*, p<0.05) and between Normal and LPS groups (§, p<0.01; ‡, p<0.001).

3. 수중미로의 구역별 수영시간에 미치는 영향

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영하는 동안 도피대 위치를 중심으로 각 구역별 수영시간을 측정된 결과, Normal군은 zone A에서 3.9 \pm 0.4 초, zone B에서 18.5 \pm 1.5 초, zone C에서 17.0 \pm 0.8 초, zone D에서 1.3 \pm 0.4 초, zone F에서 15.4 \pm 1.7 초 및 zone G에서 3.8 \pm 0.9 초를 수영하였으며, LPS군은 각각 1.7 \pm 0.3 초, 8.7 \pm 1.0 초, 13.2 \pm 1.5 초, 3.3 \pm 0.7 초, 24.7 \pm 1.4 초 및 8.5 \pm 2.0 초로 Normal군에 비해 zone A와 zone B에서의 수영시간이 매우 유의성 (p<0.001) 있게 감소하였으며, zone C와 zone D에서의 수영시간도 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였고, zone F에서의 수영시간은 매우

유의성 ($p < 0.001$) 있게 증가하였다. 이에 비해 β -Asarone (30 mg/kg)을 투여한 LPS+BAS군은 각각 4.2 ± 0.6 초, 16.4 ± 2.1 초, 12.6 ± 1.6 초, 1.6 ± 0.4 초, 18.4 ± 3.1 초 및 7.0 ± 1.6 초로 LPS군에 비해 zone A와 zone B에서의 수영시간이 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 5, 6-A).

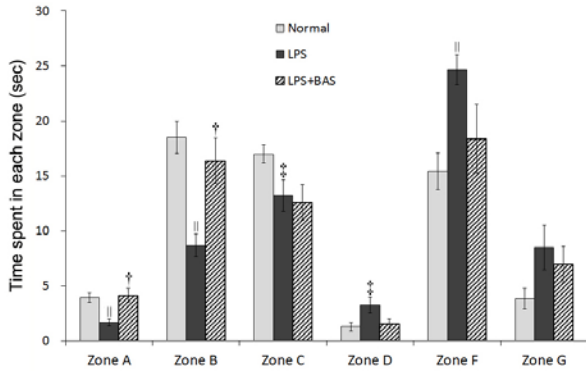


Fig. 5. Effect of β -Asarone on the time spent in each zones of the Morris water maze. In LPS group, the time spent in zones A-D was significantly reduced, while the time spent in zone F was significantly increased compared to the normal group. β -Asarone group (LPS+BAS, 30 mg/kg) showed a significant increase of the time spent in zone A and zone B compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=10 in each group). Statistical significances are compared between LPS and LPS+BAS groups (\dagger , $p < 0.01$) and between Normal and LPS groups (\ddagger , $p < 0.05$; \parallel , $p < 0.001$).

4. 공간기억력 유지에 미치는 영향

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영한 궤적으로부터 기억유지점수를 측정한 결과, Normal군은 328.0 ± 8.4 점 이었고, LPS군은 233.2 ± 13.8 점으로 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였으며, β -Asarone (30 mg/kg)을 투여한 LPS+BAS군은 296.3 ± 15.5 점으로 LPS군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 기억유지점수의 증가를 나타내었다 (Fig. 6-A, B). 또한 도피대 위치인 zone A에 진입한 횟수를 측정한 결과, Normal군은 5.6 ± 0.9 회였고, LPS군은 2.2 ± 0.6 회로 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였으며, LPS+BAS군은 4.8 ± 1.0 회로 LPS군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 도피대 위치 진입 횟수의 증가를 나타내었다 (Fig. 6-A, C).

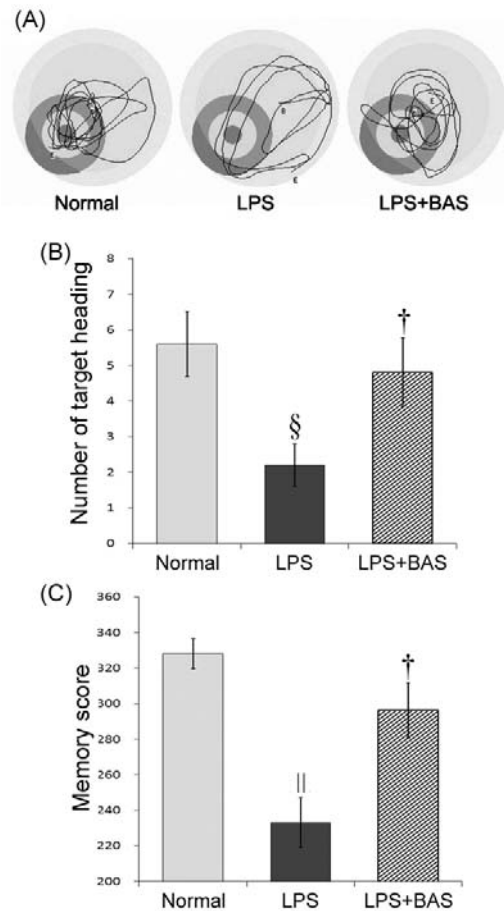


Fig. 6. Effects of β -Asarone on the memory retention test of the Morris water maze. (A) Representative swimming tracts of the Normal, LPS, and LPS+BAS groups. LPS group showed a significant reduction of the number of target heading and the memory score compared to the normal group, while β -Asarone group (LPS+BAS, 30 mg/kg) exhibited a significant increase of the number of target heading (B) and the memory score (C) compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=10 in each group). Statistical significances are compared between LPS and LPS+BAS groups (\dagger , $p < 0.01$) and between Normal and LPS groups (\S , $p < 0.01$; \parallel , $p < 0.001$).

고찰

본 연구의 주요결과는 石菖蒲의 정유성분인 β -Asarone이 LPS의 복강주사에 의해 유발된 중추신경염증 상태에서 해마 조직의 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, Morris 수중미로 실험에서 공간기억력 유지에 유의한 효능을 나타내었다는 것이다.

사이토카인은 다양한 세포들에서 분비되어 손상이나 감염에 대한 면역반응의 조절과 세포간 신호전달을 담당하는 면역 조절 물질이다. 사이토카인은 면역체계에 대한 결과적 반응에 따라 IL-1, IL-6 및 TNF 등 면역체계를 자극하는 염증성 사이토카인과 IL-4, IL-10 및 IL-13 등 면역체계를 억제하는 항염증성 사이토카인으로 분류된다³⁾. 말초의 세포들에서 생성 분비된 사이토카인은 뇌실주위기관 (circumventricular organ)과 같은 투과성이 높은 혈액뇌관문 (blood-brain barrier) 부위를 통과하여 이차적으로 뇌 세포들에서 사이토

카인을 생성 분비하게 한다¹⁹). 중추신경계 내에서 생성 분비된 사이토카인은 수면, 섭식, 배란 등 다양한 중추신경계 작용에 관여하고 있으며²⁰), 나아가 인지기능, 학습과 기억 등에도 영향을 미친다⁴). 다양한 중추신경계 질환에서 염증성 사이토카인들은 주로 미세아교세포와 별아교세포에서 분비되며²⁰), 염증성 사이토카인의 과발현은 신경세포의 손상과 퇴행성뇌질환 발생의 매우 중요한 인자가 된다²¹). 특히 알츠하이머병 등의 신경퇴행성 변화는 IL-1 β 와 TNF- α 같은 염증성 사이토카인의 점진적인 증가와 밀접한 관련이 있다고 하였다²¹).

LPS는 Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분으로 endotoxin으로 작용한다²²). 복강에 투여된 LPS는 중추신경계 조직 내의 미세아교세포, 성상아교세포, 신경세포 및 뇌혈관세포 등 다양한 세포들에 위치한 toll-like receptors (TLRs)에 의해 인지되며²³), 이 TLRs가 세포내 신호전달체계인 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 활동을 증가시키는 기전에 의해 미세아교세포를 활성화시키고, 이어서 염증성 사이토카인과 adhesion molecules, nitric oxide, prostaglandin 등의 분비에 의해 뇌조직의 염증을 확산시키고 신경세포를 손상시킨다^{23,24}). LPS 처리에 의한 뇌조직의 염증반응이 amyloid precursor protein (APP) 발현 증가와 A β 침착을 촉진한다는 것이 보고되었고²⁵), 그러므로 만성적으로 LPS 처리된 실험동물은 알츠하이머병 실험모형으로도 활용되고 있다. LPS에 의해 급성적으로 유발된 중추신경염증에서 미세아교세포의 활성화와 중성백혈구의 침윤, 염증성 사이토카인의 mRNA 및 단백질 발현이 4-8시간 내에 나타나며 1-3일 동안 지속된다고 하였다²⁶). 그러므로 본 실험에서는 β -Asarone을 3일간 사전 투여한 상태에서 LPS를 복강주사하고 4시간 후에 염증성 사이토카인의 일종인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 뇌 해마조직에서 real-time PCR 방법으로 측정하였다.

본 연구에서 β -Asarone에 대한 독성실험을 실시하지는 않았으나, 기존의 *in vivo* 연구들에서 12.5-50 mg/kg¹⁵) 또는 25-100 mg/kg¹⁶)의 용량에서 독성 없이 유의한 효능을 발휘한 것으로 보고되었으므로 본 실험에서는 7.5-30 mg/kg의 용량을 사용하였다. 본 실험의 결과, LPS의 복강주사는 해마 조직에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현을 현저하게 증가시켰으며, β -Asarone은 7.5 mg/kg, 15 mg/kg 및 30 mg/kg의 모든 용량에서 TNF- α mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 또한 15 mg/kg과 30 mg/kg 용량에서 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, 30 mg/kg 용량에서는 IL-6 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 이전의 연구에서 해마조직의 염증성 사이토카인에 대한 β -Asarone의 영향이 보고된 바는 없었다. 본 실험의 결과 30 mg/kg 용량의 β -Asarone은 해마조직에서 염증성 사이토카인들의 발현을 유의하게 억제하는 효능을 보여주었다.

이러한 결과는 β -Asarone이 해마에서의 중추신경염증에 따른 인지기능 장애에 대해서도 유의한 영향을 미칠 수 있음을 추측하게 한다. 기존의 연구보고를 살펴보면, β -Asarone은 *in vitro* 연구에서 A β 자극에 의한 신경세포 자연사를 억제한다고 하였고^{13,14}), *in vivo* 연구에서도 해마에서 Bad, Bax 및 caspase-9 발현을 억제하는 기전에 의해 신경세포 자연사를 억제하는 효능이 있다고 하였다²⁷). 또한 알츠하이머병과 관련하여 β -Asarone이 해마에 A β 를 주입한 흰쥐에서

Bcl-2, caspase-3 및 c-Jun N-terminal kinase 활성을 억제하는 기전에 의해 해마 신경세포의 자연사를 억제하고, 인지기능을 개선하였다는 보고가 있고¹⁵), d-galactose와 aluminum chloride의 복합투여에 의한 AD모형 흰쥐에서 endothelin-1 발현을 억제하는 기전에 의해 뇌혈관 보호와 뇌혈류 증가를 통해 공간지남력 장애를 개선하였다는 보고가 있다¹⁶). 나아가 본 실험에서는 LPS 복강주사에 의해 유발된 해마에서의 중추신경염증에 따른 학습과 기억 장애에 대한 β -Asarone의 영향을 관찰하고자 하였다.

말초에 주입된 LPS가 생쥐의 인지행동 장애를 유발한다는 보고는 많다²⁸⁻³⁰). 복강에 주입된 LPS는 염증성 사이토카인 분비를 유발하고, 이는 음식과 수분 섭취량의 감소, 활동량의 감소, 수면 연장 등 일종의 "sickness behavior"를 나타내고, 나아가 학습과 기억장애를 포함한 인지기능 장애가 유발된다고 하였다^{31,32}). 이러한 인지기능 장애의 유발은 해마에서의 염증이 신경연접의 퇴화와 수상돌기가지 (dendritic spine)의 감소를 촉진한 결과이며³³), TNF- α 와 IL-1 β 가 해마 신경세포의 LTP 생성을 억제한 결과로 설명된다^{7,8}). 또한 LPS의 복강주사에 의해 대뇌피질과 해마에서 A β 생성과 β -secretase 작용이 증가한다고 하였으며, 7일간의 LPS 투여는 해마 신경세포 내에 A β 가 축적된 것을 면역조직화학염색으로도 확인할 수 있다고 하였다²⁹). LPS가 해마에서 Tau 단백질의 인산화를 촉진한다는 보고도 있다³⁴). LPS가 A β 생성을 촉진하는 기전에 대해 아직은 완전하게 밝혀지지 않았지만, LPS에 의한 해마에서의 미세아교세포와 별아교세포의 활성화와 염증유발사이토카인 분비와 그에 따른 염증반응이 A β 침착을 촉진하는 것으로 설명하고 있다^{35,36}). 또한 TNF- α 와 IL-1 β 가 APP 발현을 증가시키고, A β 를 생성하는데 관여하는 β -secretase 활성을 촉진한 결과로 설명하며^{35,37}), 활성화된 미세아교세포가 β -secretase mRNA 발현 및 효소활성 증가를 통해 A β 생성을 증가시킨다고 하였다³⁸). 특히 해마 기능에 의존적인 인지기능을 관찰하는 Morris 수중미로 실험에서³⁹), 한 번의 LPS 처리가 실험동물이 도피대를 찾아가는 시간을 연장시키고, 수영 속도를 감소시키며, 약 3일 후까지 기억 유지 능력을 저하시킨다고 하였다^{28,30}).

β -Asarone (30 mg/kg)을 3일간 투여하는 동안 Morris 수중미로의 학습 훈련을 실시하였으며, 3일째에 LPS를 복강주사한 결과, LPS군은 Normal군에 비해 도피대를 찾아가는 시간이 유의성 있게 연장되었으며, β -Asarone을 투여한 군은 3일째의 7차와 8차 수영에서 LPS군에 비해 도피대를 찾아가는 시간이 유의성 있게 감소하였다. 그러나 3일째 8차례 훈련 전체에 대한 유의성 검증에서는 LPS군과 β -Asarone 투여군 사이에 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 β -Asarone의 투여가 일부 훈련에 영향을 미치기는 하였으나 그 효능이 명확하지는 않음을 보여주는 것이다. 4일째 즉, LPS 복강주사 24시간 후에 공간기억 유지 측정을 한 결과는 β -Asarone을 30 mg/kg 씩 투여한 군은 LPS군에 비해 도피대 근처의 구역에서 수영하는 시간이 유의하게 증가하고, 도피대 위치에 진입한 횟수가 유의하게 증가하였다. 또한 구역별 수영시간과 점수로부터 계산된 기억유지점수는 LPS군은 Normal군에 비해 현저하게 감소하였으며 β -Asarone군은 LPS군에 비해 유의성 있게 증가하여, β -Asarone이 LPS에 의한 기억장애를 개선하는 효능이 있음을 보여주었다. 이러한

결과는 β -Asarone이 $A\beta$ 에 의한 인지기능 장애를 개선하는 효능이 있다는 이전 연구보고¹⁵⁾의 결과를 보완하는 것이다. 단지 이전의 연구보고에서는 β -Asarone이 해마의 신경세포 자연사를 억제하는 작용을 통해 인지기능을 개선한다고 하였고, 본 연구에서는 β -Asarone이 해마의 염증성 사이토카인 발현을 억제하는 작용에 의해 기억장애를 개선한다는 것을 제시하는 것이다.

이러한 결과들은 β -Asarone이 해마의 중추신경염증을 완화하는 작용에 의해 학습과 기억장애를 개선하는 효능이 있음을 보여주는 것이다. 알츠하이머병과 관련하여, 보다 더 장기간의 중추신경염증 유발과 약물 투여에 의해 $A\beta$ 생성, APP 발현 및 β -secretase 활성 등에 대한 유의한 효능까지를 제시한다면 보다 명확한 실험적 결과에 근거하여 石菖蒲 및 β -Asarone이 중추신경염증에 의한 알츠하이머병의 인지장애에 유의한 효능이 있음을 보고할 수 있을 것이라 생각된다.

결론

石菖蒲의 정유성분인 β -Asarone이 LPS의 복강주사에 의해 유발된 중추신경염증 상태에서 해마조직의 염증성 사이토카인 발현 및 인지기능 장애에 미치는 영향을 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. β -Asarone은 7.5 mg/kg, 15 mg/kg 및 30 mg/kg의 모든 투여용량에서 LPS에 의한 해마 조직의 TNF- α mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, 15 mg/kg 과 30 mg/kg의 투여용량에서 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였고, 30 mg/kg의 투여용량에서 IL-6 mRNA 발현 증가는 유의하게 억제하였다.
2. β -Asarone은 30 mg/kg의 투여용량에서 LPS에 의한 수 중미로의 도파대 도달시간 연장을 감소시킴으로써 학습 장애의 개선 효능을 보여주었다.
3. β -Asarone은 30 mg/kg의 투여용량에서 유의한 도파대 근처 구역 수영시간의 증가, 도파대 진입 횟수의 증가 및 기억유지 점수의 증가를 나타내어 기억 장애를 개선하는 효능을 보여주었다.

이러한 결과들은 β -Asarone이 해마에서의 중추신경염증을 완화하는 작용에 의해 학습과 기억장애를 개선하는 효능이 있음을 보여주는 것으로, 보다 진전된 연구를 통하여 石菖蒲 및 β -Asarone이 중추신경염증에 의한 인지장애를 수반하는 퇴행성 중추신경계질환에 대한 효능을 명확히 할 수 있을 것으로 생각된다.

References

1. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 2008 ; 9

: 65-75.

2. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci*, 2012 ; 13 : 169-82.
3. Szélenyi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull*, 2001 ; 54 : 329-38.
4. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 2000 ; 157 : 683-94.
5. Norden DM, Godbout JP. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013 ; 39 : 19-34.
6. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012 ; 7 : 42-59.
7. Cunningham AJ, Murray CA, O'Neill LA, Lynch MA, O'Connor JJ. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*, 1996 ; 203 : 17-20.
8. Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci*, 1998 ; 18 : 2974-81.
9. Cho J, Kim YH, Kong JY, Yang CH, Park CG. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci*, 2002 ; 71 : 591-9.
10. Fang YQ, Fang RM, Fang GL, Jiang Y, Fu SY. Effects of beta-asarone on expression of c-fos in kindling epilepsy rat brain. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2008 ; 33 : 534-6.
11. Fang YQ, Shi C, Liu L, Fang RM. Pharmacokinetics of beta-asarone in rabbit blood, hippocampus, cortex, brain stem, thalamus and cerebellum. *Pharmazie*, 2012 ; 67 : 120-3.
12. Lee SI. *Herbology*. Seoul : Euiyaksa, 1975 : 415-7.
13. Li C, Xing G, Dong M, Zhou L, Li J, Wang G, Zou D, Wang R, Liu J, Niu Y. Beta-asarone protection against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via JNK signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *Eur J Pharmacol*, 2010 ; 635 : 96-102.
14. Zou DJ, Wang G, Liu JC, Dong MX, Li XM, Zhang C, Zhou L, Wang R, Niu YC. Beta-asarone attenuates beta-amyloid-induced apoptosis through the inhibition of the activation of apoptosis

- signal-regulating kinase 1 in SH-SY5Y cells. *Pharmazie*. 2011 ; 66 : 44-51.
15. Geng Y, Li C, Liu J, Xing G, Zhou L, Dong M, Li X, Niu Y. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats. *Biol Pharm Bull*. 2010 ; 33 : 836-43.
 16. Li Z, Zhao G, Qian S, Yang Z, Chen X, Chen J, Cai C, Liang X, Guo J. Cerebrovascular protection of β -asarone in Alzheimer's disease rats: A behavioral, cerebral blood flow, biochemical and genetic study. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 144 : 305-12.
 17. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*. 2008 ; 5 : 10-26.
 18. Smith DH, Okiyama K, Thomas MJ, McIntosh TK. Effects of the excitatory amino acid receptor antagonists kynurenate and indole-2-carboxylic acid on behavioral and neurochemical outcome following experimental brain injury. *J Neurosci*. 1993 ; 13 : 5383-92.
 19. Banks WA, Kastin AJ. Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: Assessment with species-specific enzyme immunoassays. *J Neuroimmunol*. 1997 ; 79 : 22-8.
 20. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des*. 2008 ; 14 : 3574-89.
 21. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry*. 2005 ; 17 : 503-14.
 22. Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2000 ; 6 : 453-7.
 23. Konat GW, Kielian T, Marriott I. The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J Neurochem*. 2006 ; 99 : 1-12.
 24. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 ; 55 : 453-62.
 25. Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation increases intra-cellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2003 ; 14 : 133-45.
 26. Jeong HK, Jou I, Joe EH. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Exp Mol Med*. 2010 ; 42 : 823-32.
 27. Liu J, Li C, Xing G, Zhou L, Dong M, Geng Y, Li X, Li J, Wang G, Zou D, Niu Y. Beta-asarone attenuates neuronal apoptosis induced by Beta amyloid in rat hippocampus. *Yakugaku Zasshi*. 2010 ; 130 : 737-46.
 28. Sparkman NL, Martin LA, Calvert WS, Boehm GW. Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2005 ; 159 : 145-51.
 29. Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, Hong JT. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation*. 2008 ; 5 : 37.
 30. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res*. 2001 ; 124 : 47-54.
 31. Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*. 2002 ; 25 : 154-9.
 32. Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001 ; 25 : 29-41.
 33. Centonze D, Muzio L, Rossi S, Cavasinni F, De Chiara V, Bergami A, Musella A, D'Amelio M, Cavallucci V, Martorana A, Bergamaschi A, Cencioni MT, Diamantini A, Butti E, Comi G, Bernardi G, Ceconi F, Battistini L, Furlan R, Martino G. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 2009 ; 29 : 3442-52.
 34. Roe AD, Staup MA, Serrats J, Sawchenko PE, Rissman RA. Lipopolysaccharide-induced tau phosphorylation and kinase activity-modulation, but not mediation, by corticotropin-releasing factor receptors. *Eur J Neurosci*. 2011 ; 34 : 448-56.
 35. Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci*. 2003 ; 23 : 9796-804.
 36. Yan Q, Zhang J, Liu H, Babu-Khan S, Vassar R,

- Biere AL, Citron M, Landreth G. Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2003 ; 23 : 7504-9.
37. Blasko I, Marx F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstein B. TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB J*. 1999 ; 13 : 63-8.
38. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C, O'Banion K, Klockgether T, Van Leuven F, Landreth GE. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*. 2005 ; 128 : 1442-53.
39. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci*. 1989 ; 48 : 29-69.