Scopolamine 유발 기억 손상 마우스 모델에서 국산 산사와 중국산 산사의 항건망 효과 비교

이지혜# · 김혜정# · 이찬희 · 박상혁 · 정철종[1] · 백경연[1] · 신진기[1] · 정지욱*

대구한의대학교 약리학연구실, 1 : ㈜옥천당

Comparative Study on the Effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Jihye Lee#, Hye-Jeong Kim#, Chanhee Lee, Sang Hyeok Park, Chul Jong Jung[1], Gyung Yun Beik[1], Jin Gi Shin[1], Ji Wook Jung*

Department of Pharmacology, Daegu Haany University, 1 : Okchundang Corporation

This study was conducted to investigate the cognitive improvement and memory recovery effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* ethanolic extracts on scopolamine-induced memory impairment in mice. In vivo studies were carried out with mice treated with Korean *Crataegus pinnatifida* extracts (KCF) and Chinese *Crataegus pinnatifida* extracts (CCF) in doses of 5 and 50 mg/kg (p.o.) and scopolamine was injected 30 min before the behavioral testing. Antioxidant activity was assessed by 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) assay and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay, and acetylcholinesterase inhibition by Ellman's modified method. The chlorogenic acid and hyperoside as marker compounds of KCF and CCF was quantified by ultra-performance liquid chromatography analysis (UPLC). Results showed that KCF was more contained high content of chlorogenic acid and hyperoside than CCF. In addition, KCF was more exerted free radical (DPPH and ABTS) scavenging activity and blocked AChE activity than CCF. In vivo studies also showed that KCF administration has a further improved the memory of scopolamine-treated mice than CCF in Y-maze test, passive avoidance test and Morris water maze test. These results revealed that KCF more prevents scopolamine-induced memory impairments through antioxidant and acethylcholinesterase inhibition effect compared CCF.

keywords : *Crataegus pinnatifida*, Scopolamine, Amnesia, Memory, Chlorogenic acid, Hyperoside

서 론

의료기술의 발달로 인한 수명연장으로 노인 인구가 증가하면서 퇴행성 질환이 급증하고 있으며, 그중의 하나인 치매는 개인적으로나 사회적으로 삶의 질을 크게 떨어뜨리고 본인과 가족 등 주변 사람들을 불행하게 만드는 질환으로서 연령에 따라 급격하게 증가하는 추세에 있다. 치매 중 가장 많은 비율을 차지하는 알츠하이머형 치매는 대뇌 피질 또는 해마의 손상으로 인한 기억력, 사고력, 이해력 등을 포함한 전반적인 인지 장애 뿐만 아니라 인격, 행동 변화가 나타나며 이로 인한 일상적 생활이 불가능하게 되는 질환이다[1-3].

알츠하이머병은 아밀로이드 베타 단백질이 세포 외 공간에 축적되어 형성되는 아밀로이드 플라크[4] 또는 과인산화된 타우 단백질 응집으로 이루어진 신경섬유다발성병변[5,6], 콜린성 신경전달 물질의 기능 저하[7,8] 및 산화적 스트레스에 의한 신경 세포의 사멸[9] 등이 제시되어 왔으나 아직까지 명확한 병인이 규명되지 않았고 현재 임상에 사용되는 약물은 대부분 acetylcholinesterase(AChE) 저해제로 소화기계나 간독성 등 부작용과 병의 진행을 더디게 할뿐 완치할 수 없어 이를 극복 할 수 있는 약물 개발에 대한 연구가 필요하다[10,11].

산사는 장미과(Rosaceae)의 사과나무속(Malus) 낙엽교목인 산사나무(*Crataegus pinnatifida*)의 열매로 한방에서는 건위와 소화불량, 식욕부진, 위산결핍증 또는 위산과다증, 설사와 생리통, 동상, 건위, 요통, 장출혈 등에 약으로 사용하고 있다. 산사는 각국 공정서에 등장하는데 대한민국약전(KP 11)에서는 산사나무

* Corresponding author

Ji Wook Jung, Department of Pharmacology, Daegu Haany University, 285-10, Eobongji-gil, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 28578, Korea

·E-mail : jwjung@dhu.ac.kr ·Tel : +82-53-819-1337

·Received : 2018/09/18 ·Revised : 2018/11/27 ·Accepted : 2018/11/28

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.12.32.6.375

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

# These two authors contributed equally to this work.

Crataegus pinnatifida Bunge 및 그 변종(장미과 Rosaceae)의 잘 익은 열매, 중화인민공화국약전(CP 2015)[12]에서는 장미과 식물인 산리홍(山里紅) *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. major N.E.Br 혹은 산사 *Crataegus pinnatifida* Bge. 의 건조 성숙 과실, 일본약국방(JP 17)[13]에서는 야산사(*Crataegus cuneata* Sieb. et Zucc. : 野山査)와 산리홍(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br. : 山里紅)의 열매로 기록되어 있으며 동양 뿐만 아니라 서양의 영국약전, 독일약전 등에도 수재되어 있어 약식동원의 대표적인 생약임을 알 수 있다. 산사의 주요 약리성분으로 cyanogenic glycoside인 amygdalin과 flavonoid인 apigenin, kaempferol, luteolin, hyperoside, rutin, vitexin 그리고 triterpenoid계인 ursolic acid, crataegolic acid, chlorogenic acid, tartaric acid, gallic acid 등이 있다[14,15]. 산사의 생리활성 연구로는 지질 대사 개선효과[16], 알러지 천식 개선효과[17], 혈압 강하효과[18,19], 항균효과[20], 항산화효과[21,22] 뿐만 아니라 기억력 개선효과[23,24]에 대해 보고되어 왔으나 현재 국내에서 이용되고 있는 산사는 크기가 작고 어두운 붉은 색의 원형 그대로 건조한 단단한 국산 산사와 국내산 보다 크기가 크고 밝은 붉은 색의 씨를 제거하고 편으로 잘라 건조한 중국산 산사로 이를 이용하여 국산과 중국산 산사가루의 첨가량에 따른 식빵의 품질 특성 연구[25]와 항산화 활성 및 암세포 증식 억제효과에 대한 연구[26]가 보고되었을 뿐 원산지에 따른 비교 연구가 미비하다. 이에 본 연구는 국산 및 중국산 산사의 추출물의 기억력 개선 효과를 비교하고자 하였다.

국산 산사와 중국산 산사의 프레타놀 추출물의 성분 함량을 비교하고 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴모델을 이용하여 행동 실험인 Y-미로 시험, 수동 회피 시험 및 모리스 물 미로 시험을 실시하였고, 작용 기전을 확인하기 위하여 항산화 활성을 측정하는 DPPH, ABTS와 AChE의 활성 측정을 실시하여 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

4주령 수컷 ICR mouse를 대한바이오링크(충북, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 순화 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이와 물은 자유 섭취시켰으며 사육실 온도는 23±1℃, 습도 50 ± 5%, 조명시간 07:00-19:00(12시간 주기)로 환경을 유지하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행하였다(승인번호:DHU2018-032).

실험동물은 총 6군으로 정상군(NOR)과 scopolamine 1 mg/kg를 복강 투여하여 건망증을 유발시킨 대조군(CON), scopolamine 투여 후 국산 산사 5 또는 50 mg/kg 경구 투여한 KCF5, KCF50군, scopolamine 투여 후 중국산 산사 5 또는 50 mg/kg 경구 투여한 CCF5, CCF50군으로 나누어 실험을 진행하였고 군당 6~8수를 사용하였다.

2) 시료

본 실험에 사용된 산사는 국산은 ㈜옥천당(경북, 한국)에서 구입하였고 중국산은 동일약업사(대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 국산과 중국산 산사를 60% 프레타놀을 이용하여 60℃에서 5시간 추출 후 Watman filter paper(No.2, GE Healthcare, UK)를 사용하여 여과하고, rotatory vacuum evaporator(Eyela, Japan)으로 감압 농축하여 동결 건조(Eyela, Japan)하여 가루 형태로 만들어 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 고형분 함량을 추출수율로 계산한 결과는 Table 1과 같다.

Scopolamine과 donepezil는 Sigma aldrich(USA)의 제품을 사용하였고 나머지 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

Table 1. Yield of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* extracts.

Sample	Yield(%)
Korean *Crataegus pinnatifida*(KCF)	18.6
Chinese *Crataegus pinnatifida*(CCF)	34.1

2. 실험방법

1) DPPH radical 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디컬 소거능은 화학적으로 안정화된 자유 라디칼인 짙은 보라색의 DPPH를 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 각 시료를 증류수에 녹인 후 0.2 mM DPPH 용액과 100 μL씩 동량으로 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디컬 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디컬 소거활성(%) = 100-[(시료 첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]

2) ABTS radical 소거능 측정

2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS) 라디컬 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와 반응시켜 짙은 청록색의 안정화된 ABTS 자유 라디컬을 생성하여 항산화 물질에 의해 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1(v:v)로 혼합하여 냉암소에서 12~16시간 반응시켜 ABTS+를 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도를 0.7±0.03으로 에탄올로 희석한 ABTS 기질용액을 사용하였다. 각 시료를 증류수에 녹인 후 ABTS+ 용액과 100 μL씩 동량으로 혼합하여 암실에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디컬 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS 라디컬 소거활성(%) = 100-[(시료 첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]

3) UPLC 분석

시료 내 chlorogenic acid와 hyperoside의 함량을 분석하였다. 시료 1.0 g을 정밀하게 달아 20 mL 용량플라스크에 넣고 희석시킨 메탄올(7→10)을 넣어 초음파 추출한 다음 희석시킨 메탄올(7→10)로 정량한 후 추출액을 syringe membrane filter(PTFE, 0.2 μm)로 여과하여 ACQUITY UPLC system(Waters, USA)로 분석하

였다. ACQUITY UPLC® BEH C18 column(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)을 35℃로 유지하여 분석하였다. 이동상은 trifluoroacetic acid(1→1000)을 함유한 물을 A, trifluoroacetic acid(1→1000)을 함유한 acetonitrile을 B로 설정하여 농도구배를 주어 사용하였고, 유량은 0.3 mL/min, 주입량은 2 μL로 하였다. PDA detector를 이용하여 254 nm에서 chlorogenic acid, hyperoside를 확인하였으며, 분석결과의 데이터처리는 Empower 2(Waters, USA) 소프트웨어를 사용하였다.

Table 2. Analytical condition for chlorogenic acid and hyperoside

Parameter	Conditions		
Column	ACQUITY UPLC® BEH C18 column(2.1×100 mm, 1.7 μm)		
Mobile phase	A : Trifluoroacetic acid(1→1000) in Water		
	B : Trifluoroacetic acid(1→1000) in acetonitrile		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	92	8
	2.5	92	8
	5	90	10
	15	88	12
	16	92	8
	18	92	8
Column flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	2 μL		
Column temperature	30 ℃		
UV Wavelength	254 nm		

4) Y-미로 실험(Y-maze test)

단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위한 방법으로 Y-maze test 실시하였다. 측정 장비는 세 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접히는 각도는 120°이다. 이 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있고, 세 개의 가지를 각각 A, B, C로 정한 뒤에 실험을 진행하였다. 실험동물을 넣고 8분 동안 각 가지에 실험동물의 꼬리까지 가지에 들어갈 때의 횟수와, 각 가지에 차례로 들어간 경우를 헤아려 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 세 가지 모두에 겹치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학식에 의해 계산하였다.

변경 행동력(Spontaneous alteration, %) = 실제변경(actual alternation) / 최고변경(maximum alternation) × 100(최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

5) 수동 회피 실험(Passive avoidance test)

해마의 조건화된 기억과 변연계와 관련 있는 기억에 관한 영향 및 working memory ability를 평가하기 위해 회피학습상자((주)정도비앤피, 대한민국, 서울)를 이용하여 실험을 하였다. 수동회피 상자는 어두운 방과 밝은 방으로 나누어져 있으며, 밝은 방에 실험동물을 넣으면 어두운 방으로 넘어가는데 그 순간 5초간 0.5 mA의 전기충격을 가한다. 전기충격을 가한 다음 날 실험동물을 밝은 방에 다시 넣었을 때 어두운 방에서의 전기충격을 기억하여 밝은 방에 머무르게 되는데, 이때 체류하는 시간(step-through latency)을 측정하여 기억력을 평가하였다.

6) 모리스 물 미로 실험(Morris water maze test)

해마 의존적 공간학습 및 장기 기억력 개선에 대한 실험으로 원형으로 된 지름 90 cm, 높이 45 cm의 수조의 사분면 한 구역에 지름 9 cm, 높이 25 cm의 도피대를 설치하고 20±2℃ 깨끗한 물을 도피대 보다 1 cm 정도 위로 채운 뒤 실험 동물이 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간을 측정하였다. 원형 수조에서 4개의 표지판을 설치하여 4분면으로 나누어 입수하는 위치를 다르게 하여 하루 4번씩 반복하여 60초간 진행하였으며 실험 동물이 60초 안에 도피대를 찾으면 실험을 완료하였고 찾지 못한 경우 손으로 위치를 안내해주어 10초간 머무르게 하였다. 실험 마지막 날 도피대를 제거하고 학습능력을 측정하기 위해 60초간 도피대가 있었던 구역에 머무르는 시간을 측정하였고 모든 실험은 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

7) 아세틸콜린에스테라아제 활성 측정(Acetylcholinesterase activity assay)

아세틸콜린에스테라아제 활성 억제능을 확인하기 위해서 Ellman[27]의 방법인 acetylthiocholine iodide(ASCh)를 기질로 사용한 비색분석법으로 실험하였다. 실험에 사용하지 않은 실험 동물을 경추 탈골 후 전체 뇌를 적출하여 차가운 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 8.0)를 이용하여 균질화하고, 12,500 rpm, 20분간 원심분리 후 얻은 상층액을 이용하여 아세틸콜린에스테라아제 활성을 측정하는데 효소로 사용하였다. KCF, CCF와 양성 대조군으로 사용한 donepezil(Sigma-aldrich, USA)은 0.1% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 단계별 희석하여 사용하였다. sodium phosphate buffer 134 μl, 75 mM ASCh 1 μl, 10 mM Ellman's 용액(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 5 μl, KCF, CCF 또는 donepezil을 50 μl 넣고 25℃에서 10분간 반응 후 효소원 10 μl를 넣고 25℃에서 5분간 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 효소를 첨가하지 않고 sodium phosphate buffer를 첨가한 반응액을 사용하였고, ASCh를 첨가하지 않은 반응액으로 시료와 효소 활성용 시약간의 비특이적 반응이 일어나지 않았음을 확인하였다. 시료를 첨가하지 않은 반응액을 아세틸콜린에스테라아제의 활성도를 100%로 하였을 때 각 시료를 첨가한 반응액의 아세틸콜린에스테라아제 활성 저해도를 그래프로 나타내었다.

8) 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 산출하였다. 그룹 간 유의성 검정은 t-test 또는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)를 실시하고 Newman-Keuls test에 의해 유의수준 $p<0.05$ 이상에서 사후검정을 실시하였다. 모든 결과는 mean ± S.E.M.으로 표시하였다.

결 과

1. DPPH 라디컬 소거능 활성

국산 산사 추출물과 중국산 산사 추출물의 DPPH 라디컬 소거능을 비교한 결과 31.25 μg/mL, 62.5 μg/mL, 125 μg/mL, 250

μg/mL, 500 μg/mL, 1000 μg/mL일 때 국산 산사 5.3±0.3%, 22.0±0.6%, 31.3±1.5%, 49.7±0.3%, 69.3±1.9%, 92.0±0.6%으로 나타났고, 중국산 산사는 2.7±0.7%, 9.7±0.3%, 23.3±0.9%, 36.3±0.6%, 61.0±0.6%, 90.7±0.3%로 농도 의존적으로 항산화 소거능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 국산 산사가 중국산 산사에 비해 같은 농도에서 DPPH 라디컬 소거능이 높은 것으로 측정되었다. 데이터에는 포함시키지 않았으나 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 경우 100 μg/mL에서 98.7±0.3%로 나타났다.

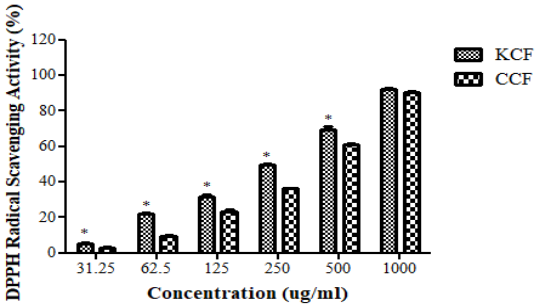

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of 60% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida*. The values represent mean±S.E.M. for triplicate experiments. *p<0.05 as compared with the CCF same treatment concentration.

2. ABTS 라디컬 소거능 활성

국산 산사 추출물과 중국산 산사 추출물의 ABTS 라디컬 소거능을 비교한 결과 31.25 μg/mL, 62.5 μg/mL, 125 μg/mL, 250 μg/mL, 500 μg/mL, 1000 μg/mL일 때 국산 산사 7.0±0.6%, 16.0±0.6%, 31.7±0.9%, 60.3±0.3%, 89.7±0.7%, 98.3±0.3%으로 나타났고, 중국산 산사는 4.0±0.6%, 13.7±0.3%, 26.3±0.3%, 49.3±0.6%, 81.3±0.8%, 98.7±0.3%로 농도 의존적으로 항산화 소거능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 국산 산사가 중국산 산사에 비해 같은 농도에서 ABTS 라디컬 소거능이 높은 것으로 측정되었다. 데이터에는 포함시키지 않았으나 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 경우 100 μg/mL에서 100.0%로 나타났다.

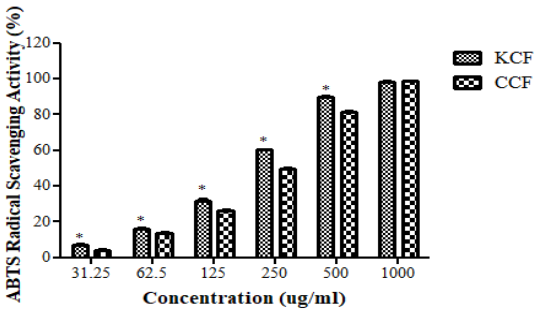

Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida*. The values represent mean±S.E.M. for triplicate experiments. *p<0.05 as compared with the CCF same treatment concentration.

3. 지표 성분 함량 분석

UPLC를 이용하여 KCF와 CCF의 chlorogenic acid와 hyperoside의 함량을 분석한 결과 chlorogenic acid는 2.6분 hyperoside는 6.5분에 검출되었고, KCF의 chlorogenic acid는 0.190%, hyperoside는 0.119%가 나왔고 CCF의 chlorogenic acid는 0.084%, hyperoside는 0.026%가 나왔다.

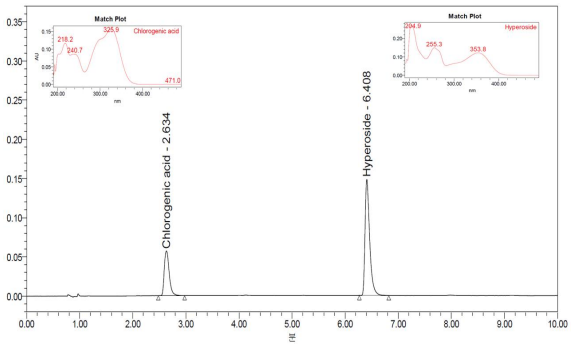

Fig. 3. UPLC chromatogram of standard solution

4. KCF의 Y-미로 시험

국산 산사의 Y-미로 시험을 통한 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 비교한 결과 변경 행동력이 정상쥐인 NOR군은 82.8±2.2%, scopolamine 투여로 기억 손상된 쥐인 CON군이 50.9±2.3%로 나타나 유의적으로 기억이 손상된 것을 확인할 수 있었고(p<0.001), 국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 KCF 3.125 mg/kg군이 56.0±2.3%, KCF 6.25 mg/kg군이 63.8±2.0%, KCF 12.5 mg/kg군이 68.8±3.4%, KCF 25 mg/kg군이 61.3±1.9%로 유의적으로 손상된 기억력이 개선되는 것을 확인 할 수 있었다(p<0.01, p<0.001). 이는 각 군당 각 가지에 입장한 총 횟수가 군당 차이가 없어 국산 산사가 실험 동물의 행동 변화에 영향을 미치지 않고 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

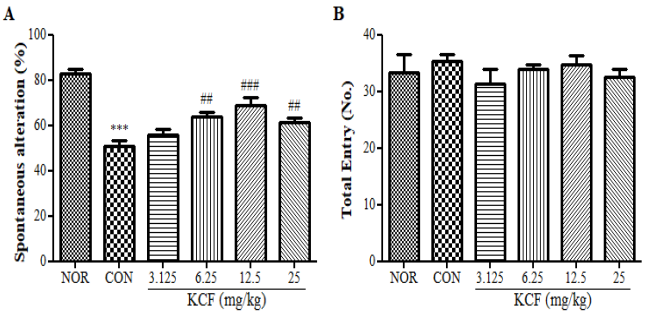

Fig. 4. Effects of Korean *Crataegus pinnatifida* on the Y-maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were treated with KCF 1 h before the test. A: spontaneous alteration %, B: total entry (No.) The values shown the mean±S.E.M.***p<0.001 as compared with the NOR group, ##p<0.01, ###p<0.001 as compared with the CON group.

5. KCF와 CCF의 Y-미로 시험

국산 산사와 중국산 산사의 Y-미로 시험을 통한 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 비교한 결과 변경 행동력이 정상쥐인 NOR군은 79.7±0.7%, scopolamine 투여로 기억 손상된 쥐인 CON군이

52.1±1.9%로 나타나 유의적으로 기억이 손상된 것을 확인할 수 있었고(p<0.001), 국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 KCF 5 mg/kg군이 73.9±1.7%, KCF 50 mg/kg군이 73.1±1.3%, 중국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 CCF 5 mg/kg군이 59.0±2.0%, CCF 50 mg/kg군이 68.2±1.6%로 유의적으로 손상된 기억력이 개선되는 것을 확인 할 수 있었다(p<0.01, p<0.001). 이는 각 군당 각 가지에 입장한 총 횟수가 군당 차이가 없어 국산 및 중국산 산사가 실험 동물의 행동 변화에 영향을 미치지 않고 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

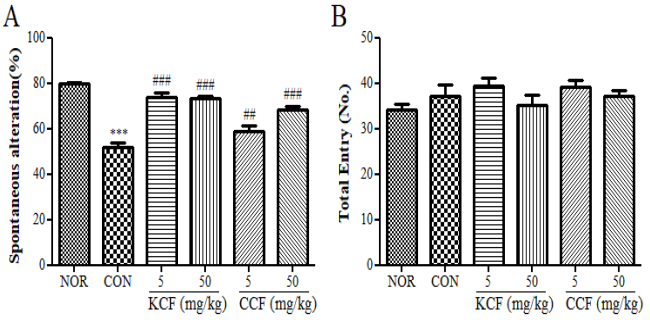

Fig. 5. Effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* on the Y-maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were treated with KCF or CCF 1 h before the test. A: spontaneous alteration %, B: total entry (No.) The values shown the mean±S.E.M.***p<0.001 as compared with the NOR group, ##p<0.01, ###p<0.001 as compared with the CON group.

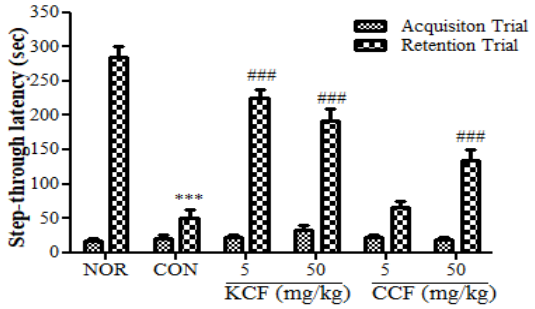

Fig. 6. Effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* on the passive avoidance test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. KCF or CCF were orally administered 1 h before the acquisition trial. Latency time was measured and the values shown the mean±S.E.M. ***p<0.001 as compared with the NOR group, ###p<0.001 as compared with the CON group.

6. KCF와 CCF의 수동 회피 시험

국산 산사와 중국산 산사의 수동 회피 시험을 통한 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 비교한 결과 retention trial에서 정상쥐인 NOR군은 285.5±14.5초, scopolamine 투여로 기억 손상된 쥐인 CON군이 50.0±13.2초로 나타나 유의적으로 기억이 손상된 것을 확인할 수 있었고(p<0.001), 국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 KCF 5 mg/kg군이 225.1±11.72초, KCF 50 mg/kg군이 191.3±17.4초로 유의적으로 손상된 기억력이 개선되는 것을 확인할 수 있었다(p<0.001). 이와 비교하여 중국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 CCF 5 mg/kg군은 66.1±8.0초로 CON군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지는 못하였으나 CCF 50 mg/kg군이 134.9±14.3초로 유의하게 기억력 개선을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 acquisition trial에서 각 군간 차이가 없어 환경에 의한 행동 변화가 없이 국산 및 중국산 산사가 실험 동물의 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

7. KCF와 CCF의 모리스 물 미로 시험

국산 산사와 중국산 산사의 모리스 물 미로 시험을 통한 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 비교한 결과 정상쥐인 NOR군은 scopolamine투여로 기억 손상된 쥐인 CON군에 비하여 훈련 기간 동안 escape latency 시간이 감소하였고(p<0.001), 국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 KCF 5 mg/kg군과 KCF 50 mg/kg군, 중국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 CCF 50 mg/kg군은 훈련 3일째부터 CON군과 비교하여 escape latency 시간이 감소하였으나(p<0.001) 중국산 산사 추출물과 scopolamine을 투여한 CCF 5 mg/kg군은 훈련 4일째 escape latency 시간이 감소하는 것을 확인하였다. 훈련 마지막날 도피대를 제거하고 probe test를 진행한 결과 NOR군에 비하여 CON군에서 도피대가 있었던 구역에 머무른 시간이 현저히 감소하였고(p<0.001) 국산 및 중국산 추출물을 투여한 실험군에서 그 시간이 증가하였으나 특히 KCF 5 mg/kg군에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(p<0.05). 이는 훈련기간 동안 scopolamine 투여군에서 escape latency가 감소하지 않아 장기기억이 손상된 것을 확인할 수 있었고 국산 및 중국산 산사 추출물 투여군에서 escape latency가 감소하여 장기기억능력을 회복시키는 것을 확인할 수 있었으며 도피대를 제거하고 실시한 probe test에서 도피대가 있었던 구역에서 머무른 시간이 scopolamine 투여군에 비하여 증가하여 공간 지각력을 회복한 것을 확인할 수 있었다.

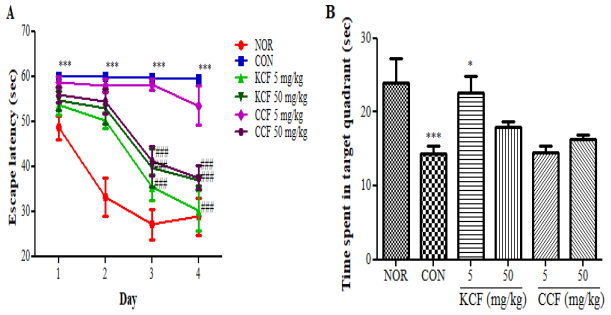

Fig. 7. Effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* on the Morris water maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were orally administered with KCF or CCF 1 h before the training trial sessions. A: escape latency, B: exploration time in target quadrant. The values shown the mean±S.E.M. ***p<0.001 as compared with the NOR group, #p<0.05, ###p<0.001 as compared with the CON group.

8. 아세틸콜린에스테라아제 활성

국산 산사와 중국산 산사의 AChE 활성도를 확인한 결과 국산 산사의 IC_{50}값이 12.49 μg/mL, 중국산 산사의 IC_{50}값이 326.7 μ

g/mL로 나타났고, 양성대조군으로 사용한 donepezil의 IC_{50}값이 0.163 μg/mL로 나타났다.

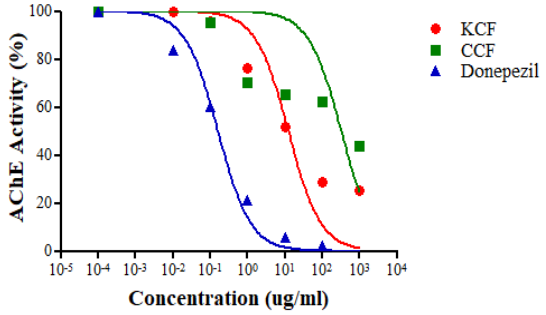

Fig. 8. Effects of Korean and Chinese *Crataegus pinnatifida* on the AChE activity.

고 찰

한의학에서 현대의 치매 질환과 정확하게 대응하는 질환명은 없으나 치매로부터 나타나는 특징인 기억 저하, 인지 장애, 심리적 변화, 행동 변화 등과 관련하여 치매(痴呆), 매병(呆病), 건망(健忘), 전광(癲狂) 등 이라 하고 이러한 질환은 간신음허(肝腎陰虛), 기체혈어(氣滯血瘀), 기혈양허(氣血兩虛), 화열치성(火熱熾盛), 담탁조규(痰濁阻竅), 비신양허(脾腎陽虛)의 변증(辨證)을 나타내어[28] 익기활혈(益氣活血), 고심보신, 화담개규(化痰開竅) 등의 치료법을 제시하고 있다. 전세계적으로 증가하는 노화관련한 질병 중 가장 흔한 형태인 알츠하이머병을 근본적으로 치료할 수 있는 치료제가 없어 신약 소재로 한약재들을 연구에 많이 활용하고 있다.

알츠하이머병의 원인 중 하나로 산화적 스트레스는 노화와 관련하여 행동 변화, 신경세포의 변화를 유발시킨다[29]. 특히 알츠하이머병에서 지질 과산화물의 농도가 증가되고 항산화 효소의 활성이 감소되는데 뇌 조직은 다른 조직에 비하여 항산화제 수치가 낮고 고도 불포화 지방산의 농도가 높아 산화적 스트레스에 취약하다[30]. 이전 연구에서 scopolamine이 대뇌 피질과 해마의 MDA 수치를 높이고 GSH의 수치를 감소시키는 결과가 보고되었고[31] 항산화 효과가 있는 약물의 기억력 개선 효과가 보고되었다[32]. 산사의 추출조건은 단 등[33]이 메탄올과 에탄올 추출물에서 높은 항산화 활성을 보고하였고, 남 등[34]의 연구에서 50% 에탄올 추출물이 우수한 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였으나 수득율을 고려하여 본 연구에서는 60% 프레타놀을 이용하여 추출하였다. 원형 그대로 건조한 국산 산사의 씨가 원물 무게의 약 48%를 차지하여 과육과 비슷한 비율이었고 씨를 제거하고 편으로 잘라 건조한 중국산 산사의 표면적이 넓어 수득율에서 큰 차이가 있는 것으로 생각되었다. DPPH 라디컬 소거능을 이용한 항산화력 측정은 안전한 유리기로 항산화 효과를 측정하는 대표적인 방법으로 항산화 물질이 유리기와 반응하여 유리기를 소거하고, 활성 라디컬에 전자를 공여하여 짙은 보라색이 탈색되는 반응을 이용하여 사용되고 있다. ABTS 라디칼을 이용한 측정은 유리기들과 반응하여 만들어진 활성 양이온 ABTS+가 환원되는 양을 흡광도를 이용하여 측정하는데 ABTS는 DPPH와 비교하여 반응이 빠르며 DPPH와 같이 시료의 색소에 의한 흡광도 측정에 대한 문제점이 없다고 보고되었을 뿐만 아니라 양이온을 제거하기 때문에 radical 제거 능력에서 차이를 보이며 지용성 및 수용성 물질 모두를 측정할 수 있다. KCF과 CCF의 DPPH 라디컬 소거능을 측정한 결과 1000 μg/mL에서 KCF가 92.0±0.6%, CCF가 90.7±0.3%로 나타났고, ABTS 라디컬 소거능을 측정한 결과 1000 μg/mL에서 KCF가 98.3±0.3%, CCF가 98.7±0.3%로 나타는데 이는 박 등[26]의 80% 에탄올로 추출한 국산 산사 추출물이 중국산 산사 추출물 보다 우수한 것과 같은 결과로 보고되었다. 이는 송 등[25]의 보고와 마찬가지로 국산 산사의 총 플라보노이드 함량과 총 폴리페놀 함량이 중국산 산사에 비하여 높아 이로 인하여 항산화 효과 역시 높아진 것으로 설명할 수 있다.

본 연구에서는 인지 능력 및 기억력 향상 효과를 비교하기 위하여 scopolamine을 투여한 기억력 손상 마우스 모델을 이용하여 행동 실험을 진행하였는데 scopolamine은 비선택적 항무스카린성 제제로 신경계에서 아세틸콜린의 활성을 감소시켜 기억손상을 일으킴으로 인지 및 기억력 측정을 위한 실험 동물 모델에 많이 활용된다[35-37]. 본 연구에서 실험동물의 복강 내 scopolamine을 주입하여 해마 및 대뇌 피질의 기능을 Y-미로 시험을 통하여 측정한 결과 변경 행동력이 KCF 농도에 따라 증가하여 12.5 mg/kg 투여군에서 가장 좋은 효과를 나타내었고 다시 감소하는 inverted-U 형의 용량 의존 효과를 나타내었다. 또한 산사의 기억력 개선 연구는 이전 연구에서 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 모델에서 70% 에탄올로 추출한 중국산 산사 추출물에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과를 확인[24]하여 이를 바탕으로 국산 산사 추출물과 중국산 산사 추출물의 기억력 및 인지 기능 개선 효과를 비교하였다. 이 연구에서 중국산 산사 추출물 25-200 mg/kg로 실험 동물에게 경구 투여 시 산사 추출물로 인한 동물의 체중 변화 및 급성 독성으로 인한 사망이 일어나지 않았고, 본 연구에서도 역시 산사 추출물 투여로 인한 동물의 상태 변화가 일어나지 않아 본 농도에서는 독성이 없는 것으로 판단된다. Y-미로 시험은 기억, 공간 학습과 관련하여 working memory를 측정하는 시험으로 변경 행동력이 scopolamine에 의해 34.6% 감소하였고 KCF 5 mg/kg군에서 29.5%, KCF 50 mg/kg군에서 28.7%, CCF 5 mg/kg군에서 11.7%, CCF 50 mg/kg군에서 23.6% 증가하여 scopolamine에 의해 감소된 기억 및 인지력을 CCF 보다 KCF에서 더 개선시키는 것을 알 수 있었다. 수동 회피 시험은 장기 기억과 관련하여 working memory를 측정하는 시험으로 밝은 방에 머무르는 시간이 scopolamine에 의해 82.5% 감소하여 전날 시행된 전기충격을 실험동물이 기억을 못하였고 이 머무름 시간이 KCF 5 mg/kg군에서 77.8%, KCF 50 mg/kg군에서 73.9%, CCF 5 mg/kg군에서 24.4%, CCF 50 mg/kg군에서 62.9% 증가하여 scopolamine에 의해 감소된 기억 및 인지력을 CCF 보다 KCF에서 더 개선시키는 것을 알 수 있었다. 모리스 물 미로 시험은 공간 인지 및 기억을 측정하는 시험으로 대뇌 피질 부위의 기능을 평가한다. 원형 수조에 설치된 도피대에 찾아가는데 걸리는 시간인 탈출 잠복기가 scopolamine에 의해 감소되지 않았고, KCF와 CCF에 의해 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 KCF 5 mg/kg군에서 정상 쥐에

비슷한 효과를 확인 할 수 있었고, KCF 50 mg/kg군과 CCF 50 mg/kg군에서 비슷한 효과를 확인할 수 있었다. 또한 KCF 5 mg/kg군은 도피대가 있었던 구역에서 머무른 시간이 정상 쥐와 비슷한 수준으로 개선되어 장기기억에 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 scopolamine으로 감소된 기억 및 인지력을 CCF 보다 KCF에서 더 개선시키는 것을 알 수 있었다.

콜린성 뉴런의 소실은 기억과 밀접하게 연관되어 있는데 아세틸콜린이 AChE의 작용으로 acetate와 choline으로 분해되어 기억 전달이 감소됨으로 중추 신경 내의 AChE의 작용을 억제하면 조금이나마 콜린성 신경 전달을 개선할 수 있다고 알려져 있어 현재 알츠하이머병 치료제로 사용되는 대부분의 약물이 AChE의 활성을 억제하는 약물이다[38,39]. 본 연구에서 AChE의 활성을 측정하여 산사 추출물의 AChE 저해 효과를 확인하였으며 특히 KCF의 효과가 CCF 보다 뛰어난 것을 확인 할 수 있었고 이로 인하여 scopolamine으로 유발된 기억 손상이 산사 추출물에 의해 개선되는 것을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과에서 KCF는 CCF 보다 뛰어난 항산화 효과를 나타내고 AChE의 활성을 억제하여 scopolamine으로 인한 기억력 손상을 개선시켰으며, 높은 chlorogenic acid와 hyperoside를 함유하고 있었다. 특히 KCF 5 mg/kg군에서 정상군과 비슷한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 국산 산사가 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있으며 추후 연구를 통해 인간의 기억력 개선을 위한 건강기능 식품 또는 약물 후보가 될 수 있을 것이라 생각된다.

결 론

원산지별 산사 추출물의 경구 투여가 scopolamine으로 유도한 건망증 마우스 모델에서의 행동 변화 및 항산화, AChE 활성화에 미치는 영향에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH 라디컬 소거능과 ABTS 라디컬 소거능을 측정하여 항산화 활성을 비교한 결과 같은 농도에서 국산 산사 추출물이 중국산 산사 추출물 보다 우수한 효과를 나타내었다. 지표 성분 함량을 비교한 결과 국산 산사 추출물이 중국산 산사 추출물에 보다 많은 chlorogenic acid와 hyperoside을 함유하고 있었다. Y-미로 시험, 수동 회피 시험을 통하여 국산 산사 추출물이 고농도 뿐만 아니라 저농도에서도 자발적 변경 행동력, 체류 잠복기가 증가하였고 중국산 산사 추출물에서는 농도 의존적으로 증가하였다. 모리스 물미로 시험에서 국산 산사 추출물 저농도 및 고농도, 중국산 추출물 고농도에서 탈출 잠복기가 감소하였으나 probe test에서 머무름 시간이 국산 산사 저농도 추출물에서만 증가하였다. AChE 활성을 측정한 결과 국산 산사 추출물이 중국산 산사 추출물과 비교하여 낮은 IC_{50}값을 나타냈다.

이상의 실험결과를 토대로 국산 산사 추출물의 경구 투여가 scopolamine 투여로 유발된 기억력 손상 마우스 모델에서 항건망 효과가 있다고 생각되며 이러한 작용은 항산화 및 AChE 억제에 의한 것이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 연구개발특구진흥재단-기술이전사업화 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No.2017DG00051/산사 추출물을 이용한 기억력 및 인지기능 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발).

References

1. Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Prog Brain Res. 1998;117:267-85.
2. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-59.
3. van der Flier WM, Scheltens P. Alzheimer disease: hippocampal volume loss and Alzheimer disease progression. Nat Rev Neurol. 2009 Jul;5(7):361-2.
4. Bondolfi L, Calhoun M, Ermini F, Kuhn HG, Wiederhold KH, Walker L, et al. Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. J Neurosci. 2002 Jan 15;22(2):515-22.
5. Villemagne VL, Dore V, Bourgeat P, Burnham SC, Laws S, Salvado O, et al. Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia. Semin Nucl Med. 2017 Jan;47(1):75-88.
6. Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. Neuron. 2008 Nov 26;60(4):534-42.
7. Nardone R, Holler Y, Bathke AC, Holler P, Lochner P, Tezzon F, et al. Subjective memory impairment and cholinergic transmission: a TMS study. J Neural Transm (Vienna). 2015 Jun;122(6):873-6.
8. Ma L, Xiao H, Wen J, Liu Z, He Y, Yuan F. Possible mechanism of Vitis vinifera L. flavones on neurotransmitters, synaptic transmission and related learning and memory in Alzheimer model rats. Lipids Health Dis. 2018 Jul 4;17(1):152.
9. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1842(8):1240-7.
10. Ali TB, Schleret TR, Reilly BM, Chen WY, Abagyan R. Adverse Effects of Cholinesterase Inhibitors in Dementia, According to the Pharmacovigilance Databases of the United-States and Canada. PLoS One. 2015;10(12):e0144337.
11. Xie SS, Lan JS, Wang XB, Jiang N, Dong G, Li ZR, et

al. Multifunctional tacrine-trolox hybrids for the treatment of Alzheimer's disease with cholinergic, antioxidant, neuroprotective and hepatoprotective properties. Eur J Med Chem. 2015 Mar 26;93:42-50.

12. Parmacopoeia of the people's republic of China. Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015;1:31
13. The ministry of health, labour and welfare, The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth edition, 2016;1842.
14. Liu P, Kallio H, Lu D, Zhou C, Yang B. Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (Crataegus spp.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Food Chem. 2011 Aug 1;127(3):1370-7.
15. Cui T, Li JZ, Kayahara H, Ma L, Wu LX, Nakamura K. Quantification of the polyphenols and triterpene acids in chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2006 Jun 28;54(13):4574-81.
16. Shao F, Gu L, Chen H, Liu R, Huang H, Ren G. Comparation of Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Aqueous and Ethanol Extracts of Crataegus pinnatifida Fruit in High-Fat Emulsion-Induced Hyperlipidemia Rats. Pharmacogn Mag. 2016 Jan-Mar;12(45):64-9.
17. Shin IS, Lee MY, Lim HS, Ha H, Seo CS, Kim JC, et al. An extract of Crataegus pinnatifida fruit attenuates airway inflammation by modulation of matrix metalloproteinase-9 in ovalbumin induced asthma. PLoS One. 2012;7(9):e45734.
18. Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. Life Sci. 2000;67(2):121-31.
19. Dong P, Pan L, Zhang X, Zhang W, Wang X, Jiang M, et al. Hawthorn (Crataegus pinnatifida Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. J Ethnopharmacol. 2017 Feb 23;198:479-88.
20. Tadic VM, Dobric S, Markovic GM, Dordevic SM, Arsic IA, Menkovic NR, et al. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. J Agric Food Chem. 2008 Sep 10;56(17):7700-9.
21. Liu S, Chang X, Liu X, Shen Z. Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (Crataegus pinnatifida) drink. Food Chem. 2016 Dec 1;212:87-95.
22. Luo M, Yang X, Hu JY, Jiao J, Mu FS, Song ZY, et al. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds in Renewable Parts of Crataegus pinnatifida inferred from Seasonal Variations. J Food Sci. 2016 May;81(5):C1102-9.
23. Pang XC, Kang, Fang JS, Zhao Y, Xu LJ, Lian WW, et al. Network pharmacology-based analysis of Chinese herbal Naodesheng formula for application to Alzheimer's disease. Chin J Nat Med. 2018 Jan;16(1):53-62.
24. Wang SB, Ahn E-M, Jung JW. The fruits of Crataegus pinnatifida Bunge ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine. The Korea journal of herbology. 2009;24(4):165-71.
25. Song TH, Choi HS, Kim YS, Woo IA. Study on sensory and mechanical characteristics of white bread containing different levels of Korean and Chinese Sansa (Crataegus pinatifida Bunge) powder. Journal of the Korean society of food culture. 2012 Aug 30;27(4):391-9.
26. Park Y, Lee HJ, Lee JJ. Effects of Korean and Chinese Crataegi Fructrus on the Antioxidant Activity and Antiproliferation of Cancer Cells. The Korean Journal of Community Living Science [Internet]. 2015 Feb 27;26(1):103-13.
27. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961 Jul;7:88-95.
28. Ryu CH, Jung IC, Cho SH, Hwang WW, Kang WC, Lee SR. Preliminary study to develop the instrument of oriental medical evaluation for dementia. Journal of oriental neuropsychiatry. 2010;21(4):123-35.
29. Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. Int J Dev Neurosci. 2000 Jul-Aug;18(4-5):367-81.
30. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C, Chirita R. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Psychiatr Danub. 2013 Dec;25(4):401-9.
31. Arora R, Kumar R, Agarwal A, Reeta KH, Gupta YK. Comparison of three different extracts of Centella asiatica for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: in vitro and in vivo study. Biomed Pharmacother. 2018;105:1344-52.
32. Li W, Zhao T, Zhang J, Xu J, Sun-Waterhouse D, Zhao M, et al. Effect of walnut protein hydrolysate on scopolamine-induced learning and memory deficits in mice. J Food Sci Technol. 2017;54(10):3102-10.
33. Duan Y, Kim MA, Seong JH, Chung HS, Kim HS. Antioxidative activities of various solvent extracts from

haw (Crataegus pinnatifida Bunge). Korean Journal of Food Preservation. 2014 Apr 30;21(2):246-53.

34. Nam SM, Kang IJ, Shin MH. Anti-diabetic and Anti-oxidative activities of Extracts from Crataegus pinnatifida. Journal of the East Asian Society of Dietary Life. 2015 Apr 30;25(2):270.
35. Han Y, Yang H, Li L, Du X, Sun C. Schisanhenol improves learning and memory in scopolamine-treated mice by reducing acetylcholinesterase activity and attenuating oxidative damage through SIRT1-PGC-1alpha-Tau signaling pathway. Int J Neurosci. 2018 Jul 21:1-23.
36. Ahmadi A, Roghani M, Noori S, Nahri-Niknafs B, Bakhtiar H. Substituted Aminobenzothiazole Derivatives of Tacrine: Synthesis and Study on Learning and Memory Impairment in Scopolamine-Induced Model of Amnesia in Rat. Mini Rev Med Chem. 2018 Jul 16.
37. Lee J, Kwon H, Yu J, Cho E, Jeon J, Lee S, et al. The enhancing effect of Aubang Gahl Soo on the hippocampal synaptic plasticity and memory through enhancing cholinergic system in mice. J Ethnopharmacol. 2018 May 26;224:91-9.
38. Bhuvanendran S, Kumari Y, Othman I, Shaikh MF. Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. Front Pharmacol. 2018;9:665.
39. Li HQ, Ip SP, Zheng GQ, Xian YF, Lin ZX. Isorhynchophylline alleviates learning and memory impairments induced by aluminum chloride in mice. Chin Med. 2018;13:29.