

아밀로이드 베타로 유발한 알츠하이머병 모델에서 신선초의 기억력 개선 효과

이지혜^{1#}, 김혜정¹, 김동현², 신범영³, 정지욱^{1*}

1 : 대구한의대학교 약리학연구소, 2 : 동아대학교 건강과학대학 의약생명공학과, 3 : (주)이노한방

Angelica keiskei Improved Beta-amyloid-induced Memory Deficiency of Alzheimer's Disease

Jihye Lee^{1#}, Hye-Jeong Kim¹, Dong-Hyun Kim², Bum Young Shin³, Ji Wook Jung^{1*}

1 : Department of Pharmacology, Daegu Haany University

2 : Department of Medicinal Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University

3: Innohanbang Co., Ltd

ABSTRACT

Objectives : Amyloid β ($A\beta$) could induce cognitive deficits through oxidative stress, inflammation, and neuron death in Alzheimer's disease (AD). This study was investigated the effect of *Angelica keiskei* KOIDZUMI (AK) on memory in $A\beta$ -induced an AD model.

Methods : AK was extracted uses 70% ethanol solvent. Total polyphenol and flavonoids content were obtained by the Folin-Ciocalteu and the Ethylene glycol colorimetric methods, respectively. The antioxidant activities were assessed through free radical scavenging assays using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) methods. Intracerebroventricular (i.c.v) injection of $A\beta$ 1-42 was used to induce AD in male ICR mice, followed by administrations of 5, 10 or 20 mg/kg AK on a daily. Animals were subjected to short and long term memory behavior in Y-maze and passive avoidance test.

Results : The total polyphenol and flavonoids contents of the AK extract were 88.73 ± 6.36 mg gallic acid equivalent/g, 84.21 ± 5.04 mg rutin equivalent/g, respectively. The assays of DPPH and ABTS revealed that AK extract in treated concentrations (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$) increased antioxidant activity in a dose-dependent manner. Oral administration of AK extract significantly reversed the $A\beta$ 1-42-induced decreasing of the spontaneous alternation in the Y-maze test and $A\beta$ 1-42-induced shorting of the step-through latency in the passive avoidance test.

Conclusions : The findings suggest that AK indicated the antioxidant protective effects against $A\beta$ -induced memory deficits, and therefore a potential lead natural therapeutic drug or agent for AD.

Key words : Alzheimer's disease, *Angelica keiskei*, Amyloid beta, Memory

I. 서 론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 점진적인 인지, 기억 손상으로부터 건망증과 관련한¹⁾ 치매 중 가장 흔한 형태¹⁾로

유전적, 생활 양식, 환경적 등의 영향으로 인하여 아밀로이드 전구단백의 비정상적인 분해로 과생성된 아밀로이드 베타 (amyloid beta, $A\beta$) 단백질이 신경세포 외부에 불용성 물질로 침착되는 아밀로이드 플라그, 미세관을 안정화시키는 기능을

*Corresponding author : Ji Wook Jung, Department of Pharmacology, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1337 · Fax : +82-53-819-1339 · E-mail : jwjung@dhu.ac.kr

#First author : Jihye Lee, Department of Pharmacology, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1337 · Fax : +82-53-819-1339 · E-mail : lghlovely@naver.com

· Received : 03 April 2019 · Revised : 23 April 2019 · Accepted : 25 May 2019

하는 타우단백(tau protein)이 과인산화되어 신경섬유매듭을 만드는 신경섬유다발성병변, 신경퇴행이 가장 중요한 요인으로 정의된다²⁾. 그 외 신경전달물질인 아세틸콜린 양 및 콜린성 신경세포의 수, 아세틸콜린 수용체 기능 저하, 산화적 스트레스에 의한 신경 세포 손상 및 사멸 등이 제시되어 왔으나 아직까지 명확한 병인이 규명되지 않았다. 현재까지 알려진 AD로 인한 신경 손상이나 파괴를 중단시키는 약물은 없지만 미국식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)에 승인된 6개의 약물인 rivastigmine, galantamine, donepezil, memantine, memantine과 donepezil 혼합물, tacrine이 증상을 일시적으로 개선시킬 뿐 투약 기간이 제한적이다³⁾.

AD는 A β 와 타우단백과 같은 바이오마커와 인지 장애 수반 여부를 통하여 진단하는데 특히 A β 는 타우단백 발병과 인지 손상을 조절하고⁴⁾, 직간접적으로 활성산소종을 유발시켜 산화적 스트레스를 촉진시킨다⁵⁾. 지질과산화, 단백질산화, DNA/RNA 산화가 AD에 밀접한 영향을 미치고⁶⁾, 이에 항산화제가 산화적 스트레스를 경감시키고, 퇴행성 신경변성 질환을 보호해 준다⁷⁾.

신선초(神仙草, *Angelica keiskei*, AK)는 아열대지방에서 자생하는 미나리과 다년생 초본으로 한국에서는 명일엽(明日葉), 신립초(伸立草) 등, 일본에서는 아시타바, 중국에서는 함초로 불린다⁸⁾. 이시진의 *본초강목*에는 도관초(都管草)라 하여 맛은 쓰고 매우며 성질은 차고 독이 없다고 하였으며, 풍중, 웅지의 독, 붉은 사마귀에는 식초에 넣고 갈아 발라주며, 목구멍이 붓고 아픈 증상을 치료할 때는 얇게 썰어 입에 물고 있으면 바로 낫고, 지네나 뱀의 독을 풀어준다고 하였다⁹⁾. 신선초에는 chalcones, coumarins, flavanones¹⁰⁾등을 포함한 활성 성분이 풍부하고 게르마늄, 비타민 B1, B12, C 및 망간, 아연 등 각종 미네랄과 필수 아미노산을 함유하고 있다^{11, 12)}. 민간에서는 줄기나 잎을 이용하여 식용으로 각종 성인병에 사용하여 왔으며¹³⁾, 최근 간 보호¹⁴⁾, 항당뇨¹⁵⁾, 항산화, 항염증¹⁶⁾, 항균¹⁷⁾, 항비만¹⁸⁾ 등 효과에 대하여 보고되었다. 뇌 질환 관련으로는 스코플라민으로 유도한 건망증 모델을 이용하여 신선초의 보호 효과에 대해 보고되어 있으나¹⁹⁾ 그 외의 뇌 질환 관련 연구 및 A β 유도 치매 모델에 대한 연구 및 보고는 되지 않은 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 신선초 70% 에탄올 추출물의 항산화능 및 알츠하이머병의 인지 및 기억력 개선능을 밝히고자 하는 것이며, 이를 위하여 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 확인하고 A β 로 유도한 치매 모델을 이용하여 Y-미로 및 수동 회피 시험을 통하여 인지 및 기억력 개선능을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 신선초는 농업회사법인 주식회사 두손에 약초(경북, 한국)에서 건조한 잎을 구입하여 동아대학교 김동현 교수로부터 감정을 받아 사용하였다. 200 g의 신선초를 2 L의 70% 에탄올을 이용하여 60°C에서 2시간 추출 후 Watman filter paper(No.2, GE Healthcare, UK)를 사용하여 여과

하고, rotatory vacuum evaporator(Eyela, Japan)으로 감압 농축하여 동결 건조(Eyela, Japan)하였고, 건조물 65.2 g을 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다(수율 32.6%).

2) 실험동물

4주령 20~22 g의 수컷 ICR mouse를 대한바이오링크(충북, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 순화 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이와 물은 자유 섭취시켰으며 12시간 간격의 light/dark cycle, 온도 23±1°C, 습도 50±5%로 환경을 유지하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DHU2017-023)을 얻어 수행하였으며 윤리 규정을 준수하였다.

실험동물은 총 5군으로 정상군(NOR)과 A β 를 주입하여 치매를 유발시킨 대조군(CON), A β 를 주입 후 신선초 5, 10 또는 20 mg/kg 경구 투여한 AK5, AK10 또는 AK20군으로 나누어 실험을 진행하였고 군당 7-9수를 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis 방법²⁰⁾에 따라 시료 10 μ l 와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 10 μ l를 혼합하여 3분간 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ 용액 200 μ l를 가하여 상온에서 30분 반응 후 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로써 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법²¹⁾에 따라 시료 50 μ l에 1 N NaOH 50 μ l, diethylene glycol 200 μ l를 혼합하여 37°C에서 5분간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로써 rutin을 사용하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

3) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 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 μ l씩 동량으로 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

4) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 라디칼 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와 반응시켜 짙은 청록색의 안정화된 ABTS 자유 라디칼을 생성

하여 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 ± 0.03 으로 에탄올로 희석한 ABTS 기질용액을 사용하였다. 각 시료를 증류수에 녹인 후 ABTS+ 용액과 100 μ l씩 동량으로 혼합하여 암실에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS 라디칼 소거활성(%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

5) A β 1-42 유발 AD 모델

A β 1-42 peptide(abcam, cambridge, UK)를 100% 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)에서 1 mg/ml의 농도로 용해하여 초음파 처리 한 후 HFIP/peptide 용액을 분주하여 건조 시키고 DMSO를 사용하여 peptide를 다시 현탁시켜 -80°C에 보관하며 사용하였다. 인산 완충 식염수(Invitrogen, UK)로 1 μ g/ μ l로 희석하여 A β 1-42를 각 실험동물 당 3 μ l의 양으로 뇌실(intracerebroventricular, i.c.v) 내 투여하여 AD를 유발하였다. 수술 다음날부터 생리 식염수에 녹인 AK를 매일 경구 투여하였고 행동 실험을 진행하는 날은 실험 시작 한 시간 전에 투여하였다.

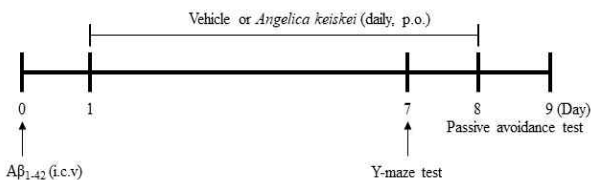


Fig. 1. Schematic of animal experiments.

6) Y-미로 시험

단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위한 방법으로 Y-미로 시험을 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 횡수와, 각 가지에 차례로 들어간 경우를 헤아려 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 세 가지 모두에 걸치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적 식에 의해 계산하였다.

자발적 변경 행동력(Spontaneous alternation, %)

$$= \text{실제변경(actual alternation)} / \text{최고변경(maximum alternation)} \times 100(\text{최고변경: 총 입장횟수}-2)$$

7) 수동 회피 시험

해마의 조건화된 기억과 변연계와 관련 있는 기억에 관한 영향 및 working memory ability를 평가하기 위해 회피학습 상자((주)정도비앤피, 서울, 한국)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 가하였다. 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.

8) 통계 분석

본 연구의 모든 실험 결과는 mean \pm standard error of mean(SEM)으로 표시하였으며, *in vitro* 결과는 SPSS(Version 24.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 일원배치분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하고 Duncan 사후 검증을 하였고, *in vivo* 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 일원배치분산 분석을 실시하고 Newman-Keuls test로 사후 검증을 하였다. 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p-value < 0.05 미만일 때 유의하다고 나타내었다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 확인

AK의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 추출물에 함유된 총 폴리페놀 및 플라보노이드는 건조 시료의 g당 gallic acid와 rutin의 mg으로 나타내었을 때 각각 88.73 ± 6.36 mg GAE/g, 84.21 ± 5.04 mg RUE/g으로 나타났다(Table 1).

Table 1. The total polyphenol and flavonoid contents of AK.

Total polyphenol content (mg GAE/g) ¹⁾	Total flavonoid content (mg RUE/g) ²⁾
88.73 ± 6.36	84.21 ± 5.04

The data were expressed as the mean \pm SEM.

1) Gallic acid equivalents.

2) Rutin equivalents.

2. DPPH 라디칼 소거능 확인

AK의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid는 $96.33 \pm 0.65\%$ 를 나타내었고, AK 13.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml 농도에서 $2.21 \pm 0.00\%$, $7.40 \pm 0.64\%$, $14.65 \pm 0.84\%$, $30.18 \pm 0.78\%$, $48.45 \pm 3.17\%$, $82.31 \pm 1.25\%$ 로 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다.

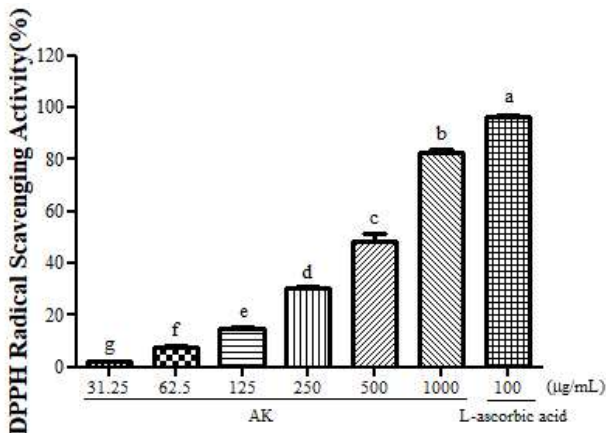


Fig. 2. DPPH free radical-scavenging activity of AK. The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of AK for 30 min. The values represent the mean \pm SEM for triplicate experiments. Different letters in graph represent statistical difference.

3. ABTS 라디칼 소거능 확인

AK의 항산화 효과를 확인하기 위하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid는 $99.90 \pm 0.10\%$ 를 나타내었고, AK 13.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $3.84 \pm 0.40\%$, $6.83 \pm 0.44\%$, $14.59 \pm 0.38\%$, $29.68 \pm 0.17\%$, $54.48 \pm 0.65\%$, $85.80 \pm 1.00\%$ 로 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다.

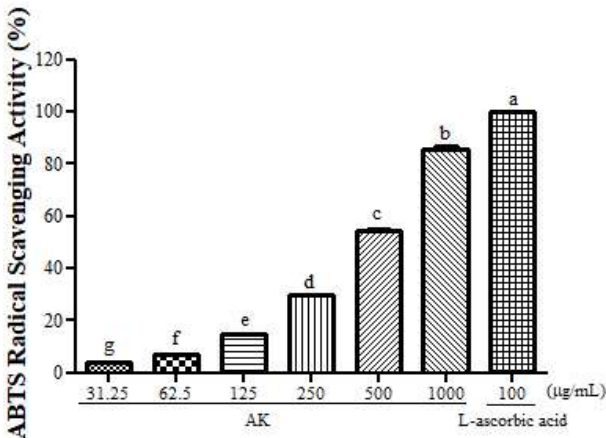


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of AK. The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of AK for 7 min. The values represent the mean \pm SEM for triplicate experiments. Different letters in graph represent statistical difference.

4. Y-미로 시험을 통한 기억 개선 효과 확인

AK의 단기 기억, 공간 학습과 관련하여 working memory 개선 효과를 확인하기 위하여 Y-미로 시험을 실시한 결과 자발적 변경 행동력에서 정상쥐인 NOR군은 $72.7 \pm 1.1\%$ 로 높게 나타난 반면 $A\beta$ 를 주입한 CON군은 $58.7 \pm 2.2\%$ 로 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.001$). 이에 $A\beta$ 를 주입한 뒤 신선초 5, 10 또는 20 mg/kg를 투여한 AK5군, AK10군, AK20군에서는 각각 $66.6 \pm 2.1\%$, $67.9 \pm 1.6\%$, $71.6 \pm$

1.5% 로 나타나 $A\beta$ 에 의한 감소된 자발적 변경 행동력을 신선초 투여가 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 각 가지에 들어간 총 입장횟수를 비교한 결과 모든 실험군간 유의한 차이가 없었다.

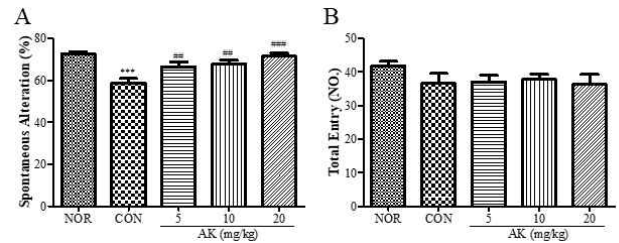


Fig. 4. Effect of AK on $A\beta$ injection AD model mice in the Y-maze test. AK was administered for seven days. The spontaneous alteration (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data represent means \pm S.E.M ($n=7$). *** $P < 0.001$ as compared with the control group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ as compared with the $A\beta$ 1-42 group.

5. 수동 회피 시험을 통한 기억 개선 효과 확인

AK의 장기 기억과 관련하여 working memory 개선 효과를 확인하기 위하여 수동 회피 시험을 실시한 결과 acquisition trial에서 어두운 방에 머무른 시간은 모든 실험군간 차이가 없었으나 retention trial에서 정상쥐인 NOR군의 어두운 방에 머무른 시간이 283.3 ± 16.7 초인 반면 $A\beta$ 를 주입한 CON군은 92.3 ± 29.7 초로 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.001$). 이에 $A\beta$ 를 주입한 뒤 신선초 5, 10 또는 20 mg/kg를 투여한 AK5군, AK10군, AK20군에서는 각각 113.0 ± 36.6 초, 150.0 ± 38.1 초, 241.7 ± 27.7 초로 나타나 $A\beta$ 에 의한 감소된 어두운 방에 머무른 시간을 신선초 투여가 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다.

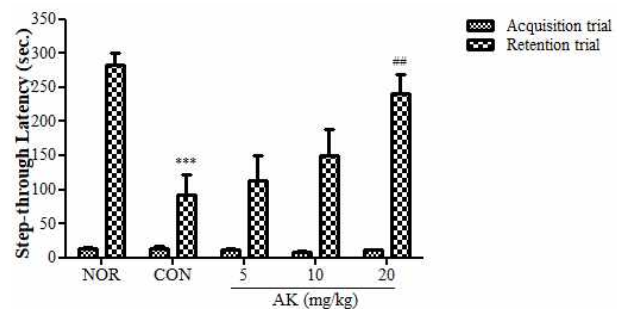


Fig. 5. Effect of AK on $A\beta$ injection AD model mice in the passive avoidance test. AK was administered for seven days. Data represent means \pm S.E.M ($n=9$). *** $P < 0.001$ as compared with the control group, ## $P < 0.01$ as compared with the $A\beta$ 1-42 group.

IV. 고찰

$A\beta$ 는 사고와 인지를 어렵게 할 뿐 아니라 기분과 행동도 변화시키는 기억 손상을 유발하는 AD와 가장 밀접한 연관성이 있는 38-43개로 구성된 아미노산의 heterogeneous peptides로 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)이 β -secretase와 γ -secretase에 의해 분해되어 뇌에서 아밀

로이드 플라그로 응집되는데 다양한 $A\beta$ 중 가장 흔한 형태가 $A\beta$ 1-40으로 알려져 있다²²⁾. 또한 $A\beta$ 는 미토콘드리아의 기능 저하로 생성되는 과산화수소나 지질과산화와 같은 활성산소종으로 인하여 인간이나 실험 동물에게 산화적 스트레스를 유발하여 신경을 손상시켜 AD를 심화시킨다^{23, 24)}. 최근 연구에서 원지가 미토콘드리아의 ROS를 제거하는 효소인 superoxide dismutase(SOD)-2를 증가시켜 아밀로이드 플라그 및 인지 손상을 경감시키고²⁵⁾, 지치의 주성분인 shikonin이 $A\beta$ 로 증가된 ROS와 malondialdehyde(MDA) 양을 경감시킬 뿐만 아니라 항산화 효소를 활성화시켜 AD로 인한 신경 손상을 감소시킨다²⁶⁾고 밝혔다. 또한 칩의 아이소플라본인 puerarin이 streptozotocin으로 유발된 AD 모델에서 학습 및 기억 행동 능력을 증가시키고 glutathione peroxidase(GSH-Px), SOD를 활성화 및 MDA 수치를 감소시키며²⁷⁾, 붉은꽃 오미자의 성분인 schisanhenol이 cholinergic system과 항산화 효과를 통하여 인지기능을 개선시킨다²⁸⁾. 뿐만 아니라 별개덩굴²⁹⁾, 병풀³⁰⁾, 백설³¹⁾, 크로커스³²⁾, 케모마일³³⁾ 등이 항산화 효과와 관련하여 인지 및 학습을 개선시킨다고 보고되었다.

선행 연구에서 신선초는 인간 간암 세포인 Hep3B와 마우스 섬유아세포인 NIH3T3에서 산화적 스트레스에 대한 농도 의존적인 보호 효과를 나타냈고³⁴⁾, 헬리코박터 파이로리균에 감염된 마우스 위 점막에서 염증성 매개인자와 산화적 스트레스를 억제한다³⁵⁾고 보고되었으나 AD에 대한 연구 및 보고가 되어 있지 않아 본 연구에서는 $A\beta$ 중합체를 형성하기 쉽고 독성이 강한 $A\beta$ 1-42로 유발한 AD 모델에서 신선초의 인지 및 기억력 개선 효과를 확인하기 위한 연구를 진행하였다.

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포된 2차 대사산물 중 하나로 한 개의 방향족 고리와 하나 또는 여러 개의 하이드록시기(hydroxyl, OH)를 가지고 단백질 및 거대분자 등과 쉽게 결합하여 항염증, 항산화, 항암 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 플라보노이드를 포함한다³⁶⁾. 플라보노이드는 두 개 이상의 방향족 고리가 한 개 이상의 하이드록시기와 노란색 또는 담황색을 나타낸다³⁷⁾. 신선초 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과 총 폴리페놀 함량은 88.73 ± 6.36 mg GAE/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 84.21 ± 5.04 mg RUE/g으로 나타냈다. 이는 지 등³⁸⁾의 결과에 비해 높은 수치로 연구에 사용한 신선초의 수확 시기 및 추출 온도, 실험 방법 등에 따른 차이로 생각된다.

DPPH는 비교적 안정한 자유 라디칼을 가지고 있는 화합물로서 페놀성 화합물, 방향족 아민류 등 항산화력이 있는 물질과 만나게 되면 환원 작용에 의해 라디칼이 소거되어 탈색되고, ABTS는 ABTS와 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온 라디칼이 친수성 및 소수성 항산화 물질에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용한 방법으로, 신선초 에탄올 추출물이 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 농도 의존적으로 증가하였고 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 80% 이상의 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 박³⁹⁾의 80% 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 나타낸다는 것과 상응한다.

Y-미로 시험은 단기 기억을 평가하는 방법으로 자발적 변경 행동력으로 공간 작업 기억을 측정하고⁴⁰⁾, 수동 회피 시험은 공포 자극으로 유도된 장기 기억을 측정하는 방법으로⁴¹⁾ $A\beta$ 로

유발한 AD 모델에서 신선초 에탄올 추출물을 투여 후 진행된 Y-미로 시험에서 AD 모델에서 감소된 자발적 변경 행동력이 신선초 투여군에서 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였고, 각 가지에 들어간 총 입장 횟수가 군간 유의한 차이가 없어 약물이 동물의 locomotor에 영향을 미치지 않고 인지 및 기억력을 개선시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 수동 회피 시험에서 AD 모델에서 감소된 step-through latency가 신선초 투여군에서 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. 이는 학습 기간에 진행된 step-through latency에서는 차이가 없어 약물이 환경에 영향을 미치지 않고 인지 및 기억력을 개선시키는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 신선초 에탄올 추출물은 총 폴리페놀 및 플라보노이드가 풍부하고 DPPH, ABTS 라디칼 소거능이 우수하며 $A\beta$ 로 유발한 AD 모델에서 단기 및 장기 기억을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 신선초는 AD의 예방 및 치료와 관련한 건강 기능 식품 또는 의약 원료 등 기능성 소재로 응용 가능성이 있는 약물로 사료된다.

V. 결 론

본 실험은 알츠하이머 질환에 대한 신선초 에탄올 추출물의 기억 개선 효과를 알아보기 위하여 항산화능 및 $A\beta$ 로 유도한 알츠하이머 질환 모델에서 행동 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신선초의 총 폴리페놀 함량은 88.73 ± 6.36 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 84.21 ± 5.04 mg RUE/g로 나타났다.
2. 신선초의 DPPH 자유 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하였고 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 높은 활성을 보였다.
3. 신선초의 ABTS 자유 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하였고 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 높은 활성을 보였다.
4. 신선초는 Y-미로 시험에서 $A\beta$ 로 인하여 감소된 자발적 변경 행동력을 농도 의존적으로 증가시키고 20 mg/kg에서 정상군과 비슷한 수준으로 개선되었다.
5. 신선초는 수동 회피 시험에서 $A\beta$ 로 인하여 감소된 step-through latency를 농도 의존적으로 증가시키고 20 mg/kg에서 유의한 개선 효과를 나타내었다.

따라서 신선초 에탄올 추출물이 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS 자유 라디칼 소거능과 $A\beta$ 로 유도한 알츠하이머 질환 모델을 이용한 행동 실험에서 항산화와 기억 개선 효과를 나타내어 알츠하이머 질환 치료 및 예방을 위한 기능성 소재로 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 중소기업청의 재원으로 융·복합기술 개발사업(S2230716)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Dinda B, Dinda M, Kulsi G, Chakraborty A, Dinda S. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019 ; 169 : 185-99.
- Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo JL, Montine T, Phelps C, Rankin KP, Rowe CC, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM, Sperling R, Contributors, NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 ; 14(4) : 535-62.
- Atri A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Seminars in Neurology*. 2019 ; 39(2) : 227-40.
- Chabrier MA, Blurton-Jones M, Agazaryan AA, Nerhus JL, Martinez-Coria H, LaFerla FM. Soluble abeta promotes wild-type tau pathology in vivo. *Journal of Neuroscience*. 2012 ; 32(48) : 17345-50.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018 ; 14 : 450-64.
- Franca MB, Lima KC, Eleutherio EC. Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017 ; 118(6) : 1442-52.
- Postu PA, Sadiki FZ, El Idrissi M, Cioanca O, Trifan A, Hancianu M, Hritcu L. Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019 ; 112 : 108673.
- Kil YS, Pham ST, Seo EK, Jafari M. *Angelica keiskei*, an emerging medicinal herb with various bioactive constituents and biological activities. *Archives of Pharmacal Research*. 2017 ; 40(6) : 655-75.
- Korean Traditional Medicine Knowledge Database [homepage on the Internet]. KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE; 2015 [cited 26 Mar 2019]. Available from: https://mediclassics.kr/books/190/volume/17#content_354
- Caesar LK, Cech NB. A Review of the Medicinal Uses and Pharmacology of Ashitaba. *Planta Medica*. 2016 ; 82(14) : 1236-45.
- Lim UK. *Angelica utilis* Makinu. *Food industry*. 1990 ; 103 : 81-3.
- Kim MY. Kim Mu-yeol's Ginseng story-Myung Il Yeop. *Ginseng · Herbal plant*. 2006 ; 4(2) : 10-1.
- Kim OK, Kung SS, Park WB, Lee MW, Ham SS. The nutritional components of aerial whole plant and juice of *Angelica keiskei* Koidz. *Korean journal of food science and technology*. *Technol*. 1992 ; 24(6) : 592-6.
- Choi YH, Lee HS, Chung CK, Kim EJ, Kang IJ. Protective effects of an ethanol extract of *Angelica keiskei* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in HepG2 and HepaRG cells. *Nutrition Research and Practice*. 2017 ; 11(2) : 97-104.
- Zhang W, Jin Q, Luo J, Wu J, Wang Z. Phytonutrient and anti-diabetic functional properties of flavonoid-rich ethanol extract from *Angelica Keiskei* leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 2018 ; 55(11) : 4406-12.
- Lee HJ, Choi TW, Kim HJ, Nam D, Jung SH, Lee EH, Lee HJ, Shin EM, Jang HJ, Ahn KS, Shim BS, Choi SH, Kim SH, Sethi G, Ahn KS. Anti-inflammatory activity of *Angelica keiskei* through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB activation pathways. *Journal of Medicinal Food*. 2010 ; 13(3) : 691-9.
- Caesar LK, Kellogg JJ, Kvalheim OM, Cech RA, Cech NB. Integration of Biochemometrics and Molecular Networking to Identify Antimicrobials in *Angelica keiskei*. *Planta Medica*. 2018 ; 84(9-10) : 721-8.
- Lee H, Li H, Kweon M, Choi Y, Kim MJ, Ryu JH. Isobavachalcone from *Angelica keiskei* Inhibits Adipogenesis and Prevents Lipid Accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 ; 19(6) :
- Oh SR, Kim SJ, Kim DH, Ryu JH, Ahn EM, Jung JW. *Angelica keiskei* ameliorates scopolamine-induced memory impairments in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2013 ; 36(1) : 82-8.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 1912 ; 12(2) : 239-43.
- Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994 ; 64(2) : 155-61.
- Das B, Yan R. A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *CNS Drugs*. 2019 ; 33(3) : 251-63.
- Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of

- neurons through activation of NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*. 2004 ; 24(2) : 565–75.
24. Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases. *Journal of Clinical Immunology*. 2004 ; 24(6) : 683–92.
 25. Park H, Kang S, Nam E, Suh YH, Chang KA. The Protective Effects of PSM-04 Against Beta Amyloid-Induced Neurotoxicity in Primary Cortical Neurons and an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2019 ; 10 : 2.
 26. Tong Y, Bai L, Gong R, Chuan J, Duan X, Zhu Y. Shikonin Protects PC12 Cells Against beta-amyloid Peptide-Induced Cell Injury Through Antioxidant and Antiapoptotic Activities. *Scientific Reports*. 2018 ; 8(1) : 26.
 27. Zhao SS, Yang WN, Jin H, Ma KG, Feng GF. Puerarin attenuates learning and memory impairments and inhibits oxidative stress in STZ-induced SAD mice. *Neurotoxicology*. 2015 ; 51 : 166–71.
 28. 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. *International Journal of Neuroscience*. 2019 ; 129(2) : 110–8.
 29. Jing X, Shi H, Zhu X, Wei X, Ren M, Han M, Ren D, Lou H. Eriodictyol Attenuates beta-Amyloid 25–35 Peptide-Induced Oxidative Cell Death in Primary Cultured Neurons by Activation of Nrf2. *Neurochemical Research*. 2015 ; 40(7) : 1463–71.
 30. Chen CL, Tsai WH, Chen CJ, Pan TM. Centella asiatica extract protects against amyloid beta1–40-induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system. *J Tradit Complement Med*. 2016 ; 6(4) : 362–9.
 31. Simpson T, Pase M, Stough C. Bacopa monnieri as an Antioxidant Therapy to Reduce Oxidative Stress in the Aging Brain. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015 ; 2015 : 615384.
 32. Zengin G, Aumeeruddy MZ, Diuzheva A, Jeko J, Cziaky Z, Yildiztugay A, Yildiztugay E, Mahomoodally MF. A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC-MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019 ; 164 : 581–9.
 33. Ionita R, Postu PA, Mihasan M, Gorgan DL, Hancianu M, Cioanca O, Hritcu L. Ameliorative effects of *Matricaria chamomilla* L. hydroalcoholic extract on scopolamine-induced memory impairment in rats: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine*. 2018 ; 47 : 113–20.
 34. Kil YS, Park J, Jafari M, Woo HA, Seo EK. Minor phenolics from *Angelica keiskei* and their proliferative effects on Hep3B cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2017 ; 27(14) : 3065–70.
 35. Kim A, Lim JW, Kim H, Kim H. Supplementation with *Angelica keiskei* inhibits expression of inflammatory mediators in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected mice. *Nutrition Research*. 2016 ; 36(5) : 488–97.
 36. Tang Y, Cai W, Xu B. From rice bag to table: Fate of phenolic chemical compositions and antioxidant activities in waxy and non-waxy black rice during home cooking. *Food Chemistry*. 2016 ; 191 : 81–90.
 37. Sankaranarayanan R, Valiveti CK, Kumar DR, Van Slambrouck S, Kesharwani SS, Seefeldt T, Scaria J, Tummala H, Bhat GJ. The Flavonoid Metabolite 2,4,6-Trihydroxybenzoic Acid Is a CDK Inhibitor and an Anti-Proliferative Agent: A Potential Role in Cancer Prevention. *Cancers*. 2019 ; 11(3) :
 38. Ji SJ, Lee DJ, Lim SH, Shin WJ, Cho YS, Kim SY, Kim JB, Kim SN. Antioxidant activities of *Angelica keiskei* L. and dried leaves of *Raphanus sativus* L. *Korean journal of food preservation*. 2013 ; 20(1) : 104–10.
 39. Park MH. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fractions from *Angelica Keiskei*. The graduate school of Seoul national university. 2008 ;
 40. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in Molecular Biology*. 2019 ; 1916 : 105–11.
 41. Kalani A, Chaturvedi P, Kalani K, Kamat PK, Chaturvedi P, Tyagi N. A high methionine, low folate and vitamin B6/B12 containing diet can be associated with memory loss by epigenetic silencing of netrin-1. *Neural Regen Res*. 2019 ; 14(7) : 1247–54.