

Scopolamine 유발 기억력 손상 마우스 모델에서 분심기음의 항산화 및 기억력 감퇴 억제 효과

한다영, 유옥철*, 김상호, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과교실, 자생한방병원 신경정신과*

Anti-amnesic and Antioxidant Effect of *Bunsimgieum* (*Fenxingiyin*) on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice

Da-Young Han, Ok-Cheol Yu*, Sang-Ho Kim, Dae-kyoo Chung

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University, *Department of Oriental Neuropsychiatry, Jaseng Korean Medicine Hospital

Received: July 3, 2019

Revised: September 10, 2019

Accepted: September 24, 2019

Correspondence to

Dae-kyoo Chung
Department of Oriental
Neuropsychiatry, College of Korean
Medicine, Daegu Hanny University,
136 Sincheondong-ro, Suseong-gu,
Daegu, Korea.

Tel: +82-53-770-2243

Fax: +82-53-770-2169

E-mail: chung@dhu.ac.kr

Acknowledgement

This manuscript is a revision of the first author's master's dissertation from Daegu Hanny University in February 2019.

Objectives: The purpose of this study was to confirm the anti-amnesic effects of Bunsimgieum (BSGE) through its favorable acetylcholine (ACh) and, acetylcholinesterase (AChE) activity, choline acetyltransferase (ChAT) mRNA expressions, and antioxidant effect on scopolamine (Sco)-induced memory impairment in C57BL/6 mice.

Methods: Six groups, a total of 20 intact or 100 Sco-induced mice were used in this study, based on their body weight. Half of each group underwent passive avoidance tests and the measurement of hippocampus AChE activity, ACh content, and ChAT mRNA expression. The remaining half of each group underwent a Morris water-maze test and antioxidant defense system measurement as well.

Results: Significant reductions in the step-through latency times from the passive avoidance test and reductions in the escape latency times from the Morris water-maze test were observed with increases of hippocampal AChE activities and, reductions in ACh contents and ChAT mRNA expression in hippocampus, as a result of Sco intraperitoneal treatment, in this study. Additionally, the increases in cerebral cortical MDA levels and, reductions in GSH contents, SOD activities, and CAT activities were demonstrated in the Sco control mice compared with the intact vehicle control mice, respectively. However, 28 days of consecutive oral pre-treatment of BSGE hot water extracts of 400, 200, and 100 mg/kg, respectively, markedly and dose-dependently inhibited Sco treatment-related amnesia.

Conclusions: The results demonstrate that the oral administration of BSGE hot water extracts reduces Sco-induced memory impairment, through preserving ACh, related to ChAT mRNA expressions, causes AChE inhibition, and enhances the cerebral antioxidant defense system.

Key Words: *Bunsimgieum* (*Fenxingiyin*), Scopolamine, Memory impairment, ACh, AChE, ChAT mRNA, Cerebral antioxidant defense system.

I. 서론

보건복지부에서 시행한 국내 치매유병률 조사사업에서 2018년 기준 전국의 치매환자가 75만명으로 추정된다고 보고하였으며, 또한 치매환자의 수는 앞으로 급격히 늘어 2024년에는 100만명, 2039년에는 200만명을 넘어갈 것으로 추측하고 있다¹⁾. 치매를 일으키는 질환 중 60%의 높은 비율로 나타나는 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 다양한 인지기능장애와 신경정신병적 증상을 동반하는 가장 흔한 신경퇴행성 노인질환으로, 알츠하이머병의 증상들은 점진적으로 진행되어 환자는 최종적으로 모든 일상생활 수행능력을 상실하고 전적으로 타인에게 의존하게 된다^{2,3)}.

알츠하이머 환자의 뇌에서 특징적으로 나타나는 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)의 감소는 기억 손상을 유발시키는 중요한 요인으로 알려져 있다⁴⁾. 따라서 시냅스의 아세틸콜린을 분해하여 신경신호 전달을 막는 효소인 아세틸콜린에스테라제(Acetylcholinesterase, AChE)를 비활성화시키는 것은 알츠하이머 환자의 기억력 손상을 회복시키는 한 방법이 될 수 있으며, 현재 임상에서는 이러한 콜린성 가설에 근거한 AChE 억제제가 알츠하이머병 약물요법의 표준으로 인정되고 있다^{5,6)}.

알츠하이머 증상 치료제로서 테스트되고 있는 AChE 억제제인 tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine^{3,7)}은 미국, 유럽, 아시아 등의 각국에서 경도 내지 중등도 알츠하이머 환자의 치료제로 승인 받았으나⁸⁾ 합성 AChE 억제제는 tacrine의 간독성을 포함하여 오심, 설사, 구토 등의 다양한 부작용을 일으킨다는 것이 보고되고 있다^{3,9,10)}. 이에 부작용이 없는 새로운 알츠하이머 치료제 개발에 대한 필요성이 제기되고 있으며, 합성 AChE 억제제의 대안으로 독성이 적은 천연원료의 AChE 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다¹¹⁻¹³⁾.

분심기음(分心氣飮)은 <太平惠民和劑局方(태평हे민화제국방)>에 처음 기술되어 전통 한의학 분야에서 널리 이용되고 있는 처방이다¹⁴⁾. 이전의 연구에서 분심기음이 쥐 모델에서의 항우울 효과¹⁵⁾ 및 세포내에서의 항산화 효과와 serotonin 증가를 통한 항우울 효과¹⁶⁾가 있음을 밝혔으며, 또한 분심기음이 쥐 혈청 에피네프린과 알도스테론을 감소시키는 효과가 있으며¹⁷⁾ 체외 도파민성 세포에 대한 신경보호효과¹⁸⁾가 있다는 연구결과도 보고된 적 있다. 하지만 기억 손상 모델에 대한 기억력 감퇴 억제 효과 및 항산화 효과와

관련된 분심기음의 실험 연구는 찾을 수 없었다.

이에 본 연구에서 scopolamine (Sco) 유발 기억 손상 마우스에게 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg를 28일간 연속투여하여 체중변화, 수동회피실험, 모리스 수중미로실험, ACh 함량, AChE 활성도, choline acetyltransferase (ChAT) mRNA 발현, malondialdehyde (MDA) 함량 및 glutathione (GSH) 함량, 항산화 효소 활성을 확인하여 분심기음의 기억력 감퇴 억제 효과 및 항산화 효과에 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 관리

실험동물은 체중이 18~21 g인 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스(OrientBio, Seungnam, Korea) 120마리를 이용했으며, 7일간의 순화기간을 거친 후 실험에 사용되었다. 마우스들은 습도 50~55%, 온도 20~25°C, 12시간 명암주기로 일정하게 유지된 polycarbonate cage에서 다섯 마리씩 사육되었으며 사료(Samyang, Seoul, Korea)와 물을 자유롭게 공급하였다. 동물실험은 실험동물의 사용 및 복지에 대한 국립규정에 따라 수행되었으며 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회(Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea)의 승인하에 실시되었다[Approval No DHU2018-038].

2. 실험군 분류

총 20마리의 무처치군과 100마리의 Scopolamine (Sco) 처치군은 총 6 그룹으로 나뉘어졌으며 7일의 순화기간을 거친 후의 체중을 기준으로 선택되었다. 각 그룹의 실험동물 중 10마리는 수동회피실험 후 해마의 ACh 함량, AChE 활성도, ChAT mRNA 발현 측정에, 나머지 10마리는 모리스 수중미로실험 후 대뇌 항산화 방어시스템 측정에 활용되었다(Table 1, Fig. 1).

3. 실험물질 준비 및 투여

1) 실험물질의 준비: BSGE, Tacrine

분심기음 열수 추출물은 갈색 과립제로, 구성약재는 원처방에 따른 21가지의 약재(Table 2)를 제천한방약초(Jecheon, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 회전식 진공농축기(N-

1110, Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조기(FDB-5503; Operon, Kimpo, Korea)를 이용해 준비하였다. 총 448 g의 분심기음을 100°C에서 6시간동안 10배 증류수에 끓여 둥근 플라스크에 증발시킨 후 완전히 동결 건조시켰다. 이 과정에서 126.78 g (수득율=28.30%)의 분심기음 열수 추출물을 얻었으며, 이를 기록한 바우처 표본은 ○○대학교 방제과학 글로벌 연구 센터의 식물표본실에 보관되었다(Code BSGE2018CDK).

투명한 고체형태의 tacrine은 Sigma-Aldrich사(tacrine hydrochloride; St. Louise, USA)에서 구입하여 대조군에 사용되었다.

2) 실험물질의 투여

분심기음 열수 추출물과 tacrine은 빛과 습기로부터 보

Table 1. Experimental Design Used in This Study

Groups	Inducer	Identification of Group	Treatment
Control	Saline, vehicle (oral)	Intact vehicle control	Distilled water 10 ml/kg/day (oral)
Control	Sco (intraperitoneal)	Sco control	Distilled water 10 ml/kg/day (oral)
Reference	Sco (intraperitoneal)	Tacrine	Tacrine 10 ml/kg/day (oral)
Active	Sco (intraperitoneal)	BSGE 400	BSGE hot water extracts 400 ml/kg/day (oral)
Active	Sco (intraperitoneal)	BSGE 200	BSGE hot water extracts 200 ml/kg/day (oral)
Active	Sco (intraperitoneal)	BSGE 100	BSGE hot water extracts 100 ml/kg/day (oral)

BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxinqiyin*), Sco: Scopolamine. 20 mice in each group.

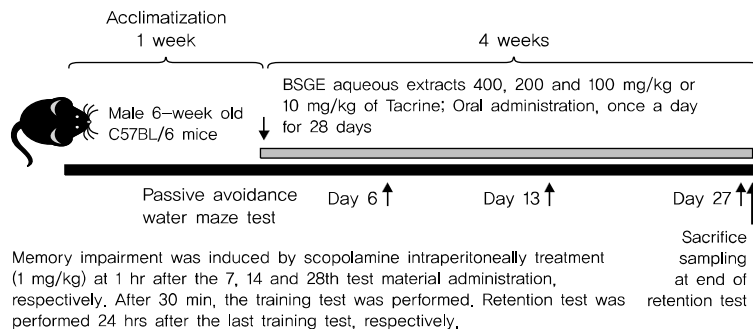
호하기 위해 -20°C의 냉장고에 보관 후 사용되었다. 두 약제 모두 증류수에 잘 용해되므로, 400, 200, 100 mg/kg의 분심기음과 10 mg/kg의 tacrine을 증류수에 바로 용해시킨 다음 1일 1회 28일간 10 ml/kg 용량으로 위관영양법을 이용해 경구투여 하였다. 정상대조군과 Sco대조군은 실험약물 대신 동일한 양의 증류수를 각각 투여했다(Fig. 1).

4. Scopolamine을 이용한 기억 손상 유도

앞서 시행된 연구방법^{8,19,20}에 따라 약물투여 시작 7, 14,

Table 2. Prescription of *Bunsimgieum* (*Fenxinqiyin*, BSGE)

Herbs	Pharmacognosy name	Dose (g)
紫蘇葉	Perilla Folium	4.5
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.62
半夏	Pinelliae Rhizoma	2.25
枳殼	Aurantii Fructus Pericarpium	2.25
陳皮	Citri Pericarpium	1.87
青皮	Citri Unshiu Immaturi Pericarpium	1.87
木通	Akebiae Caulis	1.87
桑白皮	Mori Radicis Cortex	1.87
大腹皮	Arecae Pericarpium	1.87
木香	Aucklandiae Radix	1.87
赤茯苓	Poria	1.87
檳榔	Arecae Semen	1.87
蓬朮	Zedoariae Rhizoma	1.87
麥門冬	Liriope Radix	1.87
桂皮	Cinnamomi Ramulus	1.87
桔梗	Platycodi Radix	1.87
香附子	Cyperi Rhizoma	1.87
藿香	Agastachis Herba	1.87
生薑	Zingiberis Rhizoma	3
大棗	Zizyphi inermis Fructus	2
燈心草	Junci Herb	2
Total		44.8



Hippocampus ACh content and AChE activity with antioxidant defense systems – Lipid peroxidation, GSH contents, SOD and CAT activity

Fig. 1. Experimental design used in this study.

28일째에 약물투여 1시간 후 Scopolamine (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA)를 1 mg/kg 복강투여하여 기억 손상을 유도하였다. Sco를 멸균생리식염수에 용해시켜 10 ml/kg 용량으로 복강 내 주사하고, 정상대조군에는 Sco 용액 대신 동일 용량의 멸균생리식염수를 복강투여하였다.

5. 체중 측정

체중의 변화는 초기 약물투여 1일전과 첫 번째 분심기음, tacrine 투여일, 첫 약물투여 1, 6, 13, 20, 27 및 28일 후 자동전자저울(Precisa XB320M, Precisa Instrument, Dietikon, Switzerland)을 이용하여 확인하였다. 개체 차이를 줄이기 위해 28일의 실험기간동안의 체중 증가량은 [(마지막 28번째 약물투여 24시간 후 희생되는 날의 체중)-(첫번째 약물투여날의 체중)]으로 계산하였다.

6. 수동회피실험(Passive avoidance test)

수동회피실험은 빛과 소음이 발생하는 시스템이 설치된 칸과 전기가 흐르는 바닥이 설치된 칸의 두 부분으로 나뉜 상자를 이용해 이루어졌다. Sco 처리 30분 후 각 마우스들은 빛/소음 실험 상자에 놓여지고, 15초 후부터 마우스가 인접한 칸의 바닥에 진입할 때까지 빛과 소음이 마우스에게 가해졌다. 마우스가 이렇게 옆 칸으로 이동하면 두 공간이 이어진 통로가 즉시 닫히고 마우스가 있는 칸의 바닥에 전기 자극(3.0 mA, 3초)이 가해졌다. 120초 내에 전기자극이 가해지는 칸으로 이동하지 않은 마우스는 다음 실험에서 제외되었다.

학습 실험(training test) 24시간 후 같은 방법으로 기억 검사(retention test)가 시행되었다. 옆칸으로 이동하는 시간을 체류잠복기(stepthrough latency time)로 기록했으며 이 시간은 최대 300초로 제한하였다. 수동회피실험은 초기 시험물질 투여 28일 후, 마지막 Sco 처리 24시간 후에 실시되었다.

7. 모리스 수중미로 실험(Morris water-maze test)

모리스 수중미로실험은 Morris²¹⁾에 의해 고안되고 다른 연구자들에 의해 일부 수정된 방법에 따라 시행되었다^{22,23)}. 이 실험은 27 cm 깊이의 22°C 물로 채워진 직경 100 cm, 높이 37 cm의 원통형 수조에서 이루어졌으며 마우스가 목표로 하는 직경 10 cm의 탈출 플랫폼은 수조 사면면 중 한

곳의 수면 밑에 설치하였다. Sco 처리 30분 후 학습 실험이 시행되었다. 각 마우스를 물에 빠뜨려 탈출 플랫폼을 찾으려 하였으며 모든 과정은 비디오 추적 시스템(Smart junior, PanLab., Barcelona, Spain)을 이용해 관찰되었다. 마우스가 성공적으로 플랫폼에 도착하면 플랫폼에서 10초 동안 그대로 머물게 했고, 만약 마우스가 플랫폼을 찾지 못한 채 150초가 지나면 그 마우스를 플랫폼으로 옮겨 10초간 머물게 했다. 기억 검사는 학습 실험 24시간 후 같은 방법으로 시행되었다. 마우스가 탈출 플랫폼에 도달하는 시간을 탈출 잠복기(escape latency time)로 기록했으며 이 시간은 최대 300초로 제한하였다. 모리스 수중미로실험은 초기 시험물질 투여 28일 후, Sco 처리 24시간 후에 실시되었다. 이 실험은 수동회피실험을 수행한 마우스들과는 구분하여 이루어졌다.

8. 해마 아세틸콜린(ACh) 함량 및 아세틸콜린 에스테라제(AChE) 활성도 분석

실험 28일째, 수동회피실험 완료 후 설치류 흡입용 마취 장치(Surgivet, Waukesha, WI, USA) 및 설치류 인공호흡기(Model 687; Harvard Apparatus, Cambridge, UK)를 통해 마우스들은 70% N₂O, 28.5% O₂가 혼합된 2~3% 아이소플루레인(Hana Pharm. Co., Hwasung, Korea)를 흡입하여 마취된 후 최종 희생되어 뇌가 추출되었다. 얼음위에서 해마 부위를 제거한 후, 분석할 때까지 -150°C에서 냉동 보관되었다. 분리된 해마는 무게측정 후 Del Rio²⁴⁾이 기술한 방식대로 차가운 pH 7.4의 0.01M Tris-HCL에서 균질화되어 12000 g에서 15분간 원심분리되었다. Amplex Red ACh/AChE assay kit (Cat No. A12217, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용해 해마 조직의 ACh 함량과 AChE 활성도를 측정하였다. 저장된 용액에서 0.2 U/ml choline oxidase와 2 U/ml horseradish peroxidase가 포함된 400 μ M AmplexRedTM 시약의 작업 용액을 준비하였다. 조직에서의 ACh 함량과 AChE 활성도에 대한 GBe의 효과를 측정하기 위해 100 U/ml AChE과 100 μ M ACh를 첨가하여 ACh 함량과 AChE의 활성을 각각 측정하였다. 샘플이 포함된 microplate wells에 100 μ l의 작업 용액이 가해졌을 때 반응이 시작되어 각각의 샘플에서 형광 물질이 방출됐는데, VersaMaxTM microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용해 560 nm의 ex-

citation wavelength와 590 nm의 emission wavelength를 측정했다. 백그라운드 형광물질은 음성 대조군으로부터 유도된 값을 감산하여 제거하였다.

9. 양적 RT-PCR을 이용한 해마 ChAT mRNA 발현

해마 ChAT 및 기억감수성 유전자인 BDNF, PI3K, Akt, ERK1 and 2, CREB, and CaMK IV mRNA 발현과 분심기음의 기억 손상 치료효과 사이의 매커니즘을 밝히기 위해, 본 연구에서는 이전의 보고²⁰⁾에 따라 실시간 RT-PCR 분석을 이용해 해마의 ChAT mRNA 발현을 측정하였다. 수동회피실험이 끝난 후 즉시 마우스에게서 해마 조직을 꺼내어 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용해 RNA를 추출하였다. RNA의 품질과 농도는 CFX96™ Real-Time System (BioRad, Hercules, USA)를 이용해 확인하였다. 오염된 DNA를 제거하기 위해 재조합형 DNase I (Ambion, Austin, USA)를 이용해 샘플들을 처리하였다. RNA는 제조업체의 지침에 따라 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 시약(Applied Biosystems, Foster City, USA)에 의해 역전사되었다. ABI Step One Plus Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA)을 사용해 분석했으며, 이들의 발현 수준은 대조군과 비교하여 계산되었다. 94°C에서 10분이 지나면 94°C 15초, 57°C 20초, 72°C 30초 순서로 39번 반복하여 온도를 조절하였다. comparative threshold cycle 방법으로 β -actin mRNA를 발현시켜 데이터 값을 표준화하였다²⁵⁾. PCR oligonucleotide primers (Bioneer, Daejeon, Korea)의 배열은 다음과 같다.

ChAT: 5'-CTTGGATGGTCCAGGCAC-3'
 5'-GTCATACCAACGATTCGCTCC-3'
 β -actin: 5'TGGTGGGTATGGGTCAGAAG-3'
 5'-CATGGCTGGGGTTGAAGG-3'

정량분석을 위해 정상대조군의 복부대동맥 조직을 대조군으로써 사용하였고 ChAT의 상대적 발현은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법²⁶⁾을 이용해 계산하였다.

10. 대뇌 항산화 방어시스템

실험 28일째 모리스 수중미로실험이 완료된 후 마우스는

흡입 마취 후 희생되어 뇌가 추출되었다. 대뇌피질을 제거한 후 MDA, GSH 함량, CAT, SOD 효소의 활성을 평가하여 대뇌 항산화 방어시스템을 관찰하였다. Zhan과 Yang²⁷⁾이 기술한 바와 같이 분리시킨 대뇌피질은 무게측정 후 10 mM 자당, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 0.1 M MEDTA으로 구성된 완충액으로 균질화시켜 12000 g에서 15분간 원심 분리되었다. UV/VIS 분광광도계(OPTIZEN POP, Mecasys, Daejeon, Korea)를 사용해 g당 MDA nM로 흡광도 525 nm에서 thiobarbituric acid 테스트를 통해 MDA를 측정하여 대뇌 지질과산화 농도를 확인하였다²⁸⁾. 총 단백질 함량은 Lowry 등²⁹⁾이 기술한 방법을 따라 bovine serum albumin 시약(Invitrogen, Carlsbad, USA)을 내부기준으로 하여 측정하였다. GSH의 함량을 측정하기 위해 준비한 균질액을 0.1 ml의 25% 트리클로로아세트산(Merck, San Francisco, USA)과 혼합한 후 4,200 rpm 4°C에서 40분간 원심분리하였다. GSH 함량은 nM/mg 단백질로 2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 412 nm 흡광도에서 측정하였다³⁰⁾. CAT의 존재하에 H₂O₂는 240 nm에서 분해되었다³¹⁾. CAT 활성은 25°C 및 pH 7.8에서 분당 1 nM H₂O₂를 분해하는데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 결과는 U/mg 단백질로 표현되었다. Sun 등³²⁾의 방법에 따라 SOD 활성을 측정하였으며 SOD 평가는 nitrotetrazolium blue와 반응하면 formazan 염료를 생성하는 xanthine과 xanthine oxidase로 인해 발생한 과산화물로 측정하였다. SOD 활성은 이 반응을 억제하는 560 nm에서 측정하였고, U/mg 단백질로 표현되었다. SOD 효소 활성을 나타내는 단위는 1분간 nitroblue tetrazolium의 초기 흡광도를 50% 감소시키는 효소의 양과 같다.

11. 통계분석

모든 데이터는 10마리 또는 20마리 마우스의 평균±표준편차(SD)로 표현되었다. 투여량이 다른 그룹들에게는 다중 비교검정이 수행되었으며, Levene 검정³³⁾을 이용하여 분산 균질성을 검사하였다. 만약 Levene 검정에서 분산 균질성이 유의한 편차를 보이지 않으면 얻은 데이터는 일원분산분석(one way ANOVA test) 후 LSD (least-significant differences) 다중비교검정을 통해 차이가 큰 두 그룹을 비교하였다. Levene 검정에서 분산 균질성이 크게 벗어난 경우 비모수 비교 검정인 Kruskal-Wallis H 검정이 이루어졌다.

Kruskal-Wallis H 검정에서 유의한 차이가 확인되면 Mann-Whitney U 검정으로 유의한 차이가 있는 두 그룹을 비교하였다. 통계 분석은 윈도우 SPSS (Release 14.0 K, IBM SPSS Inc., Armonk, USA)에 의해 이루어졌다³⁴. 또한 Sco의 복강투여에 의해 유도된 기억 손상의 중증도를 확인하기 위해 정상대조군과 Sco대조군 간의 변화율을 $[(\text{Sco대조군 데이터}-\text{정상대조군 데이터}) / \text{정상대조군 데이터}] \times 100$ 의 계산식으로 산출하였다. Sco대조군 및 실험군을 비교한 변화율은 시험물질의 효능에 대한 이해를 돕기 위해 이전의 Choi 등³⁵과 Lim 등³⁶에 설명된 방법을 따라 $[(\text{실험군 데이터}-\text{Sco대조군 데이터}) / \text{Sco대조군 데이터}] \times 100$ 의 계산식으로 산출하였다.

III. 결과

1. 체중 변화

28일의 실험기간동안 정상대조군과 비교했을 때 모든 Sco 처리 마우스에서 체중증가에 대한 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 및 tacrine 10 mg/kg 투여군 모두에서 체중증가에 대한 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다(Table 3, Fig. 2).

28일의 실험기간동안 Sco대조군에서 체중증가는 정상대조군에 비해 -3.59%의 변화를 보였으며, Sco대조군에 비해 tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서 각각 -2.98, 3.85, 3.23, 2.73%의 체중변화를 관찰했다.

2. 수동회피실험에서의 효과

정상대조군에 비해 Sco대조군에서 체류잠복기의 유의한 감소가 발견되었다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg

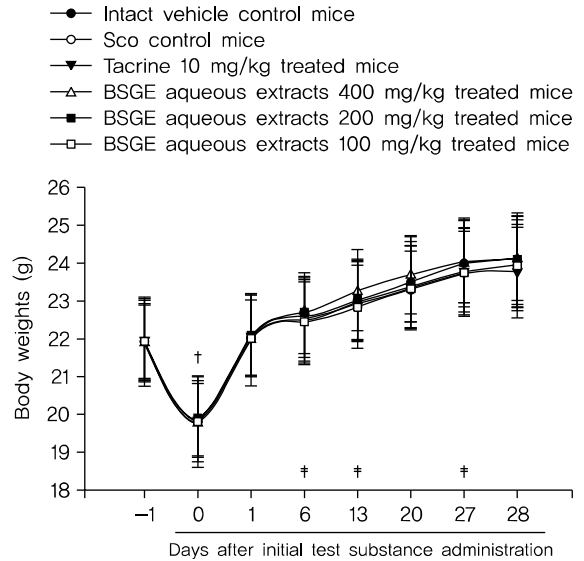


Fig. 2. Body Weight Changes of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxingjiyin*), Sco: Scopolamine. The day -1 refers to 1 day before the first test material administration. The day 0 refers to at first administration of test materials. †All animals were fasted overnight before the initial test materials administration. †Scopolamine was intraperitoneally treated at 1 hour after the 7, 14 and 28th test materials administration.

Table 3. Changes on the Body Weight in Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice

Groups Times	Body weights at		Weight gains [B-A]
	First administration* [A]	Sacrifice [B]	
Controls			
Intact vehicle	19.89±0.95	24.07±1.15	4.18±0.81
Scopolamine	19.91±1.00	23.94±1.08	4.03±0.56
Tacrine 10 mg/kg	19.84±1.07	23.75±1.19	3.91±0.53
BSGE treated			
400 mg/kg	19.94±1.06	24.12±1.11	4.19±0.50
200 mg/kg	19.91±1.13	24.07±1.24	4.16±0.53
100 mg/kg	19.80±1.18	23.94±1.19	4.14±0.40

Values are expressed as Mean±SD of 20 mice (g).

BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxingjiyin*).

Sacrifice means at 28 days after the first test material treatment, 24 hours after the last third Sco treatment.

* All animals were fasted overnight before first test material treatment.

kg 투여군에서는 체류잠복기의 유의한 증가가 발견되었다 ($p < 0.01$). 특히 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군은 수동회피실험에서 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사한 효과를 보였다(Fig. 3).

Sco대조군에서 체류잠복기는 정상대조군에 비해 72.28%의 변화가 있었으나, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 159.12, 153.78, 99.08, 64.46%의 변화가 있었다.

3. 모리스 수중미로실험에서의 효과

Sco대조군의 탈출잠복기는 정상대조군에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 tacrine 10 mg/kg 및 분심기음 열수 추출물 투여군 400, 200, 100 mg/kg의 탈출잠복기는 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 특히 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군은 최근의 연구에서 보고된 모리스 수중미로실험에서의 tacrine 10 mg/kg 투여군과 비슷한 효과를 보였다(Fig. 4).

Sco대조군의 탈출잠복기는 정상대조군에 비해 222.04%의 변화를 보였지만, Sco대조군에 비해 tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 각각에서는 -50.94, -50.14, -40.49, -20.82%의 변화를 보였다.

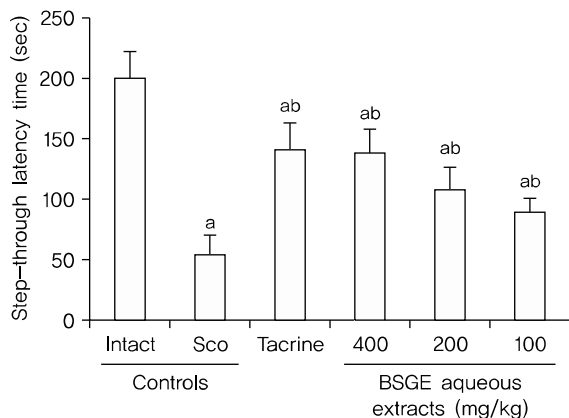


Fig. 3. Changes on the Step-through Latency Times of Passive Avoidance Test of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxinqiyin*), Sco: Scopolamine. a: compared to intact vehicle control by LSD test ($p < 0.01$). b: compared to Sco control by LSD test ($p < 0.01$).

4. 해마 ACh 함량의 변화

Sco대조군에서 정상대조군에 비해 해마 ACh 함량이 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 모두에서는 ACh 함량의 용량의존적이고 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군은 해마조직에서 Sco대조군에 비해 ACh 함량이 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사했다(Fig. 5).

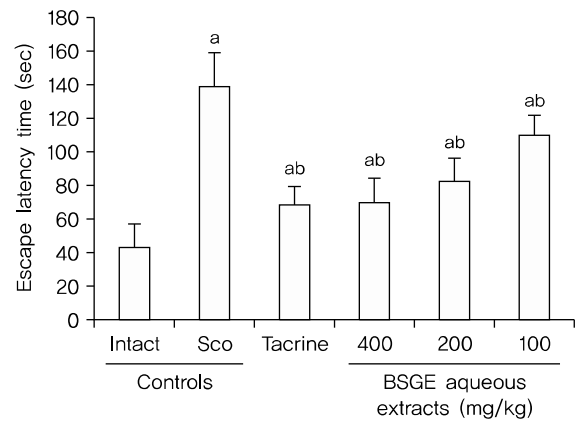


Fig. 4. Changes on the Escape Latency Times of Morris Water-Maze Test of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxinqiyin*), Sco: Scopolamine. a: compared to intact vehicle control by LSD test ($p < 0.01$). b: compared to Sco control by LSD test ($p < 0.01$).

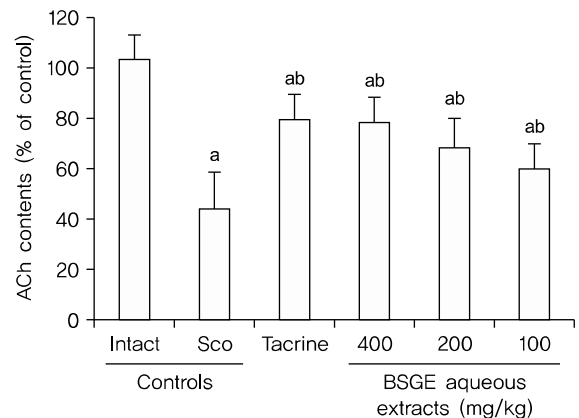


Fig. 5. Changes on the ACh Contents in Hippocampus of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxinqiyin*), Sco: Scopolamine, ACh: Acetylcholine. a: compared to intact vehicle control by LSD test ($p < 0.01$). b: compared to Sco control by LSD test ($p < 0.01$).

Sco대조군의 해마 AChE 활성은 정상대조군에 비해 -57.24%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 79.77, 77.73, 55.23, 35.91%의 변화를 보였다.

5. 해마 AChE 활성의 변화

정상대조군에 비해 Sco대조군에서 해마 AChE 활성이 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 모두에서는 AChE 활성의 용량의존적이고 유의한 감소를 보였다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군은 해마조직에서 Sco대조군에 비해 AChE 활성이 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사했다(Fig. 6).

Sco대조군의 해마 AChE 활성은 정상대조군에 비해 84.16%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 -32.37, -30.08, -22.72, -16.44%의 변화를 보였다.

6. 해마 ChAT mRNA 발현의 변화

정상대조군에 비해 Sco대조군에서 해마 ChAT mRNA

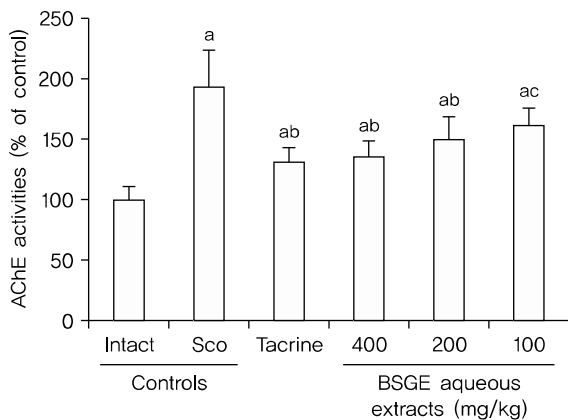


Fig. 6. Changes on the AChE Activities in Hippocampus of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxingjiyin*), Sco: Scopolamine, AChE: Acetylcholinesterase. a: compared to intact vehicle control by Mann-Whitney U test ($p < 0.01$). b: compared to Sco control by Mann-Whitney U test ($p < 0.01$). c: compared to Sco control by Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

(ChAT/ β -actin mRNA) 발현 정도가 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 모두에서는 ChAT mRNA 발현의 용량의존적이고 유의한 증가가 보였다($p < 0.01$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군은 RT-PCR 분석에서 ChAT mRNA 발현이 Sco대조군에 비해 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사했다(Fig. 7).

Sco대조군의 해마 ChAT mRNA 발현은 정상대조군에 비해 -55.67%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 70.55, 65.98, 44.98, 33.33%의 변화를 보였다.

7. 대뇌 항산화 방어시스템에서의 효과

대뇌피질의 MDA, GSH 함량, CAT, SOD 효소 활성을 측정하여 대뇌 항산화 방어시스템을 평가할 수 있다³⁷⁻³⁹.

1) 대뇌 MDA 함량의 변화

Sco대조군에서 정상대조군에 비해 MDA 함량과 대뇌 지질과산화의 유의한 증가가 관찰되었다($p < 0.01$). 그러나 분심기음 열수 추출물 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 모두에서는 MDA 함량의 증가가 용량의존적이고 유의

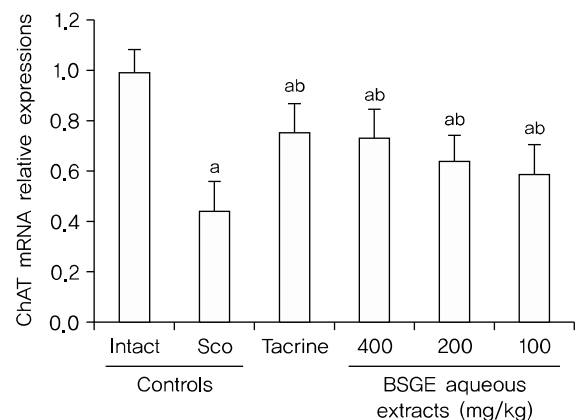


Fig. 7. Changes on the ChAT mRNA Expressions in Hippocampus of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice. BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxingjiyin*), Sco: Scopolamine, ChAT: Choline acetyltransferase. a: compared to intact vehicle control by LSD test ($p < 0.01$). b: compared to Sco control by LSD test ($p < 0.01$).

Table 4. Cerebral Cortex Antioxidant Defense Systems of Intact Vehicle Control and Sco-induced Memory Impairment Mice

Items Groups	MDA	GSH	CAT	SOD
Controls				
Intact vehicle	1.97±0.60	9.08±1.76	43.57±12.49	21.97±5.25
Scopolamine	5.66±1.94 ^a	2.63±0.79 ^a	8.29±2.32 ^a	5.73±2.13 ^a
Tacrine 10 mg/kg	2.77±0.62 ^{bc}	4.96±1.02 ^{ac}	27.98±11.84 ^{ac}	14.89±2.59 ^{ac}
BSGE treated				
400 mg/kg	2.80±0.53 ^{ac}	4.99±1.09 ^{ac}	30.89±10.77 ^{bc}	15.43±4.59 ^{bc}
200 mg/kg	3.23±0.52 ^{ac}	4.01±0.76 ^{ac}	21.21±10.66 ^{ac}	11.62±2.15 ^{ac}
100 mg/kg	3.82±0.46 ^{ac}	3.62±0.45 ^{ac}	15.98±5.12 ^{ac}	8.42±1.07 ^{ac}

MDA: Malondialdehyde, GSH: Glutathione, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, BSGE: *Bunsimgieum* (*Fenxingqiyin*).

Unit of MDA, GSH: nM/mg protein.

Unit of CAT, SOD: nM/min/mg protein.

^aCompared to intact vehicle control by Mann-Whitney U test ($p < 0.01$).

^bCompared to intact vehicle control by Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

^cCompared to scopolamine control by Mann-Whitney U test ($p < 0.01$).

하게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군은 대뇌 지질과산화가 Sco대조군에 비해 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사했다(Table 4).

Sco대조군의 대뇌 MDA 함량은 정상대조군에 비해 187.02%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 -51.10, -50.57, -42.90, -32.44%의 변화를 보였다.

2) 대뇌 GSH 함량의 변화

항산화 효소 GSH의 함량은 Sco대조군에서 정상대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군의 28일 연속 경구투여시 대뇌 GSH의 함량의 이러한 감소는 용량의존적으로 유의하게 억제되었다($p < 0.01$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군에서 GSH의 함량은 Sco대조군에 비해 유의하고 극적인 증가를 보였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사한 수치이다(Table 4).

Sco대조군의 대뇌 GSH 함량은 정상대조군에 비해 71.05%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 88.70, 89.76, 52.59, 37.60%의 변화를 보였다.

3) 대뇌 CAT 활성의 변화

항산화 효소 CAT의 활성은 Sco대조군에서 정상대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군의 28일 연속 경구투여시 이러한 대뇌 CAT의 활성의 감소가 용량의존적으로 유의하게 억제되었다($p < 0.01$). 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군에서 CAT의 활성은 Sco대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), 이는 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 결과와 유사한 수치이다(Table 4).

Sco대조군의 대뇌 CAT의 활성은 정상대조군에 비해 -80.98%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 237.70, 272.76, 155.97, 92.83%의 변화를 보였다.

4) 대뇌 SOD 활성의 변화

항산화 효소 SOD의 활성은 Sco대조군에서 정상대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되었다($p < 0.01$). 그러나 Sco대조군에 비해 tacrine 10 mg/kg, 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 SOD의 활성이 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군은 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사한 정도의 SOD 활성을 보였다(Table 4).

Sco대조군의 대뇌 SOD의 활성은 정상대조군에 비해 73.94%의 변화를 보였지만, tacrine 10 mg/kg, 분심기음

열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군에서는 Sco대조군에 비해 각각 160.07, 169.43, 97.64, 47.07%의 변화를 보였다.

IV. 고찰

현대인들의 평균 수명이 80세를 넘어가면서 치매 환자의 수도 함께 급증하고 있다. 2018년을 기준으로 이미 국내 치매 환자의 수는 75만명을 넘었을 것으로 추정되고 있으며 치매환자를 돌보기 위한 치매관리비용은 약 16조원에 이를 정도로 그 규모가 상당하다¹⁾. 치매는 기억장애를 포함하여 인격변화, 정신이상 및 이상행동의 임상증상이 나타나는 노인질환으로 그 중 60%가 알츠하이머병으로 인해 발생한다²⁾. 특히 알츠하이머 환자에게서 가장 두드러지게 일어나는 생화학적 변화인 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린 감소는 기억장애를 일으키는 요인으로 알려져있다⁴⁰⁾. 아세틸콜린은 ChAT에 의해 합성되며 AChE에 의해 분해되는 신경전달물질로⁴¹⁾, 알츠하이머 환자의 기억장애 증상을 치료하기 위해 AChE 억제제를 이용해 아세틸콜린의 감소를 막는 방법이 가장 많이 시행되고 있다^{8,45,46)}.

Tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine 등의 AChE 억제제가 알츠하이머 증상 치료제로서 테스트되고 있는데^{3,7)}, 그 중 tacrine은 1993년경 미국 식품의약청(FDA)에서 승인받은 알츠하이머병의 1차 치료제이다⁹⁾. Tacrine은 대뇌피질과 해마에서 콜린성 신경의 분해를 차단하여 콜린성 신경전달을 증가시키는 활성 콜린에스테라제 억제제로⁴²⁾, 뇌내 streptozotocin으로 유발된 치매 생쥐 모델에서 유의한 항산화 효과가 있다⁴³⁾. 그러나 tacrine은 약 30%의 환자에서 혈청 ALT 수치를 증가시킨다고 밝혀져 현재는 임상적인 효과에도 불구하고 사용이 엄격하게 제한되고 있다^{3,10)}. 또다른 AChE 억제제인 donepezil은 오심, 설사, 불면, 구토, 근육통, 피로 및 식욕부진 등의 부작용이 있으며⁴⁴⁾, rivastigmine 및 galantamine은 오심, 설사, 구토, 식욕저하, 체중감소, 두통 등의 부작용이 발생할 수 있다³⁾.

분심기음은 <太平惠民和劑局方(태평혜민화제국방)>에 처음 기술된 처방으로 紫蘇葉(자소엽) 4.5 g, 甘草(감초) 2.62 g, 半夏(반하), 枳殼(지각) 각 2.25 g, 陳皮(진피), 青皮(청피), 木通(목통), 桑白皮(상백피), 大腹皮(대복피), 木香(목향), 赤茯苓(적복령), 檳榔(빈랑), 蓬朮(봉출), 麥門冬(맥문동), 桔梗(길

경), 桂皮(계피), 香附子(향부자), 藿香(곽향) 각 1.87 g, 生薑(생강) 3 g, 大棗(대조), 燈心草(등심초) 각 2 g으로 구성되어 있으며, 憂愁(우수), 思慮(사려), 怒氣(노기)로 인하여 神(신)을 상하였을 때 시기에 구애 받지 않고 쓸 수 있고 氣滯(기체)를 소통시키고 陰陽(음양)을 승강시키며 三焦(삼초)를 조화시키며 脾臟(비장)을 和(화)하게 하는 효능이 있어, 氣不和(기불화)로 인한 모든 증상에 응용되어 왔다^{14,16)}. 또한 <東醫寶鑑(동의보감)>에서는 분심기음을 喜怒思悲憂恐驚(희노사비우공경)을 의미하는 七情(칠정)의 침체를 치료하기 위한 처방으로 설명하고 있으며⁴⁷⁾, 현재 임상에서도 신경정신병 증상을 치료하는데 분심기음이 사용되고 있다⁴⁸⁾.

선행연구에서 半夏(반하), 木香(목향)의 scopolamine 유발 기억력 감퇴 개선 효과 및 항산화 효과를 확인한 바 있으며^{13,49)}, 麥門冬(맥문동), 桔梗(길경), 香附子(향부자)의 기억력 감퇴 개선 효과⁵⁰⁻⁵²⁾, 桂皮(계피), 藿香(곽향), 生薑(생강)의 항산화 효과⁵³⁻⁵⁵⁾가 각각의 연구에서 확인되었다. 이와 같이 분심기음의 다양한 구성약제는 기억력 감퇴 개선 효과 및 항산화 효과를 나타낸다. 또한 임 등⁵⁶⁾의 연구에서 분심기음이 치매의 발병기전 중 하나로 알려진 베타아밀로이드 응집을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러므로 분심기음도 항치매 효과를 나타낼 것으로 예상되며, 또한 현재까지 분심기음을 사용하여 행동실험을 시행하고 아세틸콜린 함량과 항산화효과를 평가한 연구는 없었기에 본 연구를 시행하였다.

이에 본 연구에서는 분심기음 열수 추출물의 기억력 감퇴 억제 효과를 평가하기 위해 이전에 실시된 연구방법^{8,19,20)}에 따라 7, 14, 28일째 실험물질 투여 1시간 후 Sco 1 mg/kg을 복강투여하여 기억 손상을 유발했으며, tacrine 10 mg/kg 및 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 28일간 연속투여하여 체중측정 및 수동회피실험, 모리스 수중미로 실험, ACh 함량과 AChE 활성, ChAT mRNA 발현을 이용한 해마의 콜린성 시스템 반응성의 변화를 관찰하였다. 또한 지질과산화 정도를 확인하기 위해 대뇌피질 MDA 함량을 측정하였으며³⁷⁾, 항산화 효과를 확인하기 위해 추가적으로 대뇌피질 GSH 함량과 SOD 활성 및 CAT 활성을 측정하였다^{27,57)}.

분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 용량의 선택기준은 이전에 이루어진 생체내 및 시험관내 연구에 근거하였으며^{17,18,58)}, 분심기음 열수 추출물의 실험결과는 중추

신경계에 작용하는 가역성 AChE 억제제인 tacrine 10 mg/kg 경구투여 마우스의 실험결과와 비교하여 분석하였다^{7,8)}.

Sco대조군에서 수동회피실험의 체류잠복기가 눈에 띄게 감소하였고 모리스 수중미로실험의 탈출잠복기가 증가했으며 마우스의 해마 ACh 함량 및 ChAT mRNA 발현이 감소하였고 AChE 활성이 증가되었는데 이는 이전의 연구 결과^{8,19,20)}와 일치한다. 또한 정상대조군에 비해 Sco대조군에서 대뇌피질 MDA 함량이 증가하였으며 GSH 함량 및 SOD와 CAT 활성이 감소했는데 이는 대뇌피질 항산화 방어시스템의 손상을 의미한다. 그러나 scopolamine 처리 후 발생하는 AChE 활성화 및 대뇌피질 항산화 방어시스템의 파괴로 인한 기억 손상은 28일간 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 각각을 연속 경구투여 했을 때 용량의존적으로 현저하게 억제된다. 이것은 분심기음 열수 추출물이 ChAT mRNA 발현 증가와 AChE 활성 억제를 통한 ACh 함량 유지 및 대뇌 항산화 방어시스템의 증강을 통해 scopolamine 유발 기억 손상을 완화시킨다는 직접적인 증거로 생각된다. 또한 본 실험에서 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 전반적인 효과는 tacrine 10 mg/kg 투여군의 효과와 유사했다.

체중에서는 Sco대조군과 정상대조군 사이에 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 scopolamine 처리는 28일간의 실험물질 연속 경구투여동안 체중 증가에 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다. 또한 tacrine 10 mg/kg 투여군과 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군 역시 실험기간동안 정상대조군 및 Sco대조군과 비교하여 체중증가에 유의한 영향을 미치지 않았다. Sco대조군과 tacrine 투여군을 포함한 이 실험에 사용된 모든 마우스는 28일의 실험기간동안 정상적인 체중증가를 보였으며 이는 정상참고군인 동일 주령의 마우스의 체중증가 범위에 해당했다^{59,60)}.

수동회피실험은 일반적으로 학습, 기억 저장, 기억 회상의 세가지 단계에서의 치료를 평가하는데 사용한다^{8,46)}. Sco대조군은 기억 보존 검사에서 체류잠복기를 현저하게 단축시켰는데, 이는 중추 콜린성 뉴런 시스템이 기억 및 학습에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 분심기음 열수 추출물 투여군에서 scopolamine에 의해 단축된 체류잠복기가 용량의존적으로 증가되었는데 이는 분심기음 열수 추출물이 콜린성 신경계의 증재와 관련하여 scopolamine 유발 기억 손상을 개선시키는 효과가 있음을 나타낸다. 본 연

구의 실험조건에서 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 효과는 tacrine 10 mg/kg 투여군의 효과와 유사했다.

모리스 수중미로실험은 선택적 인지행동 실험 중 하나로, 중추 콜린성 시스템의 변화를 관찰하는데 이용되며 공간학습과 기억을 연구하는 실험이다²¹⁾. 물이 채워진 수조에서 탈출플랫폼에 도달하는 시간을 탈출잠복기라고 하는데 인지장애가 있는 동물에서는 이 시간이 현저히 증가하며 반복실험을 해도 탈출잠복기는 단축되지 않는다⁶¹⁾. 기억 검사에서 실험동물이 이보다 앞서 시행됐던 학습 실험(training session) 때 플랫폼이 있었던 수조 사분면 위치에서 더 많은 시간동안 더 많은 거리를 수영했다면, 그 실험동물은 모리스 수중미로실험 경험을 통해 학습하여 공간기억력이 향상되었다는 것을 의미한다^{8,20,21,61)}. 본 실험 결과상 Sco대조군의 탈출잠복기는 정상대조군보다 더 증가되었다. 분심기음 열수 추출물 투여군에서는 실험기간동안 용량의존적으로 탈출잠복기가 감소하였으며 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 효과는 tacrine 10 mg/kg 투여군의 효과와 유사했다. 이러한 결과는 현재의 실험조건에서 분심기음 열수 추출물이 scopolamine 유발 기억 손상 상태에서 장기 기억력을 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

중추 콜린성 시스템은 인지기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 아세틸콜린은 콜린성 신경세포에서 ChAT에 의해 합성되며⁴¹⁾ 집중, 학습, 기억을 포함한 여러 인지 과정의 중추 및 말초 조절에 필요한 신경전달물질이다. 따라서 콜린성 신경세포의 병변은 시냅스 사이에 방출되는 아세틸콜린을 감소시켜 학습 및 기억 기능장애를 일으킨다⁶²⁾. 아세틸콜린 작용 지속시간은 방출 후 아세틸콜린을 가수분해하는 AChE의 활성 정도에 좌우된다^{19,63)}. AChE 억제제는 알츠하이머병 또는 다른 유형의 치매, 외상성 뇌손상 및 정신착란 치료의 한 방법으로 이용된다⁶⁴⁾. ChAT는 중추 및 말초신경계에서 콜린성 신경세포 기능의 가장 특이적인 표지자로⁶⁵⁾, ChAT의 활성도는 노화된 뇌에서 크게 저하되며 이렇게 발생한 비활성의 회복 정도는 인지기능 손상의 심각도와 상당한 관련이 있다⁶⁶⁾.

Scopolamine은 M1AChR 및 M2AChR을 주요 표적으로 하는 비선택적 mAChR 길항제로, 설치류와 인간의 학습 및 단기기억 능력을 손상시킨다⁶⁷⁻⁶⁹⁾. 인지기능 개선에 대한 효과를 알아보기 위해 콜린성 조절장애를 가지며 노화되지 않은 기억 손상 모델을 사용한 약물 실험이 필요하다²⁰⁾. 해

마와 전두엽피질은 scopolamine 유발 신경손상에 특히 취약한데⁷⁰⁾, 분심기음 열수 추출물은 용량의존적으로 scopolamine 처리로 인해 손상된 해마의 ChAT mRNA 발현을 상승시키고 AChE의 활성을 억제해 아세틸콜린 감소를 막는다. 이 실험에서 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 효과는 tacrine 10 mg/kg 투여군과 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 분심기음이 해마의 AChE를 억제하고 ChAT mRNA 발현을 증가시켜 결과적으로 AChE 감소를 통한 scopolamine 유발 기억 손상을 개선시킨다는 것을 의미한다.

자유라디칼은 외인성 물질과 세포 신진대사에 의해 세포에서 만들어지며 나이가 들수록 자유라디칼의 생성량이 증가하는데⁷¹⁾ 이렇게 생성된 자유라디칼은 뇌의 생체분자와 반응하여 신경퇴행 및 기억력 손상을 일으킨다⁷²⁾. 또한 산화 스트레스는 알츠하이머병의 인지적 결함을 일으키는 주요 원인이 된다³⁸⁾. 이 사실을 뒷받침하는 직접적인 증거 중 하나는 SOD, MDA, 최종 당산화물, peroxyxynitrite, hemoxygenase-1과 같은 산화 스트레스 생체표지 물질의 수치가 알츠하이머 환자 뇌의 신경섬유매듭과 노인반에서 높게 나타난다는 것이다^{38,73)}. 뇌는 에너지 요구량과 산소 소비량이 높으며 쉽게 과산화될 수 있는 고도 불포화지방산이 풍부하고 항산화제 및 관련 효소의 상대적 결핍으로 인해 산화적 불균형에 매우 민감하다⁷⁴⁾. 특히 학습 및 기억 형성에 관여하는 부위인 기저전뇌와 편도체는 산화적 스트레스를 받기 쉬운 가장 취약한 영역이기 때문에⁷⁵⁾ 산화적 불균형은 산화 스트레스로 인한 생체분자의 손상으로 이어져 결국 다양한 신경퇴행성 질환을 일으키게 된다³⁸⁾. 활성 산소종 발생의 증가로 인한 미토콘드리아 기능이상 또한 노화 및 신경퇴행 질환과 관련되어 있는데, 산화 스트레스와 미토콘드리아 기능이상 사이의 상호작용은 결함을 증폭시키는 악순환의 고리를 형성하기 때문에 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환에서 중요한 역할을 한다⁷⁶⁾. 또한 scopolamine은 알츠하이머병 유사 증상과 관련된 지질과산화 현상을 증가시켜 항산화 방어시스템을 심각하게 파괴시키고^{22,38,39)} 지질과산화로 인해 생성된 다양한 독성물질들은 조직 주변을 손상시킨다^{37,77)}. GSH는 대표적인 내분비 항산화물질로 활성 산소종을 특정 세포 농도의 낮은 수준으로 유지시켜 조직 손상을 막아주는 조직내 항산화 인자로 여겨진다⁷⁸⁾. SOD는 뇌에서 효소 방어 메커니즘에 기여하는 항산화 효소 중 하나

이며^{27,57)}, CAT는 H₂O₂의 H₂O로의 전환을 촉매하는 효소이다⁷⁹⁾. 따라서 지질과산화 및 활성 산소종의 증가를 억제하는 것과 GSH 함량, SOD, CAT 활성을 증가시키는 것은 뇌 손상 보호에 중요한 의미를 가지고 있다^{27,37,57)}.

본 연구에서 Sco대조군은 대뇌피질 조직의 SOD, CAT, GSH와 같은 효소들의 활동을 방해하는 활성 산소종을 현저하게 감소시켰으며, 지질과산화를 의미하는 MDA의 생성 또한 정상대조군에 비해 현저하게 증가시켰다. 분심기음 열수 추출물 투여군에서 대뇌 지질과산화 정도가 용량의존적으로 유의하게 억제되었으며 SOD, CAT 활성 및 GSH 함량이 Sco대조군에 비해 증가하여 분심기음 열수 추출물 400 mg/kg 투여군의 효과가 tacrine 10 mg/kg 투여군의 효과와 유사한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 분심기음 열수 추출물이 항산화 효과를 통해 scopolamine 유발 기억 손상을 개선시켰다는 것을 의미한다.

향후 분심기음의 기억력 감퇴 억제 효과의 평가를 위해 여러 가지의 실험모델을 통한 다양한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어야 할 것이다. 또한 선행연구에서 밝혀진 半夏(반하), 木香(목향), 麥門冬(맥문동), 桔梗(길경), 香附子(향부자), 桂皮(계피), 藿香(곽향), 生薑(생강) 각 단미들의 기억력 감퇴 개선 또는 항산화 효과와 이 단미들을 포함한 혼합제제인 분심기음의 효과의 비교연구 및 고찰연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이며, 분심기음을 구성하는 각각의 약재들은 많은 활성 성분이 함유되어있으므로 분심기음 열수 추출물의 개별 생화학적 활성 화합물에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

분심기음 열수 추출물의 기억력 감퇴 억제 효과에 대해 조사하기 위해 scopolamine 유발 기억력 손상 모델을 이용하여 체중변화, 수동회피실험, 모리스 수중미로실험, ACh 함량, AChE 활성, ChAT mRNA 발현, malondialdehyde (MDA)와 glutathione (GSH) 함량, superoxide dismutase (SOD) 활성도 및 catalase (CAT) 활성도를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 측정에서 Sco대조군과 비교했을 때 분심기음 열수 추출물 400, 200, 100 mg/kg 투여군은 체중증가에 대한 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

2. 수동회피실험에서 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 투여군에서 체류잠복기가 용량의존적으로 유의하게 증가하였다.

3. 모리스 수중미로실험에서 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 투여군에서 탈출잠복기가 용량의존적으로 유의하게 감소하였다.

4. 해마에서의 AChE 활성은 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 투여군에서 용량의존적으로 유의하게 감소하였다.

5. 해마에서의 ChAT mRNA 발현은 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 투여군에서 용량의존적으로 유의하게 증가하였다.

6. 대뇌 항산화 방어시스템 평가실험에서 Sco대조군에 비해 분심기음 열수 추출물 투여군에서 대뇌 MDA 수준이 용량의존적으로 유의하게 감소되었으며 GSH 함량, CAT 활성, SOD 활성이 용량의존적으로 유의하게 증가하였다.

이러한 결과들은 분심기음이 해마에서 AChE 활성을 억제하고 ChAT mRNA 발현을 증가시키며 대뇌에서 항산화 효과를 나타냄으로써 scopolamine에 의해 유발된 기억 손상을 개선시킬 수 있음을 보여주었다.

REFERENCES

- Kim GW, Jo HS, JO YH. National Institute of Dementia Annual Report 2018. Seongnam:National Institute of Dementia. 2019. p.3.
- The Textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of Oriental Medical Schools in Nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. 3th ed. Seoul:Jipmoon-Dang. 2016:319-25, 589.
- Suh GH, Kee BS, Jung HY, Yoo SH. Drug therapy in geriatrics 1st ed. Seoul:Jungang Moonhwasa. 2006:41-65.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science. 1982;217:408-14.
- Roberson MR, Harrell LE. Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism. Brain Res Brain Res Rev. 1997;25:50-69.
- Roberson MR, Kolasa K, Parsons DS, Harrell LE. Cholinergic denervation and sympathetic ingrowth result in persistent changes in hippocampal muscarinic receptors. Neuroscience 1997;80:413-8.
- Taraschenko OD, Barnes WG, Herrick-Davis K, Yokoyama Y, Boyd DL, Hough LB. Actions of tacrine and galanthamine on histamine-N-methyltransferase. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2005;27:161-5.
- Chuong NN, Trung BH, Luan TC, Hung TM, Dang NH, Dat NT. Anti-amnesic effect of alkaloid fraction from *Lycopodiella cernua*(L.) Pic. Serm. on scopolamine-induced memory impairment in mice. Neurosci Lett. 2014;575:42-6.
- Park SM, Ki SH, Han NR, Cho IJ, Ku SK, Kim SC, Zhao RJ, Kim YW. Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition. Biol Pharm Bull. 2015;38:184-92.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. JAMA. 1994;271:992-8.
- Gang SY, Lee SY, Yoon HD, Shin OC, Park CG, Park CS. Neuroprotective and Memory Enhancing Effects of Pinelliae Rhizoma Extract. J Korean Oriental Med. 2005;26(3):27-42.
- Kang YG, Lee TH. Liriodopsis Tuber Improves Stress-induced Memory Impairments in Rats. Kor. J. Herbology. 2006;21(2):63-75.
- Park NE, Han DY, Kim SH, Chung DK. Aucklandiae Radix Ameliorates Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2017;28(2):123-36.
- Liu JY. Taepyeonghyeminhwajegukbang(太平惠民和劑局方). Beijing:National Health Publisher. 1985.
- Lee S, Kim J, Whang W, Kim H, Kwack S, Park E. The effects of Punsimgi-eum in the chronic mild stress model of depression in rats. J Korean Oriental Med. 2001;22:129-40.
- Lim JW, Jung IC, Lee SR. The Effects of BunSimGiEum-Gami-Bang(Fenxingqiyinjiaimeifang) on Serotonin of P815 cell. J. of Oriental Neuropsychiatry. 2011;22(2):147-62.
- Ji SY, Jeong DG. An experimental study on the change of stress-related hormone contents by prescription of Bunsimgieum. J Oriental Neuropsychiatry. 1992;3:49-63.
- Kim R, Lee C, Lee J, Cho J, Jang J, Lee K. Neuroprotective effects of Bunsimgieum. J Oriental Obstetrics & Gynecology. 2009;22:119-31.
- Bartus RT, Dean 3rd RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science. 1982;217:408-14.
- Lee S, Kim J, Seo SG, Choi BR, Han JS, Lee KW, Kim J. Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice. Pharmacol Res. 2014;85:23-32.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods.1984;11:47-60.
- Nam Y, Lee D. Ameliorating effects of constituents from *Cortex Acanthopanax Radicis* on memory impairment in mice induced by scopolamine. J Tradit Chin Med. 2014;34:57-62.

23. Hung TM, Na M, Dat NT, Ngoc TM, Youn U, Kim HJ, Min BS, Lee J, Bae K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J Ethnopharmacol.* 2008;119:74-80.
24. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15:316-28.
25. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-8.
26. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods.* 2001;25:402-8.
27. Zhan C, Yang J. Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Res.* 2006;53:303-9.
28. Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;80:33-42.
29. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
30. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.
31. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis.* New York: Academic Press, pp 673-86, 1974.
32. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
33. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1981;6:145-51.
34. Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24:294-6.
35. Choi JS, Kim JW, Park JB, Pyo SE, Hong YK, Ku SK, Kim MR. Blood glycemia-modulating effects of melanian snail protein hydrolysates in mice with type II diabetes. *Int J Mol Med.* 2017;39:1437-51.
36. Lim JM, Lee YJ, Cho HR, Park DC, Jung GW, Ku SK, Choi JS. Extracellular polysaccharides purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan) inhibit dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Int J Mol Med.* 2018;41:1245-64.
37. Mansoorali KP, Prakash T, Kotresha D, Prabhu K, Rama Rao N. Cerebroprotective effect of *Eclipta alba* against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats. *Phytomedicine.* 2012;19:1108-16.
38. Ghumatkar PJ, Patil SP, Jain PD, Tambe RM, Sathaye S. Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;135:182-91.
39. Lee JS, Kim HG, Lee HW, Han JM, Lee SK, Kim DW, Saravanakumar A, Son CG. Hippocampal memory enhancing activity of pine needle extract against scopolamine-induced amnesia in a mouse model. *Sci Rep.* 2015;5:9651.
40. Becker R, Giacobini E, Elble R, McIlhany M, Sherman K. Potential pharmacotherapy of Alzheimer disease. A comparison of various forms of physostigmine administration. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1988;116:19-32.
41. Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science.* 1983;221:614-20.
42. Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA.* 1992;268:2523-9.
43. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008;581:283-9.
44. Campbell NL, Perkins AJ, Gao S, Skaar TC, Li L, Hendrie HC, et al. Adherence and tolerability of Alzheimer's Disease medications: a pragmatic randomized trial. *J Am Geriatr Soc.* 2017;65:1497-504.
45. Giacobini E. The cholinergic system in Alzheimer disease. *Prog Brain Res.* 1990;84:321-32.
46. LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* 1993;58:69-79.
47. Huh J. Donguibogam. Seoul:Namsandang. 1994.
48. Neuropsychiatry of Oriental Medical Schools. Clinical Guidelines for Hwabyung. Seoul:Jipmoon-Dang. 2013.
49. Gang SY, Lee SY, Yoon HD, Shin OC, Park CG, Park CS. Neuroprotective and Memory Enhancing Effects of Pinelliae Rhizoma Extract. *J Korean Oriental Med.* 2005;26(3):27-42.
50. Kang YG, Lee TH. Liriopsis Tuber Improves Stress-induced Memory Impairments in Rats. *Kor. J. Herbology.* 2006;21(2):63-75.
51. Kim YS, Kim JS, Choi YH, Seo JH, Lee JW, Kim SK et al. Ameliorating Effect of the Root Extract from *Platycodon Grandiflorum* on the Ethanol-induced Cognitive Impairment in Mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 2004;35(3):239-43.
52. Yun SH, Jung IC, Lee SY. Effects of *Cyperus rotundus* (CPRT) on Inhibition Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry.* 2003;14(1):59-74.
53. Kim J, Kim SA, Yun WK, Kim EJ, Woo MK, Lee MS. Antioxidative Effect of Ethanol Extract for 5 Kinds of Spice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004;33(9):1426-31.
54. Shin SR, Hong JY, Nam HS, Yoon KY, Kim KS. Anti-oxidative Effects of Extracts of Korean Herbal Materials. *J*

- Korean Soc Food Sci Nutr. 2006;35(2):187-91.
55. Kim EJ, Ahn MS. Antioxidative Effect of Ginger Extracts. Korean J. Soc. Food Sci. 1993;9(1):37-42.
 56. Lim HS, Kim YJ, Kim OS, Jeong SJ. Screening of 50 Korean Herbal formulas with Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity and Amyloid- β Aggregation. Kor. J. Pharmacogn. 2016;47(3):287-94.
 57. Hu D, Cao Y, He R, Han N, Liu Z, Miao L, Yin J. Schizandrin, an antioxidant lignin from Schisandra chinensis, ameliorates A β 1-42-induced memory impairment in mice. Oxid Med Cell Longev. 2012;721.
 58. Kim SH, Park YC, Hong KE, Kang W, Lee SR, Jung IC. The effect of Bunsimgieum on Hwa-byung: randomized, double blind, placebo controlled trial. J Ethnopharmacol. 2012;144:402-7.
 59. Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. Laboratory animal medicine. Academic Press. Inc., Orlando, 1984.
 60. Tajima Y(Ed). Biological reference data book on experimental animals. Soft Science Inc., Tokyo, 1989.
 61. Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. Stroke. 2001;32:2648-57.
 62. Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. Neurobiol Aging. 2005;26:939-46.
 63. Eichenbaum H. How does the brain organize memories? Science. 1997;277:330-2.
 64. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. Pharmacol Res. 2004;50:433-40.
 65. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. Pathol Int. 1999;49:921-37.
 66. Zambrzycka A, Alberghina M, Strosznajder JB. Effects of aging and amyloid-beta peptides on choline acetyltransferase activity in rat brain. Neurochem Res. 2002;27:277-81.
 67. Dawson GR, Heyes CM, Iversen SD. Pharmacological mechanisms and animal models of cognition. Behav Pharmacol. 1992;3:285-97.
 68. Molchan SE, Martinez RA, Hill JL, Weingartner HJ, Thompson K, Vitiello B, Sunderland T. Increased cognitive sensitivity to scopolamine with age and a perspective on the scopolamine model. Brain Res Brain Res Rev. 1992;17:215-26.
 69. Iversen SD. Behavioural evaluation of cholinergic drugs. Life Sci. 1997;60:1145-52.
 70. Abe E. Reversal effect of DM-9384 on scopolamine-induced acetylcholine depletion in certain regions of the mouse brain. Psychopharmacology. 1991;105:310-6.
 71. Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. Zingiber officinale mitigates brain damage and improves memory impairment in focal cerebral ischemic rat. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:429-505.
 72. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. Indian J Biochem Biophys. 2009;46:9-15.
 73. Kumar H, Kim BW, Song SY, Kim JS, Kim IS, Kwon YS, Koppula S, Choi DK. Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. Biosci Biotechnol Biochem. 2012;76:1518-22.
 74. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2001;60:759-67.
 75. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Ann N Y Acad Sci. 1999;893:154-75.
 76. Swerdlow RH. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2011;1812:1630-9.
 77. Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab Invest. 1985;53:599-623.
 78. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2006;103:59-65.
 79. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993;49:481-93.