

# LPS에 의해 유도된 인지기능 손상모델에 대한 천마 추출물의 방어효과

권강범, 김하림, 김예슬, 박은희, 강형원\*, 류도곤

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 신경정신과학교실\*

## Protective Effect of *Gastrodia* Rhizoma Extracts on the LPS-Induced Cognitive Impairment Model

Kang-Beom Kwon, Ha-Rim Kim, Ye-Seul Kim, Eun-Hee Park, Hyung-Won Kang\*, Do-Gon Ryu

Departments of Physiology and \*Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Received: August 22, 2022

Accepted: September 22, 2022

### Correspondence to

Do-Gon Ryu

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandae-ro 460, Iksan, Korea.

Tel: +82-63-850-6846

Fax: +82-63-842-3138

E-mail: [desson@wku.ac.kr](mailto:desson@wku.ac.kr)

### Acknowledgement

This study was supported by grant of the Wonkwang University in 2020.

**Objectives:** *Gastrodia elata* (GE) has been used to treat cognition impairment, including Alzheimer's disease (AD) in Korea. The purpose of this study was to investigate the effects of GE water extracts (GEE) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced AD model in mice. (Aβ).

**Methods:** We classified six groups as follow; group 1: control (CON), group 2: LPS (0.5 mg/kg/day, four times), group 3: 4 mg/kg donepezil (DP), group 4: 100 mg/kg GEE+LPS, group 5: 200 mg/kg GEE+LPS, group 6: 500 mg/kg GEE+LPS.

**Results:** We found that GEE has an effect that inhibits decrease of discrimination index in object recognition test, as well as spontaneous alteration in the Y-maze test by LPS. Treatment with LPS increased amyloid-β (Aβ) concentration, and decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebral cortex of mice. However, GEE significantly protected against LPS-induced Aβ and BDNF changes. Our findings also showed that the inflammatory cytokines [tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β)] mRNA and protein were up-regulated by the LPS injection. But GEE significantly suppressed LPS-induced inflammatory cytokines increase in a dose-dependent manner.

**Conclusions:** This study suggests that the GEE may be an effective AD therapeutic agent, in treating neurodegenerative diseases including AD.

**Key Words:** *Gastrodia elata*, Alzheimer's disease, Lipopolysaccharide, Amyloid-β, Brain-derived neurotrophic factor, Neurodegenerative diseases

## I. 서론

인지기능이란 상황을 보고, 듣고 파악하는 능력으로, 기억력, 연산능력, 판단력, 사고력 등을 말한다. 이러한 인지 기능 문제가 생기는 대표적인 퇴행성 두뇌 질환이 치매이다. 치매의 60~70% 정도를 차지하는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)의 원인을 설명하는 많은 가설들이 존재함에도 불구하고 아직 발병 원인에 대한 명확한 이해가 부족하다.

지금까지 연구된 결과에 의하면 AD는 아밀로이드 베타(amyloid- $\beta$ : A $\beta$ )가 쌓여서 나타나는 플라크(plaque)와 인산화된 Tau 단백질이 만든 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangle)가 AD를 앓고 있는 환자의 뇌에서 발견된다고 보고되고 있다<sup>1,2)</sup>. AD에서는 A $\beta$ 가 축적되는 것이 밝혀지면서 A $\beta$ 는 AD를 일으키는 주요 원인으로 지목되어 이에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. A $\beta$  플라크는 주로 A $\beta$ 가 fibril form으로 응집한 것이 대부분을 차지하는 불용성 덩어리로서, 42개의 아미노산으로 구성된 A $\beta$ (1~42) 플라크에 의한 신경세포 독성 및 신경섬유종의 유발이 AD의 가장 중요한 원인으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)는 neurotrophin family에 속하는 내인성 단백질로 다양한 신경독성 인자로부터 신경세포를 보호하고, 신경발달, 증추 및 말초 신경세포의 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. BDNF는 세포 생존, 장기 기억력 강화(long-term potentiation), 시냅스 가소성(synaptic plasticity)과 관련되어 기억 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 특히 치매와 BDNF의 상관관계를 밝히고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>5)</sup>.

최근 신경염증(neuroinflammation)은 AD를 포함한 다양한 퇴행성 신경질환에서 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>6)</sup>. Lipopolysaccharides (LPS)는 Toll-like receptor 4 (TLR4)의 리간드(ligand)로 증추신경계를 포함하여 다양한 조직에서 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. LPS에 의해 유도된 염증 반응은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 증추신경계에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>8)</sup>. 이러한 이유로 LPS에 의해 유도된 신경염증 및 퇴행성 뇌병변 질환 모델이 많이 이용되고 있다.

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초과(Orchidaceae)에 속한 다년생 기생초본의 근경을 건조한 것으로<sup>9)</sup>, 실험적

으로 신경세포 손상에 대한 방어효과<sup>10,11)</sup>, 임상적으로 기억력 향상에 대한 효과<sup>12-14)</sup> 등이 있는 것으로 보고되었다.

이에 저자는 LPS에 의해 유도된 인지 기능 손상모델에 대한 천마 추출물의 방어 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 천마 추출물

본 연구에 사용된 (건)천마(*Gastrodia elata*)는 무주농협(무주군, 전북)에서 구입하여 아래와 같이 추출하였다. 천마 100 g에 15배수의 물을 투입한 후 90°C에서 6시간 전탕하여 추출물을 얻어 여과하고, 다시 1차 잔여물에 15배수의 물을 넣어 90°C에서 6시간 전탕하여 2차 추출물을 얻어 여과한 후, 1, 2차 추출물을 혼합, 농축, 살균, 분무건조를 하여 30.2 g의 추출물을 획득하였다.

### 2. 시약 및 재료

RIPA buffer와 BCA Protein Assay kit는 Thermo Fisher Scientific (CA, USA)에서 구입하였고, TRIzol™ Reagent는 Invitrogen (CA, USA)에서 구입하였다. Positive control로 사용한 Donepezil과 Anti- $\beta$ -Actin Antibody는 Santa Cruz Technology (CA, USA)에서 구입하였다. SAPK/JNK Antibody, Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody, p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody, Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody는 Cell Signaling Technology (MA, USA)에서 구입하였고, Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Phosphatase Inhibitor Cocktail, Protease inhibitor Cocktail은 Millipore (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. PVDF blotting membrane은 GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. Total BDNF Quantikine ELISA Kit는 R&D systems (MN, USA)에서 구입하였고, Mouse Amyloid beta 42 ELISA kit는 Mybiosource (CA, USA)에서 구입하였고, Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit, Mouse IL-6 ELISA Kit, Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit는 Bioss Antibodies Inc.(MA, USA)에서 구입하였다. Prime Script™ reagent kit

(perfect realtime)는 Takara (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Power SYBR Green PCR Master Mix는 Applied Biosystems (CA, USA)로부터 구입하였다. 그 외 Lipopolysaccharide (LPS; E. coli O111: B4), Chloroform, Iso-propanol, Methanol 등 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였다.

### 3. 동물실험 및 실험군 구성

본 실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 승인하에 시행하였으며(승인번호:WKU20-116), 실험동물에 대한 규정을 준수하였다. 실험동물은 11~12주령, 30~32 g 무게의 BALB/c 수컷 생쥐를 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 실험 과정 동안에는 일정한 조건(온도, 21±2°C; 습도, 50~60%; 12시간 주기 명/암)에서 일반 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험의 전체적인 과정은 Fig. 1에 제시하였다. 실험동물은 생리식염수를 투여한 정상군(Control, CON), LPS 처리군(LPS), 양성대조군인 4 mg/kg donepezil 투여한 군(DP), LPS와 천마 추출물(GEE) 100, 200, 500 mg/kg/day 농도로 투여한 군의 총 6군으로 나누어 실험을 진행하였다. 기억력 손상을 위해 0.5 mg/kg의 농도로 LPS를 1일 1회, 행동시험 시행일 포함 총 4회 복강 투여하였다. 천마 추출물과 donepezil은 존대를 이용하여 11일간 경구 투여하였으며, 경구 투여 기간 11일 중 종료전 2일 동안 신물질탐색시험(노출된 LPS 농도: 0.5 mg/kg), Y-maze test(노출된 LPS 농도: 1.0 mg/kg)의 2가지 행동시험을 연속적으로 실시하였다. 마지막 LPS 투여 4시간 후, 모든 실험동물은 diethyl ether를 이용하여 안락사시켰으며 이후 즉시 채혈하고 뇌 조직을 적출하여 -80°C에 보관하

여 실험에 사용하였다.

### 4. 신물질탐색시험(ORT, object recognition test)

마우스를 백색 플라스틱 상자(40×40×40 cm)에 넣어 5분간 적응시킨 후, 약물의 경구 투여 및 유도물질의 복강 내 투여를 진행하였다. 재질, 모양과 색상 및 크기가 같은 2개의 물체(A, A1)를 넣은 뒤 5분 동안 각 물체에 흥미를 보이는 시간을 측정하였다. 24시간 후 마우스가 상대적으로 관심을 덜 가지는 물체(A)를 새로운 물체(B)로 바꾸어 주고 다시 5분 동안 관심도를 측정하였다. 새로운 물체는 기존 물체와 동일한 재질과 색상으로 모양과 크기만 다른 상태로, 마우스가 코나 앞발로 물체를 만지는 경우 물체에 흥미가 있는 것으로 판단하였다. 물체 인지능력은 새로운 물질 탐색에 소요된 시간을 측정하여 전체 탐색시간에 대한 비율, 즉 변별지수(discrimination index; DI)를 구하여 판단하였다. DI(%)=B/(A1+B)×100, A1:바꾸지 않은 물체에 흥미를 보였던 시간, B:바꾼 물체에 흥미를 보였던 시간

### 5. Y-maze test

Y-maze 상자는 외부가 보이지 않는 백색 아크릴로 길이 20 cm, 넓이 5 cm, 높이 10 cm의 Y자 모양(A, B, C 부분)의 사방이 막힌 미로로 제작하여 실험에 사용하였다. 시험 전, mouse를 Y-maze 상자에 2분간 넣어 상자에 적응시켰다. 적응시킨 후, 약물의 경구 투여 및 유도물질의 복강 내 투여를 진행하였다. 본 시험은 상자의 가장 가운데에서 마우스를 출발시켜 5분 동안 자유 이동 동선을 기록하였다. 해당 가지 부분에 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우를 동선으로 기록하였다, 직전에 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우에 1점씩 부여하였으며, 연속으로 들어가지 않은 경우에는 점수를 부여하지 않는 방식으로 '실제 변경 점수'를 기록하였다. 변경행동력(spontaneous alteration, %)은 '전체 통로에 들어간 횟수'와 '실제 변경 점수'를 기록하여 산출하였다.

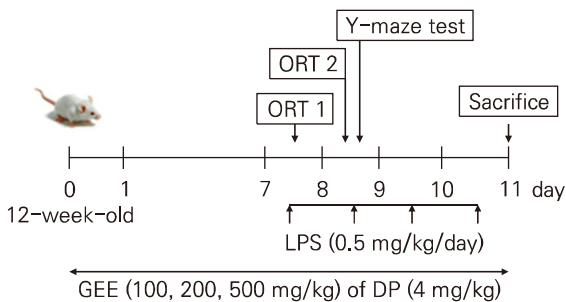


Fig. 1. A schematic drawing of animal experiments. ORT: object recognition test, GEE: *Gastrodia elata* extracts, DP: donepezil.

변경행동력(%)	=	$\frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{총 출입 횟수}-2} \times 100$
- 실제 변경, actual alternation : 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점씩 부여 : 연속으로 들어가지 않을 시 점수를 부여하지 않았다.		

## 6. BDNF, A $\beta$ 42 측정

적출한 마우스 대뇌 피질 조직의 일정량에 protease inhibitor, phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer를 넣고 균질화한 후 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000 rpm, 4°C, 10분 조건으로 원심분리하여 단백질을 추출하였다. BCA protein assay로 단백질량을 정량하여 같은 농도의 단백질량으로 샘플을 만들고, ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 ELISA reader (Molecular Devices, California, USA)로 조직 내 BDNF의 양, A $\beta$ 42의 양을 확인하였다.

## 7. Total RNA 분리

실험이 끝난 후 적출된 해마 조직으로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent를 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 각각의 조직을 잘게 자른 후 1 mL Trizol로 용해시킨 후 200  $\mu$ L chloroform을 첨가하여 얼음 속에서 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 13,000 rpm으로 20분 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 13,000 rpm으로 10분 원심분리하고 침전물을 75% EtOH로 2번 세척하였다. 세척된 RNA를 건조시킨 후 DEPC water 20  $\mu$ L로 녹이고 분광광도계(IMPLEN GmbH, Munich, Germany)에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

## 8. 실시간 역전사 효소 중합반응(Real Time PCR)

역전사 반응(reverse transcription reaction)은 1  $\mu$ g total RNA와 Prime Script TM reagent kit (perfect realtime)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA (1  $\mu$ g), oligod(T)primer (25 pmol), PrimeScript RT enzyme Mix I, 5X primeScript Buffer가 함유된 반응액으로 37°C에서 15분, 85°C에서 5초, 4°C로 유지시키는 반응으로 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 효소 중합 반응은 10배 희석한 cDNA에 Power SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 수행하였다. 발현된 각각 유전자의 mRNA양은 Real-time PCR systems (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 GAPDH에 대한 상대적인 양으로서 계산하였다. 사

용된 primer의 sequence는 Table 1에 기록하였다.

## 9. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ELISA

적출한 마우스 대뇌 피질 조직의 일정량에 protease inhibitor, phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer를 넣고 균질화한 후 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000 rpm, 4°C, 10분 조건으로 원심분리하여 단백질을 추출하였다. BCA protein assay로 단백질량을 정량하여 같은 농도의 단백질량으로 샘플을 만들고, ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 ELISA reader (Molecular Devices, California, USA)로 조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 양을 확인하였다.

## 10. Western blotting

실험이 끝난 후 적출된 대뇌피질 조직 내 단백질은 protease inhibitor, phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer를 사용하여 분리하였다. 20  $\mu$ g 단백질은 10% 아크릴아마이드와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, PVDF membranes을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 5%의 bovine serum albumin 또는 skim milk를 사용하여 2시간 동안 블로킹하였고, 일차 항체는 1  $\mu$ g/mL을 1:2,000으로 희석하여 4°C 냉장고에서 overnight 처리하였다. 이차 항체는 HRP-conjugated IgG (1:2,000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현량은 image analyzer (EZ-Capture ST, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

## 11. 통계분석

모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(Mean $\pm$ S.D.)로 계산

**Table 1.** Sequences and Accession Numbers for Primer, Forward and Reverse, Used in Real-Time PCR

Gene	Sequence for Primers	Accession no.
GAPDH	Forward: CGTCCCGTAGACAAAATGGT	NM_008084
	Reverse: TTGATGGCAACAATCTCCAC	
TNF- $\alpha$	Forward: AGGGTCTGGGCCATAGAACT	NM_013693
	Reverse: CCACCAGCTCTTCTGTCTAC	
IL-6	Forward: GACAAAGCCAGAGTCCCTCAGAGA	NM_00131405 4.1
	Reverse: CTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC	
IL-1 $\beta$	Forward: TCAGGCAGGCAGTATCACTC	NM_008361.4
	Reverse: AGCTCATATGGGTCGACAG	

하였다. 각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test) Duncan 사후검정 비교를 실시하여  $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다(SPSS V12., SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

### III. 결과

#### 1. 인지기능 손상에 대한 천마 추출물의 효과

인지기능 손상에 대한 천마 추출물의 효과를 조사하기 위하여 신물질탐색 시험을 시행하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 변별지수(discrimination index)는  $24.5 \pm 9.7\%$ 로 나타나 대조군( $35.2 \pm 10.6\%$ )에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ , Fig. 2A). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 변별지수는 투여한 용량에 비례하여 증가하였다(Fig. 2A). 특히 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 변별지수는  $33.2 \pm 9.7$  ( $p < 0.05$ ),  $37.9 \pm 15.6$  ( $p < 0.01$ )로 나타나 LPS 투여군에 비해 유의한 증가 효과가 나타났다(Fig. 2A).

천마 추출물의 인지기능 개선 효과를 조사하기 위한 다른 방법으로 Y-maze test를 시행하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 변형행동력(spontaneous alteration)은  $13.0 \pm 16.6\%$ 로 나타나 대조군( $29.7 \pm 3.1\%$ )에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ , Fig. 2B). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 변형행동력은 유의하게 증가하였다 (Fig. 2B). 특히 100 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 변형행동력은  $36.5 \pm 7.9\%$  ( $p < 0.01$ )로 나타나 LPS 투여군에 비해 유의한 증가 효과가 나타났으며, 양성대조군으로 투여

한 donepezil (DP)군( $26.2 \pm 20.6\%$ ) 효과가 뛰어났다(Fig. 2B).

#### 2. A $\beta$ 와 BDNF에 대한 천마 추출물의 효과

인지기능 손상의 지표 물질로 알려진 A $\beta$ 42에 대한 천마 추출물의 효과를 조사하기 위하여 실험이 끝난 마우스의 대뇌피질을 적출하여 A $\beta$ 42의 양을 조사하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 A $\beta$ 42는  $1.5 \pm 0.4$  ng/mg protein으로 대조군( $1.1 \pm 0.1$  ng/mg protein)에 비해 유의하게 증가( $p < 0.05$ )하였다(Fig. 3A). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 A $\beta$ 42는 투여한 용량에 비례하여 감소하였으며(Fig. 3A), 특히 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 A $\beta$ 42는  $1.1 \pm 0.2$  ng/mg protein ( $p < 0.05$ )으로 나타나 양성대조군으로 투여한 donepezil(DP)군( $1.1 \pm 0.2$  ng/mg protein)과 유사한 감소 효과를 보였다(Fig. 3A).

인지기능과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)에 대한 천마 추출물의 효과를 조사하기 위하여 실험이 끝난 마우스의 대뇌피질을 적출하여 BDNF의 양을 조사하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 BDNF는  $8.2 \pm 1.1$  ng/mg protein으로 대조군( $11.2 \pm 0.3$  ng/mg protein)에 비해 유의하게 감소( $p < 0.05$ )하였다(Fig. 3B). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 BDNF는 투여한 용량에 의존적으로 증가하였으며(Fig. 3B), 특히 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 BDNF는 유의한 증가 효과를 나타냈다(Fig. 3B).

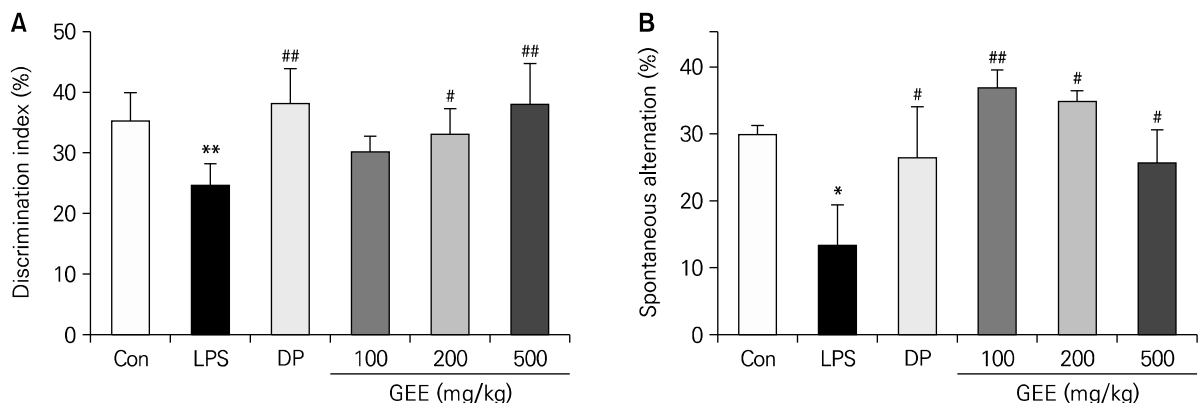


Fig. 2. Effects of *Gastrodia elata* extracts (GEE) on object recognition test (A) and Y-maze test (B) in mice treated with LPS. The data are expressed as mean  $\pm$  SD with  $n = 7$  mice/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control (CON); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. LPS. DP: donepezil.

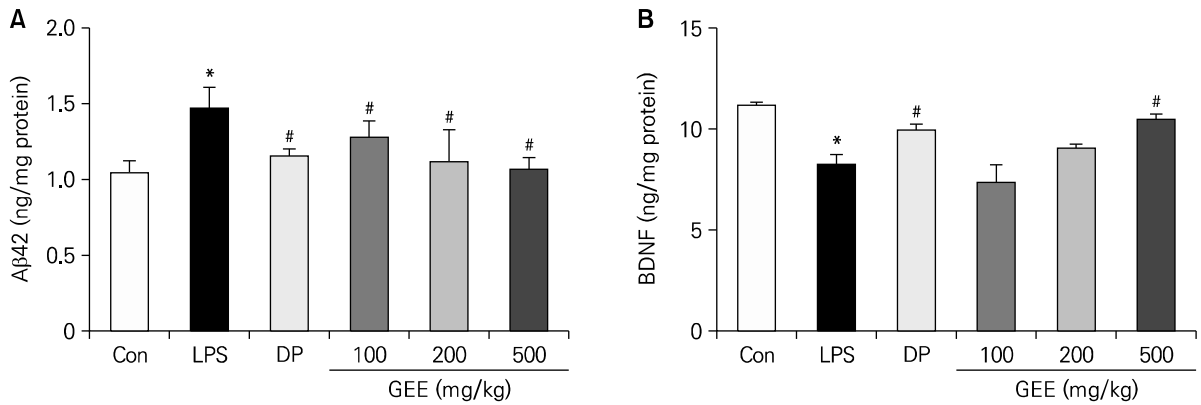


Fig. 3. Effects of *Gastrodia elata* extracts (GEE) on Aβ42 (A) and BDNF (B) in cerebral cortex of mice treated with LPS. The data are expressed as mean±SD with n=7 mice group. \*p<0.05 vs. control (CON); #p<0.05 vs. LPS. DP: donepezil.

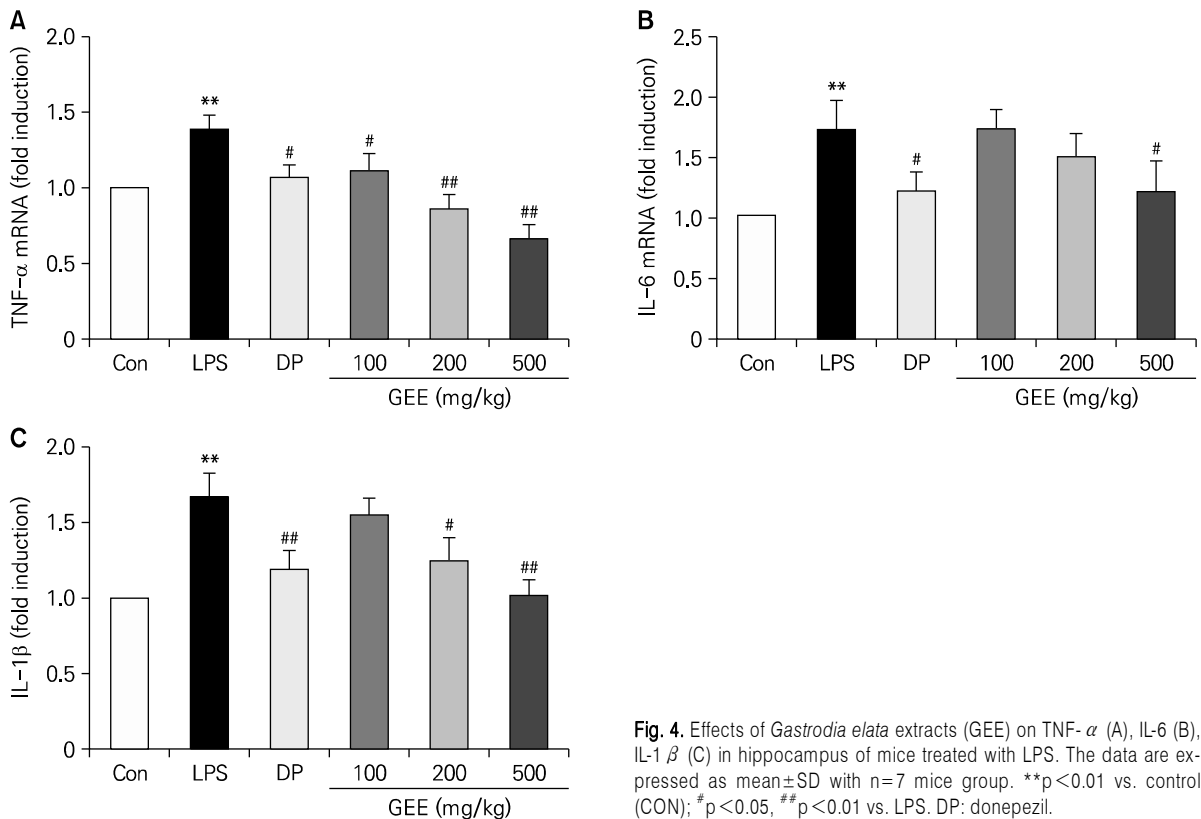


Fig. 4. Effects of *Gastrodia elata* extracts (GEE) on TNF-α (A), IL-6 (B), IL-1β (C) in hippocampus of mice treated with LPS. The data are expressed as mean±SD with n=7 mice group. \*\*p<0.01 vs. control (CON); #p<0.05, ##p<0.01 vs. LPS. DP: donepezil.

### 3. 염증성 사이토카인에 대한 천마 추출물의 효과

#### 1) 해마(hippocampus)조직 내 TNF-α, IL-6, IL-1β mRNA 발현에 대한 효과

인지기능 손상과 관련이 있는 것으로 알려진 염증성 사이

토카인에 대한 천마 추출물의 효과를 조사하기 위하여 실험이 끝난 마우스의 해마를 적출하여 TNF-α (Fig. 4A), IL-6 (Fig. 4B), IL-1β (Fig. 4C)의 mRNA 발현량을 조사하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 TNF-α, IL-6, IL-1β의 mRNA 발현량은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.01). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현량은 투여한 용량에 의존적으로 감소하였다(Fig. 4).

## 2) 대뇌피질(cerebral cortex)조직 내 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 농도에 대한 효과

천마 추출물의 대뇌피질에서 발현하는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 에 대한 효과를 조사하기 위하여 실험이 끝난 마우스의 대뇌피질을 적출하여 TNF- $\alpha$  (Fig. 5A), IL-6 (Fig. 5B), IL-1 $\beta$  (Fig. 5C)의 농도를 조사하였다. 그 결과 LPS를 투여한 군의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  농도는 각각  $148.5 \pm 45.7$ ,  $145.9 \pm 4.7$ ,  $299.7 \pm 72.6$  pg/mg protein으로 나타나, 대조군에 비해 유의하게 증가( $p < 0.01$ )하였다(Fig. 5). 그러나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  농도는 투여한 농도에 의존적으로 감소하여 유의한 효과를 나타냈다. 특히 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  농도는 각각  $76.0 \pm 25.2$ ,  $93.4 \pm 8.9$ ,  $185.6 \pm 9.6$  pg/mg protein으로 나타나, LPS를 투여한 군과 비교하여 유의하게 감소( $p < 0.01$ )하였

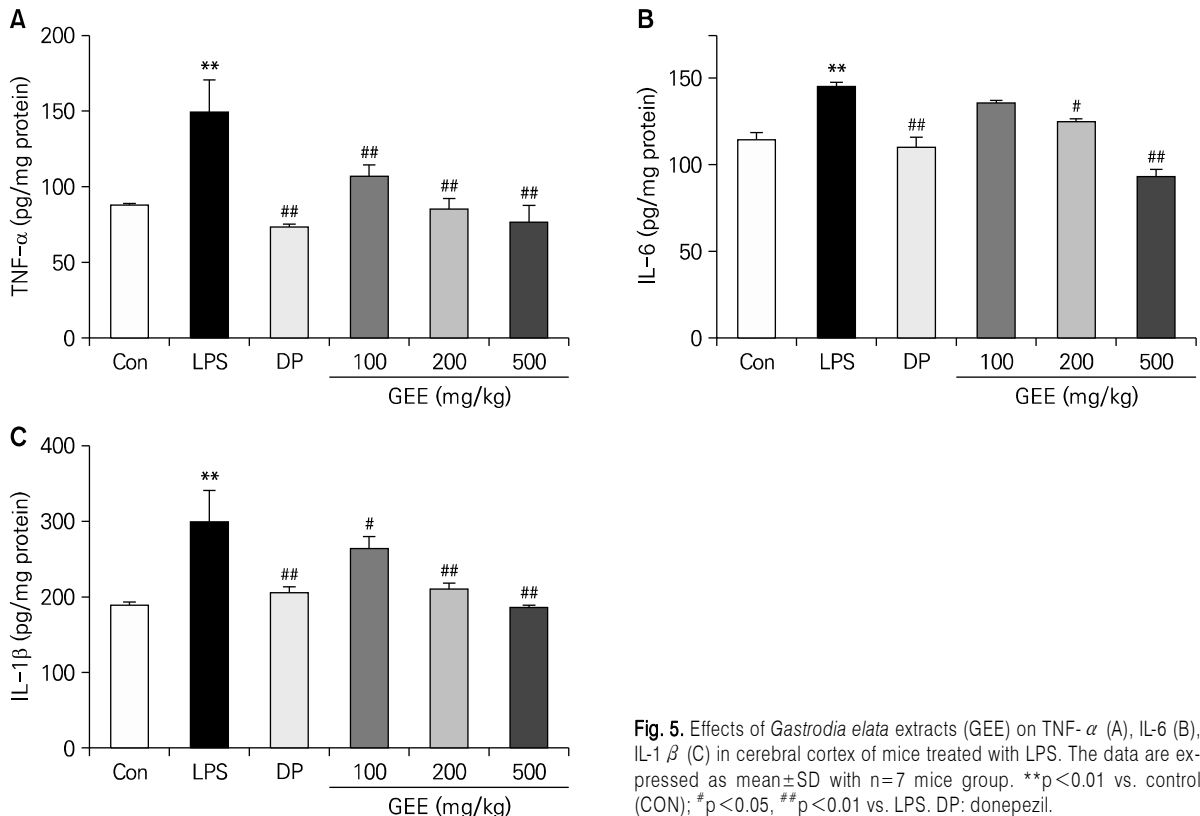
다(Fig. 5).

## 4. 천마 추출물의 MAPK에 대한 효과

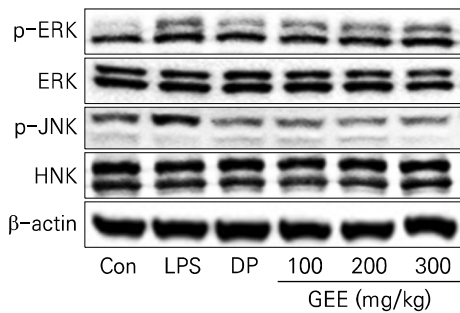
LPS 유도 인지기능 손상에 대한 천마 추출물의 방어 효과 기전을 조사하기 위하여 실험이 끝난 mice의 대뇌피질을 적출하여 Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 발현량을 조사하였다. 그 결과 LPS를 처리한 군의 phospho-ERK (p-ERK), phospho-JNK (p-JNK) 단백질 발현량은 대조군에 비하여 증가하였으나 100, 200, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군의 p-ERK, p-JNK 단백질 발현량은 양성대조군으로 사용한 donepezil (DP)군과 유사하게 감소하였다(Fig. 6).

## IV. 고찰

인지기능의 이상으로 인한 치매 환자의 증가는 사회적 문제로 대두되고 있다. 치매 환자의 대부분은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)이 차지하고 있다. 전 세계적인



**Fig. 5.** Effects of *Gastrodia elata* extracts (GEE) on TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C) in cerebral cortex of mice treated with LPS. The data are expressed as mean $\pm$ SD with n=7 mice group. \*\* $p < 0.01$  vs. control (CON); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. LPS. DP: donepezil.



**Fig. 6.** Effects of *Gastrodia elata* extracts (GEE) on the expression of MAPK pathway in cerebral cortex of mice treated with LPS. Each protein expressions were determined by western blot analysis. Similar results were observed in three separated experiments.

로 AD 환자는 증가하고 있으나<sup>14)</sup> 발병 원인이 명확하게 밝혀지지 않았으며, 치료제 또한 증상 완화에 초점이 맞춰져 있다<sup>15)</sup>.

천마는 한의학 임상에서 인지기능 개선을 위해 오랫동안 사용되어온 한약재이다. 천마 추출물의 인지기능 개선에 대한 실험 연구와 임상연구가 많이 보고 되었다<sup>10-13)</sup>. 이를 근거로 본 논문에서 LPS를 이용한 인지기능 손상모델에서 천마 추출물의 효과를 조사하였다. Zhao 등<sup>16)</sup>의 보고에 의하면 LPS를 투여한 마우스에서 퇴행성 뇌병변 질환의 증상인 인지기능 손상, 우울한 행동 등이 나타났다. 인지기능 손상에 대한 천마 추출물의 효과를 조사하기 위하여 LPS 유도 인지기능 손상 마우스에 천마추출물을 투여하고 신물질탐색 시험과 Y-maze test를 시행하였다. Fig. 2에서 보여주듯이 LPS를 투여한 군에서 변별지수(discrimination index)와 변경행동력(spontaneous alteration)은 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 그러나 천마 추출물을 투여한 군의 변별지수와 변경행동력은 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 2). 또한 양성대조군으로 사용한 donepezil (DP) 투여군의 변별지수와 변경행동력도 LPS 투여군과 비교하여 유의하게 증가하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 LPS는 인지기능 손상모델로서 적합하였으며, 천마 추출물이 LPS에 의한 인지기능 손상에 유의한 효과가 있음을 시사한다.

AD의 발병 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, 아밀로이드 베타(amyloid- $\beta$ ; A $\beta$ )의 축적이 AD 환자에서 많이 발견된다는 보고<sup>1,2)</sup>가 있어 A $\beta$ 가 AD를 유발하는 주요 원인으로 인식하고 있다. Fig. 3A에 의하면 LPS를 투여한 군의 A $\beta$  농도는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였

으나, 천마 추출물을 투여한 군은 투여한 농도에 비례하여 A $\beta$  농도가 감소하였다. 이러한 결과는 Fig. 2에서 보여준 LPS에 의한 인지기능 손상은 대뇌피질에 축적된 A $\beta$  농도의 증가가 관여함을 시사한다. 또한 천마 추출물의 인지기능 손상에 대한 개선 효과 기전에 A $\beta$  농도의 감소가 포함됨을 의미한다.

뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)는 신경세포의 보호, 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. BDNF의 감소 현상은 AD 환자를 포함한 퇴행성 뇌질환 환자에서 많이 보고되고 있다<sup>17,18)</sup>. LPS를 투여한 군의 BDNF 농도는 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, 500 mg/kg 천마 추출물을 투여한 군에서는 LPS를 투여한 군과 비교하여 유의한 증가( $p < 0.05$ ) 효과를 나타냈다(Fig. 3B). 최근 BDNF 유전자 발현을 조절하는 전사 인자(transcription factor)중의 하나가 cAMP-responsive element binding protein (CREB)이며, BDNF가 수용체에 결합하면 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 포함한 신호전달 기전에 의해 결국 CREB의 활성화시킨다고 보고되었다<sup>19)</sup>. Fig. 6에서 인지기능 손상 유발 물질인 LPS의 투여는 MAPK의 활성화(p-ERK, p-JNK 증가)를 유도하였으나 천마 추출물 투여군은 감소하였다. 이러한 결과는 천마 추출물에 의한 BDNF의 증가 기전은 MAPK 경로와 관련이 있음을 시사한다.

AD를 포함한 다양한 퇴행성 뇌질환에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  등과 같은 염증성 사이토카인의 증가로 인한 신경염증이 동반하고 있다<sup>6,8)</sup>. 본 연구에서 천마 추출물을 투여한 군의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 단백질과 mRNA 발현량은 LPS 투여군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 4, 5). LPS에 의한 염증성 사이토카인의 증가의 원인 중 하나는 미세아교세포(microglia)의 탐식능(phagocytic activity)의 손상인 것으로 보고되고 있다<sup>20)</sup>. 미세아교세포의 탐식능은 뇌의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 본 실험에서 양촌사 추출물의 염증성 사이토카인의 감소 효과는 미세아교세포의 탐식능과 관련이 있는 것으로 유추할 수 있으며 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

1. 양촌사 추출물은 LPS에 의한 변별지수와 변경행동력



의 감소를 유의하게 억제하였다.

2. 양춘사 추출물은 LPS에 의한 A  $\beta$ 와 BDNF의 감소를 유의하게 억제하였다.

3. 양춘사 추출물은 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1  $\beta$ 의 증가를 유의하게 억제하였다.

4. 양춘사 추출물은 LPS에 의한 ERK와 JNK의 인산화를 유의하게 억제하였다.

이와 같은 결과는 양춘사 추출물이 AD를 포함한 인지기능 손상을 예방하거나 치료할 수 있는 제제 개발의 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430(7000):631-9.
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated Tau sequesters normal Tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature Medicine*. 1996;2(7):783-7.
- Lorenzo A, Yankner BA.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(25):12243-7.
- Thoenen H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Progress in Brain Research*. 2000;128:183-91.
- Schinder AF, Poo MM. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*. 2000;23:639-45.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 2004;14:1-4.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. Lps/tlr4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42:145-51.
- Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia tlrs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12:329.
- Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim I. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* BLUME. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1981;29:55-62.
- Jung YS, Kang JH, Prak SH, Kwon YM, Kim GW, Ko BS. Protective Effect of *Gastrodia Elata* on Neuronal Cell Damage in Alzheimer's Disease. *Journal Of Oriental Neuropsychiatry*. 2010;21(2):125-40.
- Youn YS, Lee JS. Effect of *Gastrodiae Rhizoma* on Apoptosis in Cerebral Infarction Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2009;19(3):1-13.
- Kim WC, Jeong JK, Kim JS, Kim KO. The Verify of Memory Improvement by *Gastrodia Elata* Blume. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2013;24(1):27-44.
- Kim HN, Kim JE, Jeong JK, Kim JS, Kim KO. The Verify of Memory Improvement by *Gastrodia Elata* Blume Depends on the Amount. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2014;25(3):243-52.
- Alzheimer's Association. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2012;8(2):131-68.
- Rafii MS, Aisen PS. Advances in Alzheimer's disease drug development. *BMC Medicine*. 2015;13(1):62.
- Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*. 2019;9:5790.
- Wu PL, Lee M, Huang TT. Effectiveness of physical activity on patients with depression and Parkinson's disease: A systematic review. *PLoS ONE*. 2017;12:e0181515.
- Galts CP, Bettio LE, Jewett DC, Yang CC, Brocardo PS, Rodrigues ALS, Thacker JS, Gil-Mohapel J. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019;102:56-84.
- Jin Y, Sun LH, Yang W, Cui RJ, Xu SB. The role of BDNF in the neuroimmune axis regulation of mood disorders. *Frontiers in Neurology*. 2019;10:515.
- Kim MW, Choe K, Park JS, Lee HJ, Kang MH, Ahmad R, Kim MO. Pharmacological Inhibition of Spleen Tyrosine Kinase Suppressed Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction in LPS-Induced Neurodegeneration Model. *Cells*. 2022;11(11):1777.