

## 석창포의 학습능력 및 기억장애 개선에 미치는 효과에 관한 연구

변 경 회<sup>1), 2)</sup>, 현 진 옥<sup>1)</sup>, 이 봉 회<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>씨. 에프(주) 생명과학연구소, <sup>2)</sup>제주대학교 의과대학 해부학교실

### A Study on effect of *Acori Graminiei Rhizoma* Extract on Learning and Spatial Memory Deficit

Kyoung-Hee Byun<sup>1), 2)</sup>, Jin-Uk Hyun<sup>1)</sup>, Bong-Hee Lee<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>C.F CO.,LTD Institute of Life Science, <sup>2)</sup>Department of Anatomy and Neurobiology,

Institute of Medical Science, College of Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

석창포는 머리를 맑게 하고 기억력을 증진시키는데 많이 사용되어지며 인지기능개선에 효능이 있다고 알려진 약재이다. 본 연구는 석창포의 신경 세포 보호효과를 확인하기 위해 해마(Hippocampus) 세포인 HT-22세포주를 배양하여 치매를 유발하는 것으로 알려진 전구 단백질인 아밀로이드 베타 1-42를 처리하여 인지기능 장애 모델을 만들어 실험에 사용하였다. 석창포 추출물을 투여한 뒤 MTT-Assay 시행하였고, 석창포의 노화에 대한 보호 효과를 알아보기 위해 항산화 활성을 측정하였다. MTT-Assay에서 70%의 저해도를 나타내었으며, 자유라디칼의 활동에 의한 산화 억제 정도를 측정한 항산화 활성도 70%로 나타났다. 이상과 같은 연구 결과는 석창포가 학습능력 및 기억 장애 개선에 좋은 효과를 가진 소재임을 확인할 수 있었다.

**Key words** : 석창포, 해마, 인지기능 장애, 아밀로이드 베타 1-42

#### 서 론

인간의 학습과 기억력은 뇌의 신경 전달 물질의 교류에 의해 이루어지고 있다. 신경 전달 물질인 아세틸콜린의 분비가 제대로 이루어지지 않거나, 신경 세포가 사멸될 경우 학습 능력과 기억력 등이

인지능력이 떨어지게 된다. 인지능력의 저하는 노인에게서 많이 나타나는데, 치매란 질병으로 많이 나타난다. 치매에는 크게 혈관성 치매와 알츠하이머형 치매로 분류된다 (1, 2, 3). 그 중 알츠하이머형 치매는 전체 치매환자의 반 이상을 차지하고 있으며 (4), 특히 뇌 신경세포들의 퇴행성 병변으로 인해 콜린성 신경계 활성을 감소시킨다고 알려졌다 (5, 6, 7). 알츠하이머 환자에 있어서 뇌의 사

후 조직 병리학적 병변은 노인반, 신경섬유 덩어리, 아밀로이드 혈관 등이 관찰되어진다 (8). 또한 최근 연구 결과에 따르면 아밀로이드베타 단백질이 세포와 혈관에 침착되어 신경세포에 독성작용을 함으로써 뇌기능 장애를 초래한다고 보고되었다 (9, 10, 11). 이와 같은 인지기능과 관련된 알츠하이머형 치매를 연구하거나 특정물질의 치매 보호효과를 검사하는 연구가 해마를 대상으로 많이 시행되고 있다.

상록성 다년초로 학명이 *Acours gramineus Soland.* 인 석창포는 과명이 전남성과이며, 향명이 창포, 석향포, 석장포이다. 주 분포지가 제주도 및 남부 다도해 섬 지방의 냇가이며, 종자에 의한 실생번식은 불가능하고 적당한 환경조건에서 재배하면 자연증식 속도가 빠르므로 주로 봄, 가을철에 분주하는 것이 이상적이다. 석창포의 형태학적 특징은 뿌리 줄기는 옆으로 뻗고 마디가 많다. 석창포는 고미. 건위. 치통. 산후하혈. 종창. 구충. 치풍. 진정. 안태. 개선. 치림. 안질. 익정. 진통. 진정. 건위. 진통. 이뇨. 항진균작용에 효능이 있다고 알려져 있으며, 관상용. 약용으로 사용되고 있다 (12, 13).

따라서, 본 연구에서는 해마의 신경세포를 이용하여 석창포의 인지기능 개선 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 석창포 시료 준비

제주산 석창포의 추출은 석창포 200 g을 70% 에탄올 2 L에 넣고 3일간 추출 후 filter paper를 사용하여 1회 걸러낸 후 다시 70% 에탄올 2 L를 넣고 2일간 추출하여 filter paper로 걸러내었다. 2회에 걸쳐 걸러진 추출액은 회전감압농축기를 사용하여 농축하였고, 농축이 끝나고 -20 °C에서 6시간, -70 °C에서 24시간 방치 후 동결 건조기에서 4일간 건

조한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 해마 세포배양

흰 쥐의 pheochromocytoma에서 얻은 HT-22 세포는 HT4 해마세포주의 subclone이다. HT-22 cell을 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / 10% fetal bovine serum (FBS) / 1% antibiotics (penicillin-streptomycinamphotericin B mixture; Gibco) 배지를 사용하여 96well 배양접시에  $1.0 \times 10^4$ 개/well 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다.

### 3. 세포의 viability 측정(MTT assay)

준비된 cell ( $1.0 \times 10^4$ )에 10 μM 아밀로이드 베타 1-42와 석창포 추출물 (0.1 g/ml)을 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 48시간 후 MTT reagent 50 μl/well씩 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 4시간 배양하였고, 상층액을 제거하고 생성된 blue formazan을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μl/well씩 분주 후 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 30분 배양한 후, ELISA를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 정상세포에서의 세포 독성을 비교해 보기 위하여 아밀로이드 베타 1-42를 투여하지 않은 실험군에 대해서도 상기와 같은 방법으로 MTT assay를 수행하여 세포의 viability를 측정하였다.

### 4. 항산화활성 측정

석창포의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 측정하였다. 0.4 mM DPPH를 조제하고, 시료는 최종농도를 1/4배의 농도가 되도록 희석한다. MeOH을 100 μl 씩 96well에 분주하고 시료를 100 μl를 넣고 암실에서 30분간 반응시킨 후 ELISA를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정 후 아래와 같은 계산법에 의해 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100}$$

## 결 과

### 1. MTT-Assay

HT-22 cell을 96well 1.0×10<sup>4</sup>개 분주하여 24시간 배양 후 25종의 herb를 0.1 g/ml와 10μM Aβ<sub>1-42</sub>를 동시에 각well에 처리하였다. 그 결과 석창포가 세포독성 저해도가 70%로 다른 herb보다 저해도가 강한 것으로 나타났다. 석창포가 신경 세포의 직접적인 생성을 유발하지는 않지만, 베타 아밀로이드 단백질의 세포독성을 저해함으로써 신경 세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 보여진다. HT-22 cell을 배양하여 아밀로이드 베타 1-42만 처리한 군과 아밀로이드 베타 1-42와 석창포를 같이 처리한 군의 세포를 microscopy로 관찰한 것이다 (Fig. 1). 아밀로이드 베타 1-42와 석창포를 같이 처리한 군이 아밀로이드 베타 1-42만 처리한 군에 비해 세포의 수에서 큰 차이를 보임을 알 수 있다.

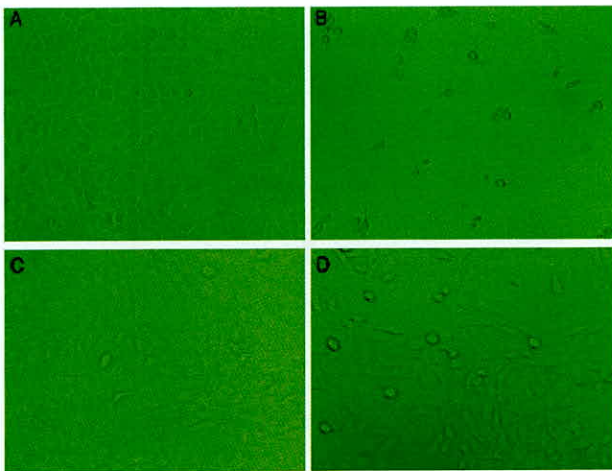


Fig. 1. Phase contrast micrographs of HT 22 cells grown in serum-free medium for 3 days with different conditions. (A) control, (B) amyloid beta 1-42, (C) media and AGR (D) media + amyloid beta + AGR 4μl

### 2. DPPH scavenging activity

Free radical 소거 활성은 확인하기 위해 DPPH 방법을 사용하였다. 먼저 석창포 추출물을 각 농도별로 나누어 MeOH 1 ml에 녹여 제조 하였고, 96well에 100 μl씩 분주하였다. 여기에 0.4 mM DPPH 용액을 100 μl씩 분주하여 30min 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. control은 시료와 MeOH 혼합액으로 사용하였다. Fig. 2.에서 각각의 농도에 따른 자유라디칼 소거활성 정도를 나타내었다. 석창포 추출물이 1000 μg에서 70%정도의 생리활성을 보여주고 있다.

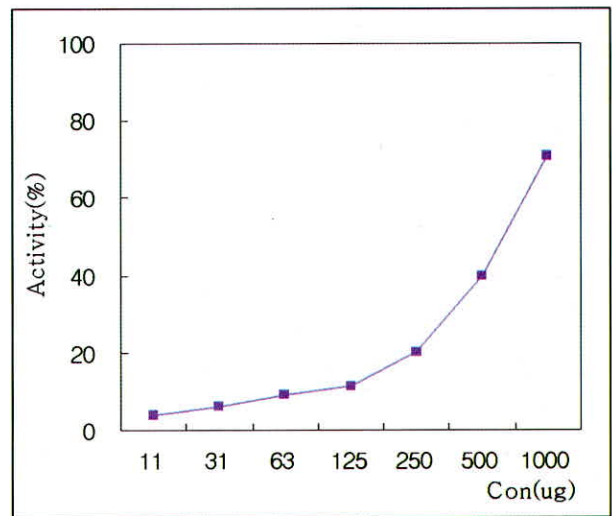


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of *Acori Graminiei Rhizoma*.

## 고 찰

인지능력의 저하로 나타나는 질병 중에 하나인 알츠하이머환자들 뇌에서 관찰되어지는 세포 변성은 아밀로이드 베타 단백질의 과생산과 직접적으로 연관 되어지고 그 결과 아밀로이드가 침착되어지는 형태로 나타나며, 결국 수상돌기와 축삭돌기의 수축과 세포사를 일으킨다고 보고되어지고 있다 (14). 해마에 아밀로이드 베타

1-42를 주입하면, 병리학적 병변이 나타난다고 보고되어지고 있으나 (15, 16, 17) 이를 이용하여 인지기능 개선 소재 탐색에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 아밀로이드 베타 1-42를 이용하여 인지기능 장애 모델을 제작하였다. 해마 세포에 아밀로이드 베타 1-42를 주입하였을 경우 아밀로이드 베타 1-42를 주입하지 않은 것에 비하여 50%의 세포사가 일어나는 것을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 이는 외상에 의한 것이 아닌 아밀로이드 베타 1-42를 주입함으로써 아밀로이드 침착이 유도 되어지는 결과라고 사료된다. 이와 같은 인지기능 장애 모델을 제작한 후 머리를 맑게 하고 기억력을 증진시키는데 많이 사용되어지며 인지기능개선에 효능이 있다고 알려진 (12, 13) 석창포를 세포 독성이 없는 농도로 처리하여 석창포의 인지기능 개선효과에 대한 실험을 시행하였다. 석창포 처리 후 인지기능 개선 효과를 관찰한 결과 석창포를 투여하지 않은 실험군이 50% 세포사를 일으킨 반면, 석창포를 투여한 실험군은 30%의 세포사만을 일으켜 석창포의 인지기능 개선 효과를 관찰하였다. 이는 석창포가 인지기능 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다. DPPH는 화학적으로 안전한 자유 라디칼을 가지고 있어 항산화 물질을 만나면 전자를 잃게 되어 라디칼이 소거되게 된다. sample 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 기준으로 DPPH free radical 소거 활성을 비교해 본 결과 해양 기원의 *sterptomyces* sp. JR1, 인삼 등에 대한 연구결과 (18, 19)보다 석창포 추출물이 좋은 활성을 나타내었다.

본 실험 결과를 요약하면, 석창포 추출물은 인지기능 개선, 높은 항산화 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 석창포 추출물을 통한 인지기능 개선, 예방 또는 치료에 대한 연구, 여러 천연물 추출물을 이용한 인지기능 개선에 대한 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

## Acknowledgments

본 연구는 산업자원부에서 지원하는 제주대학교 기능성 식품사업단의 지원으로 이루어진 것입니다.

## 참 고 문 헌

1. Fahlander K, Wahlin A, Almkvist O, Backman L. Cognitive Functioning in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: Further Evidence for Similar Patterns of Deficits. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002;24(6):734-744.
2. Herrmann N. cognitive pharmacotherapy of Alzheimer's disease and other dementias. *Can J Psychiatry* 2002;47(8):715-22.
3. Yuspeh R, Vanderploeg R, Crowell T, Mullan M. Defferences in executive functioning between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002;24(6):745-54.
4. Jellinger KA, bancher C. Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update. *J Neural Transm Suppl* 1998;54:77-95.
5. Langlais PJ, Thal L, Hansen L, Galasko D, Alford M, Masliah E. Neurotransmitters in basal ganglia and cortex of Alzheimer's disease with and without Lewy bodis. *Neurology* 1993;43(10): 1927-34.
6. Lehericy S, Hirsch EX, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Pitte F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 1993;330(1): 15-31.

7. Gonzalo-Ruiz A. Changes in neurotransmission systems after the injection of bet-amyloid protein beta (12-28) in the hypothalamus and anterior thalamus of the rat. *Rev Neurol.* 1999;28(10): 931-41.
8. Pappolla MA, Omar RA, Sambamurti K, Anderson JP, Robakis NK. The genesis of the senile plaque. further evidence in support of its neuronal origin. *Am Pathol* 1992;141(5):1151-9.
9. Kennedy AM, Newman S, McCaddon A, Ball J, Roques P, Mullan M, Hardy J, Chartier-Harlin M-C, Frackwiak RSJ, Warrington EK, Rossor MN. Familial Alzheimer's disease: a pedigree with a missense mutation in amyloid precursor protein gene. *Brain* 1993;166:309-24.
10. Suimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H, Shirasawa T. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 2000;381(2):225-34.
11. Sjogren M, Davidsson P, Gottfries J, Vanserstichele H, Edman A, Vanmechelen E, Wallin A, Blennow K. The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12(4):257-64.
12. Koo BS, Park KS, Ha JH, Park JH, Lim JC, Lee DU. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biol. Pharm. Bull* 2003; 26(7):978-982.
13. Lee BB, Choi YK, Kim HC, Kim SY, Hahm DH, Lee HJ, Shim IS Protective effects of methanol extract of *Acori graminei* rhizoma and *uncariae ramulus et uncus* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairment in the rat. *Life Sciences* 2003;74:435-450.
14. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;52(6):1158-65.
15. Sigurdsson EM, Lee JM, Dong XW, Hejna MJ, Lorens SA. Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects. *Neurobiol aging* 1997; 18(6):591-608.
16. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Nat'l Acad Sci. USA.* 2002; 99(9):6364-9.
17. Ramirez MJ, Heslop KE, Francis PT, Rattray M. Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Res* 2001;907(1-2): 222-32.
18. Lee ES. Characterization of pigmentation and bioactivities of streptomyces sp. JR1. 제주대학교 석사학위논문 2005.
19. Kang KA. Induction of apoptosis by ginseng saponin metabolite compound K and its action mechanism in U937 human monocytic leukemia cells. 제주대학교 석사학위논문 2004.