

## 스코폴라민으로 유도한 인지능력 장애 동물모델에서 구절초 열수 추출물의 개선 효과

박민수<sup>1,#</sup> · 정세진<sup>1,#</sup> · 한주은<sup>2</sup> · 배호정<sup>3,\*</sup> · 류종훈<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 한약학과, <sup>2</sup>경희대학교 약학대학 융합생명의약학과,

<sup>3</sup>국립창원대학교 글로벌첨단기술대학 청단바이오헬스

## The Effects of *Chrysanthemum zawadskii* on Scopolamine-induced Cognitive Impairment in Mice

Minsu Park<sup>1,#</sup>, Sejin Jung<sup>1,#</sup>, Ju Eun Han<sup>2</sup>, Ho Jung Bae<sup>3,\*</sup>, and Jong Hoon Ryu<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

<sup>2</sup>Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

<sup>3</sup>School of Advanced Bioengineering, Golcal Advanced Institute of Science and Technology, Chanwon National University, Changwon, Gyeongnam 51140, Korea

**Abstract** – *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura, a traditional medicinal herb abundant in caffeoylquinic and flavone glycosides with reported anti-inflammatory and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities, was investigated for its cognition-enhancing potential. We investigated whether a hot-water extract of *C. zawadskii* mitigates scopolamine-induced cognitive deficits in mice. The administration of scopolamine markedly reduced spontaneous alternation in the Y-maze test, the discrimination ratio in novel object recognition test, and step-through latency in passive avoidance test. Oral administration of the extract (300 mg/kg) significantly reversed all three behavioral impairments. Western blotting revealed that scopolamine suppressed phosphorylation of ERK and CREB in hippocampal tissues, whereas *C. zawadskii* hot water extract (300 mg/kg) significantly reinstated their levels. In addition, *C. zawadskii* hot water extract at 300 mg/kg also inhibited AChE activity to an extent comparable with donepezil. Collectively, these findings demonstrate that *C. zawadskii* hot water extract ameliorates scopolamine-induced deficits in working, recognition, and long-term memory via modulation of the cholinergic system and the ERK-CREB signaling pathway. Thus, *C. zawadskii* may represent a promising natural therapeutic agent for the prevention or management of dementia.

**Keywords** – *Chrysanthemum zawadskii* herba, Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, Extracellular signal-regulated kinases, cAMP response element binding protein

치매(dementia)는 의학적으로 뇌기능이 손상되면서 인지 기능 저하를 포함하여 정서 장애 및 운동능력 상실이 나타나는 대표적인 퇴행성 뇌 질환이다.<sup>1,2)</sup> 전체 인구의 수명증가 및 고령화로 치매 환자의 수는 매년 증가하고 있으며, 보건복지부 통계 자료에 따르면 대한민국에는 현재 100만명 정도의 치매환자가 있는 것으로 파악된다.<sup>3)</sup> 치매환자의 증가로 인하여 환자관리를 위해 사용되는 사회적 비용도 날로 증가하고 있으며, 2050년에는 대한민국 GDP의 약 3.8% 정도가 사

용될 것으로 예상되어 치매환자 관리를 위한 대책마련이 시급히 요구된다.<sup>4)</sup>

현재 치매환자에게 처방되는 약물은 donepezil, galatamine, rivastigmine 등의 콜린에스터라제 억제제(cholinesterase Inhibitor, ChEI)이다. 이러한 콜린에스터라제 억제제는 치매 환자 뇌에서 아세틸콜린을 분해하는 콜린 에스터라제(choline esterase)라는 효소를 억제하여 아세틸콜린 분해를 방지하는 역할을 통해 신경세포가 뇌에서 정상적으로 유지되도록 해주어 인지기능 개선에 도움을 준다.<sup>5,6)</sup> 그러나 이러한 약물들은 오심, 구토, 식욕감퇴, 복통 등 소화기계 부작용과 심장미주 신경 작용 증가 등의 이상반응이 나타날 수 있어,<sup>7)</sup> 새로운

<sup>#</sup>These authors equally contributed to this work.

\*교신저자(E-mail): baehj321@changwon.ac.kr, jhryu63@khu.ac.kr  
(Tel): +82-55-213-3557, +82-2-961-9230

치료 후보 물질의 개발이 필요하다.

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura)는 국화과(Compositae)에 속하는 관속식물로 대한민국, 중국, 일본 등의 고원이나 들판에 자생하는 여러해살이 풀로 생약명은 선모초(仙母草) 또는 구절초(九折草)라 불린다.<sup>8)</sup> 구절초는 대한민국약전의한약(생약)규격집에 수재되어 있으며, 전통적으로 건위(健胃), 보익(補益), 정혈(淨血), 조경(調經), 보온(保溫) 등의 효능을 가져 진정작용과 항염증 작용이 있으며, 신경통(神經痛), 중풍(中風), 부인병(婦人病)에 광범위하게 사용되어온 약재이다.<sup>9,10)</sup> 구절초의 주성분은 linarin, chlorogenic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 및 caffeoylquinic acid 등이 알려져 있다.<sup>11,12)</sup> 이 중 caffeoylquinic acid는 항염증, 항산화 효과를 가지고 있으며, AChE 활성을 억제하는 작용이 보고되었다.<sup>12-14)</sup> 이러한 연구결과는 구절초가 뇌내 AChE 활성을 억제하고, 항염증 작용을 통해 신경세포 사멸을 막아 인지기능 개선에 효과가 있을 것을 뒷받침한다. 하지만 현재까지 구절초가 AChE 활성 및 인지기능에 어떠한 영향을 미치는지 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 scopolamine으로 유도한 인지기능이 저하된 모델을 이용하여 신규 물체 인식검사(novel object recognition test, NOR) 시험, Y자 미로 시험(Y-maze test), 수동회피시험(passive avoidance test, PAT)와 같은 행동약리학적 평가법을 통해 구절초 열수추출물이 인지기능 저하에 미치는 효과를 탐색하였다. 또한, Western blotting과 AChE 활성 억제능 평가를 통해 구절초 열수 추출물의 인지기능 개선효과와 관련된 작용기전을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** – 수컷 ICR 마우스(5주령)를 주식회사 오리엔트(경기도, 대한민국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 경희대학교 약학대학 동물실에서 1주일 간 적응시킨 후 사용하였으며, 동물실의 온도(23±3°C), 습도(60±10%) 및 명암 주기(12 시간)는 일정하게 유지하였다. 실험동물은 적응 및 실험 기간 동안 자유롭게 물과 사료를 공급받았으며, 동물 처치 및 유지 관리는 경희대학교 동물관리 및 사용지침에 따라 수행되었다. 동물을 이용한 모든 실험은 경희대학교 동물 실험윤리위원회의 승인(승인번호; KHUASP(SE)-18-025)을 받아 수행하였다.

**시험물질** – 실험에 사용된 scopolamine과 donepezil은 Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA)의 제품을 구매하여 사용하였다. Rabbit 단일 클론 anti-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), anti-ERK, anti-phosphorylated cAMP response element binding protein (p-CREB), anti-CREB 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하

였다. Rabbit anti-IgG는 Gene Tex Inc (San Antonio, Texas, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence reagent (ECL)시약은 GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, USA)의 제품을 사용하였고, pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 다른 모든 시료는 시중에서 구할 수 있는 최상 등급의 제품을 사용하였다.

**구절초 열수추출물의 제조** – 대영제약(경기도, 대한민국)에서 판매하는 구절초의 전초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura)를 구입하여 추출물 제조하였다. 증거표본(2025-CHSP-015)은 경희대학교 약학대학 천연물의약실에서 보관 중이다. 건조된 구절초 50.0 g에 증류수 500 ml을 가하여 2시간동안 100°C에서 환류 추출 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 구절초 열수 추출물 20.6 g을 확보하였다. 실험 동안에는 감압 농축하여 얻은 구절초 열수 추출물을 생리식염수(0.9% NaCl)에 현탁하였으며, 약물 투여 용량은 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg으로 증량하여 사용하였다.

**약물투여** – 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액으로 녹인 scopolamine (1 mg/kg)을 복강 투여하였다. 구절초 열수추출물의 투여용량은 임상 사용 용량을 기준으로 설정하였으며, 각각 투약은 10 mg/kg, 30 mg/kg 및 100 mg/kg의 용량으로 0.9% saline 수용액에 현탁하여 실험 1시간 전에 경구투여 하였다. 양성 대조군에는 0.9% saline으로 녹인 donepezil (5 mg/kg)을 실험 1시간 전에 경구 투여하였다.

**Y-미로 시험(Y-maze test)** – 마우스는 실험 전 무작위로 나눈 후 적응기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 마우스는 군별로 10 마리를 이용하였다. Y-미로는 Y자 모양처럼 세 갈래로 나뉘는 polyvinyl plastic으로 만들어진 미로이다. 미로의 각 세 가지는 길이 40 cm, 폭 3 cm, 높이 12 cm이며, 서로 120°의 각도로 위치해 있다. 각 길은 A, B, C로 정한 뒤 마우스를 A 가지의 끝 쪽 벽면을 보게끔 위치시키고 8분간 마우스가 자유롭게 탐색하며 들어가는 가지를 기록하였다. 3개의 다른 가지에 차례대로 들어가면 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하여 다음 공식으로 그 변경 행동력을 계산하였다. 변경행동력이 높은 경우 단기 기억이 높음을 의미한다.

변경행동력(%) = 실제변경(actual alternation)/최대변경(총 입장 횟수 - 2; maximum alternation) × 100

**신규 물체 인지 시험(novel object recognition test)** – 신규 물체 인지 시험을 진행하기 위해 검정 polyvinyl plastic으로 제작된 박스(30×30×30 cm)를 사용하였다. 실험에 사용한 마우스는 군별로 10 마리를 이용하였다. 실험동물은 박스에 적응할 수 있도록 2일 동안 마우스를 10분간 자유롭게

탐색할 수 있게 하였다. 실험 2일차에는, 마우스를 박스에 배치하기 1시간 전에 구질초 열수 추출물(30, 100, 300 mg/kg)과 donepezil (10 mg/kg)을 0.9% saline으로 녹여 경구투여 하였으며, 대조군을 제외한 모든 실험군에 각각 실험 시작 30분 전에 0.9% saline 수용액에 녹인 scopolamine (10 mg/kg)을 복강 투여한 뒤 박스 정 중앙에 위치시켰다. 탐색 단계에서는 박스의 양 대각선 꼭짓점으로부터 같은 거리(5 cm)에 동일한 물체 두 개를 제공하여 5분 동안 자유롭게 물체를 탐색하게 하였다. 24시간 후 두 개의 물체 중 하나만 새로운 형태의 물체로 대체한 뒤, 동일한 조건에서 다시 마우스로 하여금 5분 동안 자유롭게 물체를 탐색할 수 있게 하였다. 이 과정에서 마우스가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)에 대한 접촉, 냄새 맡기, 핥기 등의 탐색 행동을 보이는 시간을 측정하였다. 이러한 행동 데이터를 바탕으로 물체 선호도(object preference ratio)와 물체 분별 척도(discrimination index)를 다음 공식을 이용하여 계산하였다. 분별척도가 높을수록 새로운 물체에 대한 인식이 높음을 의미한다.

물체선호도(Object preference ratio)(%) = 새로운 물체 또는 기존에 있던 물체를 탐험한 시간/(새로운 물체를 탐험한 시간+기존에 있던 물체를 탐험한 시간)×100

물체 분별 척도(Discrimination ratio) = (새로운 물체를 탐험한 시간-기존물체를 탐험한 시간)/(새로운 물체를 탐험한 시간+기존에 있던 물체를 탐험한 시간)

**수동 회피 시험(Passive avoidance test)** – 실험에 사용된 마우스는 무작위로 그룹을 나눈 뒤, 적응기간을 거친 후 실험에 투입되었다. 실험에 사용한 마우스는 군별로 10 마리를 이용하였다. 실험은 두 개의 20×20×20 cm 크기의 박스로 구성된 수동 회피 테스트를 통해 진행되었으며, 각각 흰색과 검정색의 polyvinyl plastic으로 만들어졌다. 박스의 바닥은 2 mm 간격의 grid로 되어 있어 전류가 흐를 수 있도록 설계되었다. 먼저 흰색 박스에 50 W 전구를 설치하여 밝은 환경을 만든 후, 마우스를 그곳에 놓고 10초간 탐색할 시간을 준다. 이후 길로틴 문(5×5 cm)을 열어 마우스가 어두운 구획으로 이동할 수 있게 했다. 만약 마우스가 문이 열린 후 60초 이내에 어두운 구획으로 들어가지 않으면, 실험자는 마우스를 유도하여 어두운 구획으로 들어가게 하고, 이때의 시간은 60초로 기록된다. 마우스가 어두운 구획에 들어가면 길로틴 문을 닫고 0.5 mA의 전기자극을 3초간 주고, 이후 마우스를 케이지로 이동시킨다.

전기자극을 준 뒤 24시간이 지난 후, 마우스를 다시 밝은 박스에 놓고 10초간 탐색시간을 준 뒤 길로틴 문을 열어 마우스가 어두운 구획으로 이동하는 데 걸리는 시간(latency time)을 측정한다. 이 측정은 최대 300초까지 진행된다.

**Western blot analysis** – 구질초 열수 추출물(300 mg/kg)과

donepezil (5 mg/kg)을 경구투여하고 30분 후, scopolamine (1 mg/kg)을 복강투여하고 그 다음 30분 후에 마우스를 치사하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌로부터 해마를 분리한 뒤, 각 무게의 10배에 해당하는 냉각시킨 용액[1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM EDTA, 0.32 M sucrose, protease inhibitor (50 mL용액 당 1정)]을 첨가한 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)용액에 넣어 균질화하였다. 균질액은 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 새로운 tube에 상층액을 옮긴 후 단백질을 정량하여 사용하였다. 단백질(30 µg)을 SDS-polyacrylamide gel (10%)에 reducing condition에서 전기 영동을 실시하였다. 단백질을 PSDF membrane에 transfer buffer [192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl (pH 7.4)]를 이용하여 300 mA로 2시간 동안 이전시켰다. 이전 후 membrane을 상온에서 2시간 동안 blocking solution (5% skim milk)으로 blocking을 실시한 다음, 각 권고되는 비율로 희석한 1차 항체를 가하여 4°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 membrane을 Tris-buffered saline/Tween 20으로 5회 세척 후 1:3000으로 희석시킨 2차 항체로 2시간 동안 incubation하였다. 이후 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발광시켜 LAS-4000 mini bio-imaging program (Fujifilm Lifescience, Stamford, CT, USA)을 이용하여 분석한 뒤 membrane을 20% glycine 용액으로 상온에서 20분 동안 stripping하였다.

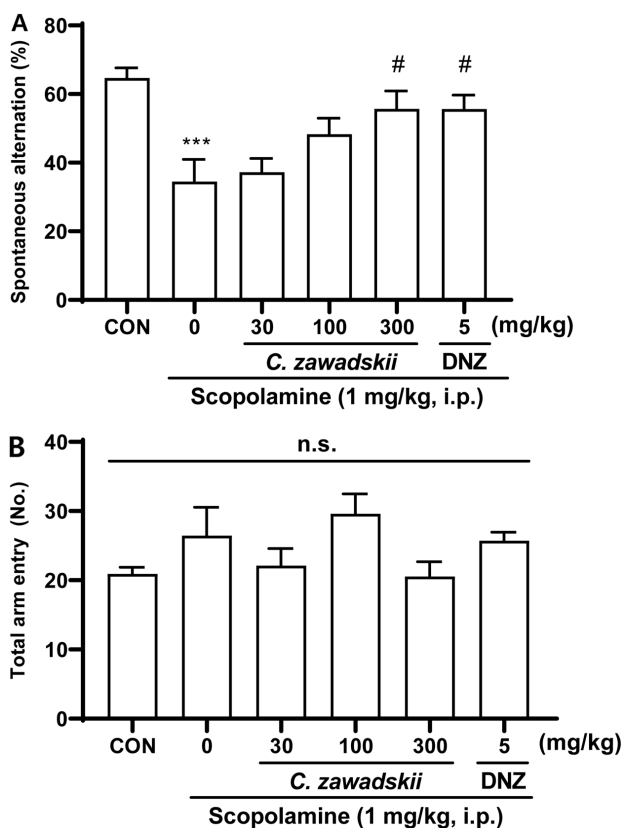
**Acetylcholinesterase 억제능 측정 (AChE inhibition assay, ex-vivo)** – Ellman이 제시된 방법을 응용하여 acetylthiocholine (ATCh)이 acetylcholinesterase (AChE)에 의해 thiocholine으로 분해되고, 분해된 thiocholine은 DTNB를 TNB로 전환시켜 노란색으로 발색되는 원리를 이용하여 실험을 진행하였다.<sup>15)</sup> 적출된 뇌 조직의 절반을 분리하여 차가운 50 mM phosphate buffer (pH 8.0)를 넣고 균질화하여 10,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 AChE 효소원으로 사용하고 단백질을 정량한다. 96 well plate를 이용, 50 mM phosphate buffer (pH 8.0), DTNB와 뇌에서 추출한 효소원을 넣은 후 acetylthiocholine iodide 넣고 10분간 반응시킨 후 neostigmine을 넣어 반응을 정지시키고 412 nm에서 흡광도를 측정하여 AChE의 활성 정도를 파악한다. 정상대조군의 AChE 활성 정도를 100%로 하여 투여군의 AChE 활성 정도를 다음과 같이 계산하였다.

AChE 활성도(%) = (반응 흡광도-blank 흡광도)/정상대조군 AChE 활성도 평균) × 100

**통계처리** – 실험 결과는 mean ± S.E.M.으로 나타내었다. 모든 실험결과는 일원분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 통계 처리하였고, 유의적인 차이가 있을 경우 Student-Newman-Keuls 방법을 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 군간 유의성 검정을 실시하였다. 군간 유의적인 차이는  $p < 0.05$ 를 기준으로 결정하였다.

### 결과 및 고찰

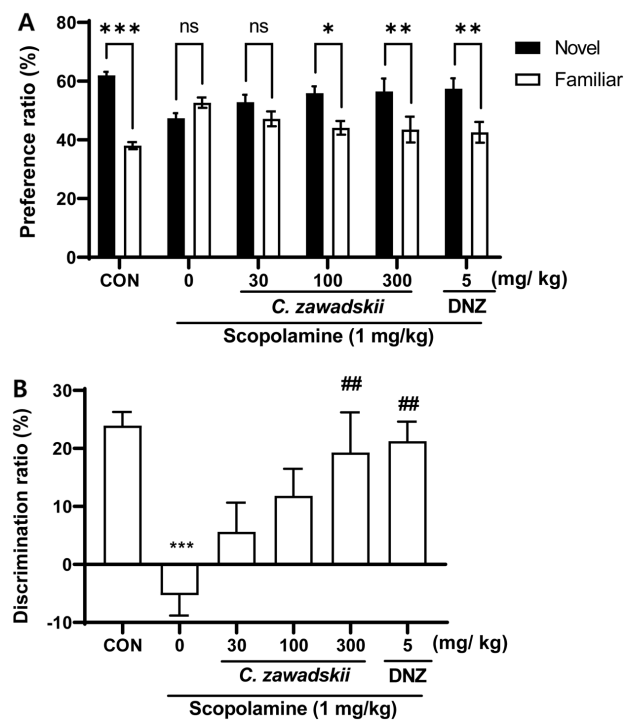
**Y자 미로 시험(Y-maze)에서 구절초 열수 추출물의 인지 기능 개선효과** – Y자 미로 시험은 실험동물의 작업기억능력 (working memory) 및 단기기억(short-term memory)를 측정하기 위해 고안된 실험법으로 scopolamine 투여로 유도된 기억력 감퇴 동물모델에서 구절초 열수추출물 투여에 의한 작업기억 및 단기기억 개선효과를 확인하기 위해 실시하였다. 일원분산분석(one-way ANOVA) 결과 각 투여군에서 유의적인 차이를 확인하였다( $F_{5, 52}=6.397, p<0.0001$ , Fig. 1A). Scopolamine 투여군에서는 정상대조군 대비 유의적인 변경 행동력(spontaneous alternation, %) 감소를 확인하여( $p<0.001$ ), scopolamine에 의한 기억력 감퇴가 유도되었음을 확인하였다. Scopolamine 투여에 의해 감소된 변경 행동력은 구절초 열수 추출물 300 mg/kg 투여에 의해 양성 대조군인 donepezil 수준으로 회복되는 것을 확인하였다( $p<0.05$ ). 이러한 결과는



**Fig. 1.** The ameliorating effect of *C. zawadskii* hot water extract on Y-maze task in scopolamine-induced cognitive impairment in mice. (A) The percentage of spontaneous alternation and (B) the total arm entries in Y-maze test were presented. The results were expressed as mean means  $\pm$  S.E.M ( $n = 8-10$ /group). (\*\*\*) $P < 0.001$ , compared to the control group; (#) $P < 0.05$ , compared to the scopolamine-treated group). CON, Control group. DNZ, donepezil.

구절초 열수 추출물이 scopolamine 투여로 유도된 단기기억 (작업기억)의 손상을 회복시킴을 시사한다. 더불어, Y-미로의 각 가지에 마우스가 들어간 총 횟수(total entry)를 비교하였을 때, 구절초 열수 추출물 투여에 의한 영향이 없는 것을 확인하여(Fig. 1B), 구절초 열수 추출물의 기억력 개선 효과는 행동력 변화와는 관계가 없는 것으로 생각된다.

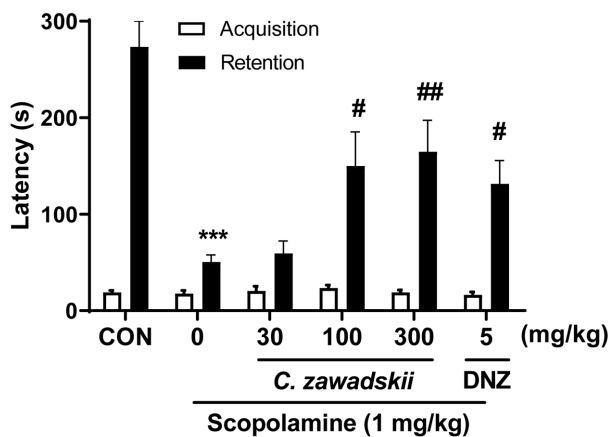
**신규 물체 인지시험에서 구절초 열수 추출물의 효과** – 신규 물체 인지시험은 실험 동물이 신규 물체와 기존 물체를 탐색하는 시간을 비교 분석함으로써 새로운 물체를 인지하고 구별할 수 있는 인지기능을 평가하기 위한 실험으로, scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 동물모델에서 구절초 열수 추출물의 투여에 의한 실험동물의 장기기억 및 인지 기억의 개선효과를 확인하기 위해 실시하였다. 일원분산분석결과 사물 선호도(object preference ratio, Fig. 2A)와 분별척도(discrimination index, Fig. 2B)에서 각 투여군의 유의적 차이를 확인하였다( $F_{5, 54}=5.480, p<0.0001$ , Fig. 2A;  $F_{5, 108}=10.96, p<0.0001$ , Fig. 2B). Scopolamine 투여군은 정상군에 비해 사물 분별척도가 유의적으로 감소하였으며( $p<0.05$ ), 새로운



**Fig. 2.** The ameliorating effect of *C. zawadskii* hot water extract in the novel object recognition test on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. (A) The percentage of exploration time between familiar and novel object and (B) the discrimination ratio in the novel object test were presented. The results were expressed as mean means  $\pm$  S.E.M ( $n = 8-10$ /group). (\*\*\*) $P < 0.001$ , compared to the control group; (#) $P < 0.05$ , compared to the scopolamine-treated group). CON, Control group. DNZ, donepezil.

물체와 기존 물체를 탐색하는 시간에 유의적 차이가 없는 것을 통해 인지기역의 손상이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 반면, donepezil을 투여한 군에서는 scopolamine으로 유도된 인지기역 손상이 유의적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(discrimination index,  $p < 0.05$ ; object preference ratio,  $p < 0.001$ ). 이러한 인지기역의 회복은 구절초 열수 추출물 300 mg/kg (discrimination index,  $p < 0.05$ )에서도 유의적으로 나타났으며, 이를 통해 구절초 열수추출물이 효과적으로 scopolamine으로 유도된 인지기역 손상을 회복시킴을 확인할 수 있었다. 신규 물체에 대한 인식 기능의 감퇴는 치매 환자의 초기에 관찰되는 사항이어서, 구절초 열수추출물이 치매 환자에게도 유효할 수 있음을 의미한다.

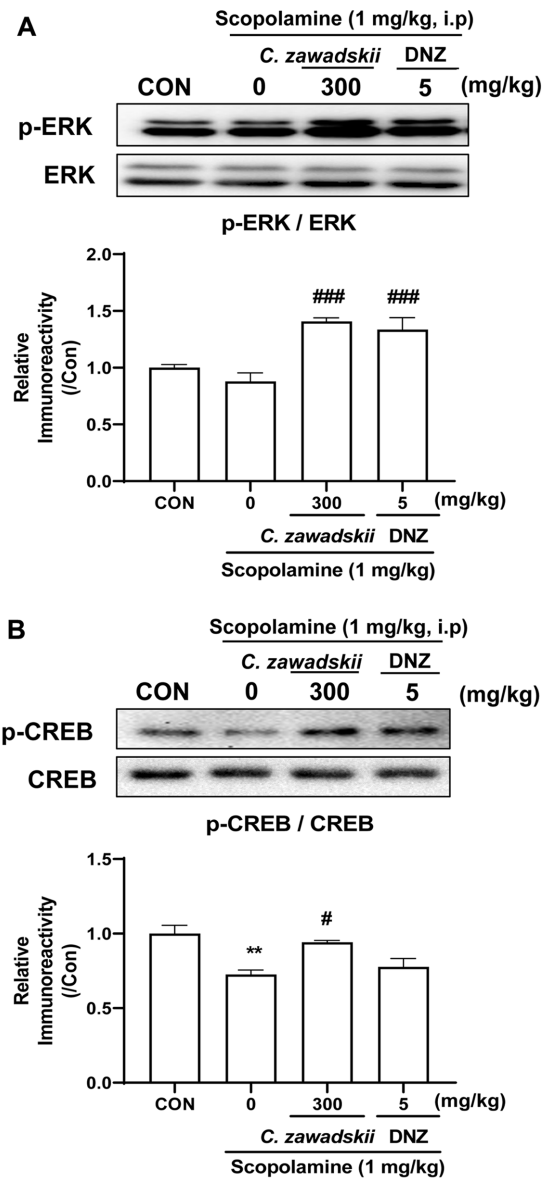
**수동 회피 시험을 이용한 구절초 열수 추출물의 인지기능 개선효과** - 수동회피 실험은 실험동물의 장기기억 학습 및 도출을 평가하기 위한 실험으로, scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 동물모델에서 구절초 열수 추출물을 투여하여 그 효과를 평가하기 위해 실시하였다. 일원분산분석 결과 각 투여군에서 유의적인 차이를 확인하였다( $F_{5,52} = 15.61$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 3). Scopolamine의 투여에 의한 기억력 저하는 대조군 대비 머무름 시간(latency time)의 유의적 감소를 통해 확인할 수 있었으며( $p < 0.01$ ), 양성대조군으로 사용한 donepezil 투여군의 머무름 시간이 scopolamine 투여군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 통해 scopolamine 유도 인지기능 저하 동물모델이 구축됨을 확인하였다( $p < 0.05$ ). 구절초 열수추출물을 30, 100 및 300 mg/kg의 용량으로 단회 투여한 군의 머무름 시간(latency time)을 측정하였을 때, 100 및 300 mg/kg 투여군의 머무름 시간이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수



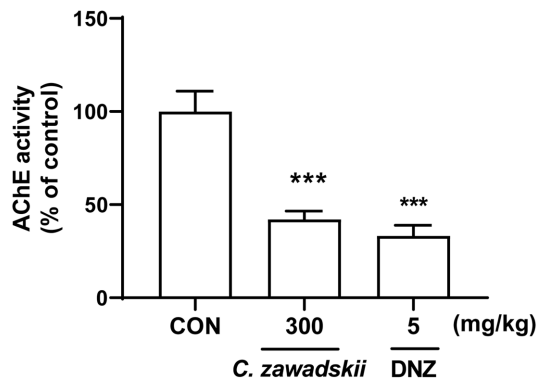
**Fig. 3.** The ameliorating effect of *C. zawadskii* hot water extract in the passive avoidance test. The latency time of acquisition and retention trial in passive avoidance test were presented. Each data was expressed as means  $\pm$  S.E.M (n = 8-10/group). (\*\*\*) $P < 0.001$ , compared to the control group; # $P < 0.05$  or ## $P < 0.01$ , compared to the scopolamine-treated group). CON, Control group. DNZ, donepezil.

있었다( $p < 0.05$ ). 이를 통해 구절초 열수 추출물이 donepezil과 유사한 정도의 수준으로 scopolamine으로 유도한 장기기억 형성 장애를 극복한다는 사실을 알 수 있었다.

**구절초 열수 추출물 투여 후 해마에서의 ERK-CREB 신호전달체계의 변화** - 구절초 열수추출물에 의한 기억력 개선의 원인을 규명하고자 Western blot을 진행하였다. Scopolamine



**Fig. 4.** The expression levels of phosphorylated (A) ERK (p-ERK) and (B) CREB (p-CREB) in hippocampal tissue were measured by western blot analysis. The representative immunoblots of p-ERK and p-CREB were presented. The immunoreactivity of (A) p-ERK/ERK and p-CREB/CREB were normalized to the control group (taken as 1.0). The results were expressed as means  $\pm$  S.E.M (n = 6/group). (\*\*) $P < 0.01$ , compared to the control group; # $P < 0.05$  or ### $P < 0.001$ , compared to the scopolamine-treated group). CON, Control group. DNZ, donepezil.



**Fig. 5.** The inhibitory effect of AChE activity in the administration *C. zawadskii* hot water extract in the mice brain. After the administration of *C. zawadskii* hot water extract, the mice were sacrificed and isolated whole brain tissues. The AChE activities were normalized with vehicle-treated control group. The results were expressed as means  $\pm$  S.E.M ( $n = 6/\text{group}$ ). (\*\*\*) $P < 0.001$ , compared to the control group). CON, Control group. DNZ, donepezil.

투여로 유도한 인지기능 저하동물에 구절초 열수 추출물 300 mg/kg을 투여한 해마를 적출한 후 기억을 형성하는 장기기억강화와 관련되었다고 알려져 있는 ERK-CREB의 인산화된 양을 측정하였다. 기존 보고들과 유사하게 해마에서의 ERK와 CREB의 인산화 수치는 scopolamine의 투여에 의해 감소되는 것을 확인하였으며, 구절초 열수 추출물 300 mg/kg 농도로 투여한 군에서의 인산화된 ERK ( $F_{3,20} = 14.46, p < 0.0001$ , Fig. 4A)와 CREB ( $F_{3,20} = 9.159, p < 0.001$ , Fig. 4B)의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 행동실험 결과로 확인한 구절초 열수 추출물의 단기 및 장기기억에 대한 개선 효과가 해마에서의 ERK-CREB 신호전달체계의 강화에 의한 결과라고 추측할 수 있다.

**구절초 열수 추출물 투여가 AChE 억제에 미치는 영향** – 구절초 열수 추출물의 기억력 개선효과의 작용기전 확인을 위하여 뇌내 AChE 활성 평가를 진행하였다. 일원분산분석 결과, 정상대조군 대비 AChE 억제제인 donepezil 투여군에서 유의적인 AChE 활성 저하가 나타남을 확인하였으며, 구절초 열수추출물 300 mg/kg 투여군에서도 donepezil과 유사 동등한 억제효과를 확인하였다( $F_{2,15} = 22.99, p < 0.0001$ , Fig. 5). 이는 구절초 열수추출물의 기억력 개선효과가 AChE 활성 억제와 관련이 있을 것을 시사하는 결과이다.

## 결론

본 연구는 구절초 열수 추출물의 기억력 개선효과를 콜린성 신경계 차단약물인 scopolamine으로 유도한 기억력 손상 마우스 모델에서 확인하고자 진행하였다. Y자 미로 시험, 신규

물체 탐색 시험과 수동회피실험을 수행함으로써 구절초 열수추출물의 기억력 개선 효과를 확인하였다. 더불어, Western blot을 통해 구절초 열수추출물의 기억력 개선효과 관련 작용기전을 탐색한 결과, 구절초 열수추출물 300 mg/kg 투여 동물의 해마에서 ERK-CREB 신호전달체계가 강화되는 것을 확인하였다. 알츠하이머병 환자에서 나타나는 ERK-CREB의 인산화가 감소하는 경향이 알려져 있으며,<sup>16,17)</sup> donepezil과 같은 AChEI 약물이 ERK-CREB 신호전달체계 강화를 유도하여 기억력을 증가시킨다는 보고와 상응하는 결과이다.<sup>18-20)</sup> 이러한 결과는 구절초 열수추출물이 해마의 ERK-CREB 신호전달체계를 강화하여 scopolamine으로 유도한 콜린성 신경계 활성 저하를 회복시켜 인지기능을 개선시킴을 시사한다.

한편, 구절초 열수 추출물의 인지기능 개선효과가 뇌내 아세틸콜린의 활성 변화와 관련된 것인지 확인하기위해 AChE 활성 억제능 평가를 *ex vivo*로 측정하였다. 그 결과, 구절초 열수 추출물 300 mg/kg에서 donepezil과 유사 동등한 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 구절초에 포함된 성분 중 caffeoylquinic과 flavone glycoside 종류가 AChE 활성을 나타낸다는 결과와 일치한다.<sup>13,21)</sup> 특히, 구절초에는 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid 및 caffeoylquinic acid가 건조중량 대비 약 1~3% 정도 함유되어 있는 것으로 보고되었으며,<sup>22)</sup> 이러한 페놀화합물은 열수 추출에서도 충분히 용출이 가능한 것으로 알려져 있다.<sup>23,24)</sup> 차후 연구를 통해 구절초 내 함유된 caffeoylquinic과 flavone glycoside들의 함량 분석이 진행된다면, 본 연구 결과를 뒷받침할 수 있을 것으로 생각한다.

위의 결과를 종합하였을때, 구절초 열수 추출물의 섭취가 콜린성 신경의 기능저하 내지 사멸 등에 의해 유발되는 인지 기능 저하를 비롯한 치매에 대한 예방 내지 치료 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 후속 연구를 통해 구절초의 유효 성분 및 작용기전이 보다 뚜렷하게 제시된다면 치매와 같은 인지 기능 장애를 가지는 질병에 관한 천연물 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사사

이 논문은 2025~2026년도 국립창원대학교 자율연구과제 연구비 지원으로 수행된 연구결과임.

## 인용문헌

- Dibello, V., Solfrizzi, V., Lozupone, M., Vertucci, V., Santarcangelo, F., Pace, C., Dibello, A., Daniele, A. and Panza, F. (2025) Targeting oral frailty indicators of late-life cognitive disorders and depression: A systematic review. *Age and Ageing* 54: afaf1822.

2. Burns, A. and Iliffe, S. (2009) Alzheimer's disease. *BMJ* **338**: b158.
3. Lee, K. H. and Kim, S. I. (2018) Case study for the elderly welfare center for the aging society. *Korea Convergence Society* **9**: 177-189.
4. Choi, H. J., Kim, S. H., Lee, J. H., Lee, A. Y., Park, G. U., Lee, E. A., Choi, S. H., Na, D. R. and Jung, J. H. (2018) National responsibility policy for dementia care: Current and future. *Korean Neurological Association* **36**: 152-158.
5. Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S. and Quirion, R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: Relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**: 209-245.
6. Preet, A. and Baldev, S. (2013) A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* **36**: 375-399.
7. Lazarević-Pašti, T. (2023) Side effects of Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* **30**: 2705-2709.
8. 이창복. (2003) 원색 대한식물도감(하) (pp. 377-378). 서울: 향문사.
9. Lee, J. H., Kim, E. H. and Lee, J. H. (2008) Effect of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* on the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J. Oriental Neuropsychiatry.* **19**: 209-222.
10. Kim, Y. S., Kim, S. G., Kwon, D. A., Kim, H. G. and Lee, H. S. (2019) Hepatoprotective effect of *Chrysanthemum zawadskii* extract in experimentally induced liver damage model in vitro and in vivo. *The Korean Journal of Food and Nutrition* **48**: 189-197.
11. Lee, H. J., Kim, Y. I., Mirmala, F. S., Jeong, H. Y., Seo, H. D., Ha, T. Y., Jung, C. H. and Ahn, J. Y. (2021) *Chrysanthemum zawadskii* Herbich attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the regulation of proteostasis and mitochondrial function. *Biomed. Pharmacother.* **136**: 111226.
12. Nirmala, F. S., Lee, H. J., Kim, Y. I., Hahm, J. H., Seo, H. D., Kim, M. J., Jung, C. H. and Ahn, J. H. (2024) Exercise-induced signaling activation by *Chrysanthemum zawadskii* and its active compound, linarin, ameliorates age-related sarcopenia through Sestrin 1 regulation. *Phytomedicine* **129**: 155695.
13. Mahnashi, M. H., Ayaz, M., Alqahtani, Y. S., Alyami, B. A., Shahid, M., Alqahtani, O., Kabrah, S. M., Zeb, A., Ullah, F. and Sadiq, A. (2023) Quantitative-HPLC-DAD polyphenols analysis, anxiolytic and cognition enhancing potentials of *Sorbaria tomentosa* Lindl. Rehder. *J. Ethnopharmacol.* **317**: 116786.
14. Liao, Y., Bae, H. J., Zhang, J., Kwon, Y. B., Koo, B. K., Jung, I. H., Kim, H. M., Park, J. H., Lew, J. H. and Ryu, J. H. (2019) The ameliorating effects of bee pollen on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **42**: 379-388.
15. Almeida, R. B. M., Luz, R. L. S. A., Leite, F. H. A. and Botura, M. B. (2022) A review on the in vitro evaluation of the anticholinesterase activity based on Ellman's method. *Mini Rev. Med. Chem.* **22**: 1803-1813.
16. Zhang, Z., Wu, H., Wang, S., Li, Y., Yang, P., Xu, L., Liu, Y. and Liu, M. (2024) PRG ameliorates cognitive impairment in Alzheimer's disease mice by regulating  $\beta$ -amyloid and targeting the ERK pathway. *Phytomedicine* **130**: 155671.
17. Ma, Q. L., Harris-White, M. E., Ubeda, O. J., Simmons, M., Beech, W., Lim, G. P., Teter, B., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2007) Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J. Neurochem.* **103**: 1597-1607.
18. Kim, M. S., Kim, B. Y., Kim, J. I., Lee, J. and Jeon, W. K. (2023) Mumefural improves recognition memory and alters ERK-CREB-BDNF signaling in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Nutrients* **15**: 3271.
19. Deepa, P., Bae, H. J., Park, H. B., Kim, S. Y., Choi, J. W., Kim, D. H., Liu, X. Q., Ryu, J. H. and Park, S. J. (2020) *Draacocephalum moldavica* attenuates scopolamine-induced cognitive impairment through activation of hippocampal ERK-CREB signaling in mice. *J. Ethnopharmacol.* **253**: 112651.
20. Tchekalarova, J., Ivanova, P., Krushovlieva, D., Kortenska, L. and Angelova, V. T. (2024) Protective effect of the novel melatonin analogue containing donepezil fragment on memory impairment via MT/ERK/CREB signaling in the hippocampus in a rat model of pinealectomy and subsequent A $\beta$ 1-42 infusion. *Int. J. Mol. Sci.* **25**: 1867.
21. Nugroho, A., Park, J. H., Choi, J. S., Park, K. S., Hong, J. P. and Park, H. J. (2019) Structure determination and quantification of a new flavone glycoside with anti-acetylcholinesterase activity from the herbs of *Elsholtzia ciliate*. *Nat. Prod. Res.* **33**: 814-821.
22. Kim, K. M., Lee, S. Y., Jo, A., Kang, B. M., Ham, S., Cho, J. and Lee, G. (2017) Quantitative analysis about phenolic compounds of *Dendranthema* species in Korean native plants. *Korean Journal of Pharmacognosy* **48**: 70-76.
23. Kang, H., Park, C.-H., Kwon, S.-O. and Lee, S.-G. (2021) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts at different ethanol ratios. *Korean Journal of Food Science and Technology* **55**: 416-422.
24. Ncube, E. N., Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A. and Madala, N. E. (2014) Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal* **8**: 66.

(2025. 7. 16 접수; 2025. 8. 18 심사; 2025. 9. 15 게재확정)