



# 기억력 손상 마우스에서 흑미 호분층 추출물의 인지능력 개선 효과

최지혜<sup>1</sup> · 이은별<sup>2</sup> · 장환희<sup>3</sup> · 박용순<sup>4</sup> · 이성현<sup>5\*</sup>

## Cognitive-enhancing Effects of Black Rice Aleurone Layer Extract on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice

Ji Hye Choi<sup>1</sup>, Eun Byeol Lee<sup>2</sup>, Hwan Hee Jang<sup>3</sup>, Youn Soon Park<sup>4</sup> and Sung Hyen Lee<sup>5</sup>

### ABSTRACT

**Received:** 2021 September 6  
**1st Revised:** 2021 September 27  
**2nd Revised:** 2021 October 20  
**3rd Revised:** 2021 October 25  
**Accepted:** 2021 October 25

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background:** The aim of this study was to investigate the potential of black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer (BR) extract at improving the memory function of scopolamine-induced memory impaired mice.

**Methods and Results:** BR extract (150 and 300 mg/kg), scopolamine (1 mg/kg), and tacrine (10 mg/kg) were administered to C57BL/6 mice. We analyzed the effects of BR extract on the scopolamine-induced cholinergic system, inflammatory response, and brain damage. It was observed that the BR extract offered protection against scopolamine-induced short- and long-term memory loss, and reduced learning deficits in the behavioral task. It also improved the cholinergic system and decreased the inflammatory cytokine levels. Furthermore, the BR extract downregulated the scopolamine-induced overexpression of amyloid  $\beta$ -peptide and caspase-3 in the hippocampus.

**Conclusions:** These results suggest that the BR extract may be beneficial as a dietary supplement, due to its neuroprotective effect against cognitive impairment and cholinergic deficit.

**Key Words:** *Oryza sativa* L., Aleurone Layer Extract, Cognitive-enhancing Effects, Memory Impairment

## 서 언

최근 급격한 경제 발전에 따른 생활수준의 개선 및 의학 발달로 평균 수명이 연장되었다. 노인 인구의 증가에 따라 노인성 질환의 발병률이 증가하였고 그 중 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease; AD)이 가장 높은 비율로 나타났다(Choe *et al.*, 2016; Muhammad *et al.*, 2019).

AD는 인지능력의 상실과 amyloid  $\beta$  plaque의 축적, 뇌 신경세포 사멸 및 염증반응 등의 병리학적인 특징을 갖는 퇴행성 신경 질환이다(Park *et al.*, 2019). 또한, 콜린성 작동 뉴런의 손실이나 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)과 콜린 아세틸트랜스페라제(choline acetyltransferase; ChAT) 감소 및 아세틸콜린 에스테라제(acetylcholinesterase; AChE) 증가와 관련이

있다(Ling *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2020).

AD 환자에게서 ACh 감소와 AChE 증가는 중요한 병리적 소견으로서 알려져 있으며, 현재까지의 AD 치료제는 AChE를 억제하는 기전을 갖는 약물을 사용하고 있다(Lee *et al.*, 2016; 2020a). 하지만 AChE 억제제를 장기간 투여 시 간독성이나 구역 및 구토가 나타날 수 있고(Watkins *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2018) 약물에 대한 짧은 반감기 등의 부작용이 보고되었다(Kwon *et al.*, 2010). 이에 최근 연구에서는 치매의 예방 및 치료를 위하여 효과적이지만 부작용이 없는 안전한 약물이나 식품 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

동물 실험에서 인지능 저하 유도에 사용되는 스코폴라민(scopolamine)은 무스카린성 ACh 수용체의 길항제로서

\*Corresponding author: (Phone) +82-63-238-3681 (E-mail) lshin@kroea.kr

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 연구원 / Researcher, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea.

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 전문연구원 / Researcher, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea.

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 농업연구사 / Researcher, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea.

<sup>4</sup>한양대학교 식품영양학과 교수 / Professor, Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04762, Korea.

<sup>5</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 농업연구원 / Researcher, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea.

(Hritcu *et al.*, 2012) 뇌에서 AChE의 활성을 증가시켜 ChAT 효소 활성을 억제하고, ACh를 분해함으로써 단기 기억력 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Choi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2021). 또한 스코폴라민은 AChE 활성을 유도할 뿐만 아니라 사이토카인과 같은 염증 매개 인자들의 발현을 증가시키게 된다 (Iqbal *et al.*, 2020). 스코폴라민의 기억력 억제제는 동물모델뿐만 아니라 인체 적용 임상시험에서도 인지능의 저하가 확인되어 (Bae *et al.*, 2014), 항치매 및 기억력 개선 효능 검증 등의 연구에서 주로 사용되고 있다.

흑미 (*Oryza sativa* L.)는 대표적인 유색미로서 특색 있는 향미와 더불어 각종 무기질, 비타민 및 식이섬유를 풍부하게 함유하고 있으며, 감마 오리자놀, 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 등 다양한 기능성 성분을 함유하고 있어 흑미의 다양한 생리활성이 보고되었다 (Kong *et al.*, 2008; RDA, 2011). 흑미는 다른 유색미나 특수미에 비하여 항산화력, 환원력 등이 우수하였으며 (Seo *et al.*, 2008), 고지방식이 섭취로 인한 비만 마우스에서 지방산의 산화를 조절하여 간 조직의 지질 축적을 효과적으로 억제하는 효능이 밝혀진 바 있다 (Jang *et al.*, 2012).

안토시아닌을 풍부하게 함유한 흑미의 호분층에는 cyanidin 3-*O*-glucoside (C3G) 및 penidin 3-*O*-glucoside (P3G)가 함유되어 있음이 보고된 바 있고 (Apridamayanti *et al.*, 2017), C3G는 신경염증을 완화하며 뇌에서 산화스트레스를 줄여 신경세포 독성에 대한 완화 작용으로 허혈성 뇌 질환, 알츠하이머 치매 및 파킨슨병 치매 등의 질환에서의 효과가 있다고 보고되었다 (Min *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019). 특히, C3G는 인지기능 장애가 유발된 성인에게서 기억력을 개선하는데 도움이 된다고 하였다 (Joo *et al.*, 2019).

최근까지 안토시아닌의 인지능력 개선에 관한 연구가 진행되어왔으나, 기억력 손상을 유도한 마우스 모델에서 안토시아닌을 주성분으로 함유하는 흑미 호분층 추출물이 행동 유형에 미치는 영향 및 관련 인지능력 개선에 관한 연구는 보고된 바 없다.

흑미 호분층 추출물의 기억력 개선에 대한 효과를 알아보기 위하여 스코폴라민으로 기억력이 억제된 마우스에게 흑미 호분층 추출물의 행동 유형 검사를 진행하였다. 마우스 혈청에서 ACh 함량 및 AChE 활성과 사이토카인 함량을 확인하였으며 뇌 조직을 통한 amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ), caspase-3 (Cas-3) 및 ChAT의 발현을 확인하였다. 모든 실험군은 AChE 저해제인 tacrine을 섭취한 실험군과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 연구에 사용된 흑미 (*Oryza sativa* L.)는 조생흑찰 품종

으로 현미 상태로서 진도정미소에서 구입하였으며, 도정기 (Samwoo Co., Ltd., Daegu, Korea)로 흑미 현미를 10 도미까지 절삭하고 흑미 호분세포층 (8%)을 분리하였다.

분리된 흑미 호분층에 10 배의 50% 발효 주정을 추가하여 40°C에서 48 시간 동안 추출하고 감압농축기 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축 후, 동결건조 (IlshinBio-Base, Dongducheon, Korea)하여 분말 형태로써 본 실험에 사용하였다. 증거 표본 (RDABRA01)은 국립농업과학원 농식품자원부에 보관하였다.

### 2. 실험동물

본 시험에는 specific-pathogen free (SPF) 상태의 12 주령 수컷 C57BL/6 마우스 30 마리를 (주)샘타코 BIO KOREA (Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 사육 기간 중 일반 고형사료와 물을 자유 섭취하였으며, 온도 23 ± 1°C, 습도 50 ± 10%, 12 시간 단위의 명암주기 (light-dark cycle) 환경에서 사육되었다. 매일 실험동물의 상태를 모니터링하고 식이에 따른 체중 변화량을 확인하기 위하여 체중을 주 1 회 측정하였다.

본 연구의 동물실험에 관한 모든 내용은 농촌진흥청 국립농업과학원 동물실험윤리위원회 승인 (NAS201906) 절차와 윤리규정에 따랐다.

### 3. 인지능 저하 마우스 모델 및 시료 투여

실험동물은 스코폴라민 (scopolamine, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 인지능 저하를 유도한 후 사용하였다.

일주일 동안 실험환경에 적응된 마우스는 체중을 측정한 후 난괴법 (randomized complete block design)에 따라 정상군 (control), 스코폴라민 처리군 (negative control; NC), 스코폴라민 처리 후 약물 섭취군 (positive control; PC) 및 스코폴라민 처리 후 흑미 호분층 추출물을 150, 300 mg/kg BW (body weight) 농도로 섭취한 투여군 (BR150, BR300)으로 나누어 실험을 진행하였다 (n = 6).

인지능력 저하를 유도하기 위하여 스코폴라민은 1 mg/kg BW 농도로 행동 유형 실험 30 분 전에 복강 투여하였으며, 스코폴라민 처리를 하지 않은 control군은 동량의 생리식염수를 복강 투여하였다. 약물섭취군으로 사용한 tacrine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)은 10 mg/kg BW 농도로 급여하였으며, 시험물질은 총 8 주간 실험동물에게 투여되었다.

### 4. Y-미로 실험 (Y-maze test)

사용된 미로는 세 개의 가지로 구성되어 있는 하얀색의 플라스틱 소재로서 각 가지의 길이는 50 cm, 높이는 20 cm, 그리고 넓이는 10 cm이며, 세 가지가 접히는 각도는 120°로 구

성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후, 시작 부분에 마우스를 두고 60 초 동안 마우스가 미로를 자유롭게 돌아다니도록 하였으며, 각 미로에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 변경 행동력을 평가하였다.

세 주로의 다른 영역에 순차적으로 들어간 경우 1 점을 부여하였고, 연속되게 들어가지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 시험 수행자는 학습 및 기억 능력 평가 기준에 있어서 기본 조건을 수립하고 시험방법의 합리성, 정확성 및 재현성을 고려하여 검증하였다.

### 5. 수중 미로 실험 (Water maze test)

시험에 사용된 수조는 직사각형 모양의 420 mm × 290 mm × 200 mm 크기이며, 시험에 사용된 물의 온도는 22 ± 2°C로 유지되었다. 수영 시작 점으로부터 420 mm 지점에 50 mm × 50 mm × 50 mm 크기의 도피대 (escape platform)를 설치하고, 도피대 수면 아래 10 mm까지 물을 채워 넣었다. 실험 첫날은 실험동물이 60 초 동안 자유로이 수조 안에서 수영하도록 하였고, 그 후 실험동물이 수조 속 반대 구간에서 출발해서 60 초 안에 도피대를 인지하여 도달하는 시간 (second)을 측정하였다.

### 6. 수동회피 실험 (Passive aviodance test)

수동회피 실험은 어두운 곳을 선호하는 마우스의 특성을 이용한 것으로, 기억 능력 증진 및 명시적 기억력을 평가하기 위한 일반적인 방법 중 하나이다 (Kang *et al.*, 2013).

수동회피 실험은 암소 공간과 밝은 공간으로 이루어진 두 개의 아크릴 상자 사이에 마우스가 이동할 수 있는 길로틴 문이 설치되어 있고, 아크릴 상자 바닥에는 스테인리스 막대가 깔려있어 시험자의 조건에 따라 전기충격을 가할 수 있는 장치가 연결된 장비를 이용하여 실시하였다.

실험 시작 전, 암소 공간에 10 초 동안 적응하게 한 후, 밝은 공간에 조명을 통해 불빛을 비추고 길로틴 문이 열리면서 혐오자극 (전기충격, 0.3 mA)을 가해 마우스가 반대편 상자로 이동하는 시간을 측정하였다. 또한 밝은 공간으로 이동한 마우스가 암소 공간의 전기 기억을 기억한 후 어두움에 대한 본성을 억제하여 밝은 공간에 머무는 것을 1 분 내로 측정하였으며, 그 후 움직임이 없으면 실험을 멈추었다.

### 7. 혈청 ACh 함량 및 AChE 활성 억제 측정

실험 기간이 종료된 마우스는 CO<sub>2</sub> 가스로 마취하여 희생하고 혈액을 채취한 뒤 2,000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리한 혈청을 실험에 사용하였다.

혈청 ACh은 choline/acetylcholine assay kit (Abcam, London, England)를 사용하여 분석하였다. 96-well plate에 분석할 혈청 샘플과 표준 용액을 50  $\mu$ l, reaction mix 용액을 50  $\mu$ l 씩 분주한 후 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 끝

난 plate는 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ACh의 농도는 colorimetric kit의 표준 용액에서 산출된 곡선으로부터 계산하였다.

효소 활성 저해 효과는 acetylcholinesterase assay kit (Abcam, London, England)를 사용하여 분석하였다. 96-well plate에 AChE reaction mixture를 50  $\mu$ l 씩을 분주한 다음에 AChE 표준 용액과 마우스 혈청을 각각 50  $\mu$ l 씩 넣고 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 410 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

각 AChE 농도는 colorimetric kit의 표준 용액에서 산출된 곡선으로부터 계산하였다.

### 8. 혈청 사이토카인의 함량 측정

흑미 호분층 추출물이 혈중 신경염증 억제 지표에 미치는 영향을 평가하기 위하여 사이토카인 수준을 ELISA kit (Abcam, London, England)로 분석하였다.

각 항체가 부착되어 있는 96-well plate에 혈청 50  $\mu$ l과 사이토카인 antibody cocktail 50  $\mu$ l 을 넣고 1 시간 동안 실온 배양한 후 wash buffer를 이용하여 3 회 세척하였다. 그 후 각 well에 100  $\mu$ l의 TMB solution을 넣고 10 분간 반응시켰다. 마지막으로 각 well에 100  $\mu$ l의 stop solution을 넣어 반응을 정지시키고 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 사이토카인의 농도는 ELISA kit에 포함되어있는 표준 용액에서 산출된 곡선으로부터 계산하여 사용하였다.

### 9. 면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining)

CO<sub>2</sub>를 사용하여 마취한 마우스의 대동맥을 따라 식염수와 4% paraformaldehyde를 관류하고, 뇌를 적출한 후에 4% paraformaldehyde 용액에서 4°C 조건으로 12 시간 고정하였다. 조직을 손질하고 알코올 농도별로 조직처리 과정을 거쳐 탈수를 진행하였다. 탈수를 마친 조직은 xylene으로 투명한 후 paraffin으로 조직처리를 완료하였다. 조직은 파라핀을 사용하여 포매 하였고, 10  $\mu$ m의 두께로 슬라이스 하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드는 60°C의 건조 오븐에서 1 시간 동안 방치하여 파라핀을 모두 녹이고, 탈파라핀 과정을 수행한 후, 1 × PBS buffer로 세척하였다. 1 × citrate buffer와 TE buffer를 사용하여 antigen retrieval을 100°C에서 35 분간 진행한 후, blocking 하여 내인성 과산화 효소에 대한 반응을 차단하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다.

본 실험에서는 A $\beta$  (amyloid  $\beta$ -peptide, ab201060, 1 : 50, Abcam, London, England), Cas3 (caspase 3, 43-7800, 1 : 50,

Invitrogen, Waltham, MA, USA) 및 ChAT (choline acetyltransferase, ab178850, 1:1000, Abcam, London, England)을 1차 항체로 사용하였으며, 4°C에서 20 시간 동안 반응 후 PBS로 3 회 세척하였다. 이 후 2차 항체로 사용한 goat anti-rabbit H&L (ab150077, 1:2000, Abcam, London, England) 및 goat anti-mouse H&L (ab150116, 1:2000, Abcam, London, England)은 상온에서 2 시간 반응 후 PBS로 3 회 세척하였다.

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, ab104139, Abcam, London, England)를 fluoroshield mounting 용액에 희석한 후, 슬라이드에 5 분간 처리하고 cover glass로 덮고 현미경 (TCS SP8 confocal laser scanning microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 슬라이드 글라스를 관찰하였으며 immune software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 분석하였다.

### 10. 통계 분석

모든 데이터는 평균 ± 표준오차 (means ± S.E.)로서 나타내었으며 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS ver. 24, IBM Corp, Armonk, NY, USA)를 이용하여 One-way ANOVA (one-way analysis of variance)를 실시한 후, 5% 수준에서 Duncan's Multiple Range Test 유의성 검정을 실시하였다 (DMRT,  $p < 0.05$ ).

## 결과 및 고찰

### 1. 흑미 호분층 추출물이 공간 지각 능력에 미치는 영향

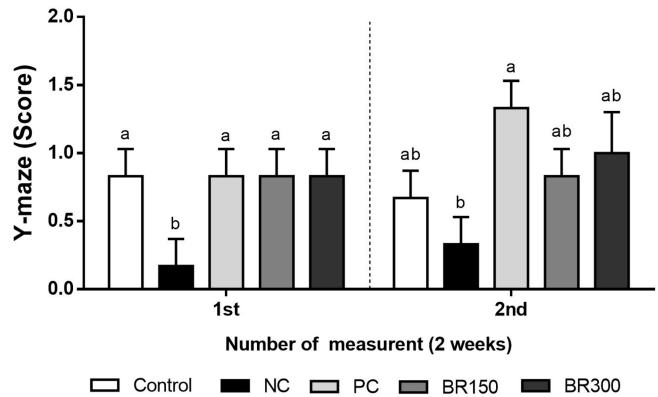
Y-maze 실험은 행동 유형 측정 방법 중 한 가지로 여러 신경 보호 메커니즘이 운동성과 관련되어 있기 때문에 가장 기본적으로 평가되어지고 있다 (Kwon *et al.*, 2010).

스코폴라민으로 ACh와 muscarinic receptor의 결합을 억제하여 기억력을 손상시킨 NC군에서는 반복적으로 한 영역에 들어가는 오류 동작의 횟수가 많아 점수를 크게 얻지 못하였다 (Fig. 1). 1 차 실험에서는 NC군을 제외한 실험군에서 유사한 행동 유형을 보여 획득 점수에 유의적인 차이가 없었다. 2차 실험에서 BR300군에서는 오류 동작 횟수의 감소와 각 주로에 순차적으로 들어가는 횟수가 늘어 1.0의 점수를 획득하였고 PC군 (1.3) 다음으로 높은 점수를 기록하였다.

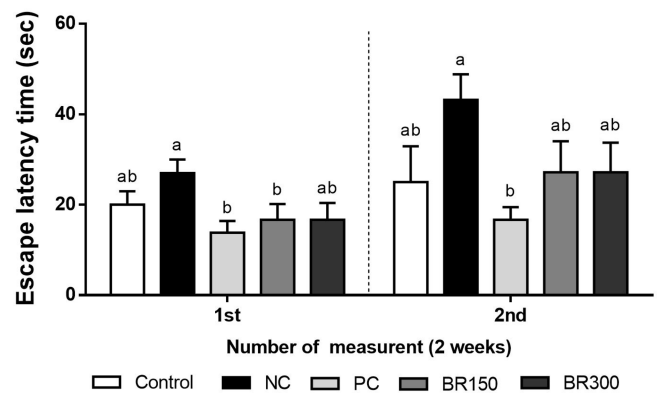
따라서, 흑미 호분층 추출물의 급여는 인지가 저하된 상태에서 공간 지각 능력을 회복시키고, 기억력 증진에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

### 2. 흑미 호분층 추출물이 공간 학습 능력에 미치는 영향

수중 미로 실험은 공간 학습 및 인지기능 개선을 평가하는 방법으로 (Kang *et al.*, 2013), 밀폐된 공간에서 수동적으로 헤



**Fig. 1. Effects of black rice aleurone layer (BR) extracts on Y-maze performance of mice with scopolamine-induced memory impairment.** The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means ± S.E. (n = 6). \*Means values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ .



**Fig. 2. Effects of black rice aleurone layer (BR) extracts on water maze task performance of mice with scopolamine-induced memory impairment.** The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means ± S.E. (n = 6). \*Mean values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

엄쳐야 하는 스트레스 상황에서 얼마나 빠르게 도피대를 인지하여 그 환경을 벗어나는가에 대하여 평가하게 된다 (Hritcu *et al.*, 2012; Aydin *et al.*, 2016).

본 실험에 들어가기 앞서 실험동물은 자유로이 물에서 수영하며 도피대를 탐색하도록 하였으며, 본 실험에서는 스코폴라민 투여 후 실험을 진행하였다 (Fig. 2). PC군이 각각 13.8 초, 16.7 초로 가장 빠른 도피 시간을 보였고 NC군은 27.0 초, 43.2 초로 2 번의 실험 결과에서 가장 늦은 도피 시간을 보였으며, 스코폴라민에 의한 기억력의 저하가 확인되었다. BR150군에서는 1 차 실험에서 16.7 초로 PC군 다음으로 가장 빠른 도피 시간을 보였고, 2 차 실험에서 control군 (25.0 초)와

비슷한 27.2 초의 도달시간을 보였으며 BR300군은 2 회 실험 (16.7 초, 27.2 초) 모두 control군과 유사한 경향을 보였다.

수중 미로 측정 결과, 스코폴라민으로 유도된 기억 손실로 NC군에서는 도피대에 도달하는 시간이 증가하였으나, 흑미 호분층 추출물 투여로 인하여 손상된 기억의 회복을 확인할 수 있었다.

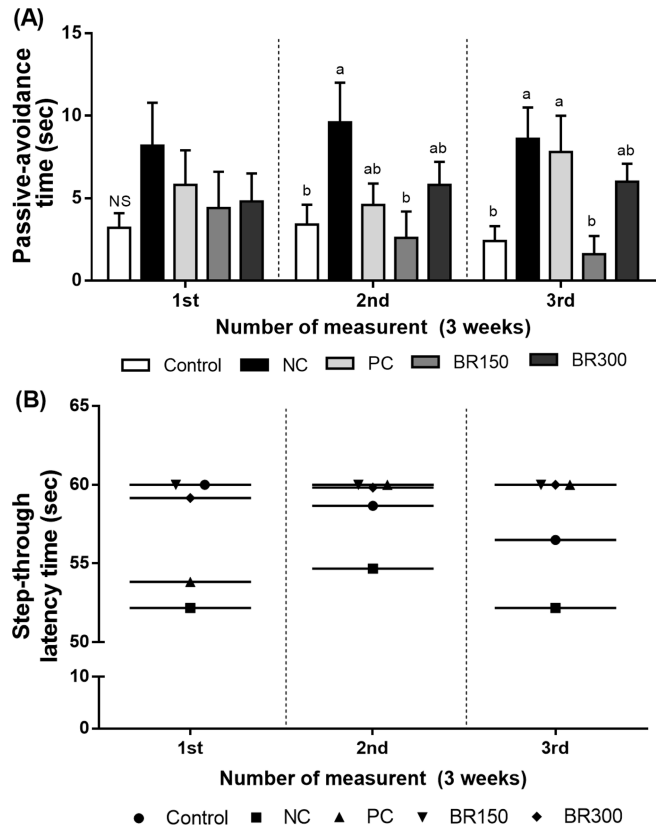
### 3. 흑미 호분층 추출물이 손상된 단기 및 장기 기억 회복에 미치는 영향

수동회피 실험은 측두엽 내측에 있는 편도체에 의존하여 장기 기억력 평가에 이용된다고 알려져 있으며, 편도체와 해마에서는 훈련 후의 기억 형성에 관여한다 (Gacar *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2020b). 따라서 수동회피 실험은 스트레스 자극을 통하여 학습과 기억을 평가하는데 사용되고 있다. 수동회피 실험은 어두움과 밝음의 두 가지 구역으로 나뉘는데, 어두움에 대한 실험동물의 선천적인 선호와 전기 자극을 주었을 때 자극을 피하여 밝음으로 이동하는 선천적 선호에 대한 억제력을 평가한다 (Gacar *et al.*, 2011).

먼저, 마우스가 암소 공간의 혐오자극을 기억하여 빠르게 밝은 공간으로 이동하는 시간을 측정하여, 단기 기억 손상에 대한 회복 효과를 평가하였다 (Fig. 3A). 1 차 실험에서는 각 실험군이 밝은 공간으로 이동하는 시간에 대한 유의적인 차이가 없었으나, 2 차 실험에서는 NC군이 9.6 초로 암소 공간에서의 체류시간이 증가하는 것을 보였다. BR150군의 체류시간은 2.6 초로, control군의 3.4 초와 유사한 경향을 나타내었으며, BR300군 (5.8 초)은 PC군 (4.6 초)와 비슷한 체류시간을 확인하였다. 또한, 3 차 실험에서 역시 BR150군은 1.6 초로 control군의 2.4 초와 유사한 체류시간을 확인할 수 있었다. 유의적이지는 않았지만, 암소 공간에 머무르는 시간이 BR150군에서 BR300군보다 적은 경향을 보여 좀 더 다양한 급여 수준에서의 비교 시험이 필요한 것으로 보인다.

흑미 호분층 추출물의 장기 기억 손상 회복 효과를 분석하기 위하여 밝은 구역에서의 머무름시간 (step-through latency time)을 측정하였다 (Fig. 3B). 실험동물이 암소 공간에서 밝은 공간으로 이동한 후, 밝은 구역에서의 머무름시간을 측정하였을 때 control군은 각각 60.0, 58.7 및 56.5 초의 머무름시간을 보여주었으나, NC군에서는 52.2, 54.7 및 52.2 초로 control군에 비하여 감소된 머무름시간을 보여 스코폴라민으로 인해 장기 기억 상실이 유도됨을 확인하였다. BR150군에서는 3 번의 실험에서 모두 60 초의 머무름시간을 보여주었으며, BR300군에서는 59.2, 59.8 및 60.0 초로 장기 기억 회복에 따른 머무름시간이 증가하는 것을 확인하였다.

이러한 결과로 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 기억력이 저하된 실험동물에서 단기 및 장기 기억력을 회복시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.



**Fig. 3.** Effects of black rice aleurone layer (BR) extracts on passive avoidance time (A) and step-through latency time (B) of mice with scopolamine-induced memory impairment. (A) The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means  $\pm$  S.E. (n = 6). \*Mean values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ . (B) The data was average step-through latency time for each group. All values are expressed as the mean (n = 6).

### 4. 흑미 호분층 추출물이 혈청 ACh 함량 및 AChE 활성 억제에 미치는 영향

뇌의 콜린성 신경세포는 신경전달물질 조절에 중요한 역할을 하고 AD 환자의 인지기능 및 행동 유형에 관여하여 AD 환자에게서 뇌의 콜린성 신경세포 손실과 ACh 감소가 보고되었다 (Lee *et al.*, 2016). ACh의 감소는 AChE 활성 증가와 관련되며, ACh을 콜린과 아세틸 CoA (acetyl CoA)로 분해하여 콜린성 기능 장애를 유도하게 되고 인지기능 장애에 영향을 미치게 된다 (Kim *et al.*, 2020).

ACh은 중요한 신경전달물질로서 중추신경계 콜린성 시스템과 관계가 깊고, 콜린성 신경계의 붕괴는 초기 AD의 주요 원인으로 알려져 있다 (Shon and Kim, 2017). ACh의 함량은 NC군에서  $2.48 \pm 0.09$  nmol로 나타나 control군의  $4.02 \pm 0.07$  nmol에 비하여 감소하였고 (Fig. 4A), 이는 스코폴라민의 투여가 ACh의 함량을 감소시킬 수 있음을 보여주었다. 감소

된 ACh의 농도는 흑미 호분층 추출물 투여로 인하여 BR150 군이  $3.27 \pm 0.15$  nmol, BR300군이  $3.23 \pm 0.11$  nmol로 나타나 유의적인 회복이 관찰되었다.

AChE 활성은 NC군 ( $1348 \pm 27$   $\mu$ U/ml)에서 control군 ( $925 \pm 16$   $\mu$ U/ml)에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. 그러나, PC군 ( $1010 \pm 24$   $\mu$ U/ml)에서 AChE의 활성이 억제되었고, BR150군 ( $917 \pm 53$   $\mu$ U/ml)과 BR300군 ( $993 \pm 67$   $\mu$ U/ml)에서는 PC군 및 control군과 유사한 AChE의 활성 억제를 보였다 (Fig. 4B).

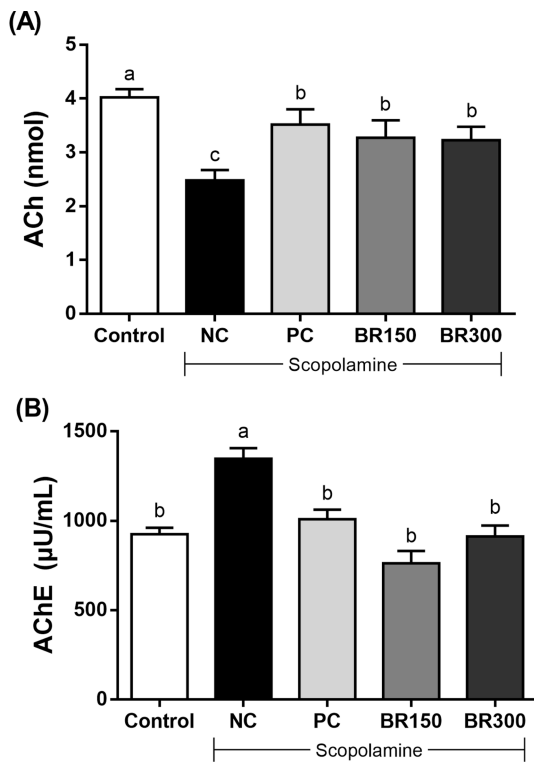
결과를 종합해 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 농도 의존적이지는 않았지만 150 mg/kg BW 이상의 수준에서 AChE의 활성을 효과적으로 억제하고 ACh의 농도를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

### 5. 흑미 호분층 추출물이 혈청 Cytokine에 미치는 영향

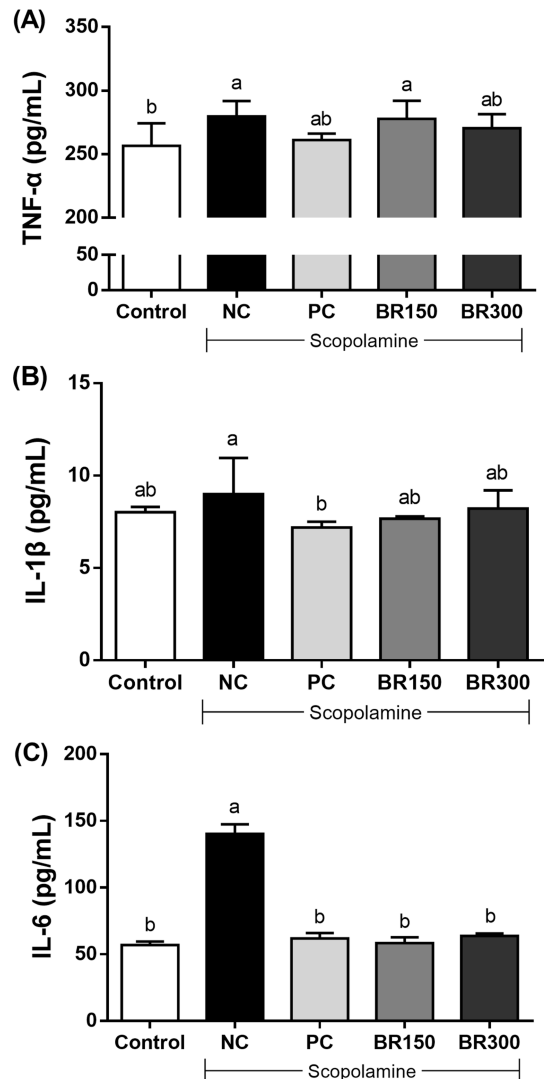
스코폴라민과 같이 뇌에 손상을 입히는 물질을 처리하면 체내 신경 세포에서 염증반응이 일어나, tumor necrosis factor

(TNF), interleukin (IL) 등 사이토카인 수치가 혈액 내에서 상승하게 된다. 이러한 신경염증은 알츠하이머성 치매 뇌의 신경아교 세포가 활성화되면서 퇴행성 변화를 일으키는 메커니즘으로 작용하게 된다 (Xu *et al.*, 2016; Muhammad *et al.*, 2019). TNF- $\alpha$ 는 뇌에서 장기 기억에 대한 반응을 억제하게 되어 학습 능력을 감퇴시키며, 신경세포 사멸 및 A $\beta$  축적의 증가에도 관여한다고 알려져 있다 (McCaulley and Grush, 2015).

TNF- $\alpha$  함량은 NC군 ( $279.6 \pm 6.1$  pg/ml)에서 control군



**Fig. 4.** Effects of black rice aleurone layer (BR) extracts on cholinergic nervous system activity in the serum of mice with scopolamine-induced memory impairment. (A) ACh concentration and (B) AChE activity. The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means  $\pm$  S.E. (n = 6). \*Mean values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

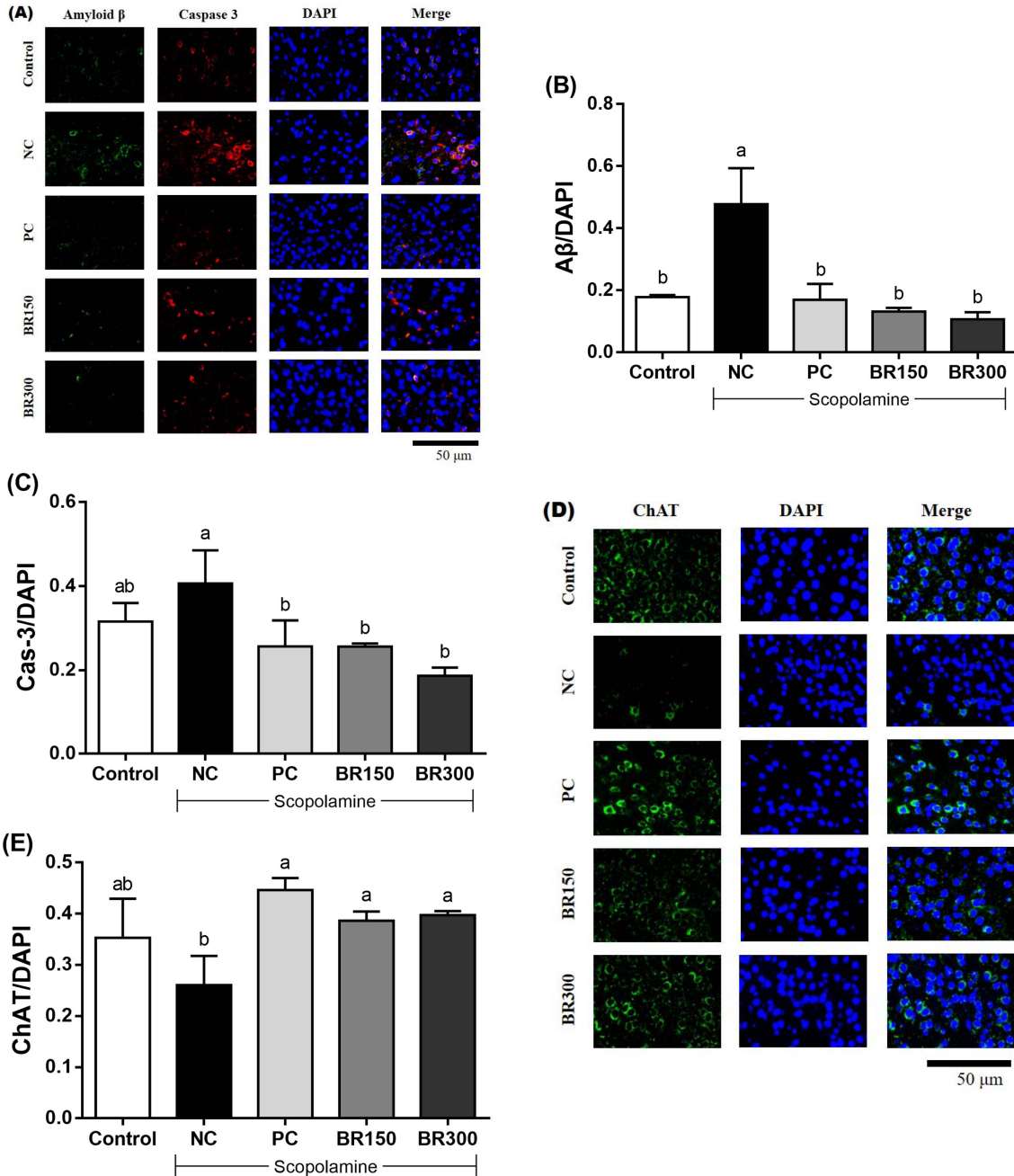


**Fig. 5.** Effects of black rice aleurone layer extracts on serum inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) and IL-6 (C) levels of mice with scopolamine-induced memory impairment. The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means  $\pm$  S.E. (n = 6). \*Mean values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

( $266.5 \pm 8.9 \text{ pg/ml}$ )보다 유의적으로 상승하였고, BR300군 ( $270.4 \pm 5.5 \text{ pg/ml}$ )과 PC군 ( $261.1 \pm 2.6 \text{ pg/ml}$ )에서 각각 3%와 6% 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 5A).

IL-1 $\beta$ 는 염증을 촉진하는 사이토카인으로서, 신경염증 반응의 가장 기초적인 염증반응 인자로서 알려져 있다 (Shaftel *et*

*al.*, 2007). 혈중 IL-1 $\beta$ 는 스코폴라민의 투여로 인하여 NC군 ( $9.0 \pm 1.0 \text{ pg/ml}$ )에서 control군 ( $8.0 \pm 0.2 \text{ pg/ml}$ )보다 증가되었으나, BR150군 ( $7.7 \pm 0.1 \text{ pg/ml}$ )과 BR300군 ( $8.2 \pm 0.5 \text{ pg/ml}$ )에서 증가한 IL-1 $\beta$ 의 함량을 감소시키는 경향을 보였다 (Fig. 5B).



**Fig. 6.** Effects of black rice aleurone layer extracts on protein expression by immunofluorescence staining in hippocampus of mice with scopolamine-induced memory impairment. (A) A $\beta$  and Cas-3 immunofluorescence staining image, (B) A $\beta$ /DAPI, (C) Cas-3/DAPI, (D) ChAT immunofluorescence staining image, (E) ChAT/DAPI. The data was analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after One-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the means  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ). \*Mean values with different letters are considered statistically significant at  $p < 0.05$ .



IL-6는 신경염증에서 신경 퇴행에 영향을 주고, 만성 염증에 관여하여 AD 환자에게서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Xu *et al.*, 2016). 스코폴라민을 처리한 NC군 ( $140.2 \pm 3.6$  pg/ml)은 control군 ( $56.9 \pm 1.3$  pg/ml)보다 IL-6 수준이 2배 이상 증가하였으나, PC군 ( $61.8 \pm 2.0$  pg/ml) 및 흑미 호분층 추출물 투여군에서는 BR150군과 BR300군에서 각각  $58.4 \pm 2.1$  pg/ml 및  $63.7 \pm 0.9$  pg/ml 을 나타내어 control군과 유사한 경향을 보였다 (Fig. 5C).

## 6. 흑미 호분층 추출물이 손상된 뇌 조직에 미치는 영향

A $\beta$ 로 인한 신경세포 기능 장애, 자유라디칼 손상과 산화 세포 사멸은 AD의 신경병리학적 특징이다 (Ling *et al.*, 2007). 또한, 스코폴라민을 투여하면 산화적 스트레스가 유발되고, A $\beta$ 와 인산화된 tau 단백질의 수치가 증가하게 된다 (Lee *et al.*, 2020a).

스코폴라민 투여로 인해서 NC군 ( $0.478 \pm 0.080$ )은 control군 ( $0.179 \pm 0.010$ ) 보다 A $\beta$  발현이 유의적으로 증가하였으나, 흑미 호분층 추출물을 투여한 BR150군에서는  $0.132 \pm 0.010$ , BR300군에서  $0.107 \pm 0.020$ 로 발현이 감소하여 흑미 호분층 추출물은 스코폴라민으로 유도된 A $\beta$ 의 과발현을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 보인다 (Fig. 6A and 6B).

Cas-3는 세포 자살에 관여하면서 신경 기능의 장애 유발에 영향을 미치게 되는 효소로 A $\beta$  단백질의 축적과 관련이 깊다 (Muhammad *et al.*, 2019). NC군의 Cas-3 발현은 control군과 비교하였을 때, 22% 증가한 반면 (Fig. 6A and 6C), BR150군에서  $0.256 \pm 0.04$ , BR300군에서는  $0.187 \pm 0.01$ 로 나타나 스코폴라민 투여에 의해서 발현이 증가된 Cas-3를 BR 투여에 의해 유의적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

ChAT는 아세틸콜린의 생합성에 관여하는 효소로, AChE의 활성 저해와 관련이 있다고 알려져 있다 (Ling *et al.*, 2007). 실험동물의 ChAT의 활성은 control군 ( $0.353 \pm 0.050$ )과 비교하여 NC군 ( $0.261 \pm 0.040$ )에서 감소한 반면, 흑미 호분층 추출물 투여군인 BR150군과 BR300군에서 각각  $0.387 \pm 0.010$ 와  $0.398 \pm 0.060$ 로 나타나 control 수준으로 회복되는 것이 확인되었다 (Fig. 6D and 6E). 이러한 결과로 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 신경세포 기능 장애 및 세포 사멸에 관여하는 A $\beta$ 와 Cas-3의 과발현을 유의적으로 감소시킬 수 있으며, ACh 생합성에 관여하는 ChAT 발현을 증가시켜 뇌 손상 회복에 도움을 줄 수 있는 것으로 확인되었다.

결과를 종합하여 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 스코폴라민으로 유도된 인지능력 저하 마우스 모델에서 손상된 공간 지각 능력, 공간 학습 능력 및 장기와 단기 기억력의 개선에 도움을 주었고, AChE 활성 억제를 통해 ChAT 효소 활성과 ACh 합성 유도로 콜린성 기능 장애가 개선되었다. 흑미 호분층 추출물의 혈청 TNF- $\alpha$ 과 IL-1 $\beta$  함량 감소 효과는 약하였으

나 IL-6 수준을 유의적으로 감소시켜 염증성 사이토카인 조절을 통한 신경염증 완화 가능성을 보여주었다. 또한 흑미 호분층 추출물은 신경독성을 일으키는 A $\beta$ 의 발현을 유의적으로 감소시켜 신경세포의 보호 및 인지 기능의 회복에 도움이 될 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 흑미 호분층은 인지기능 장애 예방 및 치료를 위한 기능성식품 소재로서 기대되나, 다양한 수준에서의 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 농업기초기반연구 농식품자원연구사업(과제번호: PJ01327901, PJ01586301)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Apridamayanti P, Pratiwi R, Purwestri YA, Tunjung WAS and Rumiati. (2017). Anthocyanin, nutrient contents, and antioxidant activity of black rice bran of *Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng' from sleman, yogyakarta, Indonesia. Indonesian Journal of Biotechnology. 22:49-54.
- Aydin E, Hritcu L, Dogan G, Hayta S and Bagci E. (2016). The effects of inhaled *Pimpinella peregrina* essential oil on scopolamine-induced memory impairment, anxiety, and depression in laboratory rats. Molecular Neurobiology. 53:6557-6567.
- Bae DH, Kim JH, Na JR, Kim YJ, Lee JY and Kim SO. (2014). Anti-amnesic effect of *Eriobotrya japonica* leaf extract on scopolamine-induced memory impairment in rats. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 43:799-806.
- Choe DJ, Ahn HY, Kim YW, Kim TH, Kim MD and Cho YS. (2016). Improvement effect of *Stachys sieboldii* MIQ. according to mixing ratio of calcium on memory impairment in scopolamine-induced dementia rats. Journal of Life Science. 26:812-818.
- Choi MR, Lee MY, Hong JE, Lee JY, Chun JW, Kim TH, Shin HK and Kim EJ. (2012). The aqueous extract of *Rubus coreanus* miquel improves scopolamine-induced memory impairment in ICR mice. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 41:192-196.
- Gacar N, Mutlu O, Utkan T, Celikyurt IK, Gocmez SS and Ulak G. (2011). Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamlamine induced memory impairment in the passive avoidance and morris water maze tests in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 99:316-323.
- Hritcu L, Cioanca O and Hancianu M. (2012). Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. Phytomedicine. 19:529-534.
- Iqbal S, Shah FA, Naem K, Nadeem H, Sarwar S, Ashraf Z, Imran M, Khan T, Anwar T and Li S. (2020). Succinamide derivatives ameliorate neuroinflammation and oxidative stress in scopolamine-induced neurodegeneration. Biomolecules. 10:443. <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/3/443> (cited by 2021



- Aug 30).
- Jang HH, Park MY, Kim HW, Lee YM, Hwang KA, Park JH, Park DS and Kwon O.** (2012). Black rice(*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high fat diet via fatty acid oxidation. *Nutrition and Metabolism*. 9:27. <https://link.springer.com/article/10.1186/1743-7075-9-27> (cited by 2021 Aug 30).
- Joo SH, Hahn C, Lim HK, Yoon KD, Yoon SH and Lee CU.** (2019). An exploration of the *Oryza sativa* L. cyanidin-3-glucoside on the cognitive function in older adults with subjective memory impairment. *Psychiatry Investigation*. 16:759-765.
- Kang SJ, Woo JH and Kim AJ.** (2013). The effects of korean ginseng on memory loss in rat models. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:1190-1196.
- Kim JH, He MT, Kim MJ, Park CH, Lee JY, Shin YS and Cho EJ.** (2020). Protective effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 28:85-94.
- Kong S, Choi Y, Lee SM and Lee J.** (2008). Antioxidant compounds and actioxidant acitivites of the methanolic extracts from milling fraction of black rice. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 37:815-819.
- Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim HC, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY and Jang CG.** (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharamacology*. 649: 210-217.
- Lee JH, Kim HJ, Jang GY, Seo KH, Kim MR, Choi YH and Jung JW.** (2020a). Effects of *Leonurus japonicus* Houtt. on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine*. 32:81-87.
- Lee JH, Kim HJ, Jang GY, Seo KH, Kim MR, Choi YH and Jung JW.** (2020b). *Mentha arvensis* attenuates cognitive and memory impairment in scopolamine-treated mice. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 51:70-77.
- Lee SE, Kim GS, Lee DY, Kim HD, Lee JW, Lee YS, Park CG and Ahn YS.** (2016). Study on white ginseng extract preparation for cognition improvement. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:375-385.
- Lee SE, Ye MS, Jung JH, Park SB, Lee JH, Kim HD, Jang GY, Soe KH, Kim DH and Shim IS.** (2021). Leaf extract of *Sedum kamtschaticum* Fisch. & Mey. ameliorates cognitive dysfunction in trimethyltin-treated rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 29:1-10.
- Ling FA, Hui DZ and Ji SM.** (2007). Protective effect of recombinant human somatotropin on amyloid  $\beta$ -peptide induced learning and memory deficits in mice. *Growth Hormone and IGF Research*. 17:336-341.
- McCaulley ME and Grush KA.** (2015). Alzheimer's disease: Exploring the role of inflammation and implications for treatment. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2015: 515248. <https://www.hindawi.com/journals/ijad/2015/515248/> (cited by 2021 Aug 30).
- Min JY, Yu SW, Baek SH, Nair KM, Bae ON, Bhatt A, Kassab M, Nair MG and Majid A.** (2011). Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 500:157-161.
- Muhammad T, Ali T, Ikram M, Khan A, Alam SI and Kim MO.** (2019). Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *Journal of Neuro-immune Pharmacology*. 14:278-294.
- Park CK, Choi SJ and Shin DH.** (2019). Ameliorative effect of *Aster scaber* thunberg and *Chaenoleles sinensis* koehne complex extracts against oxidative stress-induced memory dysfunction in PC12 cells and ICR mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 27:365-375.
- Park NE, Han DY, Kim SH and Chung DK.** (2017). Aucklandia radix ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 28:123-136.
- Rural Development Administration(RDA).** (2011). Food composition table. Rural Development Administration. Suwon. Korea. p.28-29.
- Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH and Lee JS.** (2008). Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 37:129-135.
- Shafteel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, Jennie HM, Johnson RE and O'Banion MK.** (2007). Sustained hippocampal IL-1 $\beta$  overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *The Journal of Clinical Investigation*. 117:1595-1604.
- Shon KH and Kim JS.** (2017). Anti-dementia effects of *Cornus officinalis* S. et Z. extract on the scopolamine induced dementia in mouse. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 48:301-313.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI and Lewis KW.** (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of the American Medical Association*. 271:992-998.
- Xu T, Shen X, Yu H, Sun L, Lin W and Zhang C.** (2016). Water-soluble ginseng oligosaccharides protect against scopolamine-induced cognitive impairment by functioning as an anti-neuroinflammatory agent. *Journal of Ginseng Research*. 40:211-219.
- Zhang J, Wu J, Liu F, Tong L, Chen Z, Chen J, He H, Xu R, Ma Y and Huang C.** (2019). Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. *European Journal of Pharmacology*. 858:172500. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919304522> (cited by 2021 Aug 30).