동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 16. No. 1, 2005

常山이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

이승희, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의학과대학 신경정신과교실

The Effects of Dichroa febrifuga(DIF) Extract on the Alzheimer's Disease Model

Seung-hee Lee, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental Neuropsychiatry
College of Oriental Medicine, Daejeon University

ABSTRACT

This experiment was designed to investigate the effect of Dichroa febrifuga(DIF) on the Alzheimer's disease.

The effects of DIF extract on IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA of THP-1 cell treated by Aβ plus LPS and amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by Aβ plus rIL-1β and AChE activity of PC-12 cell lysate treated by Aβ plus rIL-1β and behavior of memory deficit mice induced by scopolamine and mice glucose, uric acid, AChE activity of memory deficit rats induced by scopolamine were investigated, respectively.

The results were summarized as follows ;

1. DIF extract suppressed APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by Aβ.
2. DIF extract suppressed IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in THP-1 cell treated by LPS.
3. DIF extract suppressed AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by Aβ.
4. DIF extract increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit rats induced by scopolamine.
5. DIF extract group showed significantly inhibitory effect on the memory deficit of mice induced by scopolamine in the experiment of Morris water maze.

According to the above results, it is suggested that DIF extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease and memory deficit.

Key Words : Dichroa febrifuga, Alzheimer's disease

◆ 투고 : 5/19 수정 : 6/11 채택 : 6/13
교신저자 : 이상룡 주소 : 충남 천안시 구성동 476-8 대전대학교 부속 천안한방병원
전화 : 041-560-8781 Fax : 041-553-2225 E-mail 7575np@dju.ac.kr

I 緖 論

痴呆는 보통 뇌의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 증후군이며, 이로 인해 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습능력, 언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애가 있는 것을 말한다[1]. 단일 질환이기보다는 인지 기능의 저하를 나타내는 여러 질환들에 대한 보다 포괄적인 개념이라 할 수 있다[2,3].

이런 치매에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease ; AD), 혈관성 치매(vascular dementia ; VD), 혼합형 치매, 중독성 치매 등의 유형이 있으며[4], 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있고[5,6], VD는 20-30% 정도이고 약물이나 알코올중독에 의한 중독성 치매는 10-20% 정도이며 여성이 남성에 비해서 2-3배정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다[7].

AD의 유발 인자에 대한 이론은 다양한데[8], 신경반(neuritic plaque) 구조의 주된 구성성분으로 amyloid precursor protein(APP)으로부터 잘려나온 amyloid β protein(Aβ)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 구조의 침착이 AD환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9].

이외에도 병원균의 침입, 물리적인 뇌 손상 등에 의해 IL-1, IL-6 등의 proinflammatory cytokine을 과다하게 생성하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있고[10], 또한 acetylcholine 등 신경전달 물질의 감소는 기억력을 감소시키며, 이러한 인지장애는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화와 함께acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 더욱 심화된다고 한다[11].

韓醫學에서는 痴呆와 관련하여 ≪景岳全書 · 癲狂痴獃≫[12]에서 최초로 '痴獃證'에 대하여 기술하였고, 原因으로는 痰飮, 痰火, 氣滯瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이[12~14], 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되어 왔다[15].

常山은 涌吐藥으로 黃常山의 뿌리를 건조한 것이다[16]. 常山는 《神農本草經》[17]에서는 "主傷寒寒熱 熱發溫瘧鬼毒 胸中痰結吐逆"이라 하였고 《本草學》[16]에서는 涌吐痰飮, 截瘧하는 효능이 있어 胸中痰飮, 瘧疾 등을 치료한다고 하여 이러한 主治, 效能을 통하여 痰飮, 痰火 등의 원인으로 발생하는 치매에 응용될 수 있을 것이라 생각된다.

이에 著者는 常山이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA와 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하였고 PC-12 세포주에서 AChE 활성도를 관찰하였으며, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 모델의 혈청내 glucose, uric acid, AChE에 대한 常山의 효능을 관찰하였고 Morris water maze를 이용하여 videotrack을 통한 생쥐의 행동 변화를 측정한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

II 材料 및 方法

1. 材料

1) 動 物

실험동물은 350~400g 30주령 Sprague Dawley(SD)계 웅성백서를 대한실험동물센터에서 공급받아 사용하였고, 30g 6주령의 International Cancer Research(ICR)계 생쥐와 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 이 중에서 실험실 환경{온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux}에 2주일간 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, Korea)를, 식수는 정제수를 자유로이 섭취케 하

였다.

2) 藥 材

본 실험에 사용한 상산(*Dichroa febrifuga* ; DIF)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 試藥 및 機器

본 연구에 사용된 시약 중 cholinesterase kit(420-MC, sigma, U.S.A.), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis(β-amino- ethyl ether) N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluo- ride (PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly acryl- amide, magnesium chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A.) 제품을, RNAzol^{B}는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.) 제품을, 그리고 agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품 등을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer (shimazue, Japan), rotary vaccum evaporator (BUCHI B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, U.S.A.), bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ice-maker(비전과학 (주), Korea), ELISA reader (molecular devices, U.S.A.), 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning co., U.S.A.), VIDEOTRACK (Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 등의 것이었다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

常山 200g을 깨끗이 씻어 3,000㎖ round flask에 넣고 증류수 1,300㎖를 첨가하였다. 3시간 가열 추출하고 여과지를 이용하여 침전물을 3회 여과한 후, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -84℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 47g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) mLFC와 PC-12 cell에 대한 細胞毒性 測定

(1) 細胞培養

정상 생쥐의 폐 조직 세포(mouse lung fibroblast cell ; mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.), DNase type I (0.15㎎/㎖, Sigma, U.S.A.), antibiotics (penicillinm 104U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 PBS로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양한다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주한다.

PC-12(ATCC, CRL1721) 세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 DMEM에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였다.

(2) 細胞毒性 測定

세포독성 측정 방법은 SRB assay법[18]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. PC-12 세포주와

mLFC는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 常山 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조한다. SRB(0.4% SRB / 1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색한다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA 및

THP-1 세포주에서 IL-1β, Il-6,TNF-α mRNA 發顯 分析

(1) 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10^6세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 常山 추출물을 100㎍/㎖, 10㎍/㎖과 1㎍/㎖의 농도로 첨가하고 1시간 후 β-amyloid(Aβ) 10μM을 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

THP-1(ATCC, TIB-202) 세포주는 acute monocytes로 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin(100U/㎖), streptomycin(100㎍/㎖) 그리고 10㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO_2인 37℃ 배양기에서 배양한 것에 lipopolysacchride(LPS) 2㎍/㎖를 동시 처리하여 proinflamatory cytokine을 유발시켰다. 常山 추출물은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution(HBSS)으로 세척한 후에 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(2) mRNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 常山 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol^B 500㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2- propanol 200㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyro- carbonate(DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) RT-PCR

역전사 반응(Reverse Transcriptase ; RT)은 준비된 total mRNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성시킨 후 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로써 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다.

이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG, germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형

에 대한 primer는 APP, AChE, glial fibrillary acidic protein(GFAP), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF)-α 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/㎕)와 antisense primer(20pmole/㎕)를 혼합하여 1㎕를 가하고, 다시 3㎕ 2.5mM dNTPs, 3㎕ 10×PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$), 그리고 0.18㎕ Taq. polymerase(5U/㎕)를 첨가한 다음 최종 부피가 30㎕가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation (72℃, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석한다.

Oligonucleotide sequence의 鹽基配列은 다음과 같다.

ⓐ rat IL-1β
sence oligonucleotide 5′-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3′
antisence oligonucleotide 5′-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3′
ⓑ rat IL-6
sence oligonucleotide 5′-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3′
antisence oligonucleotide
5′-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3′
ⓒ rat TNF-α
sence oligonucleotide 5′-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3′
antisence oligonucleotide 5′-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3′
ⓓ rat APP
sence oligonucleotide 5′-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3′
antisence oligonucleotide 5′-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3′
ⓔ rat AChE
sence oligonucleotide 5′-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3′
antisence oligonucleotide 5′-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3′
ⓕ rat GFAP
sence oligonucleotide 5′-GAGCAGCTGGCCCAGCAGCAG-3′
antisence oligonucleotide 5′-CTTGAGGTGGCCTTCTGACAC-3′
ⓖ rat G3PDH
sence oligonucleotide 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′
antisence oligonucleotide 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height ; Ht)으로 측정하였다.

4) PC-12 세포주 細胞性 蛋白質에서의 AChE activity 測定

(1) 細胞性 蛋白質 抽出

PC-12 세포주에 常山 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다.

세포용해액을 얻기 위하여 50㎕의 lysis완충용액{Tris-HCl(200mM, pH8.0), 150mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후, Bradford 염색법[19]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) AChE activity 測定

세포 용해액을 표시한 후 sodium chloride solution 0.2㎖과 혼합하였다.

각 tube에 water 3.0㎖, nitrophenol solution 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다.

다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고, 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 誘導된 記憶力減退 白鼠 모델의 血液分析

(1) 藥物投與 및 scopolamine 注射

30주령 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, tacrine(10㎎/kg p.o)을 경구투여한 tacrine 투여군, 常山 추출물(150㎎/kg p.o)을 경구투여한 실험군으로 하여 각각 scopolamine(1㎎/kg i.p)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) Glucose, uric acid 測定

血淸內 glucose, uric acid의 양은 자동생화학 분석기(Express 550)를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE activity 測定

AChE activity는 cholinesterase kit로 측정하였다. 혈청 중 AChE activity를 측정하기 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2㎖와 serum 0.2㎖를 넣고 혼합하였다.

blank tube와 test tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가한다.

Acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 誘導된 記憶力減退 생쥐 모델의 Morris water maze 實驗

(1) 反復學習 및 藥物投與

ICR계 생쥐 100마리를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 선별을 실시하고 선별된 ICR계 생쥐를 다시 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복 학습을 실시하였다.

Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치하고, 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다.

선별된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 아무런 처치를 하지 않은 대조군, tacrine(10㎎/kg *p.o*)을 경구투여한 tacrine 투여군, 常山(150㎎/kg *p.o*)을 경구 투여한 실험군으로 분류하였고 계속 7일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 實驗

훈련과 약물 투여가 종료되고 1주 후 ICR계 생쥐에 scopolamine(1㎎/kg i.p)을 복강에 처리한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 videotrack으로 행동을 측정하였고 그 결과를 videotrack software로 분석하였다.

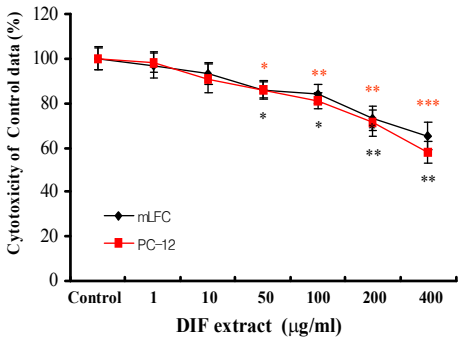
3. 統計 分析

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고 student's T-test 분석 방법[20]을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ 成 績

1. mLFC와 PC-12 세포주에 대한 細胞毒性

mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 10 ㎍/㎖ 이하의 常山 투여군은 변화가 없었고, 400 ㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖의 常山 투여군은 각각 65±6.0(%), 73±5.4(%), 84±4.2(%), 86±3.6(%)로 나타났으며, PC-12 cell의 생존율은 대조군에 비해 10㎍/㎖ 이하의 常山 투여군은 변화가 없었고, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖의 常山 투여군은 각각 58±4.9(%), 71±5.7(%), 81±3.8(%), 86±4.2(%)로 나타났다(Fig. 1).



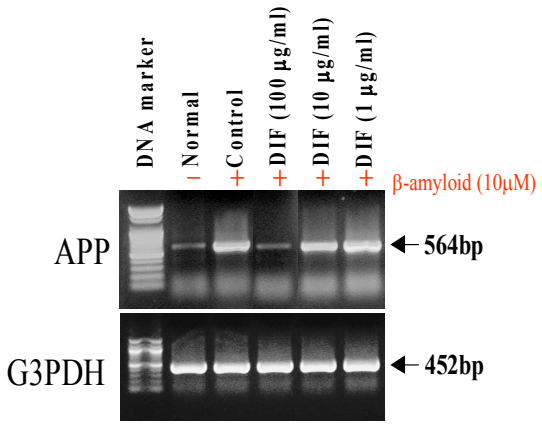
2. PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP mRNA 發顯 抑制 效果

Fig. 1. Cytotoxicity of DIF extract on mLFC and PC-12 Cell line.
Control : Non-treatment group.
DIF : Group pretreated with various concentration(1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖, 400㎍/㎖) of DIF extract for 48hrs.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 28(Ht)로 나타났고 대조군은 198(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 33(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 137(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여 실험군은 201(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 171(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 122(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 125(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여 실험군은 160(Ht)로 나타났다(Fig. 3).

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 78(Ht)로 나타났고 대조군은 148(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 26(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 59(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여 실험군은 114(Ht)로 나타났다(Fig. 4).



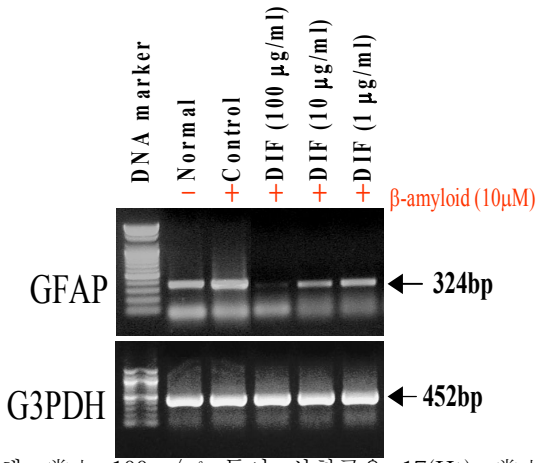
3. THP-1 세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 發顯 抑制 效果

Fig. 2. Inhibitory effects of DIF extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with Aβ.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1hr.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
PC-12 cell line was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence Aβ(10μM) for 6hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expressions were observed APP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell line.

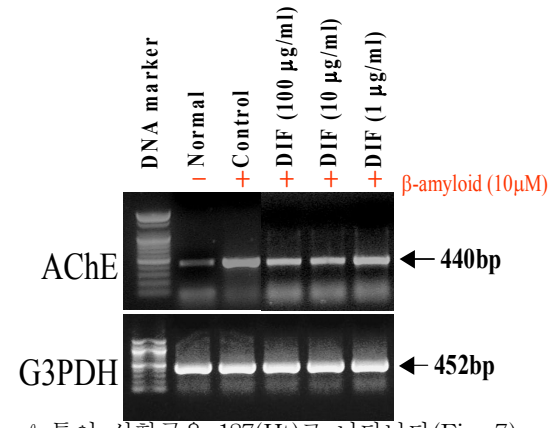
IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)로 나타났고 대조군은 197(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 19(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 34(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여 실험군은 136(Ht)로 나타났다(Fig. 5).

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 14(Ht)로 나타났고 대조군은 208(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 17(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 38(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여 실험군은 201(Ht)로 나타났다(Fig. 6).

Fig. 3. Inhibitory effects of DIF extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with Aβ.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1hr.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
PC-12 cell line was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence Aβ(10μM) for 6hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expressions were observed AChE mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell line.



TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 42(Ht)로 나타났고 대조군은 168(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여 실험군은 14(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여 실험군은 112(Ht), 常山 1㎍/



㎖ 투여 실험군은 187(Ht)로 나타났다(Fig. 7).

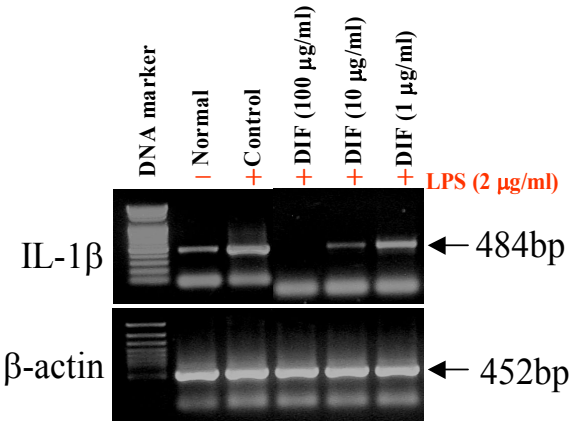
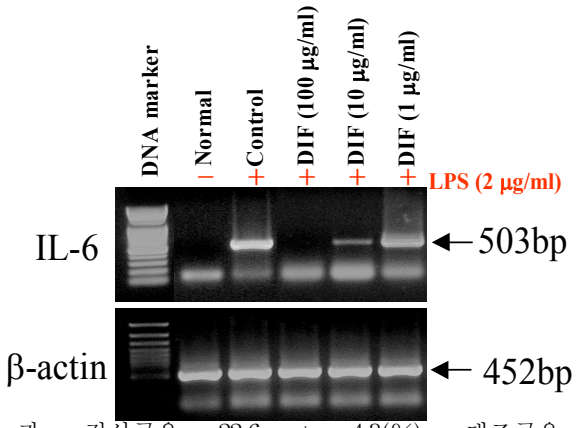


Fig. 5. Inhibitory effects of DIF extract on IL-1β mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 100㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 10㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 1㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
THP-1 cell line was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence LPS(2㎍/㎖) for 6hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expressions were observed IL-1β mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

4. PC-12 cell 細胞性 蛋白質에서의 AChE activity 抑制 效果

PC-12 cell에서의 AChE activity를 측정한 결



과, 정상군은 22.6 ± 4.3(%), 대조군은 100.0±5.7(%)로 나타났고 이에 반해 常山 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖ 투여군은 각각 44.7±7.8(%), 66.4±5.1(%), 80.5±6.4(%)로 나타나 유의성 있는

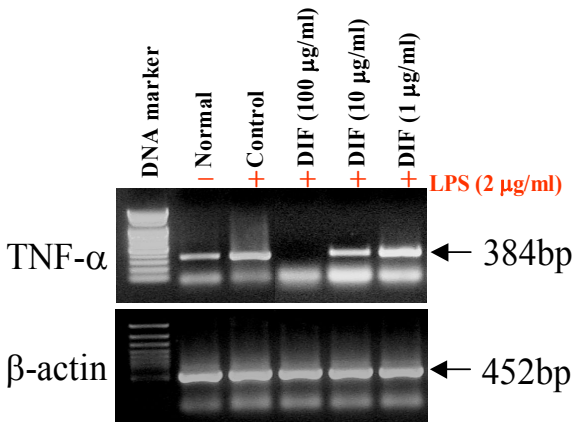


Fig. 7. Inhibitory effects of DIF extract on TNF-α mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 100㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 10㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 1㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
THP-1 cell line was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence LPS(2㎍/㎖) for 6hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expressions were observed IL-6 mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

억제효과를 보였다(Fig. 8).

5. Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠 모델의 血淸內 glucose, uric acid, AChE에 미치는 效果

Fig. 9. Ef
rats indu
Normal :
Control :
Tacrine :
DIF : Gro
* : Statist
** : p<0.
SD rats v
scopolam
was anal

Fig. 6. Inhibitory effects of DIF extract on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 100㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 10㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1hr and 1㎍/㎖ of DIF extract for 6hrs.
THP-1 cell line was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence LPS(2㎍/㎖) for 6hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expressions were observed IL-6 mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

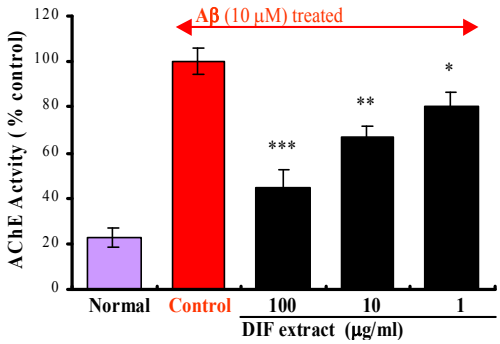
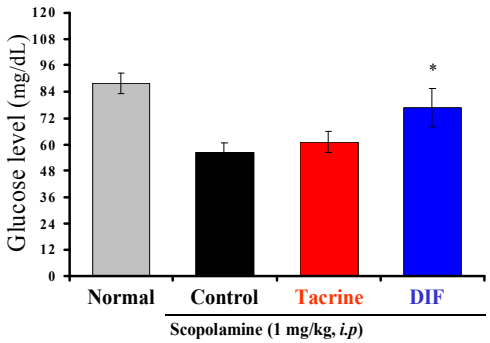


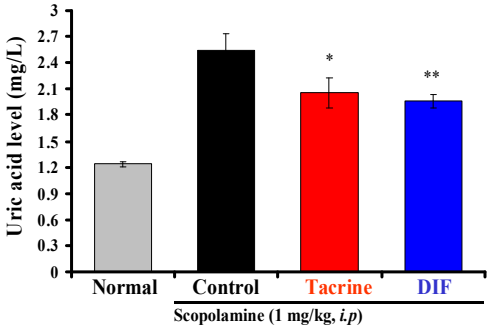
Fig. 8. Inhibitory effects of DIF extract on the AChE activity in Aβ stimulated PC-12 cells.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour.
DIF Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of DIF extract for 24 hours.
DIF Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of DIF extract for 24 hours.
DIF Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of DIF extract for 24 hours.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).
PC-12 cell was pretreated with various concentration DIF extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence Aβ(10μM) for 24hrs. The lysate(50μl) were measured using AChE diagnosis kits. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

Glucose는 정상군이 87.8±4.7(㎎/㎗), 대조군이 56.5±4.2(㎎/㎗)로 나타났고 tacrine투여군과 常山 투여군은 각각 61.1±4.8(㎎/㎗), 76.8±8.6(㎎/㎗)으로 나타나 常山 투여군에서 유의성 있는 감소 효과를 보였다(Fig. 9).

Uric acid는 정상군이 1.24±0.03(㎎/㎗), 대조군이 2.54±0.19(㎎/㎗)로 나타났고 tacrine투여군과 常山 투여군은 각각 2.06±0.17(㎎/㎗), 1.96±0.08(㎎/㎗)로 나타나 tacrine투여군과 常山 투여군 모두 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 10).

AChE activity는 정상군이 26.7±1.5(U/㎖), 대조군이 69.3±5.6(U/㎖)로 나타났고 tacrine투여군과 常山 투여군은 각각 31.3±7.1(U/㎖), 35.4±6.4(U/㎖)로 나타나 tacrine 투여군과 常山 투여군 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 11).

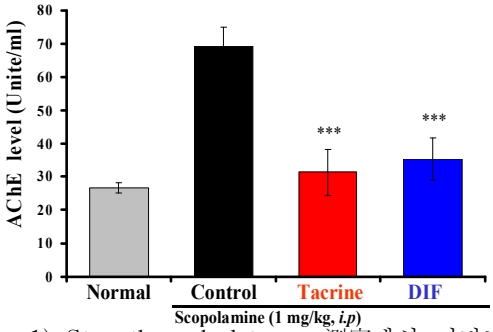




6. Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐 모델에 대한 抑制 效果

Fig. 10. Effects of DIF extract on the uric acid in the serum level of memory deficit rats induced by scopolamine.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
DIF : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and DIF extract(150㎎/kg p.o).
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).
SD rats were orally administered with DIF or tacrine and the injection of scopolamine(1㎎/kg i.p) continued once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed as described in *Materials and Methods*.

Fig. 11. Effects of DIF extract on the AChE in the serum level of memory deficit rats induced by scopolamine.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
DIF : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and DIF extract(150㎎/kg p.o).
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).
SD rats were orally administered with DIF or tacrine and the injection of scopolamine(1㎎/kg i.p) continued once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed as described in *Materials and Methods*.



1) Stop-through latency 測定에서 나타난 記憶力 減退 抑制 效果

약물 투여 1주 후 도달시간(stop-through latency)을 관찰한 결과 대조군이 80.6±13.9(sec)로 나타났고, tacrine 투여군은 15.2±4.0(sec)로 나타났으며, 常山 투여군은 26.7±7.4(sec)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 12).

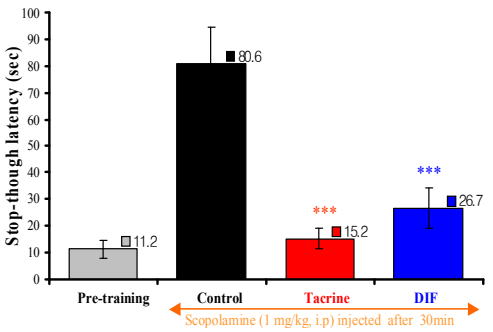


Fig. 12. Effects of DIF on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type Morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
DIF : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and DIF extract(150㎎/kg p.o).
Stop-through latency : Each time the animal moves from entry to platform.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).
ICR mice were orally administered of DIF or Tacrine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 weeks after orally administered of DIF and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

2) Distance movement-through latency 測定에서 나타난 記憶力 減退 抑制 效果

약물 투여 1주 후의 Distance movement-through latency를 관찰한 결과 대조군은 1466±153.4(㎝)로 나타났고, tacrine 투여군은 486±34.0(㎝)로 나타났으며, 常山 투여군은 503±87.6(㎝)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 13, 14).

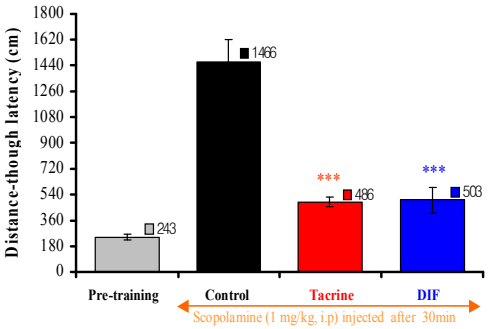


Fig. 13. Effects of DIF on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movemet-through type Morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
DIF : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and DIF extract(150㎎/kg p.o).
Lardist : The total distance covered by the animal in large movement.
Smldist : The total distance covered by the animal in small movement.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).
ICR mice were orally administered of DIF or Tacrine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 weeks after orally administered of DIF and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

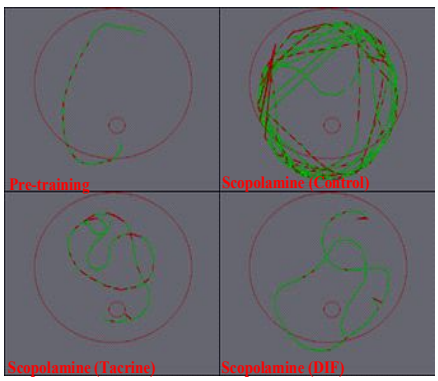


Fig. 14. Photograph on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movemet-through type Morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
DIF : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and DIF extract(150㎎/kg p.o).
Lardist : The total distance covered by the animal in large movement.
Smldist : The total distance covered by the animal in small movement.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$).
ICR mice were orally administered of DIF or Tacrine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 weeks after orally administered of DIF and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

Ⅴ 考 察

우리나라를 비롯한 주요 선진국에서는 의료기술의 발전과 함께 인간의 평균수명이 연장되고 출생률이 감소하면서 노령자의 비율이 급격히 증가하고 있으며, 그 중에서도 痴呆환자의 관리에 소요되는 막대한 인력과 비용으로 인해 심각한 사회문제가 되고 있다[21].

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타내는 질환이다[4].

이러한 치매에는 AD, VD, 중독성 치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50%이상을 차지하고 있고[5,6], VD는 20-30% 정도이며 약물이나 알코올 중독에 의한 중독성 치매는 10~20% 정도이며 여성이 남성에 비해서 2-3배정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다[7].

치매를 발생하게 하는 대표적인 원인질환 중의 하나인 AD는[22] 1906년 독일의 정신과 의사인 Alzheimer가 초로기 치매에 관하여 보고하면서 처음 알려진 것으로[23], 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 망상, 행동장애 등의 증상을 나타내는[24] 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다[25].

韓醫學에서는 痴呆와 관련하여 ≪景岳全書·雜證謨≫[12] 癲狂篇에서 "痴獃證, 凡平素無痰而或以鬱結, 或而不遂, 或而思慮, 或而疑貳 或而驚狂而漸致痴, 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常"이라 하여 구체적인 痴呆의 病因·病機, 그리고 治法·豫後에 대해서 설명하였고, 《辨證奇門》[26], 《石室秘錄》[27]에는 痴呆의 유사개념으로 神志淡漠, 寡言少語, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 閉戶獨處, 口中喃喃自語, 言辭顚倒, 擧動不經, 忽笑忽哭[27] 등의 증상을 나타내는 "呆病"을 언급하였으며, 《內經》[28]과 歷代醫書[13,29]에서 健忘 등의 유사한 증후가 언급되고 있다. 痴呆는 '痴呆[12]', '呆病[26,27]', '健忘[28,29]', '癲狂[30]' 등의 範疇로 볼 수 있다. 原因으로는 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이[12~14] 있으며, 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다[12,14,15,26].

AD 유발에는 뇌의 전반적인 위축 이외에도 amyloid β protein(Aβ), estrogen, apolipoprotein E, presenilin, free radicals, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질의 불균형 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[31]. 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 대표적인 가설이다[9].

Aβ는 β-secretase나 ɣ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되는데[32], APP의 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 세포·세포간, 세포·간질간의 유착에 관여하며 구리, 아연 등 각종 이온의 세포내 유입에 관여할 것으로 생각되는 단백질로[33], APP의 유전자는 21번 염색체에 위치하고 있으며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30代와 40代에 AD 환자의 뇌에서 발견되는 똑같은 신경섬유 덩어리와 노인반이 나타난다. 이러한 병변은 유전자 증가에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 추측되고 있다[32].

AD 기전과 관련된 다른 중요한 이론은 면역계에서만 생산될 수 있다고 믿어져 왔던 많은 cytokine들이 병원균의 침입 또는 물리적 뇌손상 등에 의해 손상된 brain blood barrier(BBB)를 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면,

astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포가 활성화되어 proinflammatory cytokine들이 과다하게 생성되고 이로 인하여 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다는 가설이다[34].

proinflammatory cytokine의 작용과정은 뇌손상 등의 외부자극인자들에 의하여 microglial cell이 활성화 되어 IL-1β 및 TNF-α를 생산하며, 이들 염증반응 cytokine들은 astrocyte를 활성화시켜 이산화질소(nitric oxide ; NO)를 생산하는 ROS의 일종인 peroxynitrite(OXOO) 등을 유도하여 신경세포의 사멸을 야기하게 된다[35].

AD 환자에게서 나타나는 기억력감퇴는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이며 이 현상은 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다[36]. 이처럼 AD는 뇌조직 내에서 choline계 활성이 감소되어 기억력의 감퇴를 일으키기 때문에 신경접합부에 작용하는 acetylcholine의 양을 증가시키거나, acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 약물들이 개발중인데 대표적으로 FDA의 승인을 받은 acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 tacrine 등이 있다[37~39]. 그러나 이들은 약물의 작용시간이 짧아 1일 4회나 복용하여야 하며 간독성이 많이 나타나는 단점이 있으며, 환자의 20~40%에서만 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있다[38,39].

常山(DICHROAE RADIX)은 涌吐藥으로 虎耳草科에 속한 落葉灌木인 黃常山 *Dichroa febrifuga LOUR.*의 뿌리를 건조한 것이다[14].

常山의 주치효능에 대하여는《神農本草經》[17]에서는 "主傷寒 寒熱 熱發溫瘧鬼毒 胸中痰結吐逆"이라 하여 痰飮, 痰火로 발생하는 痴呆에 응용될 수 있다고 생각된다.

이에 著者는 常山의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 관찰하였으며, scopolamine으로 처리한 白鼠에서의 血淸內 glucose, uric acid, AChE를 측정하였으며 역시 scopolamine으로 처리한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 세포주를 분리하여 常山의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 10㎍/㎖ 이하의 常山 투여군은 변화가 없었고, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖의 常山 투여군은 각각 65±6.0(%), 73±5.4(%), 84±4.2(%), 86±3.6(%)로 나타났고, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 10㎍/㎖ 이하의 常山 투여군은 변화가 없었고, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖의 常山 투여군은 각각 58±4.9(%), 71±5.7(%), 81±3.8(%), 86±4.2(%)로 나타났으며, 실제 실험에서는 100㎍/㎖ 이하 常山을 사용하여 실험하였다(Fig. 1).

AD 유발과 관련되어 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 세포주에서 관찰한 결과, APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 28(Ht)로 나타났고 대조군은 198(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 33(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 137(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 201(Ht)로 나타났고(Fig. 2), AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 171(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 122(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 125(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 160(Ht)로 나타났으며(Fig. 3), GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 78(Ht)로 나타났고 대조군은 148(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 26(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 59(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 114(Ht)로 나타났는데(Fig. 4), 이를 통하여 常山은 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

THP-1을 LPS로 처리한 후 mRNA 발현을 측정한 결과 IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)로 나타났고 대조군은 197(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 19(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 34(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 136(Ht)로 나타났으며(Fig. 5), IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 14(Ht)로 나타났고 대조군은 208(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 17(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 38(Ht),

常山 1㎍/㎖ 투여군은 201(Ht)로 나타났고(Fig. 6), TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 42(Ht)로 나타났고 대조군은 168(Ht)로 나타났는데 반해, 常山 100㎍/㎖ 투여군은 14(Ht), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 112(Ht), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 187(Ht)로 나타났으니(Fig. 7) 이는 2㎍/㎖ LPS만을 처리한 대조군에 비해, LPS와 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 常山을 함께 투여한 실험군에서 발현이 농도 의존적으로 억제되어 常山이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 응용될 수 있음을 알 수 있었다.

PC-12 세포주의 세포성 단백질에서의 AChE activity를 측정한 결과 정상군은 22.6±4.3(%), 대조군은 100.0±5.7(%)로 나타났는데 반해 常山 100㎍/㎖ 투여군은 44.7±7.8(%), 常山 10㎍/㎖ 투여군은 66.4±5.1(%), 常山 1㎍/㎖ 투여군은 80.5±6.4(%)로 나타나 유의성 있는 AChE activity 억제효과를 보였다(Fig. 8). 이를 AChE mRNA 발현 結果와 함께 보면 常山의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되어, 常山의 투여가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력감퇴를 회복시키는 역할을 하는 것으로 생각되고 있으며[37], uric acid는 핵산 중 purine 염기의 최종 대사산물로[38], AD와 VD에서 增加되는 것으로 알려져 있다[39].

이런 관점에서 常山이 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청내 glucose, uric acid에 미치는 효과를 분석한 결과, glucose는 대조군에 비하여, 常山을 투여한 실험군에서 유의성 있는 증가를 보였고, uric acid는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 常山을 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 나타냈는데, 이로써 常山이 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켜 기억력감퇴를 회복시키고 AD 억제에 효과가 있을 것으로 생각된다.

또한 血淸內 AChE를 분석한 결과 AChE activity는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 常山을 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데, 이로써 常山이 PC-12 cell의 유전자, 세포성 단백질뿐만 아니라 白鼠 혈청에서 역시 AChE의 활성을 억제함으로써, AChE의 과다로 인한 acetylcholine의 작용 저하를 개선하여 기억력감퇴에 대한 치료효과가 있을 것으로 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 常山을 투여한 실험군에서 유의성 시간의 단축을 보였고(Fig. 12), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 常山을 투여한 실험군에서 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데(Fig. 13, 14), 이것으로 常山 투여 후 기억력감퇴가 억제되었음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 常山은 THP-1 cell에서 유전자 수준에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 proinflammatory cytokine의 발현과 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP의 발현을 억제하였고, 세포성 단백질 수준에서 AChE의 활성을 감소시켰으며, scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청 내 uric acid와 AChE를 減少시키고, glucose를 증가시켰으며 Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 記憶力減退를 개선시켰다.

따라서 常山은 microglial cell의 proinflammtory cytokine의 과다발현, APP의 과다생성, AChE의 과잉 활성화로 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ 結 論

常山이 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 常山은 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 發顯을 抑制하였다.

2. 常山은 THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-

α mRNA의 發顯을 抑制하였다.

3. 常山은 PC-12 cell의 세포성 단백질에서 AChE의 활성을 유의성 있게 抑制하였다.

4. 常山은 scopolamine으로 誘導된 기억력감퇴 白鼠의 혈청내에서 유의성 있는 glucose의 증가, uric acid를 감소, AChE 활성을 억제하였다.
5. 常山은 scopolamine으로 誘導된 기억력감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance move met-through latency 측정에서 유의성 있게 기억력감퇴를 개선시켰다.

이상의 결과로 보아 常山은 IL-1β, IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 발현과 AChE의 활성을 억제하여 AD의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 이부영 역. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:일조각. 1998:63～6.
2. 김명호. 치매(Dementia)의 정의와 분류. 대한신경과학회지. 1985;3(1):1～4.
3. 박종한. 치매의 원인과 치료. 대한정신약물학회지. 1992;3(1):33～40.
4. 이광우 편저. 임상신경학. 서울:범문사. 2003:203～15.
5. Bierer L. M, Haroutunian V., Gabriel S., Knott P. J., Carlin L. S., Purohit D. P., Perl D., Dchmeridler J., Kanof P., and Davis K.L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. J. Neurochem. 1995:64, 749～60.
6. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L. Cellular signaling roles of TGFβ, TNF α and βAPP in brain injury responses and Alzheimer's disease. Brain ResRev. 1997;23:47～61.
7. Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P. Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β/A4 amyloid precyrsor protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:3055～9.
9. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371～8.
9. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1～4.
10. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584～9.
11. Almeida OP. Treatment of Alzheimer's disease ; critical evaluation of the use of anticholinesterase. Arq Neuropsiquiatr. 1998;56(3B):688～96.
12. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610～1.
13. 王肯堂. 證治準繩. 서울:鼎談出版社. 1992:306～7.
14. 楊思澎 외. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:224～30.
15. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242～51, 784～91.
16. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1992:.549～50.
17. 孫星衍. 神農本草經. 北京:人民衛生出版社. 1982:105.
18. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107～12.
19. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Br

adford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302～8.
20. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177～9.
21. Geldmacher DS. Cost-effective recognition and diagnosis of dementia. Semin Neurol, Mar. 2002;22(1):63～70.
22. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87～8, 465～7, 514～8, 600.
23. 裵昨星. 老人性 痴呆에 關한 體質學的 硏究. 大韓韓醫學會誌. 1992;13(2):101～6.
24. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:東洋醫學硏究院. 1991:1180.
25. 한일우 외. Alzheimer병의 증상. 계명의대논문집. 1997;16(3):339～47.
26. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222～5, 233～5.
27. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
28. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:68～70, 79～96, 134～7, 174～5, 241～3.
29. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982:129～35, 534, 545, 550.
30. 龔 信. 古今醫鑑. 江西:江西科學技術出版社. 1990:193～4.
31. Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol, 54.
32. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutunian V, DeMarco L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E : Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains. J Neurogenet. 1998;12(1):55～65.
33. Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (Ⅱ) to copper(Ⅰ). Science. 1996;271(1):1406～9.
34. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gems a D, Weber E. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. J Immunol. 1983;129(6):2413～9.
35. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999;19(9):3440～7.
36. Sramek JJ, Frackiewicz EJ, Cutler NR. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. Expert Opin Investig Drugs. 2000;9(10):2393～402.
37. Raskind MA, Sadowsky CH, Sigmund WR, Beitler PJ. Auster SB. Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. Arch Neurol. 1997;54(7):836～40.
38. Rupniak NM, Tye SJ, Field MJ. Enhanced performance of spatial and visual recognition memory tasks by the selective acetylcholinesterase inhibitor E2020 in rhesus monkeys. Psychopharmacology(Berl). 1997;131(4):406～10.
39. Cheng DH, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. Pharmacol Biochem Behav. 1998:60(2):377～86.