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

木瓜가 CT105와 βA로 誘導된 Alzheimer's Disease病態 모델에 미치는 影響

김명진, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of Chaenomelis fructus,(CMF) Extract on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT-105 and βA

Myung-Jin Kim, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental NeuropsychiatryCollege of Oriental Medicine, Daejeon University

ABSTRACT

This research investigates the effect of the Chaenomelis fructus(CMF) on Alzheimer's disease.

Specifically, the effects of the CMF extract on (1) IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA of PC-12 cells treated with LPS; (2) amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), and glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cells treated with CT-105; (3) the AChE activity and the APP production of PC-12 cell treated with CT-105; (4) the behavior of AD mice with βA; (5) expression of IL-1β, TNF-α, MDA, IL-1β mRNA, TNF-α mRNA, and ROS; (6) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

The results were summarized as follows ;

1. The CMF extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA in THP-1 cells trea ted with LPS.
2. The CMF extract suppressed the expression of APP, AChE, and GFAP mRNA in PC-12 cells treat ed with CT-105.
3. The CMF extract suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT-105.
4. A significant inhibitory effect on the memory deficit was shown on the CMF extract group of the mice with Alzheimer's disease induced by βA in the Morris water maze experiment, which measu red stop-through latency, and distance movement-through latency.
5. The CMF extract suppressed the over-expression of IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, IL-1β mR NA, TNF-α mRNA, CD68/GFAP, and ROS in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
6. The CMF extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tiss ue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

These results suggest that the CMF extract may be effective for the treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the CMF extract for Alzheimer's diseaseis suggested for future research.

Key Words : Chaenomelis fructus, Alzheimer's diseaseis

◆ 투고 : 5/19 채택 : 6/9
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

Alzheimer's Disease(AD)는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 老人癡(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며[1], 증상으로는 기억력 저하, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제 장애 또는 인격의 변화 등을 보인다[2].

AD는 βA(β amyloid peptide), estrogen, apolipoprotein E, PS(presenilin), oxidants(free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[3,4], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설로 PS 유전자들의 돌연변이와 APP(amyloid precursor proteins)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 老人癡의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이있고[5], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상에 대해서는 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어[6], acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[7,8].

한의학에서 痴呆는 《石室秘錄》[2],《辨證奇門》[9]에 "呆病"으로, 《景岳全書·癲狂癡獸》[10]에서 "癡獸"으로 언급되었으며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있는데 [2,9~11], 木瓜는 性味는 酸, 溫, 無毒하고 肺, 脾, 肝, 腎經에 歸하며 舒筋活絡, 和胃化濕, 降痰利水, 益筋主血, 調和氣滯, 固氣脫의 효능[12,13]이 있어 痰으로 인한 AD에 응용할 수 있을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 木瓜의 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木瓜와 CT-105의 세포독성을 mLFC(mouse lung fibroblast cells)와 PC-12 세포주에서 관찰하고, LPS(lipopolysacchride)를 처리한 THP-1 세포주에서 proinflammatory cytokines의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE(acetylcholinesterase), GFAP(glial fibrillary acidic protein) 유전자 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 proinflammatory cytokines, 지질과산화도(MDA)와 CD68/GFAP의 발현, ROS(reactive oxygen species)의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, lipopolysacchride(LPS), triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), leupetin, N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), $_{DL}$-dithiothreitol (DTT), diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)는 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRas사(Japan) 제품을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzol^{B}는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, β-amyloid peptide (Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1β와 anti-TNF-α(Pharmingen, U.S.A.),

그리고 anti-CD44-PE(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, Korea), Rotary evaporator(Büchi, Switzerland), Freeze dryer(EYELA, Japen), histidin affinity column(Invitrogen, U.S.A.), Windows 1D main program(AAB, U.S.A.), stereotaxic frame(Adamec, U.S.A.), Cellection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), brain matrix(ASI instruments, Warren, MI., U.S.A.), Primus 96 thermocycler system(Biotech., Germany), ice-maker (비전과학, Korea), ELISA leader(Molecular devise, U.S.A.), CO_2 incubator(Lepco, U.S.A.), Cytometry(BD, U.S.A.), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome(Serotec, U.S.A.), animal and human being behaviour a nalysis system(VIDEOTRACK, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A)등을 사용하였다.

2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6 생쥐와 BALB/c 생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이라, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 木瓜(Chaenomelis fructus, CMF)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

4) 검액의 조제

木瓜 200g에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer 냉동고(-84℃)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포 배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640{containing collagenase A(5㎎/㎖)와 DNase type Ⅰ(0.15㎎/㎖), antibiotics(penicillinm 10^4U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리한 후 RPMI1640-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI1640-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

PC-12(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721) 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였고, THP-1 세포주는 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin(100U/㎖), streptomycin(100㎍/㎖) 그리고 10㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO_2인 37℃ 배양기에서 배양하였다.

(2) CT-105 복제

CT-105를 *E. coli*에서 발현 정제하기 위해 APP 105 아미노산을 coding하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open

reading frame이 맞도록 *Bam* HI site를 넣어주었다. PC-12 세포를 LPS로 자극하고 유전자를 추출하여 reverse transcription- polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다. 증폭된 절편을 *Bam* HI로 절단하여 insert를 취해 6×his·tag을 갖는 pRSET B vector의 *Bam* HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 *E. coli* BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 *E. coli*를 획득하였다. 이 *E. coli*는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트려 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidin affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT-105를 얻었다.

(3) βA(1～40)

βA는 AD 질환자의 뇌에서 senile plaques와 diffuse deposits를 주로 유도하는 것으로 알려져 있다[5]. Calbiochem 사에서 공급받아 AD 병태 생쥐모델을 만들었고, 그 아미노산 배열은 다음과 같다(Fig. 1).

H-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH

Fig. 1. Sequence of βA(1～40).

(4) 세포독성(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay[14]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 자란 것을 Trysin- EDTA용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0 x 10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 木瓜 추출물(최종 농도 400 ㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)과 CT-105(최종 농도 80μM, 40μM, 20μM, 10μM, 5μM, 1μM)를 72간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한, 다음 공기중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA leader로 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) PC-12 세포주와 THP-1 세포주에서의 유전자발현 분석

(1) PC-12 세포주에서의 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10^6세포를 각각 분주하고 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 木瓜 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖과 1㎍/㎖)의 농도로 첨가하고, 1시간 후 CT-105(20μM)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 처리하고 5시간 동안 동시 배양하였다.

(2) THP-1 세포주에서의 약물처리

THP-1 세포주에 LPS(2㎍/㎖)을 동시 처리하여 proinflammatory cytokines을 유발시켰다. 木瓜 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.

3) 유전자 발현 분석

(1) RNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주에 木瓜 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖과 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM), rIL-1β(100ng/㎖)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol[B] 500㎕를 넣고 lysis될 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 회수하

여 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 DEPC를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) RT-PCR

Reverse transcription 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(150mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 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 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system를 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1β, IL-6, TNF-α, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH를 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 MgCl2), 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 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

ⓐ Human IL-1β
sence oligonucleotide :
5′-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3′
antisence oligonucleotide :
5′-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3′

ⓑ Human IL-6
sence oligonucleotide :
5′-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3′
antisence oligonucleotide :
5′-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3′

ⓒ Human 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 측

정하였다.

4) PC-12 세포주의 AChE activity 측정 및 western blot 분석

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 木瓜 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖, 0.1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE activity를 측정다. 세포성 lysate를 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM; pH 8.0), 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 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법[15]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) AChE activity 측정

세포성 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2㎖과 혼합하였다. 각 tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 incubation시킨 후 ELISA leader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(3) APP의 western blot 분석

세포 lysate(50㎍)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후 anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4℃에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

5) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10μM)를 Hippocampus에 주입하는 데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽) 1.2㎜, midline에서 right로 0.7㎜, 그리고 표면에서 깊이 1.1㎜로 microinjector의 injection speed 0.1㎕/min와 total volume 0.5㎕의 조건으로 수행하였다. βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2주 후, tacrine 투여군(10㎎/㎏)과 실험군(284㎎/㎏)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

② AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주간 木瓜를 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다.

선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, tacrine 투여군, 실험군(284㎎/㎏)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

훈련과 木瓜를 투여후 4주와 8주 후에 AD 유발생쥐를 Morris water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 관찰하고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2)



6) βA에 의한 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체를 이용한 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 木瓜 추출물(284 ㎎/㎏) 투여가 종료된 AD 병태 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다.

배양 후 PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 CELLection^{TM} Pan anti-mouse IgG-beads로 $CD14^{+}$ cell을 분리한 후 cell release buffer로 microglial cell만 포집하였다.

(2) Microglial cell내 proinflammatory cytokines 분석

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284㎕와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1β와 FITC-anti-TNF-α를 30분간 얼음에서 배양하였다.

배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 microglial cell내 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 유세포형광 분석기로 CellQuest 프로그램을 이용하여 분석하였다.

(3) Microglial cell내 뇌조직의 ROS 분석

Microglial cell에 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA) 50μM을 처리한 후 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 cell내 형광 ROS를 측정하였다.

(4) 뇌세포내 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[16]에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200㎕를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225㎕를 가하여 5초 동안 vortex mixer로 mixing했다. 20% acetic acid 1.5㎖을 가하고 그리고 75㎕ 증류수를 넣고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing했다. 1.2% thiobarbituric acid solution.을 각각의 1㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 532nm에서 흡광도를 측정한다

(5) 뇌세포내 CD11b/CD44, CD68/GFAP 분석

AD 유발 생쥐의 뇌조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1㎎/㎖(in 2% FBS+RPMI1640)을 넣고 37℃ shaker (1800rpm, 20) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복한다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다.

분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD44, FITC-anti-GFAP, FITC-anti-CD68, FITC-anti-CD11b을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD44, 그리고 CD68/GFAP 세포수를 분석하였다.

(6) 뇌세포내 RT-PCR

적출한 뇌조직을 조직분쇄기로 우측 뇌조직(1g)과 RNAzol^{B} 1000㎕를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 100㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 300㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 300㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용

하였고, 실험방법은 상기내용과 동일하게 수행하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

ⓐ Mouse IL-1β

sence oligonucleotide :

5′-GCAACTGTTCCTGAACTCA-3′

antisence oligonucleotide :

5′-CTCGGAGCCTGTAGTGCAG-3′

ⓑ Mouse TNF-α

sence oligonucleotide :

5′-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3′

antisence oligonucleotide :

5′-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3′

ⓒ Mouse β-actin

sence oligonucleotide :

5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′

antisence oligonucleotide :

5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′

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

7) βA에 의한 허혈 및 조직손상에 미치는 영향 측정

(1) 뇌조직의 허혈 크기 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 brain matrix를 이용하여 2㎜의 두께로 자르고 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다.

TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법[17]으로 수행하였다.

허혈의 크기(AT)는 [(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]이고, A는 사진상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2㎜)의 전체 면적. BH는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다.

(2) 병리조직 관찰

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정하여 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학현미경상에서 관찰하였다.

8) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법[17]을 이용하여 통계처리하였고, $p<0.05$수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ 成 績

1. 木瓜와 CT-105의 세포독성

1) mLFC와 PC-12 세포주에서 木瓜의 세포독성

木瓜의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군에서는 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 64.3±5.1(%), 76.4±3.2(%)로 감소되었으며, PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 71.1±5.0(%), 78.1±3.7(%)로 감소되었다(Fig. 3).

1

인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 15(Ht), 78(Ht), 117(Ht)으로 모두에서 억제되었고(Fig. 5), IL-6 유전자 발현에 있어서는 실험군이 186(Ht)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 16(Ht), 94(Ht), 138(Ht)으로 나타나 모두에서 억제되었으며(Fig. 6), TNF-α 유전자 발현에 있어서는 대조군이 162(Ht)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 15(Ht), 140(Ht), 138(Ht)으로 나타나 모두에서 억제되었다(Fig. 7).

2) PC-12 세포주에 대한 CT-105의 세포독성

CT-105를 PC-12 세포주에 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT-105 투여군은 변화가 없었고, 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타냈다(Fig. 4).

1

2. THP-1 세포의 proinflammatory cytokines 유전자 발현 억제효과

IL-1β 유전자 발현에 있어서 대조군이 163(Ht)

3. PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 141(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 11(Ht), 55(Ht), 112(Ht)으로 나타나 100㎍/㎖과 10㎍/㎖에서 발현이 억제되었고(Fig. 8), AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 143(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 25(Ht), 34(Ht), 46(Ht)으로 나타나 발현이 억제되었으며(Fig. 9), GFAP 유전자 발현은 대조군이 188(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 각각 12(Ht), 18(Ht), 29(Ht)으로 나타나 발현이 억제되었다(Fig. 10).

4. PC-12 세포주의 AChE activity와 APP의 발현 억제효과

1) AChE activity 억제 효과

PC-12 세포주에서의 AChE activity를 측정한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 100.0±4.4(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木瓜 실험군은 각각 16.5±4.8(%), 38.7±4.3(%), 51.5±5.3(%)로 유의성 있는 AChE activity 억제

효과를 보였다(Fig. 11).

12

2) APP의 발현 억제효과

PC-12 세포주에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 木瓜 실험군에서 발현이 억제되었다(Fig. 12).

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

木瓜 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.4±6.9(sec.), 31.3±6.5(sec.)로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 13).

100

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

약물 투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과 실험군은 4주 후 705±114(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 378±59(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 14)

2(

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 미치는 효과

1) Microglial 세포에서

① 세포내 IL-1β 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1β 발현을 관찰한 결과, 대조군이 78.4±6.5(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 59.4±4.3(%), 실험군은 34.6±4.0(%)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 15).

② 세포내 TNF-α 발현 억제 효과

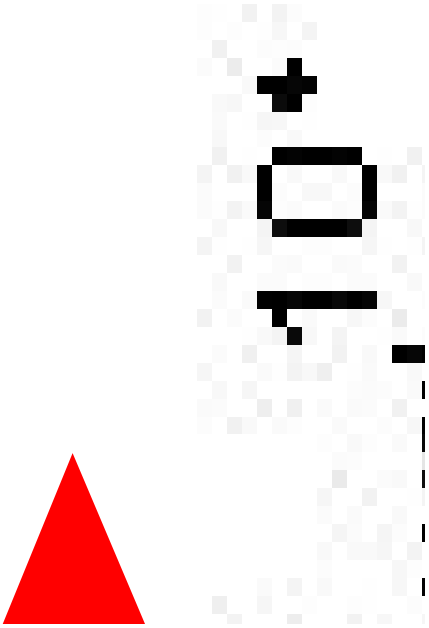
Microglial cell에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과, 대조군이 94.5±6.7(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 80.5±5.2(%), 실험군은 70.5±5.7(%)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 16).

③ 지질과산화도 측정(MDA측정)

생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, 대조군이 56.8±6.77(pg/mg), Tacrine을 투여한 양성대조군이 25.1±3.8(pg/mg), 실험군은 28.8±5.2(pg/mg)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 17).

2) 뇌조직에서의 IL-1β와 TNF-α 유전자 발현 억제 효과

생쥐의 병변 뇌조직에서 IL-1β,와 TNF-α의 유전자 발현을 관찰한 결과, IL-1β의 유전자 발현은 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 감소했고, TNF-α의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 감소했다(Fig. 18).



3) CD68/GFAP 발현 세포수 분석

생쥐의 병변 뇌조직에서 CD68/GFAP이 발현된 세포수를 관찰한 결과 정상군은 2.30(%), 대조군은 7.58(%)이었고, 양성대조군인 tacrine 투여군은 4.08(%)이었으며, 실험군은 4.21(%)로 대조군에 비하여 감소한 것으로 나타났다(Fig. 19).

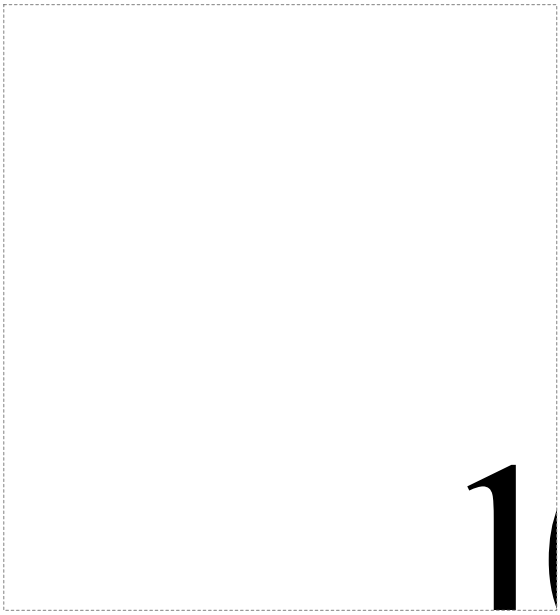
4) ROS 발현 억제 효과

Microglial cell에서 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 실험군에서는 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 20).

7. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

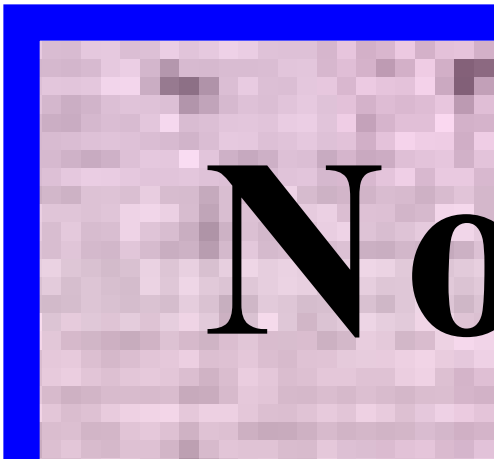
1) 허혈상태에 미치는 효과

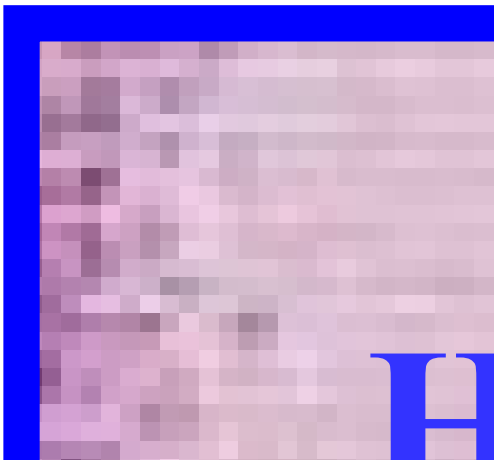
AD 병태 생쥐 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과 대조군에서 虛血의 크기가 커진 것에 비해 실험군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 21, 22).



2) 조직손상에 미치는 효과

생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, 대조군에서는 Hippocampus에서의 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum이 유도되고, oligodendrocytes-like cells와 astrocytes-like cells이 강하게 나타남을 볼 수 있었으나, 실험군에서는 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 23, 24).





Ⅳ 考 察

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 지능저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며[1,18], 높은 유병율과 사망률의 문제 뿐 아니라 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래하는데[19], 근래들어 생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명이 크게 연장되어 노년기 치매는 점차 증가 추세에 있어 커다란 사회문제로 대두되고 있다[20].

痴呆를 야기하는 원인질환은 뇌의 퇴행성 변화, 뇌혈관장애, 뇌의 염증성장애, 대사성질환, 내분비질환, 외상, 그 외 약물이나 알코올중독 등이며[1,21] 이 중 뇌의 퇴행성 변화에 의한 AD와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 痴呆 그리고 양자가 혼재된 혼합형 痴呆가 많은 비율을 차지하고 있다[22]

AD는 1907년 Alois Alzheimer에 의해 최초로 언급되었는데[23], 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며[1], 증상으로는 병의 초기부터 기억력 저하가 나타나며, 최근의 기억에 대한 손상이 더욱 크며, 상대적으로 오래된 기억은 보존되는 경향이 있다. 병이 진행되면서, 점차 기억력의 손실, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화가 나타나는데[2], 구체적으로 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 지남력 감퇴, 정서불안정, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며[24], 마지막 단계에서 환자들은 침상에서만 생활하다가 폐염, 욕창, 패혈증 등에 의해 생을 마감하게 된다[25]. 생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고되고 있으며, 보편적으로 동양보다 서양에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 빈발하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 질환에 이환되는 것으로 역학적 조사에 의해 보고되어 있다[25]

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는 데[3,4], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[5].

최근에는 APP의 일부분인 CT-105가 βA보다 더 독성이 있다는 보고와[26], βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[27], βA와 CT-105의 독성기전에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다[28].

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[4], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 증거를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[7,8] .

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[29]과 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[30]이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[31].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokines에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물

리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 Blood Brain Barrier가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 proinflammatory cytokines들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[32].

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를 들 수 있는데, AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이며 이는 신경교세포인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 노인반 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다[33].

한의학에서 痴呆는 《石室秘錄》[2], 《辨證奇門》[9]에서 "呆病으로, "《景岳全書·癲狂癡獃》[10]에 "癡獃"으로 언급되었으며, 內經[34]과 歷代醫書[11,35]에서 기억력저하의 증상 면에서 健忘과 유사한 점을 찾을 수 있다.

현재 痴呆는 呆病과 健忘을 근거로 변증되며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있고[2,9~11], 증상은 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 등이고, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다[11,35,37].

木瓜는 장미과에 속한 낙엽관목인 모과나무와 명자꽃의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 性味는 酸, 溫, 無毒하고 肺, 脾, 肝, 腎經에 歸하며 舒筋活絡, 和胃化濕, 降痰利水, 益筋主血, 調和氣滯, 固氣脫의 효능[12,13]이 있어 痰으로인한 AD에 응용할 수 있을 것으로 思料되었다.

이에 저자는 木瓜가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木瓜와 CT-105의 세포독성을 mLFC와 PC-12 세포주에서 관찰하고, LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 proinflammatory cytokines의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현과 세포성 단백질에서의 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 proinflammatory cytokines과 CD68/GFAP의 발현, ROS의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(木瓜)와 처리물질(CT-105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 木瓜를 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군에서는 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 64.3±5.1(%), 76.4±3.2(%)로 감소되었으며, PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군은 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 71.1±5.0(%), 78.1±3.7(%)로 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 100㎍/㎖이하의 농도로 木瓜를 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 세포독성이 나타나지 않아 생존율이 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 주로 100㎍/㎖이하의 木瓜를 사용하기로 하였다.

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT-105 투여군은 변화가 없었고, 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타내어(Fig. 4), 이후 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 20μM 농도의 CT-105를 주로 처리하기로 하였다.

THP-1 cell에서 발현된 proinflammatory cytokines 중, IL-1β 유전자는 LPS만을 투여한 대조군에 비해 木瓜를 투여한 실험군 모두에서 발현이 억제되었고(Fig. 5), IL-6 유전자는 LPS만을 투여한 실험군에 비해 木瓜를 투여한 실험

군 모두에서 IL-6 유전자 발현이 억제되었으며(Fig. 6), TNF-α 유전자 역시 LPS만을 투여한 대조군보다 木瓜를 투여한 실험군의 발현이 억제되었다(Fig. 7).

PC-12 세포주의 APP, GFAP 유전자 발현을 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖의 木瓜를 함께 투여한 실험군에서 발현이 억제되었고(Fig. 8, 10), AChE 유전자 발현은 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 실험군은 木瓜의 농도에 관계없이 발현이 억제되었음을 볼 수 있었다(Fig. 9).

PC-12 세포주 세포성단백질에서 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20μM의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 뒤 서로 다른 농도의 木瓜를 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도는 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 100.0±4.4(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木瓜실험군은 각각 16.5±4.8(%), 38.7±4.3(%), 51.5±5.3(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제 효과를 보였다(Fig. 11).

APP는 Western blot을 통해 측정하였는데, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 木瓜를 함께 투여한 실험군에서 억제 효과를 보였다(Fig. 12).

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로[37], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 木瓜의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

木瓜 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.4±6.9(sec), 31.3±6.5(sec)로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여(Fig. 13), 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement - through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 실험군은 4주후 705±114(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 378±59(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 유의한 운동량 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 14).

βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 병변 뇌조직에서의 proinflammatory cytokines, MDA, CD68/GFAP 및 ROS 발현을 관찰하였다. 먼저 병변 뇌조직에서의 proinflammatory cytokines의 일종인 IL-1β 생산량과 IL-1β의 유전자 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 증가되었으나 실험군에서는 그 발현이 현저히 감소했고(Fig. 15, 18), TNF-α 단백질과 TNF-α의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 16, 18).

이는 木瓜가 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 효과적으로 억제한 것으로, 木瓜의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokines으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 AD 병태 생쥐 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정한 결과 대조군에 비해 木瓜를 투여한 실험군에서 유의하게 감소하였음을 볼 수 있다(Fig. 17).

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌 부분에는 뉴론, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglia 등이 많이 沈積된 특징을 나타낸다[38].

이러한 병변 부위는 plaques과 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 microtubuleassociated protein 2(MAP2), GFAP, CD11b, CD68, βA-protein 또는 tau 단백질 등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuronal, astrocytic, macrophage 그리고 microglial differentiation 등의 세포들은 표지인자(MAP2, GFAP, CD11b and CD68)를 사용

하여 확인될 수 있고 염증유발 싸이토카인(IL-1β, TNF-α) 그리고 ROS도 높은 농도로 蓄積되어 있다[39].

이러한 배경으로 AD 유발 생쥐의 병변부분의 astrocyte와 microglial cell수를 측정하기 위하여 두세포의 표면 표지인자인 CD68/GFAP를 관찰한 바 대조군에 비하여 실험군에서 현저하게 CD68/GFAP 세포수 감소된 결과를 얻었다(Fig. 19). 이는 木瓜가 AD 유발 생쥐의 뇌 병변부위에 존재했던 염증세포수를 크게 감소시켜 뇌세포를 정상으로 회복하도록 한 것으로 사료된다.

그리고 염증유발 관련 대식세포 수와 lymphocytes수를 관찰하기 위하여 CD11b/CD44 세포수를 관찰하였으나, 병변 부위에서 유세포형광분석기로 분석할 정도의 세포를 얻지 못하여 관찰할 수가 없었다.

βA가 沈積된 老人癡 주변에서는 활성화된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 외부자극인자들에 의하여 활성화된 microglial cell이 IL-1β 및 TNF-α 등의 proinflammatory cytokines을 생산하며, 이들 proinflammatory cytokines은 성상세포를 활성화시켜 이산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하고 있는 ROS의 일종인 peroxynitrite으로 유도되어 신경세포사를 야기시킨다고 알려져 있어[40], βA와 proinflammatory cytokines의 상관성이 주목되고 있다[41].

이에 microglial cell 내에서의 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 실험군에서는 ROS의 생산이 현저히 억제되었음을 알 수 있는데(Fig. 20), 이것으로 木瓜가 ROS로 매개되는 microglial cell의 활성화를 억제하고 세포내의 과산화 과정을 감소시켜 AD에 대해 예방적 효과가 있으리라 예측된다.

AD 병태 생쥐모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 21, 22), 木瓜가 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 Hippocampus 주위에 정상군과 비교할 때 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus 등이 현저히 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes-like cells과 astrocytes-like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 실험군은 대조군에서 뇌의 hippocampus 주위에 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 현저히 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 23, 24), 이는 木瓜가 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 기전을 억제할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다.

이상의 결과를 종합해 보면 木瓜는 LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 proinflammatory cytokines인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 억제하였고, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP 유전자의 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 억제하였으며, βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델의 뇌세포에서 proinflammatory cytokines인 IL-1β, TNF-α의 발현, MDA와 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현을 모두 억제하였고, CD68/GFAP와 ROS의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 木瓜는 βA의 과다 생성, microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 木瓜의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ 結 論

木瓜가 CT-105+rIL-1β와 βA로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 木瓜는 LPS로 유도된 THP-1 세포주의 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA발현을 억제하였다.

2. 木瓜는 CT-105와 rIL-1β로 유도된 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현을 억제하였다.

3. 木瓜는 CT-105와 rIL-1β로 유도된 PC-12 세포주의 AChE의 activity와 APP 발현을 억제하였다.

4. 木瓜는 βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 있어 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

5. 木瓜는 βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 있어 병변 뇌조직에서의 IL-1β, TNF-α의 발현, MDA와 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현, CD68/GFAP의 발현과 ROS의 생산을 억제하였다.

6. 木瓜는 βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 있어 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 실험결과로 미루어 보아 木瓜는 AD의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 생각되며 향후 실험적 보완 및 임상연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 郭隆璨. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27～31.
2. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
3. Lemere CA · Lopera F · Kosik KS · Lendon CL · Ossa J · Saido TC · Yamaguchi H · Ruiz A · Maritnez A · Madrigal L · Hincapie L · Arango JC · Anthony DC · Koo EH · Goate AM · Selkoe DJ · Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβ 42 deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med. 1996;2(10):1146～50.
4. McGeer EG · McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371～8.
5. 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.
6. Trabace L · Cassano T · Steardo L · Pietra C · Villetti G · Kendrick KM · Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(1):187～94.
7. Kasa P · Papp H · Torok I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinoceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain. Neuroscience. 2000;101(1):89～100.
8. Sramek JJ · Frackiewicz EJ · Cutler NR. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. Expert Opin Investig Drug

s. 2000;9(10):2393～402.
9. 錢鏡湖. 奇問全書. 台北:甘地出版社, 1990:222～5, 233～5.
10. 張介賓. 氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610～1.
11. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378～81.
12. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1991:649～50.
13. 박종철 외. 모과의 성분에 관한 연구. 생약학회지. 1989;20(1):10～2.
14. 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.
15. Zor T・Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302～8.
16. Suematsu, T・Kamada, T・Abe, H・Kikuchi, S・Yagi, K. Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. Clin. Chim. Acta. 1977;79:267～770.
17. Michael LH・Entman ML・Hartley CJ・Youker KA・Zhu J・Hall SR・Hawkins HK・Berens K・Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion; a murine model. Am J Physiol. 1995;269:2147～54.
18. 김지혁 외. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256～71, 327～30.
19. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994:114～32.
20. Butler R.N. geriatric psychiatry. In Kaplan HI, Sadock BJ, eds. Comprehensive textbook of psychiatry V. Baltimore Williams & Wilkins. 1989:2014～9.
21. 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울:고려의학. 1992:225～8, 230～2.
22. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87～8, 465～7, 514～8, 600.
23. 손윤경. Alzheimer병 신경병리학적 소견과 분자생물학적 연구동향. 계명의대논문집. 1997;16(3):323～38.
24. 이광우 외. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199～210.
25. Swash M・Oxbury J. Clinical Neurology. NewYork. 1991;1:120～9.
26. Bryan-Sisneros AA・Fraser SP・Suh YH・Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na+/Ca2+ gradients. Neuroreport. 2000;11(15):3357～60.
27. Breakefield XO・Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1987;1(4):339～71.
28. Kourie JI : Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. Cell Mol Neurobiol, 2001;21(3):173～213.
29. Linert W・Bridge MH・Huber M・Bjugstad KB・Grossman S・Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine ; relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. Biochim Biophys Acta. 1999;1454(2):143～52.
30. 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.
31. Chapman CA・Yeomans JS・Blaha CD・Blackburn JR.. Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental peduncul opontine nucleus. Neuroscience. 1997;76(1):177～86.
32. 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 oxid

e and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999;19(9):3440～7.
33. Fukuyama R・Izumoto T・Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. Eur Neurol. 2001;46(1):35～8.
34. 洪元植. 精校黃帝內經. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:68～70, 79～96, 134～7, 174～5, 217～8, 229, 241～3, 342.
35. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242～51, 784～91.
36. 徐 浩 외. 從痰瘀論治老年期痴呆硏究進展. 浙江中醫雜志. 1996;31(10) :474～5.
37. Yamazaki M・Matsuoka N・Kuratani K・Ohkubo Y・Yamaguchi I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. J Phamacol Exp Ther. 1995;272(1):256～63.
38. Troncoso JC・Sukhov RR・Kawas CH・Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease ; correlations with senile plaques and disease progression. J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55:1134～42.
39. Love S・Barber R・WilcockG.K. Increased poly(ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. Brain. 1999;122:247～53.
40. Pandiella A・Massague J. Multiple signals activate cleavage of membrane transforming growth factor-α precursor. J Biol Chem. 1991;266:5773～96.
41. Kang J・Park EJ・Jou I・Kim JH・Joe EH. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. Neuroreport. 2001;12(7):1449～52.