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

大黃이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

박철환, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of Rheum palmatum(RHP) Extract on the the Alzheimer's Disease Model

Chul-hwan Park, 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 Rheum palmatum(RHP) on the Alzheimer's disease.

The effects of RHP extract on amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by Aβ and IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA of THP-1 celll treated by LPS and AChE activity of PC-12 cell lysate treated by Aβ and behavior of memory deficit rats 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. RHP extract suppressed APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by Aβ .
2. RHP extract suppressed IL-1β, IL-6 TNF-α mRNA in THP-1 celll treated by LPS.
3. RHP extract suppressed AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by Aβ.
4. HP extract increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit rats induced by scopolamine.
5. RHP 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 RHP extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease and memory deficit symptom.

Key Words : Rheum palmatum, Alzheimer's disease

◆ 투고 : 5/19 수정 : 6/11 채택 : 6/13

교신저자 : 이상룡 주소 : 충남 천안시 구성동 476-8 대전대학교 부속 천안한방병원
Tel : 041-560-8781 Fax : 041-553-2225 E-mail : 7575np@dju.ac.kr

Ⅰ 緖 論

치매는 보통 뇌의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 증후군으로, 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습능력, 언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애를 나타낸다[1]. 이 중 Alzheimer's disease(AD)는 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하는 원발성 퇴행성 대뇌질환으로[1,2], 뇌 안에 신경반(neuitic plaque)과 신경섬유다발(neurofibrillary)의 구조가 침착되고, 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되는 병리학적 특징을 가진다[3].

AD의 유발 기전 중[4], 대표적인 것으로 amyloid precursor proteins(APP)의 과다로 인한 amyloid β protein(Aβ)의 과량 침적으로 인해 신경독성을 나타냄으로써 신경세포의 파괴가 일어난다는 가설과[5], 뇌손상, 감염 등에 의해 활성화된 뇌내의 microglial cell과 astrocyte들이 proinflammatory cytokine을 과다하게 발현하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설 등이 있다[6].

한편, AD의 주증상 중 하나인 기억력 감퇴는 choline성 신경세포의 퇴화에 의한 acetylcholine의 부족에 기인하며 이는 acetylcholine의 분해효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 더욱 심화된다고 알려져 있다[7,8].

韓醫學에서 "痴呆"라는 用語는 張[9]의 ≪景岳全書·癲狂痴獃≫에 痴獃라고 한 것이 최초로, 呆病[10,11], 健忘[12,13] 등의 範疇에 속하며 原因은 痰飮, 痰火, 氣滯瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이다[14].

大黃은 瀉下藥으로 蓼科에 속한 다년생 草本인 掌葉大黃의 뿌리를 건조한 것으로, 淸熱除痰, 凉血解毒, 逐瘀通經하는 效能이 있어[15], 痰火, 瘀血 등의 原因으로 발생하는 痴呆에 응용될 수 있겠다고 생각된다.

著者는 大黃이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고, THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 관찰하였고, scopolamine을 처리한 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청 내 glucose, uric acid, AChE를 측정하였으며 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

실험동물은 350~400g 30주령 SD계 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 공급받아 사용하였고, 30g 6주령의 International Cancer Research系 생쥐, 4週齡의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 동물은 실험실 환경(온도 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux)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 하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 大黃(*Rheum palmatum ;* RHP)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

3) 試藥 및 機器

試藥 중 cholinesterase kit, scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde,

polyacrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody (Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1 (Oncogen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2 (Oncogen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab (Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.)과 그 외 試藥들은 특급 및 일급을 사용하였다.

機器는 원심 분리기(한일과학, Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator(녹십자, Korea), Minos-ST(Cobas Co, France), centrifuge(Beckman Co, U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Swissland), Bio-freezer(Sanyo, Japan), deep freezer(Sanyo Co, Japan), freeze dryer(Eyela Co, Japan), autoclave (Hirayama Co, Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co, U.S.A.), roller mixer(Gowon Scientific Technology Co, Korea), vortex(비전과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ELISA reader(molecular devices, U.S.A.), Videotrack(Viewpoint, France) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

大黃 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 동결건조하여 47g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) mLFC와 PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

(1) Mouth lung fibroblast cells(mLFC)와 pheochromocytoma cell line(PC-12 cell)의 배양

mLFC은 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15㎖)에 넣어 1,400rpm으로 5분간 원심 분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37℃, 5% CO_2 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 이를 D-PBS을 넣어 약 2회 1,500rpm으로 원심 분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양하고 이를 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum으로 배양하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정 방법은 SRB assay법[16]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 2.0×10^4개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 大黃 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50㎕를 가하고 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액에 100㎕/per을 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540㎚로 흡광도를 측정하였다.

3) PC-12 cell의 APP, AChE, GFAP mRNA

및 THP-1의 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현 측정

(1) 약물처리

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

THP-1 세포주에 lipopolysacchride(LPS) 2㎍/㎖를 동시 처리하여 proinflammatory cytokine을 유발시켰다. 大黃 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 대황 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2000rpm에서 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 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) RT-PCR

역전사 반응은 준비된 total mRNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성시킨 후 2.5㎕ 10 mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides (25pmole/25㎕), RNA inhibitor로써 1㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1㎕ 100 mM 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(200 U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 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 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1β, IL-6, APP, AChE, GFAP와 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㎕ 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 수행하였다. 각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 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 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 cell 세포성 단백질에서의 AChE activity 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 大黃 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)과 β-amyloid (10μM)를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다.

세포용해액을 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl (200mM; pH 8.0), 200mM 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[17]으로 단백질을 정량하였다.

(2) AChE activity 측정

세포용해액을 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2㎖과 혼합하였다. 각 tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ water bath에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 혈청내 glucose, uric acid, AChE 측정

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

30주령 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, tacrine(10㎎/㎏ p.o)을 경구투여한 양성대조군, 大黃 추출물(100㎎/㎏ p.o)을 10일 동안 경구투여한 실험군으로 하여 각각 scopolamine(1㎎/㎏ i.p)을 7일간 1일 1회 복강 주사하면서 약물을 함께 투여하였다.

(2) Glucose, uric acid의 측정

혈청내 glucose, uric acid의 양은 자동생화학 분석기를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE activity 측정

AChE activity 측정을 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. No. 150-3) 0.2㎖과 serum 0.2㎖을 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution(cat. No.420-2) 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 이후 시간을 정확히 기록하여 25℃ water bath에서 정확히 30분간 방치시킨 후 ELISA reader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 바탕으로 △A = ABLANK - ATEST 公式에 의해 검정선에서 활성도를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 Morris water maze 실험

(1) ICR계 생쥐의 반복 학습 및 약물 투여

ICR계 생쥐 100마리를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 선별을 실시하고 선별된 ICR계 생쥐를 다시 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 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 처치가 없는 대조군, Tacrine(10㎎/㎏ *p.o*)을 경구투여한 양성대조군, 大黃(75㎎/㎏ *p.o*)을 경구투여한 실험군으로 분류하였고 계속 21일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 측정

훈련과 약물 투여가 종료되고 1주 후 ICR계 생쥐에 scopolamine(1㎎/㎏ i.p)을 복강에 처리한

후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 그 결과를 videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법[18]을 이용하였다.

Ⅲ 成 績

1. mLFC와 PC-12 cell에 대한 세포독성

mLFC의 생존율은 대조군이 100±5.1(%)로 나타났고, 실험군의 400㎍/㎖에서 75±5.7, 200㎍/㎖에서 80±6.3(%)로 나타났고 100㎍/㎖이하에서 각각 87±4.5, 90±5.1, 94±3.7, 99±4.6(%)로 나타났으며, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±4.8(%), 실험군의 400㎍/㎖에서 72±5.2(%), 200㎍/㎖에서 84±3.9(%)로 나타났고 100㎍/㎖이하에서 각각 88±5.0, 89±6.1, 93±5.2, 96±4.7(%)로 나타났다(Table Ⅰ).

Group	Concentration (㎍/㎖)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell line
Control	0	100±5.1a)	100±4.8
RHP	1	99±4.6	96±4.7
	10	94±3.7	93±5.2
	50	90±5.1	89±6.1
	100	87±4.5	88±5.0
	200	80±6.3*	84±3.9*
	400	75±5.7***	72±5.2***

Table Ⅰ. Cytotoxicity of RHP Extract on mLFC and PC-12 Cell
a) : Mean ± Standard error.
Control : Non-treatment group.
RHP : Group pretreated with various concentration(1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 250㎍/㎖, 400㎍/㎖) of RHP extract for 48hrs.
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

2. PC-12 cell의 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과

APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 28(Ht)로 나타났고 대조군은 198(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 121(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 162(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 192(Ht)로 나타났다(Fig. 1).

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 171(Ht)로 나타는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 21(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 124(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 109(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 78(Ht)로 나타났고 대조군은 148(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 17(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 127(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 145(Ht)로 나타났다(Fig. 3)

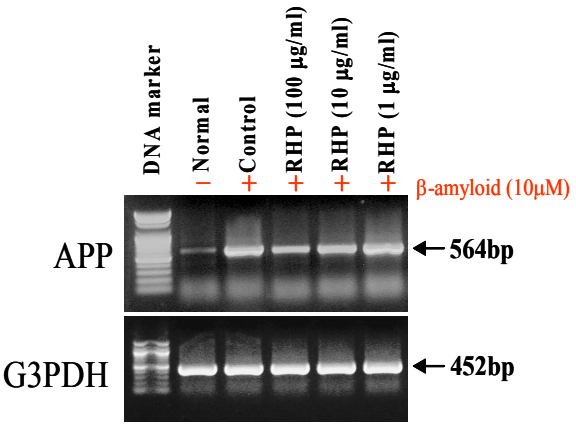


Fig. 1. Inhibitory effects of RHP extract on APP gene mRNA expression in PC-12 cell.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
PC-12 cell line was pretreated with various concentration RHP 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.

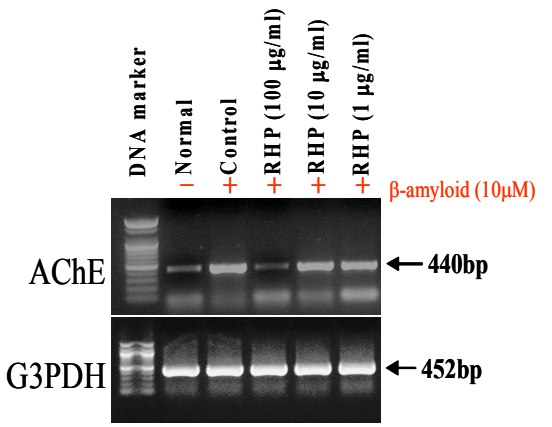


Fig. 2. Inhibitory effects of RHP extract on AChE gene mRNA expression in PC-12 cell.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
PC-12 cell line was pretreated with various concentration RHP 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.

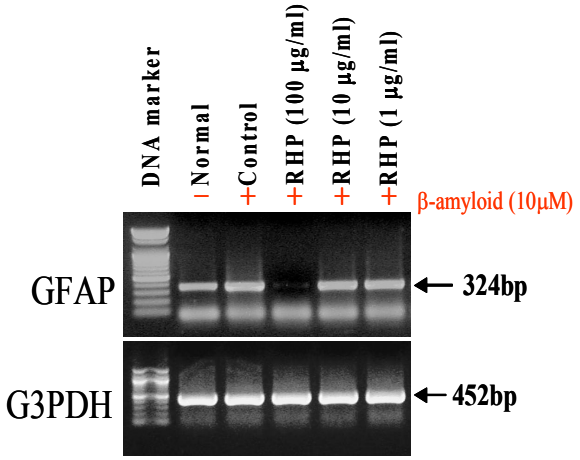


Fig. 3. Inhibitory effects of RHP extract on GFAP gene mRNA expression in PC-12 Cell Line.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
PC-12 cell line was pretreated with various concentration RHP 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 GFAP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell line.

3. THP-1 세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현 억제 효과

IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)로 나타났고 대조군은 197(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 21(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 82(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 164(Ht)로 나타났다(Fig. 4).

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 14(Ht)로 나타났고 대조군은 208(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 101(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 142(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 148(Ht)로 나타났다(Fig. 5).

TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 42(Ht)로 나타났고 대조군은 168(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 18(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 137(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 140(Ht)로 나타났다(Fig. 6)

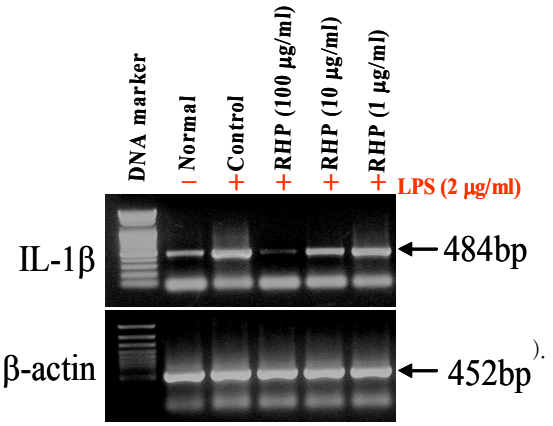


Fig. 4. Inhibitory effects of RHP extract on IL-1β mRNA expression in THP-1 cell line.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
THP-1 cell line was pretreated with various concentration RHP 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 expression were observed IL-1β mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

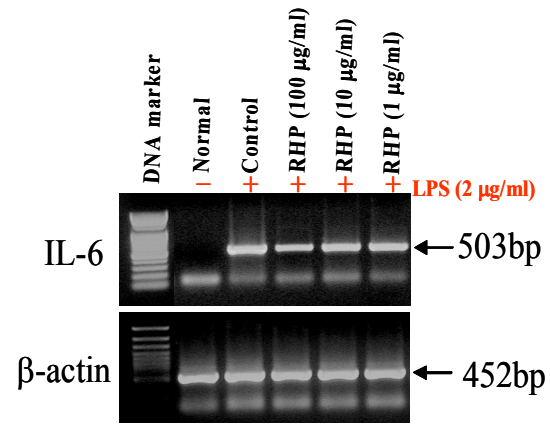


Fig. 5. Inhibitory effects of RHP extract on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
THP-1 cell line was pretreated with various concentration RHP 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.

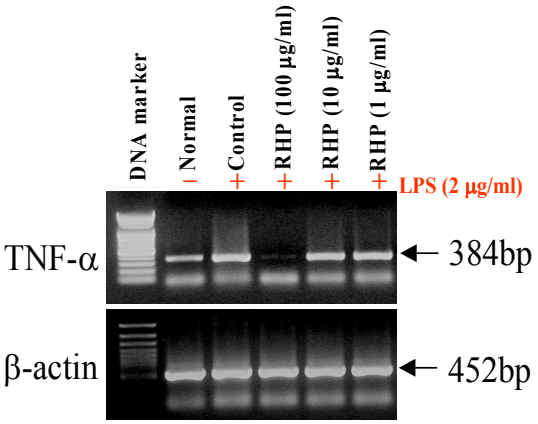


Fig. 6. Inhibitory effects of RHP extract on TNF-α mRNA expression in THP-1 cell.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 2㎍/㎖ LPS for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP extract for 6 hours.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration RHP 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 expression were observed IL-6 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 억제 효과

정상군의 AChE activity는 22.6±4.3(%), 대조군은 100±5.7(%), 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 31.5±5.4(%), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 76.4±6.4(%), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 96.4±7.3(%)로 나타났다(Fig. 7).

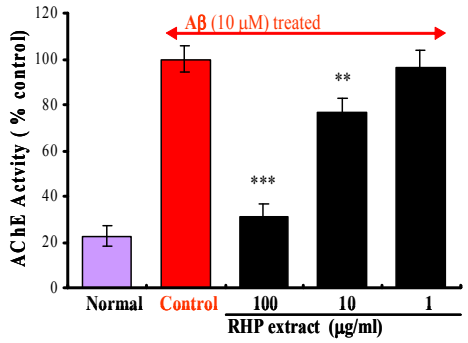


Fig. 7. Inhibitory effects of RHP extract on the AChE activity in PC-12 cell.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour.
RHP Ⅰ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 100㎍/㎖ of RHP extract for 24 hours.
RHP Ⅱ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 10㎍/㎖ of RHP extract for 24 hours.
RHP Ⅲ : Group pretreated with 10μM Aβ for 1 hour and 1㎍/㎖ of RHP 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 RHP extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence Aβ(10μM) for 24 hrs. The lysate(50㎕) were measured using AChE diagnosis kits. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

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

Glucose는 대조군이 56.5±4.2(㎎/㎗)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 61.1±4.8, 80.3±5.9(㎎/㎗)로 상승을 보여 실험군에서 유의성 있는 증가효과를 보였다(Table Ⅱ).

Uric acid는 대조군이 2.54±0.19(㎎/㎗)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 2.06±0.17, 1.83±0.09(㎎/㎗)로 나타나 모두 유의성 있는 감

소효과를 보였다(Table Ⅱ). AChE activity는 대조군이 69.3±5.6(U/㎖)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 31.3±7.1, 38.8±5.3(U/㎖)으로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table Ⅱ).

Group	Glucose (㎎/㎗)	Uric acid (㎎/㎗)	AChE (U/㎖)
Normal	87.8±4.7a)	1.24±0.03	26.7±1.5
Control	56.5±4.2	2.54±0.19	69.3±5.6
Tacrine	61.1±4.8	2.06±0.17*	31.3±7.1***
RHP	80.3±5.9**	1.83±0.09**	38.8±5.3**

Table Ⅱ. Effects of RHP on the Serum Level of Memory Deficit Rats Induced by Scopolamine
a) : Mean ± Standard error.
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*).
RHP : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and RHP extract(75㎎/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 RHP or tacrine and the injection of scopolamine(1㎎/kg *i.p*) continued once a day for 7 days. Hematology change was analyzed as described in *Materials and Methods*.

6. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 기억력감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 測定에서의 記憶力減退 抑制 效果

약물 투여 1주 후 Platform 도달시간(stop-through latency)을 관찰한 결과 대조군이 80.6±13.9(sec)로 나타났고, tacrine 투여군은 15.2±4.0(sec)로 나타났으며, 실험군은 34.1±4.8(sec)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다.(Fig. 8).

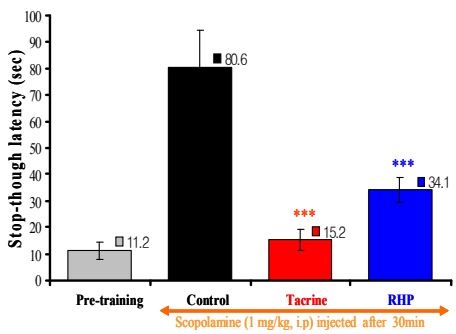


Fig. 8. Effects of RHP on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*).
tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*) and tacrine(10㎎/kg *p.o*).
RHP : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*) and RHP extract(75㎎/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 RHP or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 weeks after orally administered of RHP and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

약물 투여 1주 후 Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1466±153.4(㎝)로 나타났고, tacrine 투여군은 486±34.0(㎝)으로 나타났으며, 실험군은 725±71.4(㎝)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 9, 10).

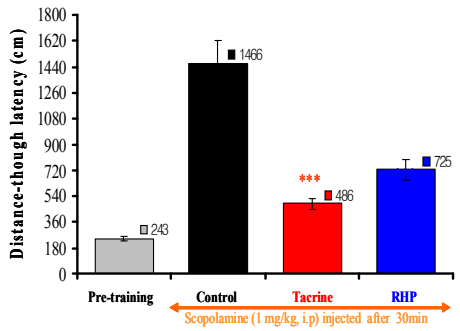


Fig. 9. Effects of RHP on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*) and tacrine(10㎎/kg *p.o*).
RHP : Group treated with scopolamine(1㎎/kg *i.p*) and RHP extract(75㎎/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 RHP or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 week after orally administered of RHP and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

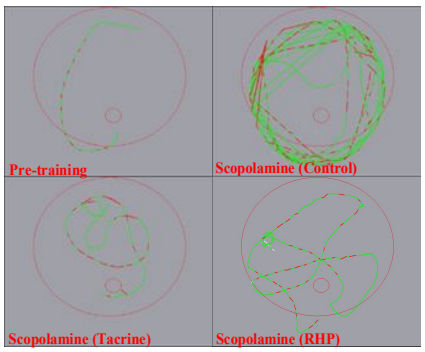


Fig. 10. Photograph on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
RHP : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and RHP extract(75㎎/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 RHP or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 1 week after orally administered of RHP and the retention trial was carried out after 7 days after the acquisition training trial.

Ⅳ 考 察

치매는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 뇌 질환과 같은 병적인 노화로 인한 뇌증후군으로[1], 뇌의 퇴행성 변화에 의한 AD와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매 그리고 兩者가 혼재된 혼합형 치매가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다[1,2].

이처럼 痴呆를 발생하게 하는 대표적인 질환인 AD는[2,19] 1906년 독일의 정신과 의사인 Alzheimer가 初老期 痴呆에 관하여 보고[20]하면서 처음 알려진 것으로, 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 망상, 행동장애 등의 증상을 나타내는[21] 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다[22].

以上과 같이 AD의 유전적, 신경병리적, 신경화학적 기전이 여러 측면에서 밝혀지고 있으며, 그에 따른 치료법도 다각적으로 연구되고 있으나, 아직까지 痴呆를 완치시킬 수 있는 치료방법은 개발되지 못한 실정이다[27]. 그러나 근본 원인에 대한 치료방법은 아니더라도 전달물질 대체요법, 아밀로이드 단백질 대사과정에 영향을 주는 藥物, 항산화제, estrogen, 비스테로이드성 소염제, 성장 인자 등을 이용한 다양한 방법이 시도되고 있다[27]. 특히 전달물질 대체요법에서 감퇴된 cholinergic system를 보충하고 개선하도록 개발된 약물들에는 acetylcholine 합성전구체로 lecithin, 수용체 활성제로 RS-86, nicotine 등이 있으며[28~30], 아세틸콜린 분해억제제(acety1cholinesterase inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용중인 tacrine과 E2020(aricept) 등이 있는데[28~30], tacrine은 30주 정도 투여되었을 때, 투여받는 환자의 20-30%에서 간 효소가 증가되는 부작용이 있어 사용에 논란은 있으나, 인지기능검사, 보호자의 전반적 평가, 삶의 질 척도 상의 개선이 나타나[28,30] 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 치료 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[27,30].

韓醫學에서 '痴呆'라는 用語는 明代 張[9]의 ≪景岳全書·癲狂痴獃≫에 痴獃라고 한 것이 최초이고 呆病[10,11], 健忘[12,13] 등의 範疇에 속하며, 原因은 痰飮, 痰火, 氣滯瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이다[14].

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 등이고, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 言及되고 있다[10,11].

大黃은 蓼科(마디풀과)에 속한 다년생 草本인 掌葉大黃의 뿌리를 건조한 것으로 淸熱除痰, 凉血解毒, 逐瘀通經하는 效能이 있어 積滯腹痛, 癥瘕積聚 등을 治療[15]하며, 痰火, 瘀血 등의 原因으로 발생하는 痴呆에 응용될 수 있겠다고 생각된다.

이에 저자는 大黃이 痴呆에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고, THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 관찰하였으며, scopolamine을 처리한 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청내 glucose, uric acid, AChE를 측정하였으며 역시 scopolamine을 처리한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하였다.

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell를 분리하여 大黃의 세포독성을 측정한 결과 mLFC의 생존율은 실험군의 400, 200㎍/㎖에서 유의성 있는 세포독성이 나타났으며, 100㎍/㎖이하에서 세포독성이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율에서도 실험군의 400, 200㎍/㎖에서 유의성 있는 세포독성이 나타났으며, 100㎍/㎖이하에서 세포독성이 나타나지 않아, 실제 실험에서는 100㎍/㎖ 이하로 실험하였다(Table Ⅰ).

AD를 유발할 수 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 cell에서 관찰한 結果 APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 28(Ht)로 나타났고 대조군은 198(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 121(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 162(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 192(Ht)로 나타났고, AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 171(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 21(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 124(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 109(Ht)로 나타났으며, GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 78(Ht)로 나타났고 대조군은 148(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 17(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 127(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 145(Ht)로 나타났는데(Fig. 1~3), 이를 통하여 大黃이 AD 유발과 관련된 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

THP-1 세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현을 측정한 결과 IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)로 나타났고 대조군은 197(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 21(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 82(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 164(Ht)로 나타났고, IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 14(Ht)로 나타났고 대조군은 208(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 101(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 142(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 148(Ht)로 나타났으며, TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 42(Ht)로 나타났고 대조군은 168(Ht)로 나타났는데 반해, 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 18(Ht), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 137(Ht), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 140(Ht)로 나타는데(Fig. 4~6), 이를 통해 大黃이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

PC-12 cell 細胞性 蛋白質에서의 AChE activity를 측정한 결과 정상군의 AChE activity는 22.6±4.3(%), 대조군은 100±5.7(%), 大黃 100㎍/㎖ 투여군은 31.5±5.4(%), 大黃 10㎍/㎖ 투여군은 76.4±6.4(%), 大黃 1㎍/㎖ 투여군은 96.4±7.3(%)로 나타났는데(Fig. 7), 이를 통해 AChE mRNA 발현 結果와 함께 보면 大黃의 투여로 PC-12 cell의 遺傳子 水準과 細胞性 蛋白質 水準에서 모두 AChE가 억제되었는데, 大黃의 투여가 acetylcholine의 量을 增加시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 誘導된 記憶力 減退를 回復시키는 役割을 하는 것으로 생각되고 있으며[28], uric acid는 核酸 중 purine 鹽基의 최종 代謝産物로[29], AD와 腦血管性 痴呆에서 增加되는 것으로 알려져 있다[30].

이를 토대로 大黃 투여로 나타나는 혈청내의 glucose와 uric acid의 變化를 측정하였는데, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 혈청내 glucose, uric acid에 미치는 효과를 분석한 결과 glucose는 대조군이 56.5±4.2(㎎/㎗)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 61.1±4.8, 80.3±5.9(㎎/㎗)로 상승을 보여 실험군에서 유의성 있는 증가효과를 보였고, uric acid는 대조군이 2.54±0.19(㎎/㎗)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 2.06±0.17, 1.83±0.09(㎎/㎗)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였는데(Table Ⅱ), 이로써 大黃이 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켜 AD를 억제하는 作用이 있음을 알 수 있었다.

血淸內 AChE를 분석한 결과 대조군이 69.3±5.6(U/㎖)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 31.3±7.1, 38.8±5.3(U/㎖)으로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였는데(Table Ⅱ), 이로써 大黃이 PC-12 cell의 遺傳子, 細胞性 蛋白質 水準 뿐만 아니라 血淸 水準에서 역시 AChE의 活性을 억제함으로써, AChE의 과다로 인한 acetylcholine의 作用 低下를 改善하여 記憶力 障碍에 대한 치료효과가 있을 것으로 判斷된

다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력감퇴 억제 효과를 분석한 결과 약물 투여 1주 후 Platform 도달시간(stop-through latency)을 관찰한 결과 대조군이 80.6±13.9(sec)로 나타났고, tacrine 투여군은 15.2±4.0(sec)로 나타났으며, 실험군은 34.1±4.8로 나타나 모두 유의성 있는 단축을 보였으며(Fig. 8), 약물 투여 1주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1466±153.4(㎝)로 나타났고, tacrine 투여군은 486±34.0(㎝)으로 나타났으며, 실험군은 725±71.4(㎝)으로 나타나 유의성 있는 단축을 보였는데(Fig. 9, 10), 이것으로 볼 때 AD에서 나타나는 記憶力 감퇴에 대한 治療劑로써 大黃을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있다.

以上의 내용을 總括해 보면 大黃은 遺傳子 水準에서는 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA 발현을 억제하였고, THP-1 세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현을 억제하였으며, 細胞性 蛋白質 水準에서는 PC-12 cell에서 AChE activity를 억제하였으며, 血淸 水準에서는 血淸內 glucose를 增加시키고 uric acid와 AChE를 減少시키는 것으로 나타났으며, Morris water maze 實驗에서 scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모델의 記憶力 減退를 억제하였다.

따라서 大黃은 proinflammtory cytokine의 過多 發顯, APP의 過多 生成 등으로 인해 惹起될 수 있는 AD에 대한 豫防과 治療 및 AChE의 活性化로 야기되는 記憶力 減退에 대한 治療劑로 活用될 수 있을 것으로 判斷된다.

Ⅴ 結 論

大黃의 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 大黃은 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 發顯을 抑制하였다.
2. 大黃은 THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 發顯을 抑制하였다.
3. 大黃이 PC-12 cell의 細胞性 蛋白質에서 AChE의 活性을 有意性 있게 抑制하였다.
4. 大黃은 scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 생쥐모델의 혈청에서 有意性 있는 glucose의 增加, uric acid의 減少, AChE 活性의 減少를 나타냈다.
5. 大黃은 scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 생쥐모델의 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 有意性 있는 記憶力 改善 效果를 나타냈다.

以上의 結果로 보아 大黃은 APP, AChE, GFAP, IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 발현과 AChE의 活性을 억제하여 AD에 대한 豫防과 治療에 使用될 수 있을 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣. 1994:63～6.
2. 金知赫, 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社.1992:256～71, 327～30.
3. 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.
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. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584～9.
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 Drugs. 2000;9(10):2393～402.
9. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610～1.
10. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
11. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222～5, 233～5.
12. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:37, 124, 196, 229, 217～8, 229.
13. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:68, 342.
14. 朱震亨. 金匱鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:727.
15. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1992:242～4.
16. 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.
17. Zor T・Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302～8.
18. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177～9.
19. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87～8, 465～67, 514～8, 600.
20. 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;9(703):101.
21. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:東洋醫學硏究院. 1991:1180.
22. 한일우 외. Alzheimer병의 증상. 계명의대 논문집. 1997;16(3):339～47.
23. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371～8.
24. 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.
25. Miyazaki H, Murayama T, Ono S, Narita H, Nomura Y. Effects of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-N,N-diethyl-amino)ethoxy]ethanol hydrochloride(T-588), a novel cognitive enhancer, on noradrenaline release in rat cerebral cortical slices. Biochem Pharmacol. 1997;53(9):1263～9.
26. 延炳吉. 치매의 약물요법. 대한의사협회지. 1999;42(10):1010～4.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Chapman CA, Yeomans JS, Blaha CD, Blackburn JR. Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculopontine nucleus. Neuroscience. 1997;76(1):177~86.