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

백서의 기억능력에 대한 釣鉤藤 디클로로메탄분획의 효과

장현호, 류승준, 한원주, 김경열, 류희영*, 김태헌, 류영수, 강형원
원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 춘천한방병원 신경정신과*

The effects of Ramulus et Uncus Uncariae DM fraction on memory enhancing in rats

Hyun Ho Jang, Seung Jun Lyu, Won Ju Han, Kyung Yeol Kim, Heui Yeong Lyu*, Tae Heon Kim, Young Su Lyu, Hyung Won Kang

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
*Dept. of Oriental Neuropsychiatry Medicine, Chuncheon Traditional Medical Hospital

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to estimate the effects of Ramulus et Uncus Uncariae DM fraction on memory enhancing in rats

Methods : We oral administered Ramulus et Uncus Uncariae DM fraction to rats then executed passive avoidance test and observed figure of pyramidal neuron on CA1

Results : Findings from our experiments have shown that REUD(>1mg/100g/㎖) was effective in memorial improvement. and oral administration of REUD(100㎎/100g/㎖) for 2 weeks was found to induced the figure of pyramidal neuron on CA1 in rat hippocampus injured by scopolamine .

Conclusions : As the result of this study, Decrease of memory induced by injection of scopolamine into rat was also attenuted by REUD, based on passive avoidance test. and REUD was found to reduce the activity of AChE and induced about the CA1 in rat hippocampus. Base on these findings, REUD may be beneficial for the treatment of AD.

Key words : Ramulus et Uncus Uncariae, Hippocampus, AD

◆ 투고 : 5/2 채택 : 6/9
* 교신저자 : 강형원, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2762

I 緖 論

치매는 고위 대뇌기능 장애나 진행성 뇌질환에 의해 나타나는 기억력 감퇴, 학습장애, 언어장애, 시공간기능장애, 판단력저하, 행동장애 등의 임상증상을 포괄하는 일종의 만성 진행성 정신 퇴행질환으로써[1], 이러한 치매에는 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머형 치매(이하 AD)와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매 그리고 양자가 혼재된 혼합형 치매가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다[2, 3].

AD의 정확한 병리학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지는 않았으나, 최근에는 AD의 발병원인으로 Aβ의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질(이하 CT105)에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 실제로 CT105를 여러 종류의 세포주에 형질전환시킬 경우 세포독성을 일으키고[4-6], 특히 이러한 CT105의 형질전환시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 관심을 끌고 있다[4]. 더구나 이렇게 CT105가 형질전환된 세포를 실험용 백서의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고됨으로써[6, 7], 실제 in vivo에서도 CT105가 신경독성을 일으킬 가능성이 높다는 것이 입증되어 CT105나 AD의 관련성을 더욱 증명해 주었다.

조구등은 性味가 甘·苦·微寒·無毒하고 효능이 淸熱, 平肝, 熄風, 鎭驚하여 小兒驚, 頭昏目眩 등의 제증상을 치료하고[8-11], 실제 임상에서도 고혈압성 頭昏이나 目眩 및 신경성 두통 등의 치료에 많이 이용될 뿐만 아니라 척수 및 말초신경의 손상에 의한 마비와 뇌졸중 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고되었다[8, 9]. 또 釣鉤藤의 수추출물은 βAPP 과발현에서 신경세포사 억제작용을 갖고 있고[12], 백서에 경구 투여된 에틸아세테이드 분획은 항경련 작용에 도움이 된다는 사실[13]이 증명되었다. 최근에는 장 등[14]의 조구등 디클로로메탄 분획(이하 REUD)이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향에 대한 보고가 있었는데, REUD가 50㎍/㎖ 이상의 농도에서 CT105 발현에 의한 세포사 유도, ROS(reactive oxygen species) 발생 유도, 신경세포의 NO(nitirc oxide)의 생성도, AChE의 효소활성도, 자유기 발생을 유의성 있게 억제하였고, neurite outgrowth 신장을 유도하였음을 보고하였다.

본 연구에서는 여기서 더 나아가 백서의 수동회피테스트를 통한 기억력 개선효과 및 백서 hippocampus CA1 영역의 pyramidal neuron의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II 實 驗

1. 實驗材料

1) 試藥

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovian serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin, lipofectin, (Gibco BRL), MeOH (Merck, Germany), MeOH, dichlorometane, Acethylcholinesterase (AChE), MTT (3-[4,5-dimethiozol-2y-]2,5-diphenytetrazolium bromide), 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Scopolamine, Greiss reagent, sodium nitrite는 Sigma CO.사에서 구입하였고, N′,N-dimethyl formamide는 amresco사(USA), D2DCFDA (2′, 7′-dichlorodihydrofluorescein는 Molecular Probes에서 (USA) 구입하였고 그 외 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기는 CO2 incubator (VS-9108 MS,vision scientific Co.), phase-constrast microscope (Olympus), GEMINI avoidance System (San Diego Instruments, San Diego, CA), evaporator(Elyla, Japon), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Bio-Red, USA) reader 등을 사용하였다.

2) 試料의 調製

REUD 조제 : 본 실험에 사용한 釣鉤藤 2 ㎏을 원광대 군포병원에서 엄선하여 잘게 분쇄한

후 메탄올(MeOH) 수용액 5ℓ를 넣고 2~4회 용매 추출하고 분리된 알콜 추출액을 50~60 mmHg 및 30~40℃의 조건하에서 감압농축기 evaporator로 증발 농축하여 추출액 내의 알콜을 제거하며, 회수된 추출액에 대해서는 동결 건조하여 추출액을 분말상태로 얻었다. 농축액 중에 함유된 불필요한 성분을 정제하기 위하여, 디클로로메탄과 물이 5 : 1 부피비로 혼합되어 있는 혼합액을 1 : 1 부피비로 투입하고 진탕하여 REUD를 얻은 다음, 용매 분획물에 대해서는 동결 건조시켜 분말상태로 45g을 회수하였다. 이와 같이 추출·정제 공정을 수행하여 회수된 디클로로메탄 분획을 사용 전에 미리 1000㎎/㎖ 농도로 희석하여 CT105에 의한 신경세포 상해의 개선효과와 아세틸콜린에스트라제(이하 AChE)의 활성을 저해시키는 효과의 유무를 확인하기 위해 사용하였다.

3) 실험동물의 사육

실험동물은 (주)중앙실험동물에서 분양받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 수컷 백서를 사용하였으며 각 군당 7마리씩 정상군, scopolamine (1㎎/㎏)을 피하투여한 대조군, scopolamine (1㎎/㎏)을 피하투여하고 REUD로 처리한 4개의 실험군으로, 총 6개 군으로 나누었다. 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 사육실 내를 실온 20±2℃, 습도 40~60%로 유지하면서 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였으며 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 實驗方法

1) CT105 플라스미드를 형질전환 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 CT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital의 Center for Neurologic Diseases 소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양받은 치매 유발 유전자 APP695로부터 포유동물세포주인 SK-N-SH cell 내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리한 다음, 이를 TA vector인 pT7 vector에 clonning하여 대장균인 JM109에 형질전환시킨 후, 이 플라스미드를 추출하여 BamH1 / HindIII의 제한효소로 처리하고, 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamHI/HindIII에 삽입하여 clonning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 CT105 플라스미드를 분리함으로써 이뤄졌다. 세포주인 SK-N-SH cell은 서울대학교 암연구소 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하였고, CT105의 플라스미드를 본 실험에서 사용할 세포주를 구축하기 위해 미리 10^3 세포를 6-well plate에 분주하였다. 이를 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀차게 배양한 다음 반응액 A로 CT105 플라스미드 2㎍와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100㎕을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10㎕와 SFM 100㎕을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음, 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5㎖와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37℃, 5% CO_2 incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450㎍/㎖로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 수동 회피 테스트

동물의 인지능력을 확인하기 위한 방법으로 수동회피(Passive avoidance test)를 관찰하는데, 실험기구인 왕복상자는 GEMINI avoidance System (San Diego Instruments, San Diego, CA)의 모델을 바탕으로 크기는 가로×세로×높이가 50×15×40㎝이고, 바닥에 전기 전도성 망이 깔려져 있는 셔틀박스(Shuttle box)는 정도산업(Seoul, Korea)에서 제작하였다. 또한 상자는 간막이문(connecting guillotine door: 10×10㎝)을 사용하여 반으로 나누어 25×15㎝의 방을 2개 만들었다. 각 방에는 20W 전구로 조명할 수 있도록 하였다. 소음이 60dB 이하이고, 조명을 어둡게 한 방에서 실험을 실시하였다. 칸막이로 나누어진

방 2개 중 한쪽(A)에 백서(rat)를 넣고 1500lux의 조명을 켜면서 간막이를 열어주었다. 그러면, 백서는 방안을 여기저기 살피다가 조명이 없는 건너편 방(B)으로 들어가게 되는데, 이 때 자동적으로 간막이가 닫히도록 하였다. 불을 켜면서 간막이가 열릴 때부터 간막이가 닫힐 때까지의 시간을 측정함으로써 도달시간(latency time)을 측정하는데, 이러한 과정을 반복 수행하면 백서는 방 A에서 방 B로 넘어간다. 이와 같은 시도를 계속하여, 백서가 20초 이내에 방 A에서 방 B로 건너가게 되면 훈련과정을 완료하였다. 다시 1일 후에 상기 훈련을 거친 백서를 방 A에 넣고 백서가 방 B로 넘어가면 불이 꺼진 상태에서 방 밑의 스테인레스 망(stainless grid)을 통해 2mA의 전류를 5초 동안 흘려 백서의 발바닥에 쇼크를 주었다. 백서는 어두운 방과 발바닥 쇼크(foot-shock)와의 관계를 기억하게 되며, 24시간 후에 방 A에 넣어주면 조명이 들어와도 방 B에 들어가기를 망설이게 된다. 이때의 도달시간(latency time)을 비교하였다. 인식시행(acquisition trial)이 끝난 후 스코폴아민(scopolamine 1㎎/㎏)을 복강 내로 투여하고 다시 30분 후에 REUD를 백서 체중 100g 당 0.1, 1, 10, 100 ㎎/㎖의 농도로 경구투여하고, 1일 후에 다시 이 백서들을 방 A에 넣고 불을 켜 주었을 때, 방 B로 넘어가기 전까지의 시간을 측정하였는데, 5분을 최대 측정시간으로 하였다.

3) 조직 염색분석법

각 군은 group당 무게 200g의 백서를 6마리로 하여 정상군(NOR), 스코폴아민(scopolamine 1㎎/㎏)을 복강내로 투여한 대조군, 그리고 대조군에 REUD를 100㎎/100g/㎖의 농도로 14일 동안 경구 투여한 실험군으로 하고, 백서 신경조직세포의 세포사에 대한 억제능력을 파악할 목적으로 14일 후 ketamin과 xylazine으로 마취하고 streotaxic frame (Stereo, U.S.A)에 고정한 후 백서 뇌의 피부를 박리하였다. 두개골을 개복하고 brain을 적출한 후 PBS로 2회 세척한 다음 Brain의 해마부분을 절단하고, 이를 4% formalin에 넣고 고정한 후 paraffin으로 포매하고 blocker를 제작하고 microtome으로 5㎛ 두께로 절단한 후 paraffin을 제거하기 위해 xylene에 30분간 유지 후 탈수과정으로 100%, 95%, 75%의 알콜에 각각 5분씩 담가둔 다음, dorsal hippocampus를 포함하는 조직을 crystal violet에 10분간 염색하여 dorsal hippocampus CA1 중 가장 세포사에 손상이 받기 쉬운 middle zone의 400㎛ 길이에서 신경 세포수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 광학현미경으로 ×200에서 동일시야 내 CA1 영역의 정상 pyramidal cell의 수를 측정하였다.

4) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±S.E로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 $p<0.05$를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

Ⅲ 成 績

1. REUD가 수동회피테스트를 통해 백서의 기억개선에 미치는 영향

신경세포의 세포사는 인지능력에 영향을 주기 때문에 scopolamine을 투여한 쥐에서 신경이 손상을 입을시 신경세포의 세포사는 결국 기억감퇴를 유도한다. Fig. 1에서처럼 백서에 REUD의 경구투여로 인한 기억개선효과를 알아보기 위해 백서 무게 100g 당 0.1, 1, 10, 100 ㎎/㎖ 농도의 REUD를 투여한 결과, 정상군에서는 기억개선효과가 267±25 sec, 대조군은 25±2 sec이고 REUD 처리군의 경우는 각각 27±1, 52±1, 53±2, 64±1 sec의 값을 얻었는데, 이는 경구내로 1회 투여한 군에서 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과들로 보아 REUD는 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 분해를 막아 농도를 유지시켜, 치매질환과 같은 증상에서 나타나는 감퇴된 기억력을 증진시켜주

는 효과가 있음을 알 수 있었다. 1㎎/㎖ 이상의 농도에서 기억개선효과에 대한 유의성이 $P<0.05$ 범위 내에서 있었다.

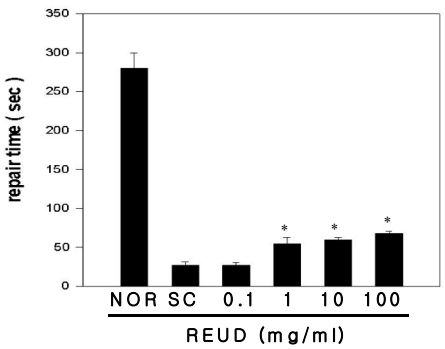


Fig 1. The retention latency of passive avoidance response.. The retention test was performed 24 hours after training session. Normal: groups of rats without any treatment(n=6), SC: groups of rat with scopolamine treatment, REUD: groups of rats administrated with 0.1, 1, 10, 100 ㎎/㎖/day of REUD treatment. All results are the Means±S.D from five experimental tests. Those values significantly different from control are indicated (*p<0.05, students two-tailed t test)

2. REUD가 백서 hippocampus CA1 영역의 pyramidal neuron의 변화에 미치는 영향

백서에 REUD의 경구투여로 인한 기억개선효과를 알아보기 위해 REUD 100㎎/100g/㎖ 농도군의 백서 뇌 조직을 확인하였는데, Fig. 2에서처럼 Hippocampus CA1영역의 신경세포 손상이 완전히 일어난 시점에서 백서를 희생하여 hippocampus의 조직 절편을 광학현미경하에서 관찰하였다. 정상군의 CA1 영역에서는 정상적인 형태의 hippocampus pyramidal neuron이 관찰되었고, 대조군의 CA1 영역의 세포들은 주변세포로부터 분리, 유리되고 세포체 형태가 상실되고 응축되어 단일세포의 형태로 존재함을 관찰할 수 있었다. 반면에 REUD를 2주간 경구 투여한 실험군은 CA1 영역에서 정상 조직과 유사한 형태로 신경세포의 분포가 개선되는 양상을 관찰할 수 있었다. 이 세포들은 잘 성장되어 perikaryon과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구분할 수 있었으며 비교적 온전한 형태로 개선되는 효과가 나타남을 관찰할 수 있었다. 한편 Fig. 3에서처럼 뇌 조직 절편을 crystal violet으로 염색하고 hippocampus CA1 영역 중앙부 500㎛ 길이에서 정상적인 pyramidal neuron 수를 측정한 결과, 정상군에서는 155±3개이고, 대조군은 27±2개이고 REUD 투여군의 경우는 91±3개가 확인되었는데, 이것은 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 REUD 투여로 유의성 있게 증진시켜주는 효과가 있음을 확인한 것이다. 이러한 결과들로 보아 REUD는 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 분해를 막아 농도를 유지시키는 작용을 하여, 치매질환과 같은 증상에서 나타나는 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 100㎎/100g/㎖이상의 농도에서 기억개선효과에 대한 유의성이 $P<0.05$의 범위 내에서 있었다.

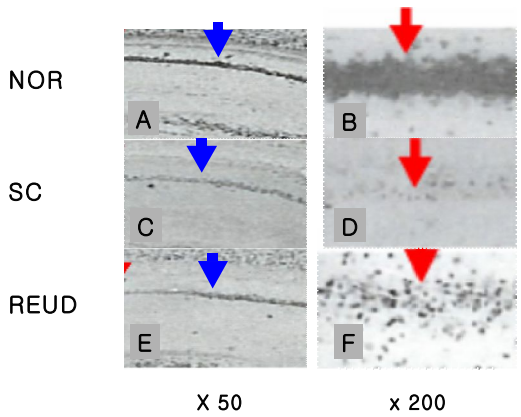


Fig 2. Crystal violet staining of hippocampus CA1 area 14 days after scopolamine treatment in the normal. Normal (A, B), scopolamine-treated group(C, D), REUD treated group (E, F). Arrows indicate pyramidal neurons in CA1 area. The crystal violet staining of hippocampus CA1 area 14 days after scopolamine treatment in the normal. Normal: groups of rats without any treatment(n=6), SC: groups of rat with scopolamine treatment, REUD: groups of rats administrated with 100㎎/㎖/day of REUD treatment.

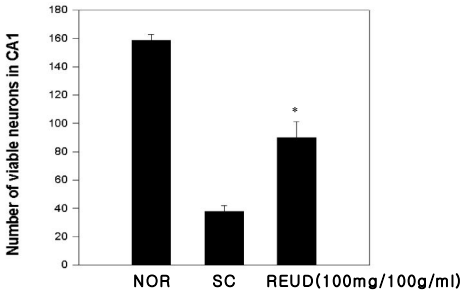


Fig 3. The neuroprotective effects of REUD in the neuronal density in the CA1 region of the hippocampus after scopolamine treatment for 14 days. The crystal violet staining of hippocampus CA1 area 14days after scopolamine treatment in the normal. Normal: groups of rats without any treatment(n=6), SC: groups of rat with scopolamine treatment, REUD: groups of rats administrated with 100㎎/100g/㎖/day of REUD treatment. All results are the Means±S.D from five experimental tests. Those values significantly different from control are indicated (*p<0.05, students two-tailed t test).

IV 考 察

痴呆 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하고 있는[2, 3] AD의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되어지는 노인반(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실뭉치처럼 보이는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)을 들 수 있다[15-18]. 노인반은 신경반(neuritic plaques) 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축색돌기와 수상돌기들의 얽힌 덩어리가 Aβ을 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교 세포(glial cell)와 얽히게 된다[19]. 노인반의 수는 질병의 심한 정도와 비례하므로 이 plaques에 대한 연구가 AD 연구의 초점이 되고 있다[19]. 이러한 병리학적 특징은 가족성 AD(Familial Alzheimer's disease. FAD)와 산발성 AD(Spradic Alzheimer's disease. SAD)의 모든 경우에 다 나타나며, 그 결과 신경세포의 사멸에 의해 결국 인지기능의 손상을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다[20-23].

AD의 원인에 대해 여러 가설들이 있으나, Aβ가 AD의 발병원인으로 작용할 것이라는 베타아밀로이드 가설은 1980년대 초에 아세틸콜린의 저하가 AD의 병인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설 이후에 가장 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여지고 있었다[24]. 그러나 AD의 원인으로 C단 단백질이 대두되고 있는데, 최근 C단 단백질(이하 CT105)에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons[25, 26]에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, xenopus oocytes[27, 28]과 purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고하였다[29]. 또한 CT105는 calcium homeostasis에도 악영향을 미치는데, rat brain microsome에서는 Mg^{2+}-Ca^{2+} ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는 Na^{+}-Ca^{2+} exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로 calcium homeostasis을 손상시키지만, Aβ는 그렇지 않다고 하여[30, 31] 기존의 Aβ보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다.

한의학적으로 볼 때, 뇌의 퇴행성 병변과 관련되어 있는 치매의 병인·병기는 臟腑的으로는 肝腎不足이 중요하게 작용하고 痰·瘀血의 생성이 뇌에 정체됨으로 인해 각종 증상이 나타나는 것임을 알 수 있다[32-35]. 최근 강[36]은 치매의 병리학적 연구에서 치매의 노화와 유전적 요인이 한의학의 臟腑的으로는 腎虛와 밀접한 관계를 맺고, Aβ와 tau 단백질과 같은 뇌 속의 비정상적인 plaque는 痰濁과 瘀血 등의 한방적 병리산물과 관련된다고 보고 하였다.

한의학에서는 한약물의 항치매에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있는데, 左歸飮과 右歸飮[37], 麝香蘇合元[38], 洗心湯[39], 星香正氣散加蒲公英[40], 益精地黃湯[41], 導痰益氣活血湯[42], 補益淸腦湯[43]등의 수추출물에 대한 연구가 보고되었고 CT105 플라스미드로 유도된 최신 치매모델에 대해서는 이 등[44]의 遠志와 石菖蒲의 수추출물과 최 등[45]의 石菖蒲의 수추출물의 항치매 효과를 증명한 연구가 있었으며, 최근에는 장 등*)의 조구등의

디클로로메탄 분획과 항치매 효과에 대한 연구가 있었다.

본 연구에 사용된 조구등(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 상록 木質藤本인 釣鉤 혹은 華鉤藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 쪄서 건조한 약재로서 釣藤, 鉤藤, 釣鉤, 弔藤釣, 嫩釣藤, 雙釣藤, 鉤𠸘 등의 이명을 가지고 있다[8, 9].

보통 약물에서 메탄올 추출물을 얻은 다음, 디클로로메탄, 에틸 아세테이드, 부탄올 등의 용매로 분획을 조제하고 마지막 수층은 물분획으로 조제하는데[46], 본 논문에서는 釣鉤藤 수추출물의 βAPP 과발현에서 신경세포사 억제작용에 대한 연구[12]와 조구등 디클로로메탄 분획의 CT105에 의한 신경세포상해의 개선 연구[14]에서 더 나아가 백서의 감퇴된 기억력을 증진시켜 주는 효과가 있음을 아래와 같이 보고하는 바이다.

REUD가 수동회피테스트를 통해 백서의 기억개선효과에 미치는 영향을 살펴 본 결과, 신경세포의 세포사는 인지능력에 영향을 주기 때문에 scopolamine을 투여한 쥐에서 신경이 손상을 입을 시 신경세포의 세포사는 결국 기억감퇴를 유도한다. Fig. 1에서처럼 백서에 REUD의 경구투여로 인한 기억개선효과를 알아보기 위해 백서 무게 100g 당 0.1, 1, 10, 100 ㎎/㎖ 농도의 REUD를 투여한 결과, 정상군에서는 기억개선효과가 267±25 sec, 대조군은 25±2 sec이고 REUD 처리군의 경우는 각각 27±1, 52±1, 53±2, 64±1 sec의 값을 얻었는데, 이는 경구내로 1회 투여한 군에서 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과들로 보아 REUD는 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 분해를 막아 농도를 유지시켜, 치매질환과 같은 증상에서 나타나는 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 1㎎/㎖ 이상의 농도에서 기억개선효과에 대한 유의성이 $P<0.05$ 범위 내에서 있었다.

한편 백서에 REUD의 경구투여로 인한 기억개선효과를 알아보기 위해 REUD 100㎎/100g/㎖의 농도군의 백서 뇌 조직을 확인하였는데, Fig. 2에서처럼 Hippocampus CA1영역의 신경세포 손상이 완전히 일어난 시점에서 백서를 희생하여 hippocampus의 조직 절편을 광학현미경하에서 관찰하였다. 정상군의 CA1 영역에서는 정상적인 형태의 hippocampus pyramidal neuron이 관찰되었고, 대조군의 CA1 영역의 세포들은 주변세포로부터 분리, 유리되고 세포체 형태가 상실되고 응축되어 단일세포의 형태로 존재함을 관찰할 수 있었다. 반면에 REUD를 2주간 경구 투여한 실험군은 CA1 영역에서 정상 조직과 유사한 형태로 신경세포의 분포가 개선되는 양상을 관찰할 수 있었다. 이 세포들은 잘 성장되어 perikaryon과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구분할 수 있었으며 비교적 온전한 형태로 개선되는 효과가 나타남을 관찰할 수 있었다. 한편 Fig. 3에서처럼 뇌 조직 절편을 crystal violet으로 염색하고 hippocampus CA1 영역 중앙부 500㎛ 길이에서 정상적인 pyramidal neuron 수를 측정한 결과, 정상군에서는 155±3개이고, 대조군은 27±2개이고 REUD 투여군의 경우는 91±3개가 확인되었는데, 이것은 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 REUD 투여로 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인한 것이다. 이러한 결과들로 보아 REUD는 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 분해를 막아 농도를 유지시키는 작용을 하여, 치매질환과 같은 증상에서 나타나는 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 100㎎/100g/㎖ 이상의 농도에서 기억개선효과에 대한 유의성이 $P<0.05$의 범위 내에서 있었다.

이상과 같이 REUD는 백서의 수동회피테스트 결과, 백서의 감퇴된 기억력 개선에 효과가 있었고 REUD를 경구 투여한 백서의 뇌 조직을 관찰한 결과에서도 REUD가 백서의 기억력 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다.

Ⅴ 結 論

조구등 디클로로메탄 분획(이하 REUD)을 백서에게 경구 복용시켜 수동회피테스트를 실시하고 CA1의 pyramidal neuron 수의 관찰한 결과,

백서의 수동회피테스트를 통해서, REUD는 1㎎/100g/㎖ 이상의 농도에서 유의성 있는 기억개선 효과를 가지고 있었다. 또한 2주간의 REUD의 경구투여(100㎎/100g/㎖)는 scopolamine에 의해 상해된 백서 hippocampus CA1의 pyramidal neuron 수의 감소를 유의성 있게 억제하였다. 이로써 REUD가 백서의 기억력 회복 증진에 도움을 주었다고 할 수 있다. 앞으로 조구등의 치매 등의 다양한 뇌 질환에의 임상응용에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료되어진다.

參 考 文 獻

1. 민성길 : 최신정신의학. 서울. 일조각. pp. 1, 104-105, 1993.
2. 대한신경정신의학회 편 : 신경정신과학, 서울 하나의학사, pp.211-220, 1997.
3. 김지혁, 황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327-330, 663-664, 1992.
4. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL : Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease, Science, 28;245(4916):417-420, 1989.
5. Fukuchi K, Kamino K, Deeb SS, Smith AC, Dang T, Martin GM : Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity, Biochem Biophys Res Commun, 15;182(1):165-173, 1992.
6. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM : Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl- terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein, Brain Res Mol Brain Res, 26(1-2):207-217, 1994.
7. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C, Vaught JL, Neve RL : Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice. expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain, Proc Natl Acad Sci USA. 15;89(22):10857-10861, 1992.
8. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.658-659, 1986.
9. 李盛雨, 盧昇鉉 : 釣鉤藤에 관한 文獻的 硏究, 大韓韓醫學會誌 第8卷第1號 附錄 本草分科學會誌 2(1): 53-58, 1987.
10. 明・李時珍 : 本草綱目 第二冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.1319-1320, 1977.
11. 김종문 : 조구등과 홍삼의 성분에 관한 연구, 서울대 대학원 학위논문(박사), 1995.
12. 김상호, 강형원, 류영수 : 釣鉤藤이 βAPP 과발현 인간세경아세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 16(5):960-966. 2002.
13. 김동영, 최종원, 박종철, 이정규 : 조구등 성분의 항경련효과Ⅱ. 메탄올추출물 및 에틸 아세테이트 분획의 뇌 신경전달 관련물질에 미치는 효과. 생약학회지. 29(3):179-186. 1998.
14. 장현호, 최 혁, 양현덕, 김상태, 김태헌, 강형원, 유영수 : 조구등 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 18(6):1810-1820, 2004.
15. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richy P, Kawai M, Perry G, Gambetti P : Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities, Brain Res, 593(2):299-303, 1992.
16. Dickson DW, Ksiezak-Reding H, Liu WK Davies P, Crowe A, Yen SH : Immunocytochemistry of neurofibrillary

tangles with antibodies to subregions of tau protein; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site, Acta Neuropathol (Berl), 84(6):596-605, 1992.

17. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK : Suppression of an amyliod beta peptide-mediated calcium chnnel response by a secreted beta-amyloid precursor protein, Neuroscience, 95(1)1-4, 2000.
18. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA : Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250: 279-282, 1990.
19. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky : Alzheimer's Disease In Pharmacotherapy; a pathophysiologic approach, Dipiro J. T. et al. Ed., New York; Elservier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
20. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR et al. : Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β-amyloid precursor protein, Neuron, 10:243-254, 1993.
21. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED : The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis, Apple Pathol. 2(6):357-369, 1984.
22. Wang GP, Grundke-Iqbal I, Kascsak RJ, Iqbal K, Wisniewski HM : Alzheimer neurofibrillary tangles: monoclonal antibodies to inherent antigen(s), Acta Neuropathol (Berl), 62(4):268-275, 1984.
23. Selkoe DJ : Alzheimer's disease, A central role for amyloid, J. Neuropathol Exp Neurol, 53(5):438-447, 1994.
24. 정창환, 정민환, 묵인희 : 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향, 한국뇌학회지, 1(1):45-52, 2001.
25. Kim SH, and Suh YH : Neurotoxicity of a caroboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, J. Neurochem 67: 1172-1182, 1996.
26. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH : Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein(βAPP) in PC12 cells by nicotine, Molecular Pharmacology 52: 430-436, 1997.
27. Fraser S, Suh YH, Chong YH, and Djamg oz MA : Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the carboxyl terminal fragment of the amyloid precursor protein, J. Neurochem 66:2034-2040, 1996.
28. Suh YH, Chong YH, Kim SH, Choi w, Kim KS, Jeong SJ et al. : Molecular physiology, biochemistry and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein(APP), Annals of N Y Acad Sci 786:169-183, 1996.
29. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, and Rowan MJ : Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments, Neuroreport 8:3213-3217, 1997.
30. Kim HS, CH Park, and YH Suh : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by mg2+-Ca2+ ATPase, Neuroreport 9(17):3875-3879, 1998.
31. Kim HS, Lee JH, and Suh YH : C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SK cell, Neuroreport 10:113-116, 1999.
32. 정인철, 이상용 : 치매에 대한 문헌적 고찰, 서울, 동의신경정신과학회지, 7(1), 77-94,

1996.
33. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
34. 郭宇鵬 외 : 謝海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 38(10):586-587, 1997.
35. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 3:20-21, 1995.
36. 강형원 외 : 痴呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰, 서울, 동의병리학회지, 13(1):36-45, 1999.
37. 鄭智天 : 左歸飮과 右歸飮에 의한 活性 酸素類의 消去작용과 抗酸化 酸素系의 活性 增加 효과에 대한 硏究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 17(1):21-36, 1996.
38. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 10(1):1-16, 1999.
39. 김태헌, 김준한, 강형원, 유영수 : 세심탕에 의한 뇌성상세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과, 동의신경정신과학회지, 12(1):137-150, 2001.
40. 박진성, 강형원, 유영수 : 생체외 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구, 동의신경정신과학회지, 12(2):157-172, 2001.
41. 최병만, 이상룡 : 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 11(2):23-42, 2000.
42. 정인철 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, 대전대학교 대학원(박사), 2001.
43. 고태준, 이상용 : 補益淸腦湯이 치매병태모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 12(1):151-167. 2001.
44. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수 : 원지와 석창포 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 동의생리병리학회지. 17(4):1037-1049.
45. 최 혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수 : pCT105로 유도된 치매모델에서 석창포 수추출액이 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 13(2):173-194. 2002.
46. 김 종, 이종규 : 저근백피성분의 생리활성에 관한 연구 - 디클로로메탄 분획의 항암작용 -, 생약학회지, 28(1):54-58, 1997.