동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 1, 2006

聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

하수영, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of ChongMyungTang(CMT) and SanSaChongMyungTang(SCMT) on the Alzheimer's Disease Model

Su-Young Ha, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental Neuropsychiatry College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : This research investigates the effect of the CMT and SCMT on Alzheimer's disease.

Methods : The effects of the CMT and SCMT on (1) amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE) mRNA of PC-12 cells treated with CT-105; (2) the AChE activity and the APP production of PC-12 cell treated with CT-105; (3) the behavior; (4) expression of IL-1β, TNF-α, MDA; (5) the infarction area of the hippocampus in Alzheimer's disease mice induced with CT105 & βA were investigated.

Rresults :

1. The CMT and SCMT suppressed the expression of APP, AChE mRNA in PC-12 cells treated with CT-105.
2. The CMT and SCMT suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT-105.
3. For the CMT and SCMT group a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by βA in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency, and distance movement-through latency.
4. The CMT and SCMT suppressed the over-expression of IL-1β, TNF-α, MDA in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

◆ 투고 : 2/17, 채택 : 3/3
교신저자 : 이상룡 주소 : 충남 천안시 구성동 621 번지 대전대학교 부속 천안한방병원
Tel : 041-521-7575 Fax : 041-521-7005 E-mail : 7575np@dju.ac.kr

5. The CMT and SCMT reduced the infarction area of hippocampus with Alzheimer's disease induced by βA.

Conclusions : These results suggest that the CMT and SCMT may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the CMT and SCMT for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words : ChongMyungTang(CMT), SanSaChongMyungTang(SCMT), Alzheimer's Disease

Ⅰ. 緖 論

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

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 있다[3,4]. AD의 기전에 대한 대표적인 가설로 PS 유전자들의 돌연변이와 APP(amyloid precursor proteins)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되면, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 있다[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》[9],《辨證奇門》[10]에 "呆病"으로《景岳全書·癲狂癡獃》[11]에서 "癡獃"로 언급되었으며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있다[12].

聰明湯은《東醫寶鑑·內景篇》[13]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 하여 건망을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 건망 및 치매 등의 병증에 활용되고 있다.

聰明湯은 김[14] 등의 건망유도백서에 대한 연구에서 학습과 기억에 유의한 효과가 있음을 보고하였고, 山査肉은 蔡의 연구[15]에서 AD에 응용 가능하다는 결과가 도출된 바 있어, 聰明湯에 山査肉을 더해 만든 山査聰明湯은 더욱 치매의 치료 및 예방에 효과가 좋을 것으로 생각할 수 있겠다.

이에 저자는 聰明湯에 山査肉을 더한 山査聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 聰明湯 단독 사용과 山査肉 加味 사용의 효과를 비교 검토해 보고자, 聰明湯, 山査聰明湯과 CT-105의 세포독성을 mLFC(mouse lung fibroblast cells)와 PC-12 세포주에서 관찰하고, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE(acetylcholinesterase) 유전자 발현과, 세포성 단백질 수준에서 AChE activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris

water maze를 통해 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여, microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α 발현과 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA) 및 뇌조직의 허혈상태의 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), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), 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), ELISA reader(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 analysis 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 聰明湯 (ChongMyungTang; CMT)의 처방구성은 《東醫寶鑑》[13]을 기준으로 하였고 山査聰明湯 (SanSaChongMyungTang ; SCMT)은 聰明湯에 山査肉 20g을 가미한 것으로, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of ChongMyungTang(CMT) & SanSaChongMyung Tang(SCMT)

韓藥名	生 藥 名	CMT 用量(g)	MCMT 用量(g)
白茯神	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
山査肉	Crataegus Fructus	0	20
Total amount		36g	56g

4) 검액의 조제

聰明湯(36g)과 山査聰明湯(56g)에 각각 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㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15㎎/㎖, Sigma), 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 PBS(인산완충생리식염수)로 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.

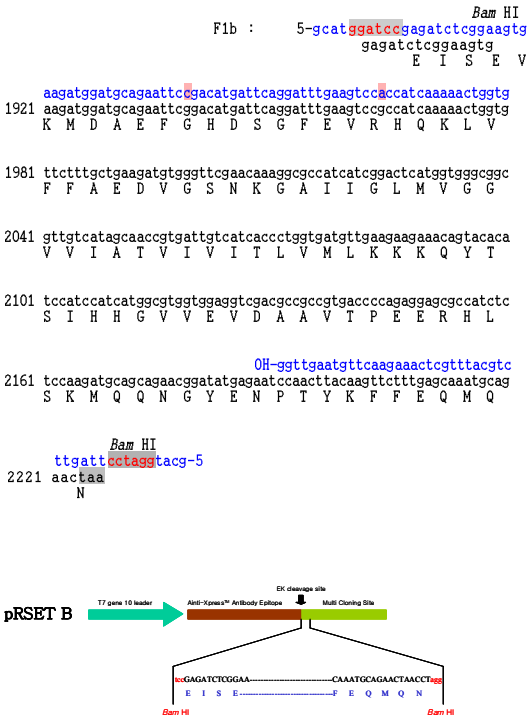
PC-12(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721) 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였다.

(2) CT-105 복제

CT-105를 *E. coli*에서 발현 정제하기 위해 APP 105 아미노산을 coding 하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 *Bam* HI site를 넣어 주었다. PC-12 세포를 LPS로 자극하고 유전자를 추출하여 RT-PCR(reverse transcription- polymerase chain reaction)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 벡터

를 *E. coli* BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 발현은 배지에 1mM IPTG를 3시간 동안 처리한 후 *E. coli* 세포를 획득하였다. 이 *E. coli*는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트리고 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidin affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT-105를 얻었다(Table 1).

Table 1. Construction of pRSET-CT-105.



(3) βA(1~40)

βA는 Calbiochem 회사에서 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 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[16]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 자란 것을 Trysin-EDTA용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 山査聰明湯 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)과 CT-105(최종 농도 80μM, 40μM, 20μM, 10μM, 5μM, 1μM)를 72시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하여 고정하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) PC-12 세포주에서의 유전자발현 분석

(1) PC-12 세포주에서의 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10^6 세포를 각각 분주하고 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 聰明湯과 山査聰明湯 추출물을 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 농도로 첨가하고, 1시간 후 CT-105(20μM)와

rIL-1β(100ng/㎖)를 처리하고 5시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현 분석

① RNA 추출

① PC-12 세포주에 聰明湯과 山査聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)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 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(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℃ 항온수조에서 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 system을 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 interleukin-1β(IL-1β), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)-α, APP, AChE, 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.

ⓐ rat IL-1β
sense oligonucleotide
5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisense oligonucleotide
5'-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3'

ⓑ rat IL-6
sense oligonucleotide
5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'
antisense oligonucleotide
5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

ⓒ rat TNF-α
sense oligonucleotide
5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

ⓓ rat APP
sense oligonucleotide
5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

ⓔ rat AChE
sense oligonucleotide
5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

ⓕ rat G3PDH
sense oligonucleotide
5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide
5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

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

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

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 聰明湯과 山査聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE activity를 측정하였다. 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[17]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 reader로 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.

4) 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 ethyl ether로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10μM)를 Hippocampus에 주입하는데, 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㎕/min과 total volume 0.5㎕의 조건으로 수행하였다. βA 주입이 끝난 생쥐는 피부

를 봉합한 뒤 2주 후, tacrine 투여군(10㎎/㎏)과 聰明湯 투여군(216㎎/㎏) 및 山査聰明湯 투여군(576㎎/㎏)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여 하였다.

② AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

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. Morris water maze에서 1주일간 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다.

선별된 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, tacrine 투여군(10㎎/㎏), 聰明湯 투여군(216㎎/㎏) 및 山査聰明湯 투여군(576㎎/㎏)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시한 후, βA(10μM)로 AD를 유발하였다.

βA(10μM) 처리 2주 후부터 AD 병태 생쥐에게 지속적으로 tacrine(10㎎/㎏), 聰明湯(216㎎/㎏) 및 山査聰明湯(576㎎/㎏)을 투여하면서 4주와 8주 후에 AD 유발생쥐를 Morris water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 관찰하고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2).

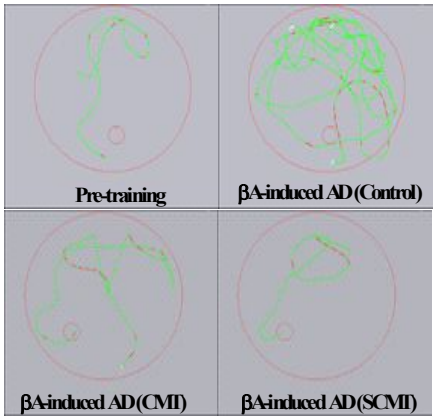


Fig 2. Photograph of water maze of βA-induced AD

5) βA에 의한 뇌세포 분석

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

8주간의 聰明湯 추출물(216㎎/㎏)과 山査聰明湯 추출물(576㎎/㎏) 투여가 종료된 AD 병태 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. 뇌를 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 284μℓ와 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) 뇌세포내 지질과산화도(MDA) 측정

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[18]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 solution을 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.

6) βA에 의한 허혈 크기에 미치는 영향 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 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[19]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.

7) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation(S.D.)로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법을 이용하여 통계처리 하였고, $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 聰明湯 및 山査聰明湯과 CT-105의 세포독성

1) mLFC에서 聰明湯과 山査聰明湯의 세포독성

聰明湯과 山査聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 聰明湯 투여군과 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 山査聰明湯 투여군에서는 큰 변화가 없었으나, 400㎍/㎖의 聰明湯 투여군은 70.5±4.6(%)으로 감소되었으며, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 山査聰明湯 투여군은 각각 58.7±4.9(%), 72.9±5.2(%)로 감소되었다 (Fig. 3).

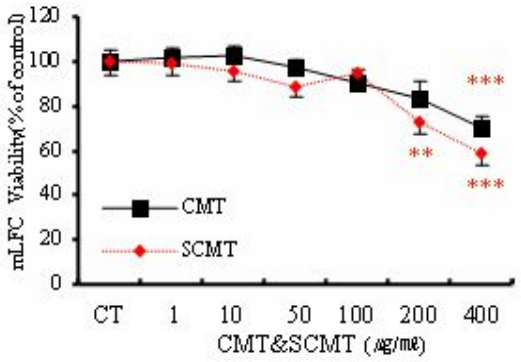


Fig. 3. Cytotoxicity effects of CMT and SCMT on mLFCs.
mLFCs were pretreated with various concentration CMT and SCMT. The results are expressed the mean±S.D. Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) PC-12 세포주에서 聰明湯과 山査聰明湯의 세포독성

聰明湯과 山査聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 聰明湯 투여군과 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 山査聰明湯 투여군에서는 큰

변화가 없었으나, 400㎍/㎖의 聰明湯 투여군은 71.5±6.5(%)로 감소되었고 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 山査聰明湯 투여군은 각각 68.6±4.9(%), 46.8±7.6(%)으로 감소되었다(Fig. 4)

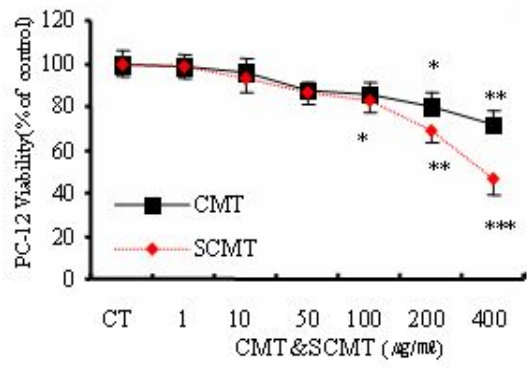


Fig. 4. Cytotoxicity effects of CMT and SCMT on rat PC-12 cell line.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and SCMT. The results are expressed the mean±S.D. Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) PC-12 세포주에 대한 CT-105의 세포독성

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT-105 투여군은 큰 변화가 없었고, 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타냈다(Fig. 5).

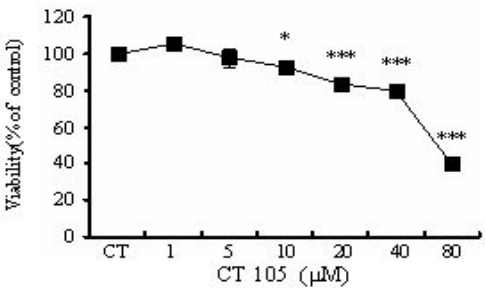


Fig. 5. Cytotoxicity of recombinant CT-105 in PC-12 cell line.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, and 80 mM of CT-105 for 72 h. The results are expressed the mean±S.D. Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. PC-12 세포주의 APP, AChE의 유전자 발현 억제 효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 136(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 56(Ht), 117(Ht)이었고, 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 17(Ht), 78(Ht)로 나타나 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 6).

AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 45(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 20(Ht), 25(Ht)이었고, 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 21(Ht), 30(Ht)으로 나타나 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 7).

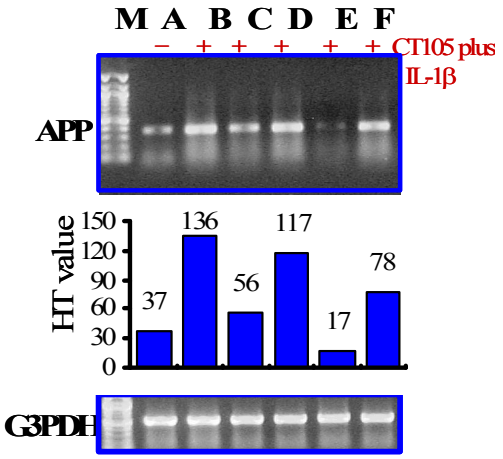


Fig. 6. Inhibitory effects of CMT and SCMT on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT-105 plus rIL-1b.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated wit various concentration SCMT (100, 10mg/ml) in the presence CT-105(20mM) plus recombinent IL-1b(100ng/ml) for 6 h. APP mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(b-actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT-105 20mM plus recombinent IL-1b 100ng/ml Control(B), CMT 100mg/ml(C), CMT 10mg/ml(D), SCMT 100mg/ml(E), SCMT 10mg/ml(F) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC12 cell line.

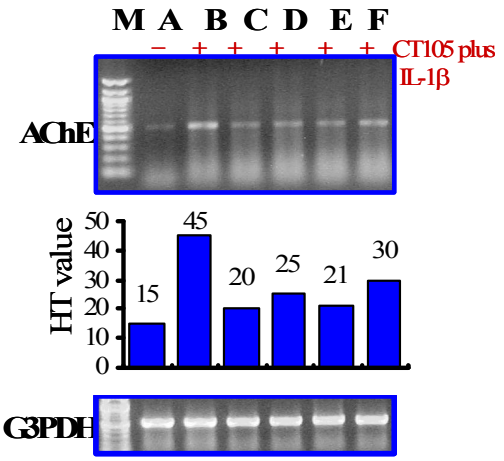


Fig. 7. Inhibitory effects of CMT and SCMT on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT-105 plus rIL-1b.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated wit various concentration SCMT (100, 10mg/ml) in the presence CT-105(20mM) plus recombinent IL-1b(100ng/ml) for 6 h. AChE mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(b-actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT-105 20mM plus recombinent IL-1b 100 ng/ml Control(B), CMT 100mg/ml(C), CMT 10mg/ml(D), SCMT 100mg/ml(E), SCMT 10mg/ml(F) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC12 cell line.

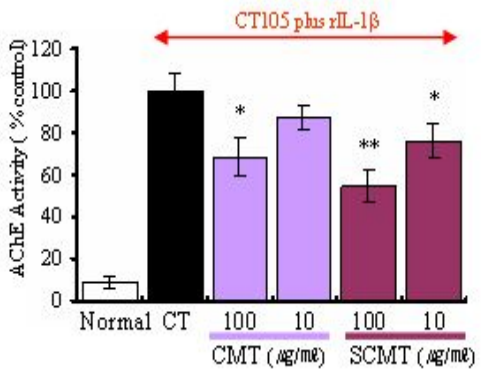


Fig. 8. Effect of CMT and SCMT on the AChE activity in CT-105 plus rIL-1b stimulated PC-12 cells.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and SCMT(100, 10mg/ml) in the presence CT-105(20mM) plus rIL-1b(100ng/ml) for 24 h. The lysate(100ml,㎍/ml) were measured using AChE diagnostic kits. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Normal was not treated, CT-105 plus rIL-1b was control, CT-105 plus rIL-1b + CMT and SCMT(100mg/ml), and CT-105 plus rIL-1b + CMT and SCMT(10mg/ml). Statistically significant value compared with CT-105 plus rIL-1b control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. 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±8.6(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 聰明湯을 함께 투여한 군은 각각 68.4±9.5(%), 87.5±5.9(%)이었고, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 山査聰明湯을 함께 투여한 군은 각각 54.3±7.6(%), 76.6±8.2(%)로 100㎍/㎖의 聰明湯 투여군과 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 山査聰明湯 투여군에서 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였다(Fig. 8).

2) APP의 발현 억제효과

PC-12 세포주에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 聰明湯과 山査聰明湯을 함께 투여한 군에서 APP 발현이 억제되었다(Fig. 9).

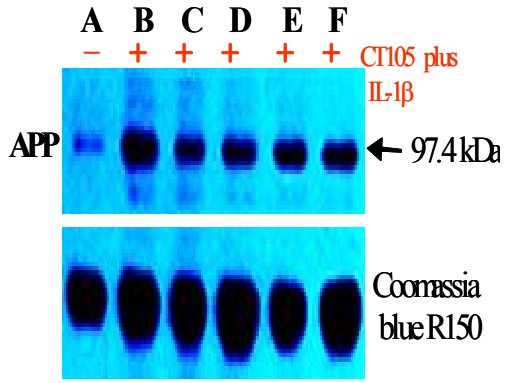


Fig. 9. Suppression effect of CMT and SCMT on the APP in PC-12 stimulated CT-105 plus rIL-1b by Western blot analysis.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and SCMT in the presence CT-105(20mM) plus rIL-1b(100ng/ml) for 24 h. APP expression was measured by immune Western blot assay. Cell lysate(50mg/lane) were separated by SDS-polyacryamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. RPMI-1640 media control was not treated(A), CT-105 20mM plus recombinent IL-1b 100ng/ml Control(B), CMT 100 mg/ml(C), CMT 10mg/ml(D), SCMT 100mg/ml(E), SCMT 10mg/ml(F).

4. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

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

聰明湯과 山査聰明湯 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 聰明湯 투여군은 각각 56.4±8.5(sec), 39.8±7.7(sec), 山査聰明湯 투여군은 각각 50.2±7.2(sec), 30.2±6.8(sec)로, 聰明湯 투여군 8주 후와 山査聰明湯 투여군 4주와 8주 후에서 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 10).

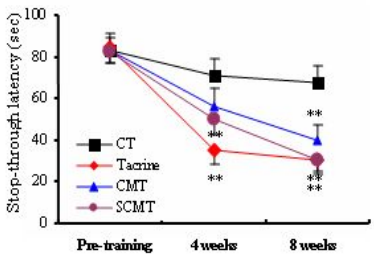


Fig. 10. Effects of CMT and SCMT on the bA-induced Alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT and SCMT or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of CMT(216㎎/kg) and SCMT(576㎎/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial(pre-training) and injected bA-induced mice. Control, bA-induced Alzheimer's mice: Tacrine(10㎎/kg ♂,♀): CMT(216㎎/kg ♂,♀): SCMT(576㎎/kg ♂,♀). **Stop-though latency** each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

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

약물 투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과 聰明湯과 山査聰明湯 투여군은 4주 후 각각 1127±176(㎝), 646±121(㎝)로 대조군에 비해 山査聰明湯 투여군에서만 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후에는 聰明湯과 山査聰明湯 투여군이 각각 608±140(㎝), 363±76(㎝)로 대조군에 비해 모두 유의성 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 11).

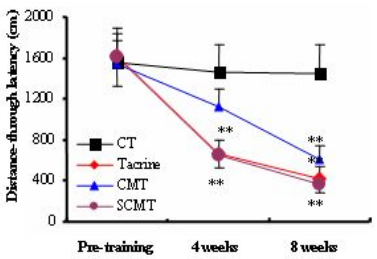


Fig. 11. Effects of CMT and SCMT on the bA-induced Alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT and SCMT or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of CMT(216㎎/kg) and SCMT(576㎎/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial(pre-training) and injected bA-induced mice. Control, bA-induced Alzheimer's mice: Tacrine(10㎎/kg ♂,♀): CMT(216㎎/kg ♂,♀): SCMT(576㎎/kg ♂,♀). **Lardist** this is the total distance(in cm) covered by the animal in large movement, and **Smldist** this is total distance covered by the animal in small movement. Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 미치는 효과

1) Microglial cell에서의 IL-1β 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1β 발현을 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군이 75.9±8.1(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 50.4±7.6%), 聰明湯과 山査聰明湯 투여군은 각각 53.6±5.3(%), 42.7±6.4(%)로 나타나, 양성대조군과 실험군에서 모두 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 12).

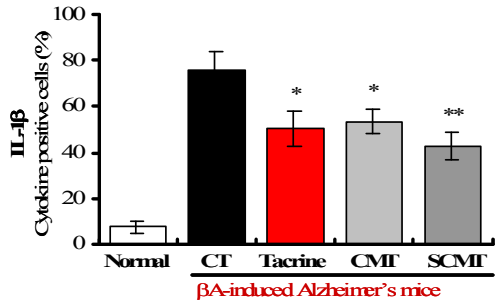


Fig. 12. Effect of CMT and SCMT on the IL-1b activity on the brain CD14+cells in bA-Alzheimer's disease mice model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216㎎/kg), SCMT(576㎎/kg) and tacrine(10㎎/kg) for 60 days. continued once a day for 60 days. IL-1b activity measured by FACScalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Microglial cell에서의 TNF-α 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군이 89.5±6.3(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 68.4±5.0(%), 聰明湯과 山査聰明湯 투여군은 각각 65.3±4.8(%), 52.3±5.6(%)로 나타나 양성대조군과 실험군에서 모두 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 13).

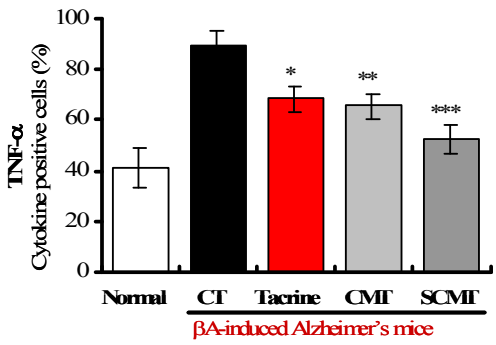


Fig. 13. Effect of CMT and SCMT on the TNF-a activity on the brain CD14+cells in bA-Alzheimer's disease mice model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216㎎/kg), SCMT(576㎎/kg) and tacrine(10㎎/kg) for 60 days. continued once a day for 60 days. TNF-a activity measured by FACScalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA)에 미치는 영향

뇌조직에서의 MDA 값을 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군이 62.8±8.7(pg/㎎), Tacrine을 투여한 양성대조군이 35.3±6.3(pg/㎎), 聰明湯과 山査聰明湯 투여군은 각각 38.4±6.6(pg/㎎), 27.0±5.0(pg/㎎)으로 나타나 聰明湯과 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군에서 그 발현이 억제되었다(Fig. 14).

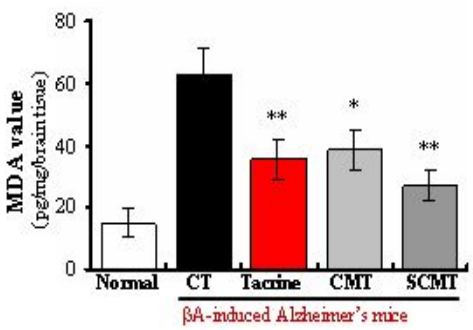


Fig. 14. Effect of CMT and SCMT on the malondialdehyde value in the brain tissue in bA-Alzheimer's disease mice model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216㎎/kg), SCMT(576㎎/kg) and tacrine(10㎎/kg) for 60 days. Malondialdehyde(MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry, Tissue in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈 크기에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 커진 것에 비해 聰明湯, 山査聰明湯 투여군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 15, 16).

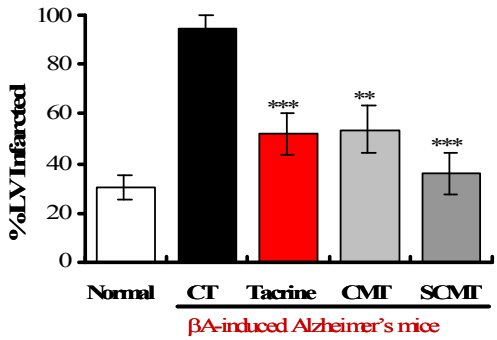


Fig. 15. Effect of CMT and SCMT on the infarct size of bA-Alzheimer's disease mice model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216㎎/kg), SCMT(576㎎/kg) and tacrine(10㎎/kg) for 60 days. Normal, C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as a percentage of the total area of the LV myocardium that was at risk(see Methods for details). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

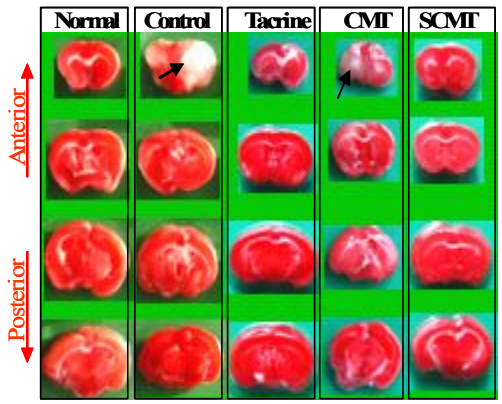


Fig.16. Effect of CMT and SCMT on the coronal section of bA-Alzheimer's disease mice model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216㎎/kg), SCMT(576㎎/kg) and tacrine(10㎎/kg) for 60 days. Normal, C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride Normal tissues are stained as strong red color. Infarcted area is not stained as white color which localizes at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6-12 mm from frontal pole.

Ⅲ. 考 察

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며[1,2], 증상으로는 병의 초기부터 기억력 저하가 나타나고, 병이 진행되면서, 점차 기억력의 손실, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화가 나타나며, 구체적으로 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 지남력 감퇴, 정서불안정, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며[2,20], 마지막 단계에서 환자들은 침상에서만 생활하다가 폐염, 욕창, 패혈증 등에 의해 생을 마감하게 된다. 생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고 되고 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[21].

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[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[22], βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[23], βA와 CT-105의 독성기전에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다[24].

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[4], 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[25]과 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[26]이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[27].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의

astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokines에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 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[28].

한의학에서 痴呆는《景岳全書·癲狂癡獃》[11]에 "癡獃"으로, 《石室秘錄》[9], 《辨證奇門》[10]에서 "呆病"으로 언급되었으며, 《內經》[29]과 歷代醫書[12,30,31]에서 언급된 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[9~12], 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[9,12,32].

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》[13]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 하여 건망을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 心虛 및 痰濁으로 인한 건망 및 치매 등의 병증에 활용되고 있으며, 김[14] 등은 聰明湯이 건망유도백서의 학습과 기억에 유의한 효과가 있음을 보고한 바 있다.

山査肉는 장미과에 속한 낙엽교목인 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로, 性味는 微溫 無毒, 酸甘하고 脾, 胃, 肝經에 歸하는데[32~34], 채[15] 등은 실험적으로 山査肉이 AD 병태 모델에 대해 항치매효과를 나타냈다는 연구결과를 도출한 바 있다.

이에 저자는 건망을 치료하는 대표적 처방으로 소개된 聰明湯과, 치매에 유효한 효과가 입증된 山査肉을 가미한 山査聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 聰明湯 및 山査聰明湯과 CT-105의 세포독성을 mLFC와 PC-12 세포주에서 관찰하고, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE 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 MDA 값을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(聰明湯 및 山査聰明湯)과 처리물질(CT-105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 聰明湯 및 山査聰明湯을 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나, 400㎍/㎖의 실험군은 70.5±4.6(%)로 감소되었으며, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 山査聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나, 200㎍/㎖, 400㎍/㎖의 실험군은 각각 72.9±5.2(%), 58.7±4.9(%)로 감소되었고(Fig. 3), PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나 400㎍/㎖의 실험군은 71.5±6.5(%)로 감소되었으며, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 山査聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나 200㎍/㎖, 400㎍/㎖의 실험군은 각각 68.6±4.9(%), 46.8±7.6(%)으로 감소되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 주로 100㎍/㎖ 이하의 농도로 聰明湯 및 山査聰明湯을 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 세포독성을 보이지 않

은 것으로 판단할 수 있는 생존율 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 주로 100㎍/㎖와 10㎍/㎖의 聰明湯 및 山査聰明湯을 사용하기로 하였다.

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

AD에 미치는 聰明湯 및 山査聰明湯의 효과를 알아보고자 PC-12 세포주에 20μM의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 후 각각 다른 농도의 聰明湯 및 山査聰明湯(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)를 24시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, APP, AChE 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하였다.

PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 聰明湯 및 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군에서 모두 발현이 억제되었다(Fig. 6, 7).

PC-12 세포주 세포성단백질에서 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20μM의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 뒤 서로 다른 농도의 聰明湯 및 山査聰明湯을 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도는 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 100.0±8.6(%)인데 비해 100㎍/㎖의 聰明湯 및 100㎍/㎖, 10㎍/㎖ 山査聰明湯 실험군은 각각 68.4±9.5(%), 54.3±7.6(%), 76.6±8.2(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제 효과를 보였다(Fig. 8).

APP는 Western blot을 통해 측정하였는데, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 聰明湯 및 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군에서 억제 효과를 보였다(Fig. 9).

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[35], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 聰明湯 및 山査聰明湯의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

聰明湯 및 山査聰明湯 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 聰明湯 실험군은 각각 56.4±8.5(sec), 39.8±7.7(sec)로 山査聰明湯 실험군은 각각 50.2±7.2(sec), 30.2±6.8(sec)로 8주 후 聰明湯 실험군과, 4주 후 및 8주 후 山査聰明湯 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여(Fig. 10), 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 聰明湯 실험군은 4주 후와 8주 후에 각각 1127±176(cm), 608±140(cm), 山査聰明湯 실험군은 각각 646±121(cm), 363±76(cm)으로 8주 후 聰明湯 실험군과, 4주 후 및 8주 후 山査聰明湯 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 유의한 운동량 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 11).

βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 병변 뇌조직에서의 proinflammatory cytokines의 일종인 IL-1β 활성도를 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 증가되었으나 실험군에서는 그 발현이 감소했고(Fig. 12), TNF-α 활성도 역시 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군은 증가하였으나 실험군은 그 발현이 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 13).

인체 조직의 산화적 손상과정은 세포막에서

지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어남으로써 진행되는 것으로 알려져 있다[36]. 그러나 미토콘드리아의 기질 및 각 조직에는 Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase 등 산화스트레스(Oxidative stress)에 대한 항산화효소들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 전자 전달계에서 생긴 산소 자유라디칼에 대해 어느 정도의 방어력을 유지하고 있고, 비정상적으로 증가하는 산소 자유라디칼이나 ROS의 제거를 위하여 그 생성이 증가하거나 활성도가 높아지는 기전을 통해 항상 손상을 입지는 않는다. 그러나 생체막에서 과도하게 생성된 지질 과산화(lipid peroxide)의 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격, 변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin 축적, 세포 구성에 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다[37]. 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 지질과산화(malonedialdehyde, MDA)의 과정은 메틸기(CH_2)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 PUFA와 반응할 때 시작된다. 형성된 라디칼(peroxyl radical)은 그들이 다음 단계의 연쇄 반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있다[38].

이런 배경으로 본 실험에서 AD 병태 생쥐 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정한 결과 대조군에 비해 聰明湯 및 山査聰明湯을 투여한 실험군에서 유의하게 감소하였음을 볼 수 있다(Fig. 14).

또한 AD 병태 생쥐모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 15, 16), 聰明湯 및 山査聰明湯이 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 聰明湯 및 山査聰明湯은 PC-12 세포주에서 APP, AChE 유전자의 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 억제하였으며, βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델의 microglial cell에서 proinflammatory cytokines인 IL-1β, TNF-α의 발현을 억제하였고, 뇌조직 MDA 값의 유의성 있는 감소효과를 나타내었으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났다.

또한 聰明湯 및 山査聰明湯의 효과를 비교하여 보면, PC-12 세포주 수준의 *in vitro* 연구에서는 큰 차이를 보이지는 않았으나, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 기억력 감퇴 억제, microglial cell에서 IL-1β, TNF-α 발현 억제, MDA 감소, 허혈 크기 감소효과에서는 모두 山査聰明湯이 聰明湯에 비해 우수한 효과를 보였으며, 특히 microglial cell에서 IL-1β, TNF-α 발현 억제, MDA 감소, 허혈 크기 감소효과에서 山査聰明湯은 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받아 현재 사용되는 양성대조군인 tacrine과 유사한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

따라서 聰明湯 및 山査聰明湯은 βA의 과다생성, 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 聰明湯 및 山査聰明湯의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

聰明湯과 山査聰明湯이 AD 病態 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 聰明湯과 山査聰明湯은 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하였다.

2. 聰明湯과 山査聰明湯은 PC-12 세포주의 세포성 단백질에서 AChE activity와 APP 발현을 억제하였다.

3. 聰明湯과 山査聰明湯은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고, 특히 山査聰明湯은 聰明湯보다 양호한 효과를 보였다.

4. 聰明湯과 山査聰明湯은 병변 뇌조직에서 IL-1β, TNF-α의 발현과 MDA 값을 억제하였고, 특히 山査聰明湯은 聰明湯보다 양호한 효과를 보였다.

5. 聰明湯과 山査聰明湯은 뇌조직의 허혈 크기를 유의성 있게 개선하였고, 특히 山査聰明湯은 聰明湯보다 양호한 효과를 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯과 山査聰明湯은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 聰明湯과 山査聰明湯의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 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. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-28.
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. Tabaton M·Cammarata S·Mandybur T·Richey P·Kawai M·Perry G·Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res. 1992;593(2):299-303.
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. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
10. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
11. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
12. 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.
13. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6.
14. 김영욱. 聰明湯이 건망유도 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1999.
15. 채종걸 외. 산사육이 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279-88.
16. Skehan P·Storeng R·Scudiero D·Monk A·McMahon J·Visca ·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. 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.
19. 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.
20. 이광우 외. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
21. Swash M·Oxbury J. Clinical Neurology. NewYork. 1991;1:120-9.
22. Bryan-Sisneros AA·Fraser SP·Suh Y H·Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na+/Ca2+ gradients. Neuroreport. 2000;11(15):3357-60.
23. Breakefield XO·Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1987;1(4):339-71.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. 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, 175, 217-18, 229, 241-3, 342.
30. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982:129-35, 534, 545, 550.
31. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242-51, 784-91.
32. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1991:369-70.
33. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:傳統醫學硏究所. 1993:485-6.
34. 김창민 외 역. 中藥大辭典. 서울:도서출판 정담. 1998:2658-63.
35. 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):256-635.
36. Nakaya, H., Tohse, N., & Nanno, M. Electrophysiological derngements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. Am J Physiol. 1987;253:1089-97.
37. Tappel, A.L. Lipid Peroxidation Damage to Cell Components. Fed. 1973.
38. Holley, A.E., and Cheeseman, K.H. Measuring free radical reaction in vivo. Br,. Med. Bull. 1993;49(3):494-505.