동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 2, 2006

杜鵑花가 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

장진실 · 정인철 · 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of Rhododendron simsii Planch(RSP) on the Alzheimer's Disease Model

Jin-Sil Jang, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : This experiment was designed to investigate the effect of Rhododendron simsii Planch(RSP) on the Alzheimer's disease.

Method : The effects of RSP on amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase (AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by amyloid β protein(Aβ) and IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA of THP-1 cell treated by lipopolysaccharide(LPS), AChE activity of PC-12 cell lysate treated by Aβ and behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine, and glucose, AChE in serum of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated, respectively.

Result :

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

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

Key Words : Alzheimer's disease, Rhododendron simsii Planch(RSP)

◆ 투고일: 6/19, 채택일: 7/10
교신저자 : 정인철, 주소/충북 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대청주한방병원
Tel : 043-229-3427, Fax : 043-253-8757, E-mail : npjeong@dju.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

치매(Dementia)는 점진적인 기억력 장애가 실어증(aphasia), 실인증(agnosia), 실행증(apraxia) 등의 행동적인 장애와 함께 나타나 사회, 직업적 기능의 장애를 가져오는 것을 말한다[1].

이런 치매에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 혈관성치매 (vascular dementia; VD), 중독성 치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있고 여성이 남성에 비해서 2-3배 정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다[2].

AD는 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실이 초래됨으로써 나타나며[3] amyloid precursor proteins (APP)의 일부인 amyloid β protein (Aβ)[4]과 IL - 1, IL - 6 등의 proinflammatory cytokine[5], acetylcholine 등 신경전달 물질의 감소 및 acetylcholinesterase (AChE)의 증가[6] 등이 AD의 발생에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

韓醫學的으로 치매는 '痴獃[7]', '呆病[8,9]', '健忘[10~13]'등의 범주에 속하며, 明代 張[7]의 ≪景岳全書・癲狂痴獃≫에서는 "痴獃症, …… 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常 ……"이라 하여 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있으며 淸代의 陳[8,9] 등은 치매와 유사한 개념으로 '呆病'에 대해 상세히 서술하고 痴呆의 원인으로는 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 거론되고 있다[7,9,14~16].

杜鵑花는 진달래과에 속한 상록이거나 반상록 관목으로서 진달래의 꽃 혹은 열매로 性味는 溫, 味 酸, 甘하며, 風濕을 없애고 和血하는 효능[17]이 있어 子宮出血, 月經不順, 吐血, 打撲, 衄血 등을 치료하므로 瘀血로 인한 치매에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

최근 치매에 대한 연구동향을 살펴보면 임상에서 활용되는 복합처방이 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향[18]과 AD 병태 모델에 미치는 영향에 대한 연구들[19,20]이 있었으나 杜鵑花에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 杜鵑花가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자, 杜鵑花를 시료로 하여 PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA와 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하였고 PC-12 세포주에서 AChE 활성도를 관찰하였으며, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, AChE에 대한 杜鵑花의 효능을 관찰하였고 Morris water maze를 이용하여 VIDEO TRACK을 통한 생쥐의 행동 변화를 측정한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit (420-MC), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether), N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), DL-dithiothreito l(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly

acrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan), 역전사효소 (Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A.), RNAzol^{B}는 Tel-Test사(U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.), Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품 등을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

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

2) 동물

8주령인 체중 32g 전후의 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명과학연구원에서 분양 받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험당일까지 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)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 杜鵑花(*Rhododendron sims Planch* ; RSP)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

杜鵑花 200g에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 杜鵑花 추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) mLFC와 PC-12 세포주에 대한 세포독성 측정

(1) 세포배양

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

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

(2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법[21]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. PC-12 세포주와 mLFC는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 杜鵑花 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB / 1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA 및 THP-1 세포주에서 IL-1β, Il-6,TNF-α mRNA 발현 분석

(1) 약물처리

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

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

(2) mRNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 杜鵑花 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 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 방치, 13,000rpm에서 원심분리하고, 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다.

추출한 RNA는 diethyl pyro-carbonate (DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 120℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) Reverse Transcriptase (RT) - polymerase chain reaction (PCR)

역전사 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 120℃에서 5분 동안 변성 시키고, 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, 3120mM KCl, 15mM MgCl2)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 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG, Germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 APP, AChE, glial fibrillary acidic protein(GFAP), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF)-α 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer (20pmole/㎕)와 antisense primer(20pmole/㎕)를 혼합하여 1㎕를 가하고, 다시 3㎕ 2.5mM dNTPs, 3㎕ 10×PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$), 그리고 0.18㎕ Taq polymerase(5U/㎕)를 첨가한 다음 최종 부피가 30㎕가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation(72℃, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다.

각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

ⓐ rat APP

sence oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'
antisence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

ⓑ rat AChE

sence oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'
antisence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

ⓒ rat GFAP

sence oligonucleotide	5'-CTTGAGGTGGCCTTCTGACAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-GAGCAGCTGGCCCAGCAGCAG-3'

ⓓ rat G3PDH

sence oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

ⓔ rat IL-1β

sence oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3'

ⓕ rat IL-6

sence oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'
antisence oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

ⓖ rat TNF-α

sence oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

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

4) PC-12 세포주의 세포성 단백질에서 AChE 활성도 측정

(1) 세포성 단백질 추출

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

세포 용해액을 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM, pH8.0), 150mM

NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후 Bradford 염색법[22]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포 용해액을 표시한 후 sodium chloride solution 0.2㎖와 혼합하였다. 각 tube에 water 3.0㎖, nitrophenol solution 2.0㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다.

5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 다음 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈액분석

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

8주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 정상군, Tacrine(10㎎/kg)을 경구투여한 Tacrine 투여군, 杜鵑花 추출물(152㎎/kg)을 10일 동안 경구 투여한 杜鵑花 투여군으로 나누고, scopolamine(1㎎/kg)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) Glucose의 측정

혈청 중 glucose치는 자동생화학분석기(Express 550)를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE 활성도 측정

AChE 활성도는 cholinesterase kit로 측정하였다. 혈청 중 AChE 활성도를 측정하기 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2㎖와 serum 0.2㎖를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가한다.

acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Moris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 수조이다.

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

선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, tacrine 투여군(tacrine 10㎎/kg p.o), 杜鵑花 투여군(杜鵑花 152㎎/kg p.o)으로 분류하였고, 21일간 계속 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 생쥐에 scopolamine(1㎎/kg)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고, 이를 video track software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법[23]을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. mLFC와 PC-12 세포주에 대한 세포독성

mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 50㎍/㎖ 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 100, 200, 400㎍/㎖의 실험군은 84±5.0, 72±3.9, 50±4.7(%)과 56±3.8(%)로 감소를 보였으며, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 10㎍/㎖ 이하의 실험군에서는 큰 변화가 없었고 50, 100, 200, 400㎍/㎖의 실험군에서는 86±3.8, 82±5.3, 74±4.8, 58±6.9(%)로 감소되었다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity Effect of RSP on mLFC and PC-12 Cell Line

Group	Concentration (㎍/㎖)	Viability(% of control) mLFC	PC-12
Control	0	100 ± 5.7	100 ± 3.3
RSP	1	98 ± 5.3	97 ± 4.6
	10	95 ± 4.6	94 ± 5.3
	50	94 ± 6.7	86 ± 3.8 **
	100	84 ± 5.0 *	82 ± 5.3 **
	200	72 ± 3.9 **	74 ± 4.8 **
	400	50 ± 4.7 ***	58 ± 6.9 ***

Control : Non-treatment group.
RSP : Group pretreated with various concentration (1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖, 400㎍/㎖) of RSF for 48 hrs.
Data represent means±standard error(S.E).
* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

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

AD와 관련 유전자 발현을 관찰하고자 PC-12 세포주에 Aβ를 처리하여 활성화시킨 후 杜鵑花 추출물에 의하여 APP, AChE, GFAP mRNA 유전자 발현 억제를 관찰한 결과, APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 12(Ht)로 나타났고 대조군은 103(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 51(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 84(Ht)로 나타났다(Fig. 1).

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 64(Ht)로 나타났고 대조군은 189(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 101(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 117(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 24(Ht)로 나타났고 대조군은 122(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 47(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 106(Ht)로 나타났다(Fig. 3)

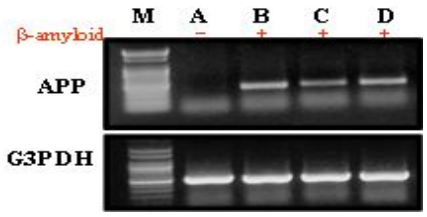


Fig. 1. Inhibitory effects of RSP on APP mRNA expression in PC-12 cell line.
PC-12 cell line were pretreated with 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 10μM Aβ(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC12 cell line. 100 bp DNA marker(M).

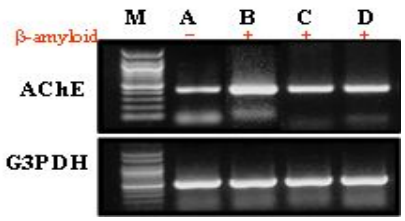


Fig. 2. Inhibitory effects of RSP on AChE mRNA expression in PC-12 cell line.
PC-12 cell line were pretreated with 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 10μM Aβ(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC12 cell line. 100 bp DNA marker(M).

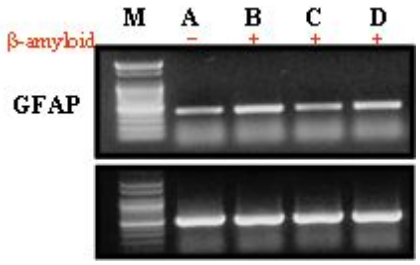


Fig. 3. Inhibitory effects of RSP on GFAP mRNA expression in PC-12 cell line.
PC-12 cell line were pretreated with 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 10μM Aβ(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed GFAP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC12 cell line. 100 bp DNA marker(M).

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

THP-1 세포주의 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 유전자 발현 억제를 관찰한 결과, IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)로 나타났고 대조군은 207(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 13(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 69(Ht)로 나타났다(Fig. 4).

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 18(Ht)로 나타났고 대조군은 182(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 14(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 35(Ht)로 나타났다(Fig. 5).

TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 152(Ht)로 나타났고 대조군은 193(Ht)로 나타났으며 杜鵑花 100㎍/㎖ 실험군은 158(Ht), 杜鵑花 10㎍/㎖ 실험군은 177(Ht)로 나타났다(Fig. 6).

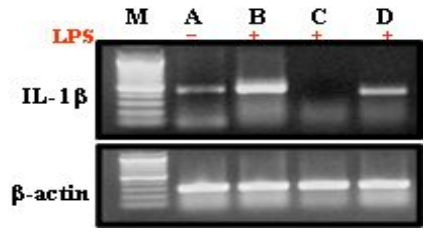


Fig. 4. Inhibitory effects of RSP on IL-1b mRNA expression in THP-1 cell line.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 2㎍/㎖ LPS(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed IL-1β mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line. 100 bp DNA marker(M).

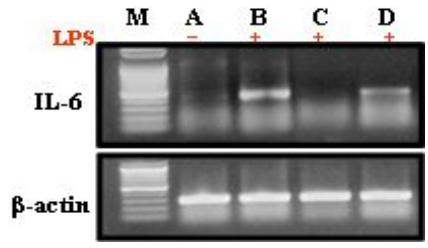


Fig. 5. Inhibitory effects of RSP on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell line.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 2㎍/㎖ LPS(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed IL-6 mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line. 100 bp DNA marker(M).

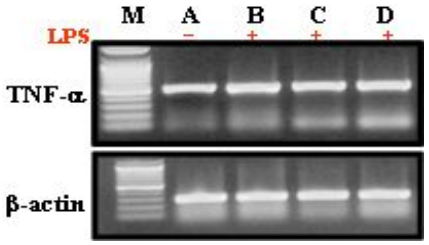


Fig. 6. Inhibitory effects of RSP on TNF-a mRNA expression in THP-1 cell line.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration 100㎍/㎖(C), 10㎍/㎖(D) of RSP in the presence 2㎍/㎖ LPS(B, control) and not treatment(A) for 6 hrs. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The gene expression were observed TNF-α mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell line. 100 bp DNA marker(M).

4. PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도 억제 효과

PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도를 관찰한 결과, 杜鵑花 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖를 투여한 실험군은 대조군에 비하여 각각 26.5±8.7 (p<0.001), 46.2±9.0 (p<0.01), 94.5±6.8 (%)로 나타나 농도 의존적으로 유의성 있는 억제효과를 보였다(Fig. 7).

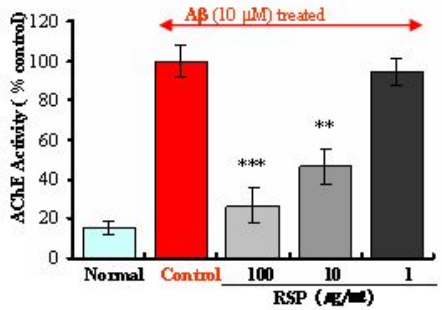


Fig. 7.Inhibitory effect of RSP on the AChE activity in PC-12 cell line.
PC-12 cell line were pretreated with various concentration RSP(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence Aβ(10mM) for 24 hrs. The lysate(50㎕) were measured using AChE diagnostic kits. Normal was not treated, control was Aβ, Aβ + RSP(100㎍/㎖), Aβ + RSP(10㎍/㎖) and Aβ + RSP(1㎍/㎖). Statistically significant value compared with Aβ control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, AChE에 대한 효과

혈청 중 glucose 수치는 정상군이 123.7±3.0(㎎/㎗)이었고 대조군은 118.2±14.3(㎎/㎗)으로 측정되었으며, tacrine과 杜鵑花 투여군은 각각 139.1±7.3(㎎/㎗)과

153.9±7.2(㎎/dℓ)(p<0.05)로 나타나 杜鵑花 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8).

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 20.3±3.1(U/㎖)이었고 대조군은 78.8±4.8 (U/㎖)로 측정되었으며, tacrine과 杜鵑花 투여군은 각각 26.3±8.0(U/㎖)(p<0.001)과 31.1±11.4(U/㎖)(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

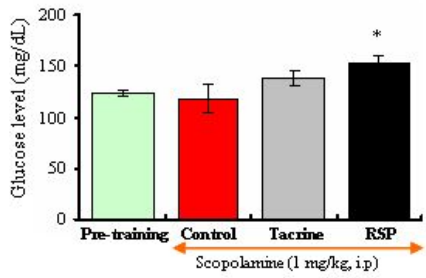


Fig. 8. Effects of RSP on the glucose level in the serum of memory deficit mice induced by scopolamine.
ICR mice were orally administered of RSP or Tacrine.HCl and the injection of scopolamine(1㎎/kg) continued once a day for 7 days. Normal: not treated, control: scopolamine(1㎎/kg *i.p*), Tacrine: scopolamine(1㎎/kg *i.p*) + Tacrine(10㎎/kg *p.o*), RSP: scopolamine(1㎎/kg *i.p*) + RSP(152㎎/kg *p.o*). Statistically significant value compared with scopolamine only group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

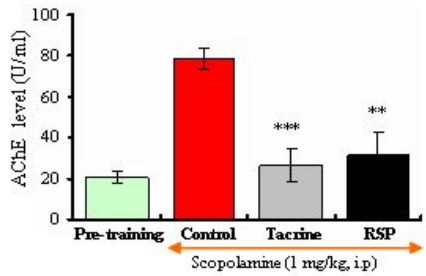


Fig. 9. Effects of RSP on the AChE activity in the serum of memory deficit mice induced by scopolamine.
ICR mice were orally administered of RSP or Tacrine.HCl and the injection of scopolamine(1㎎/kg) continued once a day for 7 days. Normal: not treated, control: scopolamine(1㎎/kg *i.p*), Tacrine: scopolamine(1㎎/kg *i.p*) + Tacrine(10㎎/kg *p.o*), RSP: scopolamine(1㎎/kg *i.p*) + RSP(152㎎/kg *p.o*). Statistically significant value compared with scopolamine only group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 85.0±16.3(sec.)이었고, tacrine 투여군은 17.9±10.3(sec.)(p<0.01), 杜鵑花 투여군은 18.8±4.9(sec.)(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있게 단축되었다.(Fig. 10).

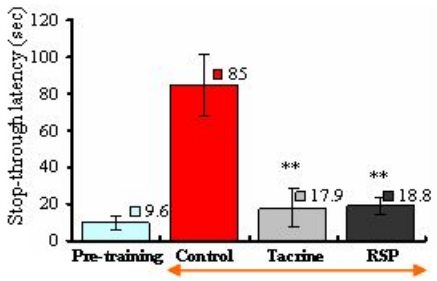


Fig. 10. Effects of RSP on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type Morris water maze.
ICR mice were orally administered of RSP or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity. Control: scopolamine-induced mice, Tacrine: scopolamine(1㎎/kg i.p) + Tacrine(10㎎/kg *p.o*), RSP: scopolamine(1㎎/kg i.p) + RSP(152 ㎎/kg *p.o*). **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 scopolamine-induced mice group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, scopolamine을 처리한 대조군은 30분 후에 1730±269(cm)이었고, tacrine 투여군은 451±89 (cm) (p<0.001)이며, 杜鵑花 투여군은 419±129 (cm) (p<0.001)로 대조군에 비해 유의성 있게 단축되었다(Fig. 11, 12).

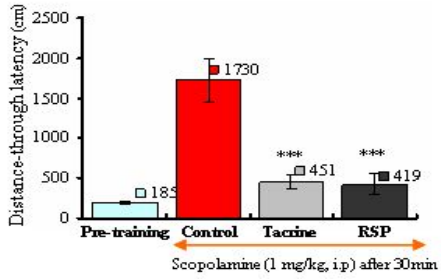


Fig. 11. Effects of RSP on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze.
ICR mice were orally administered of RSP or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injectionof scopolamine intra peritoneal cavity. Control: scopolamine-induced mice, Tacrine: scopolamine(1㎎/kg i.p) + Tacrine(10㎎/kg *p.o*), RSP: scopolamine(1㎎/kg i.p) + RSP(152㎎/kg *p.o*). **Lardist** this is the total distance(in cm) covered by the animal in large movement, and **Smldist** this is total distance(in cm) covered by the animal in small movement. Statistically significant value compared with scopolamine-induced mice group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

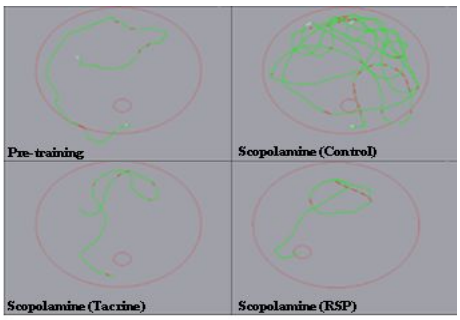


Fig. 12. Photograph on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze test.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and tacrine(10㎎/kg p.o).
RSP : Group treated with scopolamine(1㎎/kg i.p) and RSP (152㎎/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 RSP or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity.

Ⅳ. 考 察

치매는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 뇌 질환과 같은 병적인 노화로 인한 뇌증후군으로, 뇌의 퇴행성 변화에 의한 AD와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매, 그리고 兩者가 혼재된 혼합형 치매 등이 있는데, 이 중 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다[24].

치매를 발생하게 하는 대표적인 질환인 AD는[25] 1906년 독일의 정신과 의사인 Alzheimer[26]가 초로기 치매에 관하여 보고하면서 처음 알려진 것으로, 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며, 때로는 성격변화, 불면, 망상, 행동장애 등의 증상을 나타내는[2] 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다[27].

AD를 유발하는 원인은 Aβ, estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), 산화제, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질의 감소, 신경영양인자 등의 다양한 인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며[28], 여러 가지 요인에 의하여 AD에는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)과 신경반(neuritic plaque)과 같은 독특한 병리학적 소견을 나타낸다[28].

근래, 신경반과 관련하여 주목받는 가설에는, Aβ의 침적으로 인한 신경독성으로 신경세포가 파괴된다는 것과, 과인산화 타우 단백질의 침적에 의한 신경섬유다발의 작용으로 신경퇴행이 일어난다는 것이 있다[29]. Aβ은 큰 분자량의 APP로부터 유래되며, APP는 다양한 molecular weight form이 있어 Aβ sequence를 포함한 amino acid의 수에 따라 APP695, APP751, APP770 등으로 불린다. APP는 β-secretase나 1-secretase에 의해 일부가 잘라져서 비정상적인 공정과정을 거쳐 Aβ을 만드는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다[30]. Amyloid cascade hypothesis에 의하면 뇌에 Aβ가 축적이 되면 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극시켜 neuron을 상처받기 쉽게 만들고, 결과적으로 치매의 증상이 유발된다고 한다[31].

APP는 21번 염색체에 encord되어 있으며[32], 21번 염색체가 3개인 다운증후군에서 30, 40대에 조기치매 현상을 나타내며, AD 환자의 뇌에서 발견되는 것과 같은 신경섬유다발과 신경반이 형성되는 것이 보고되어, 이러한 병변은 유전자 수의 증가에 의해 APP가 과도 생성되었기 때문이라고 추측되고 있다[3,60]. AD 환자의 기저 전뇌와 해마의 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고, Aβ를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화와 치매 형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[33].

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 cholinergic system과 밀접한 관계가 있으며,

acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 AChE의 증가로 인해 기억과 인지결함이 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있다[34]. AD의 치료제 중 아세틸콜린 분해억제제(acety1cholinesterase inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용 중인 tacrine이 있는데, tacrine은 30주 정도 투여되었을 때, 환자의 20-30%에서 간 효소가 증가되는 부작용이 있어 사용에 논란은 있으나, 인지기능검사, 보호자의 전반적 평가, 삶의 질 척도 상의 개선이 나타나, 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 치료 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[35].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에 뇌의 astrocyte와 microglia cell에서 생성되는 proinflammatory cytokine과 관련된 것이 있다. 감염 또는 물리적 뇌손상 등으로 인하여 Blood Brain Barrier가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine homeostasis가 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 많은 연구 결과들에 의하여 입증되고 있다[36]. 정상상태의 뇌에서 astrocyte, microglia cell은 neuron의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 물리적 외상이나 감염 등과 같은 외부자극으로 가장 먼저 활성화되는 microglia cell은 IL-1β 및 TNF-α를 생산하며, 이들은 astrocyte를 활성화시키고[37,38], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF (colony stimulating factor), IL-5 등을 유도발현 시킨다[38]. 이 외에, 뇌손상시 병변 부위에 제일 먼저 나타나는 glial cell 역시 microglia 임을 감안할 때, microglia cell은 astrocyte의 주요 자극 인자인 IL-1β 및 TNF-α를 생성하는 세포로서 중추신경계의 염증반응을 개시하는 중요역할을 가진 것으로 생각되어 진다[38].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴獃[7]', '呆病[8,9]', '健忘[10~13]'등의 範疇에 속하며, 明代 張[7]의 ≪景岳全書・癲狂痴獃≫에서는 "痴獃症, …… 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常……"이라 하여 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있다.

淸代의 陳[8,9] 등은 치매와 유사한 개념으로 '呆病'에 대해 상세히 서술하고 있다. 또한 ≪黃帝內經≫[10,11]을 비롯하여 많은 歷代醫書[7,12,13]에서도 '痴呆'나 '呆病'의 명칭은 없으나 '健忘' 등의 언급에서 유사한 증상을 제시하고 있다.

痴呆의 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 등이며, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다. 원인은 주로 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다[7,9,14~16].

杜鵑花(*Rhododendron simsii Planch*)는 진달래과(Ericaceae)에 속한 杜鵑花(진달래)의 꽃 혹은 열매로 風濕을 없애고 和血하며 月經을 고르게 하는 효능이 있어 子宮出血, 月經不順, 吐血, 衄血 등에 사용한다[17]. 瘀血은 치매의 중요한 원인 중 하나인데, 杜鵑花의 和血의 效能으로 미루어 杜鵑花를 痴呆의 치료와 예방에 응용할 수 있으리라 사료된다.

이에 著者는 杜鵑花의 치매에 대한 효과를 알아보고자, 杜鵑花를 시료로 하여 PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 관찰하였으며, scopolamine으로 처리한 생쥐에서의 혈청 내 glucose, AChE를 측정하고, Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 세포주를 분리하여 杜鵑花의 세포독성을 측정한 결과,

mLFC 및 PC-12 세포주 모두의 생존률에 있어서 대조군에 비해 100㎍/㎖ 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 200, 400㎍/㎖의 실험군은 각각 72±3.9(%), 50±4.7(%)과 74±4.8 (%), 58±6.9(%)로 생존률이 80% 미만으로 감소되었다(Table Ⅰ). 따라서 본 실험에서는 세포독성의 영향을 받지 않는 농도인 100㎍/㎖ 이하의 杜鵑花를 使用하여 杜鵑花가 AD 유발인자에 미치는 영향을 살펴보았다. AD 유발과 관련되어 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 세포주에서 관찰한 결과, APP, AChE, GFAP mRNA 발현에 있어서 10μM의 Aβ만을 처리한 대조군에 비해, 10μM의 Aβ와 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 杜鵑花를 함께 투여한 실험군에서 모두 농도 의존적으로 APP, AChE, GFAP의 mRNA의 발현이 억제되었는데(Fig. 1, 2, 3), 이를 통하여 杜鵑花는 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현을 억제하므로 AD에 효과가 있으리라 생각된다.

THP-1 세포주는 사람의 monocyte로 LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태를 나타내므로 사람의 microglial cell의 모델로 사용할 수 있고[39] 또한 LPS와 Aβ를 처리한 THP-1 세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다는 것이 보고된 바 있다[40]. 본 실험에서는 THP-1을 LPS로 처리한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 관찰함으로써 杜鵑花가 microglial cell의 proinflammatory cytokine 발현에 미치는 억제 효과를 측정한 결과 대조군에 비해 실험군에서 IL-1β, IL-6와 TNF-α의 mRNA 발현이 2㎍/㎖의 LPS만을 처리한 대조군에 비해, 2㎍/㎖의 LPS와 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 杜鵑花를 함께 투여한 실험군에서 농도 의존적으로 억제되었는데(Fig. 4, 5, 6), 이를 통하여 杜鵑花가 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 효과가 있으리라 생각된다.

PC-12 세포주의 세포성 단백질에서의 AChE 활성도를 측정한 결과 10μM의 Aβ 만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 杜鵑花을 함께 투여한 실험군에서 농도 의존적인 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 7), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 杜鵑花의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되고, 杜鵑花의 투여가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 acetylcholine의 분해로 인한 기억력 감퇴에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력감퇴를 회복시키는 역할을 하며 이 작용은 choline계와의 기능적인 상호작용으로 이루어지는 것으로 생각되고 있다[41]. 이런 관점에서 杜鵑花가 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 glucose 및 AChE에 미치는 효과를 분석한 결과, glucose는 대조군에 비해 杜鵑花 투여군에서 유의성 있게 증가되었고(Fig. 8), AChE 활성도는 tacrine 투여군과 杜鵑花 투여군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데(Fig. 9), 이로써 杜鵑花가 glucose를 유의성 있게 증가시키고, AChE의 활성을 억제함으로써 기억력 감퇴에 대한 치료 효과가 있을 것이라 사료된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 杜鵑花 투여군에서 모두 유의성 있는 시간의 단축을 보였고(Fig. 10), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 杜鵑花 투여군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데(Fig. 11, 12), 이것으로 杜鵑花 투여 후 기억력감퇴가 억제되었음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 杜鵑花는 PC-12 세포주에서 유전자 수준에서 APP, AChE, GFAP의 발현과 IL-1β, IL-6의 proinflammatory cytokine의 발현을 억제하였고, 세포성 단백질 수준에서 AChE의 활성을

감소시켰으며, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose를 증가시키고, AChE의 활성을 억제하였다. 또한 Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

이러한 결과를 종합하면 杜鵑花는 기억력감퇴 및 AD에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

杜鵑花가 AD병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였다.
2. THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 발현을 억제하였다.
3. PC-12 세포주의 세포성 단백질에서 AChE의 활성을 억제하였다.
4. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내에서 유의성 있게 glucose 증가시키고, AChE 활성은 억제하였다.
5. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있게 기억력감퇴를 억제시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 杜鵑花는 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 杜鵑花의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 이광우 편저. 임상신경학. 서울:범문사. 2003:203-15.
2. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1986:138, 216-28.
3. 조추용. 최현자 역저. 치매 예방과 케어. 서울:창지사. 2002:49.
4. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
5. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. Glia. 1999;28(2):114-27.
6. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR : In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology, 52(4):691-9, 1999.
7. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
8. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
9. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
10. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37, 124, 196, 229, 217 -8, 229.
11. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:68, 342.
12. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982:129-35, 534, 545, 550.
13. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987 :822-5.
14. 楊思澎 외. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:224-30.

15. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242-51, 784-91.
16. 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.
17. 김창민 외. 中藥大辭典. 서울:鼎談. 1998:1437-8.
18. 金保冏, 李相龍. 蔘茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(1):59-72.
19. 최병만. 木槿皮가 CT105와 βA로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 대전대학교 박사학위논문, 2003.
20. 최보윤. 砂仁이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 대전대학교 석사학위논문, 2003.
21. 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.
22. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302-8.
23. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
24. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣. 1994:63-6.
25. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87-8, 465-7, 514-8, 600.
26. 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.
27. 한일우 외. Alzheimer병의 증상. 계명의대 논문집. 1997;16(3):339-47.
28. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
29. 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). 1992;84(6):596-605.
30. Forsell C, Froelich S, Axelman K, Vestling M, Cowburn RF, Lilius L, Johnston JA, Engvall B, Johansson K, Dahlkild A, Ingelson M, St. George-Hyslop PH, Lannfelt L. A novel pathogenic mutation(Leu262Phe) found in the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 1997;234(1):3-6.
31. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. J Neurochem. 1999;73(2):532-7.
32. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S. Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein (APP) gene. Biochem J. 1999;338:777-82.
33. Breakfield XO and Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1989;1(4);339-71.
34. 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.

35. 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.
36. 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.
37. Hankyoung Pyo, Eun-hye Joe, Soyoung Jung, Soo Hwan Lee, and Ilo Jou. Gangliosides Activate Cultured Rat Brain Microglia. J Biol Chem. 1999;274(49) :34584-9.
38. F Aloisi, A Care, G Borsellino, P Gallo, S Rosa, A Bassani, A Cabibbo, U Testa, G Levi and C Peschle. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL - 6, IL - 8, colony - stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL - 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. The Journal of Immunology . 1992;149(7):2358-66.
39. Stephen LY, Loyd HB, June KA, Joyce MA, Michael DD, Paula BE, Anthony MP, Piorkowski, Kurt RB. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. J Neurochem. 2000;74(3) :1017-25.
40. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Naworth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature. 1996;382 (6593):685-91.
41. Messier C. The absence of effect of glucose on memory is associated with low susceptibility to the amnestic effects of scopolamine in a strain of mice. Behav Brain Res. 1998;96(1-2):47-57.