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

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

김건진, 정대규
대구한의대학교 한의과대학 신경정신과 교실

The Effects of JangWon-Dan,(JWD) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT-105 and βA

Geon-Jin Kim, Dae-Kyoo Chung
Dept. of Oriental Neuropsychiatry College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objective :
This research investigates the effect of the JangWon-Dan,(JWD) on Alzheimer's disease.

Method :
The effects of the JWN extract on (1) IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA of PC-12 cells treated with LPS; (2) amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), and glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA, 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, IL-1β mRNA, and TNF-α mRNA; (5) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Result :
1. The JWN extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA in THP-1 cells treated with LPS.
2. The JWN extract suppressed the expression of APP, AChE, and GFAP mRNA in PC-12 cells treated with CT-105.
3. The JWN extract suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT-105.
4. For the JWN extract 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.

◆ 투고일: 6/22, 수정일: 7/11, 채택일: 7/12
교신저자: 정대규. 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대 부속 대구한방병원
Tel : 053-770-2178, Fax : 053-770-2169, E-mail : dkjung55@hanmail.net)

5. The JWN extract suppressed the over-expression of IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, IL-1β mRNA, TNF-α mRNA, and CD68/GFAP, in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
6. The JWN extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

Conclusion :

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

Key Words : JangWon-Dan,(JWD), Alzheimer's disease, CT105

I. 緖 論

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 惹起되는 기억력을 비롯한 認知機能의 저하를 특징으로 하는 症候群으로, 대개 만성적으로 진행하여 여러 가지 방면에서 고도의 대뇌기능의 障碍를 나타내며[1-3], 일상생활의 營爲에서도 심각한 障碍를 초래한다[4].

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 혈관성치매(vascular dementia; VD), 중독성 치매중에서 AD는 50% 이상의 가장 많은 비율을 차지하고 있는 것으로서[5], 뇌의 全般的 萎縮과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[1-2], 發病은 서서히, 경과는 漸進的인 것이 특징이다[2]. 증상으로는 주위에 대한 無關心, 自發性의 缺如, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緖不安, 騷亂 또는 憂鬱, 無言, 無反應, 大小便失禁 등을 보인다[3].

AD는 βA (β amyloid peptide), estrogen, apolipoprotein E, PS (presenilin), oxidants (free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는 데[6], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP (amyloid precursor proteins) 의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며[7], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어[8], acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[9].

또한, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 염증반응 싸이토카인을 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 細胞毒性을 일으킨다는 假說이 提起되고 있다[10].

장원단은 養血安神理脾의 효능을 가지며, 문헌적으로 心血不足으로 氣鬱生痰하고 脾氣不舒하여 된 健忘에 通用되어 온 처방[11]으로, 氣機不利 후의 痰, 血虛 등이 原因이 되어 발생하는 치매에 응용을 고려해 보았다.

최근 한의학에서의 치매에 대한 연구동향을 살펴보면 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響12), 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 영향13), 聰明湯이 健忘誘導 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響에 대한 연구14)등이 이루어졌으나, 장원단에 대한

연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 장원단이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 장원단과 CT-105의 細胞毒性을 mLFC (mouse lung fibrast cells)와 PC-12 세포주에서 관찰하였고, LPS (lipopolysacchride) 를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주에서 APP(amyloid precursor proteins), AChE (acetylcholinesterase), GFAP(glial fibrillary acidic protein) 유전자 발현과 AChE의 activity를 관찰하였다. 그리고 western blot으로 APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 기억 행동 변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 싸이토카인, 지질과산화도 (MDA)와 GFAT, CD68/ CD11b의 발현을 관찰하여, 뇌조직의 虛血상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 機器

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, 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(MgCl2)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(Madison, U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을 그리고, Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, 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 sceondary Ab (1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

機器는 spectrophotometer (shimazue, Japan), 원심분리기 (한일과학, Korea), Bio-freezer (sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column을(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 (MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA leader(Molecular devise, U.S.A.), CO2 incubator (Lepco, U.S.A.), Cytometry (BD, U.S.A.), Microscope (Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec. U.S.A.), VIDEOTRACK (animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및

homogenizer(OMNI, U.S.A) 등의 것을 사용하였다.

2) 動物

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐와 BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 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 Co. Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 藥材

本 實驗에 使用한 장원단(JangWon-Dan, JWD)의 處方構成은 대구한의대학교 附屬韓方病院 處方集에 準하였으며 使用한 藥劑는 대구한의대학교 附屬韓方病院 약제과에서 購入한 後 精選하여 使用하였고, 處方 1丸의 內容과 分量은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of JangWon-Dan (JWD)

Herbs	Scientific name	Dose(g)
遠 志	Polygala tenuifolia	0.42
龍眼肉	Euphoria longan	0.42
生地黃	Rehmannia glutinosa	0.42
玄 蔘	Scrophularia buergeriana	0.42
石菖蒲	Acorus gramineus	0.42
朱 砂	Cinnabar	0.42
人 蔘	Panax ginseng	0.42
白茯神	Poria cocos	0.42
當 歸	Angelica gigas	0.42
酸棗仁	Ziziyphus spinosa	0.42
麥門冬	Liriope platyphylla	0.42
栢子仁	Biota orientalis	0.42
	Total amount	5.04

4) 검액제조

장원단에 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. 실험방법

1) 세포 독성 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℃, 5% CO2 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 mLFC cell을 분리하여 RPMI1640- 5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

PC-12 (rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721) 세포주는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였고, THP-1 (acute monocytes, ATCC TIB- 202; American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) 세포주에서는 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin (100U/㎖), streptomycin(100㎍/㎖) 그리고 10㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO_2인 37℃ 배양기에서 배양하였다.

(2) CT-105 복제

CT-105를 E. coli에서 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 벡터를 E. coli BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 E. coli를 획득하였다. 이 E. coli는 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(Fig. 1).

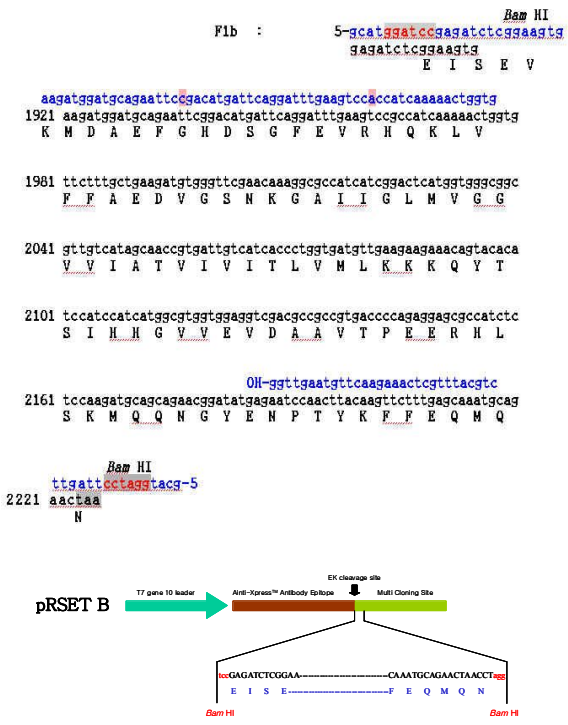


Fig 1. Construction of pRSET-CT105.

(3) βA(1-40)

βA는 AD 환자의 뇌에서 senile plaques 와 diffuse deposits를 주로 유도하는 것으로 알려졌다. Calbiochem 회사에서 공급받아 AD 病態 생쥐모델을 만들었고, 그 아미노산 배열은 다음과 같다 (Fig. 2).

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 2. Sequence of βA(1-40).

(4) 세포독성 측정

細胞毒性 측정방법은 SRB (0.4%/1% acetic acid) assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 자란 것을 Trysin- EDTA용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0 x 10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 장원단 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)과 CT-105(최종 농도 80μM, 40μM, 20μM, 10 μM, 5μM, 1μM)를 72간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다.

SRB 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한, 다음 공기중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA leader에서 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 약물처리

① PC-12 세포주에서 알츠하이머병과 관련된 유전자발현 분석

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

② THP-1 세포에서 염증반응 사이토카인 발현

THP-1 세포주에 LPS 2 ㎍/㎖를 동시 처리하여 염증반응 사이토카인을 유발시켰다. 장원단 추출물은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution(HBSS)로 세척한 후에 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에 100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(6) 유전자 발현 분석

① RNA 추출

PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 장원단 추출물(100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖과 1 ㎍/㎖)과 양성대조군으로 cyclosporin A (CSA, 10 ㎍/ml)를 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM), rIL-1β(100ng/㎖)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24 시간 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol^B 500 ㎕를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다.

이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 혼합(voltex)하였다. 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75 ℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 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 DEPC처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR(polymerase chain reaction)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)을 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3 ㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1β (interleukin-1β), IL-6, TNF(Tumor necrosis factor)-α, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH을 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/㎕)와 antisense primer (20 pmole/㎕)를 혼합하여 1㎕를 가하고, 다시 3㎕ 2.5 mM 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㎕ 되도록 멸균 증류수를 가하고 pre-denaturation; 95℃, 5분, denaturation; 95℃, annealing; 55℃, 1분, elongation; 72℃, 1분을 25 cycles한 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 분석한다.

Oligonucleotide sequence의 鹽基配列은 다음과 같다.

① rat IL-1β

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

② rat IL-6

sence oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACT G-3'
antisence oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

③ rat TNF-α

sence oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTT AG-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGG G-3'

④ rat APP

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

⑤ rat AChE

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

⑥ rat GFAP

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

⑦ rat G3PDH

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

⑧ rat β-actin

sence oligonucleotide	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
antisence oligonucleotide	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT C-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, U.S.A.)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.

(7) AChE activity 측정

① 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 장원단 추출물 (100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖, and 0.1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 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 염색법으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

② AChE activity 측정

세포성 lysate를 label한 후 sodium chloride solution 0.2㎖와 혼합하였다. 각 tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2

㎖를 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ water bath에서 30분간 incubation시킨 후 ELISA Leader (Molecular Devices, U.S.A.)로 420㎚에서 absorbance를 측정하였다.

③ APP의 immunoblotting 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 sceondary Ab (1:4000, Amersham, Arlington Heights, IL) 과 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

2) βA로 유도된 AD 病態 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정과 microglial cell의 분석

(1) AD 病態 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① 장원단 검액제조

장원단 (3.65g/1개)를 증류수 녹여 생쥐에 1주일에 3회 73mg/kg으로 경구투여하였다.

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 病態 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10μM)를 Hippocampus에 주입하는 데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽으로) 1.2㎜, midline에서 right로 0.7㎜, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1㎜로 microinjector의 injection speed 0.1㎕/min와 total volume 0.5㎕의 조건으로 수행하였다.

βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 陽性對照群인 tacrine 投與群(10㎎/㎏), 장원단 投與群(73 ㎎/㎏)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

③ AD 病態 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 病態 생쥐는 8주일간 장원단을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다.

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 對照群, 陽性對照群(tacrine), 장원단 投與群(73 ㎎/㎏)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

④ 행동 관찰

훈련과 장원단을 투여후 4주와 8주 후에 AD 유발생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 3).

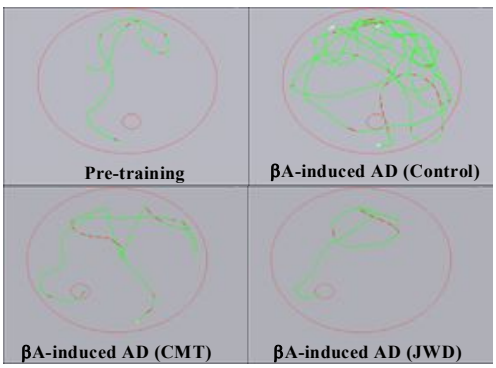


Fig 3. photograph of water maze of bA-induced AD

(2) AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

① Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 장원단 投與群(73 ㎎/㎏) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37℃, 5% 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 Pan anti-mouse IgG-bead로 microglial cell를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

② microglial cell내 염증반응 싸이토카인 염색법

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충용액 (0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284㎕와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다.

고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액 (0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC - anti - IL - 1β와 FITC-anti-TNF-α를 30분간 얼음에서 배양하였다.

배양 후 permeabilization완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 마아크로글리아 세포내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

③ 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 가하고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing한다. 20% acetic acid 1.5㎖을 가하고 그리고 75ul 증류수를 넣고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000r.p.m에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용한다. 532n.m에서 흡광도를 측정한다.

④ AD 病態 생쥐의 뇌세포 형광 유세포 분석

AD 유발 생쥐에서 虛血이 일어난 뇌조직을 잘게 chopping한 후 cell strainer (BD, Falcon)에 넣고 3ml sylinge rubber로 뇌조직을 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수한다. 회수된 부유액을 Hypaque-1077 (Sigma) 5ml과 뇌세포 부유액 5ml을 gradient를 만든 다음 2000 rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 buffy coat 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 FITC - anti - GFAP, FITC - anti - CD68, FITC - anti - CD11b을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD68, CD44/CD80 그리고 GFAP 세포수를 분석하였다.

⑤ AD 病態 생쥐 뇌조직의 RT-PCR

적출한 뇌조직을 조직분쇄기로 우측 뇌조직(1g)과 RNAzol[B] 1000㎕를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다.

이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 100㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 300㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 300㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다.

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

(3) AD 病態 생쥐 뇌조직에서 虛血 및 조직손상에 미치는 영향

① 뇌조직의 虛血 크기 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 brain matrix를 이용하여 2㎜의 두께로 자른후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 虛血된 부분은 염색이 되지 않는다. 虛血 크기의 측정은 Michael의 방법으로 수행하였다.

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

② 병리조직검사

분리된 AD 病態 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의 figure 4과 같은 과정을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 figure 5와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

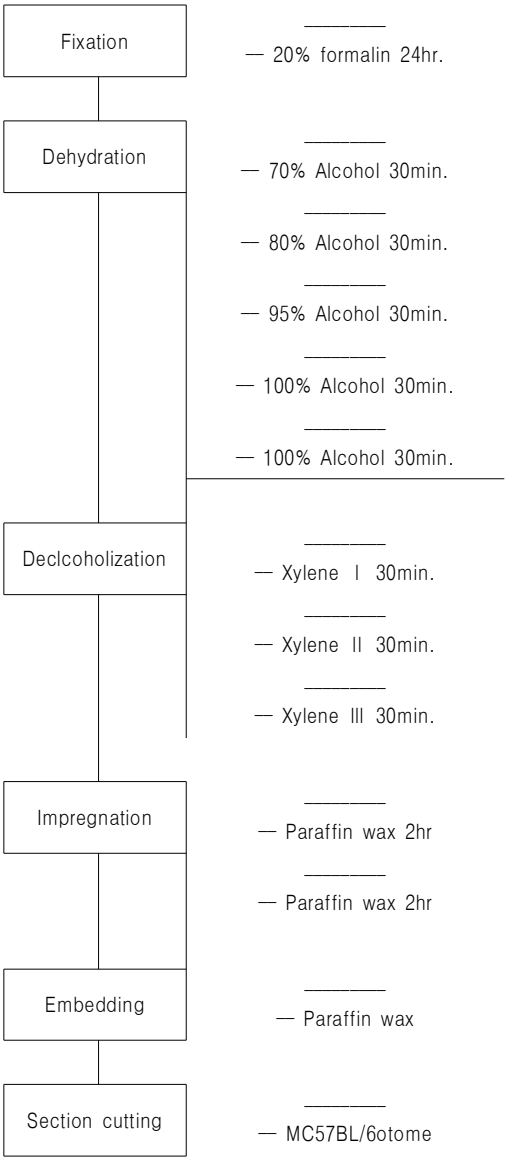


Fig 4. Tissue processing

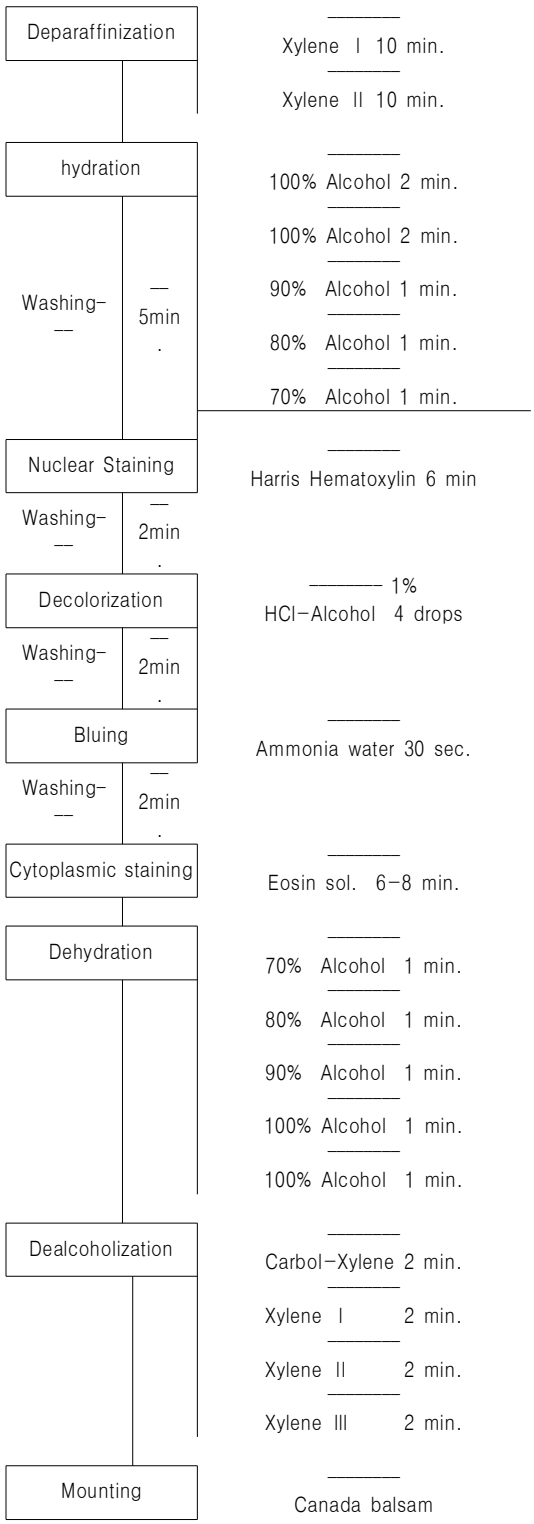


Fig 5. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

4. 통계분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 成 績

1. 장원단과 CT-105에 대한 細胞毒性

1) mLFC 과 PC-12 세포주에서 장원단의 細胞毒性

장원단의 細胞毒性을 측정한 결과, Table 2에서 보는 것 처럼 mLFC의 生存率은 對照群에 비해 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단 投與群에서는 세포독성이 없었으나, 400㎍/㎖ 장원단 投與群은 76.5±5.2(%)로 감소되었으며 ($p<0.01$), PC-12 세포주의 生存率 역시 對照群에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단 投與群은 세포독성이 거의 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 장원단 投與群은 각각 75.8±7.7(%), 80.1±6.8(%)($p<0.05$)로 감소되었다 (Fig.6).

Table 2. Cytotoxicity effects of JangWonDan (JWD) extract on mouse lung fibroblast cells (mLFCs) and PC-12 cell line.

Drugs	Dose (mg/ml)	Percent of control data (%)	
		mLFCs	PC-12
Control	0	100 ± 5.2	100 ± 6.3
JWD extract	1	99.4 ± 5.6	98.8 ± 7.2
	10	97.8 ± 7.8	97.4 ± 5.8
	50	94.6 ± 5.9	93.7 ± 6.0
	100	91.1 ± 6.4	89.1 ± 5.8
	200	82.6 ± 6.8*	80.1 ± 6.8*
	400	76.5 ± 5.2**	75.8 ± 7.7*

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) and PC-12 cell line were pretreated with various concentration JangWonDan (JWD. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

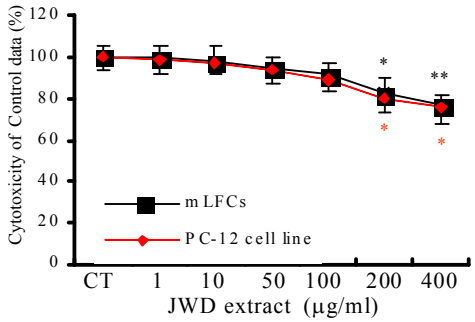


Fig. 6. Cytotoxicity effects of JWD extract on mouse lung fibroblast cells (mLFCs) and PC-12 cell line.
Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) and PC-12 cell line were pretreated with various concentration JangWon-Dan (JWD. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

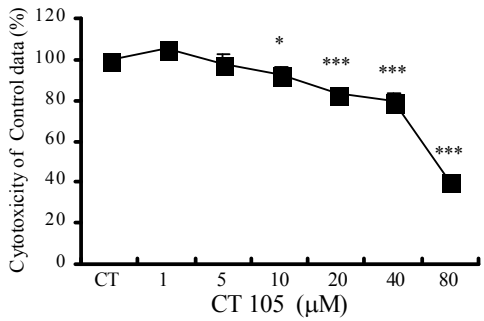


Fig. 7. Cytotoxicity of recombinant CT 105 in PC-12 cell line.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, and 80 mM of CT105 for 72 h. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with CT (control) group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) PC-12 세포주에서 CT-105의 細胞毒性

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 生存率을 관찰한 결과, Table 3에서 보듯이 對照群에 비해 5μM, 1μM의 CT-105 投與群은 변화가 없었고, 80μM, 40μM, 20μM, 10μM 投與群은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%), 83.1±2.7(%), 92.4±3.4(%)로 감소되어 농도 依存的으로 細胞毒性을 나타냈다(Fig. 7).

Table 3. Cytotoxicity of recombinant CT 105 in PC-12 cell line.

Drugs	Dose (μM)	Percent of control data (%) PC-12 cell line
Control	0	100 ± 1.3
CT105	1	105 ± 3.1
	5	97.8 ± 4.9
	10	92.4 ± 3.4*
	20	83.1 ± 2.7***
	40	79.5 ± 3.7***
	80	40.0 ± 1.4***

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with 1 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM, and 80 μM of CT105 for 72 h. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. THP-1 세포주에서 장원단의 염증반응 싸이토카인 유전자 발현 억제효과

THP-1 세포주에서 발현된 염증반응 싸이토카인 중, IL-1β mRNA 유전자 발현에 있어서 Fig.8에서 보듯이 LPS만을 처리한 對照群이 110(Ht)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단을 투여한 實驗群은 각각 31(Ht), 29(Ht), 64(Ht)으로 모두에서 IL-1β mRNA 유전자 발현이 현저히 억제되었고, IL-6 유전자 발현에 있어서는 Fig.9에서 보듯이 LPS만을 처리한 實驗群이 143(Ht)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단을 투여한 實驗群은 각각 56(Ht), 52(Ht), 53(Ht)으로 나타나 모두에서 IL-6 mRNA유전자 발현이 현저히 억제되었으며, TNF-α mRNA유전자 발현에 있어서는 Fig.10에서 보듯이 LPS만을 처리한 對照群이 109(Ht)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단을 투여한 實驗群은 각각 38(Ht), 35(Ht), 52(Ht)으로 나타나 모두에서 TNF-α 유전자 발현이 현저히 억제되었다.

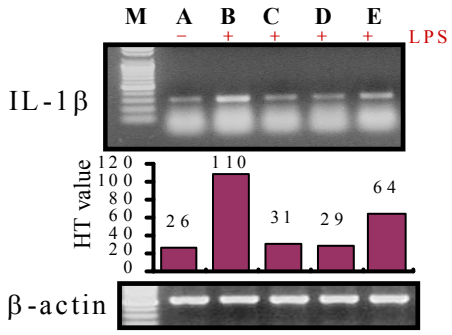


Fig. 8. Inhibitory effects of JWD extract on pro-inflammatory IL-1b gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration JWD extract (100, 10, 1 mg/ml) in the presence LPS (2 mg/ml) for 6 h. IL-1b mRNA express were measured 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. THP-1 cell line media (A), LPS 1 mg/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D), JWD 1 mg/ml (E) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed IL-1b mRNA expression in THP-1 cell line.

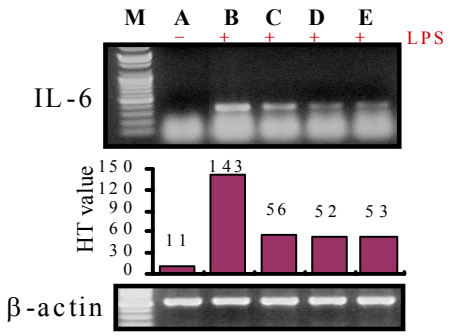


Fig. 9. Inhibitory effects of JWD extract on pro-inflammatory IL-6 gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration JWD extract (100, 10, 1 mg/ml) in the presence LPS (2 mg/ml) for 6 h. IL-6 mRNA express were measured 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. THP-1 cell line media (A), LPS 1 mg/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D), JWD 1 mg/ml (E) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed IL-6 mRNA expression, and internal control (b-actin) in THP-1 cell line.

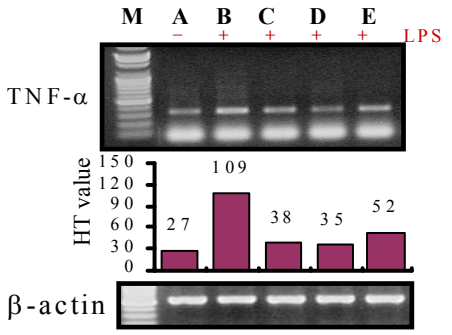


Fig. 10. Inhibitory effects of JWD extract on pro-inflammatory TNF-a gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.
THP-1 cell line were pretreated with various concentration JWD extract (100, 10, 1 mg/ml) in the presence LPS (2 mg/ml) for 6 h. IL-6 mRNA express were measured 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. THP-1 cell line media (A), LPS 1 mg/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D), JWD 1 mg/ml (E) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed TNF-a mRNA expression, and internal control (b-actin) in THP-1 cell line.

3. 장원단이 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE activity에 미치는 억제효과

1) APP, AChE, GFAP 유전자 발현 억제효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, Fig.11에서 보듯이CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群이 152(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 實驗群은 각각 89(Ht), 149(Ht)으로 나타나 100㎍/㎖에서 발현이 현저하게 억제되었고, AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, Fig.12에서 보듯이 對照群이 58(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 實驗群은 각각 25(Ht), 33(Ht)으로 나타나 농도의존적으로 발현이 현저하게 억제되었으며, GFAP 유전자 발현은 Fig.13에서 보듯이 對照群이 69(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 實驗群은 각각 43(Ht), 56(Ht)으로 나타나 100㎍/㎖ 농도에서 발현이 현저히 억제되었다.

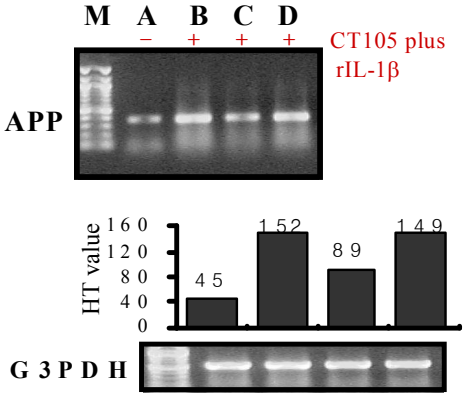


Fig.11. Inhibitory effects of JWD extract on amyloid precursor protein (APP) mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1b.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated wit various concentration JWD extract (100, 10 mg/ml) in the presence CT105 (20 mM) plus recombinent IL-1b (100 ng/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), CT105 20mM plus recombinent IL-1b 100 ng/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

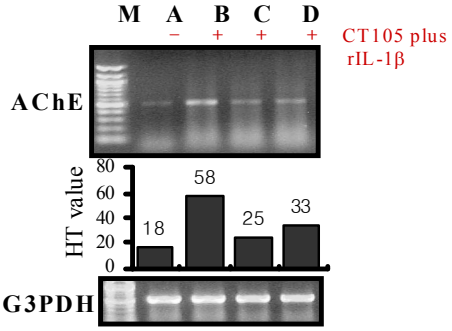


Fig.12. Inhibitory effects of JWD extract on acetylcholinesterase (AChE) mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1b.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated wit various concentration JWD extract (100, 10 mg/ml) in the presence CT105 (20 mM) plus recombinent IL-1b (100 ng/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), CT105 20mM plus recombinent IL-1b 100 ng/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D), and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

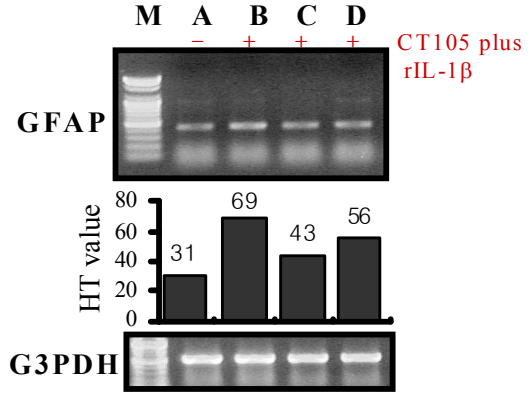


Fig.13. Inhibitory effects of JWD extract on glial fibrillary acidic protein (GFAT) mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1b.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated wit various concentration JWD extract (100, 10 mg/ml) in the presence CT105 (20 mM) plus recombinent IL-1b (100 ng/ml) for 6 h. GFAP 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), CT105 20mM plus recombinent IL-1b 100 ng/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D), and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed GFAP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

2) AChE activity와 APP의 immunoblotting 분석

① AChE activity의 억제 효과

PC-12 세포주에서의 AChE activity를 측정한 결과, Table 4에서 보는 것처럼 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群이 100.0±8.6(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 投與群은 각각 42.5±8.8(%) ($p<0.001$), 59.3±9.1(%) ($p<0.01$), 97.1±7.1(%)로 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였다 (Fig. 14).

Table 4. Effect of JWD extract on the AChE activity in CT105 plus rIL-1β stimulated PC-12 cells.

Group		CT105 + rIL-1β	AChE activity (% of control)
PC-12 cell Media		−	8.7 ± 2.6
Control (CT)		+	100.0 ± 8.6
JWD (μg/ml)	100	+	42.5 ± 8.8***
	10	+	59.3 ± 9.1**
	1	+	97.1 ± 7.0

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration JWD extract (100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105 (20 μM) plus rIL-1β (100 ng/ml) for 24 h.The lysate (100 μl,mg/ml) were measured using AChE diagnostic kits (Sigma). The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Media was not treated, CT105 plus rIL-1β was control, CT105 plus rIL-1β + JWD (100 μg/ml), CT105 plus rIL-1β + JWD (10 μg/ml), and CT105 plus rIL-1β + JWD (1 μg/ml). Statistically significant value compared with CT105 plus rIL-1β control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

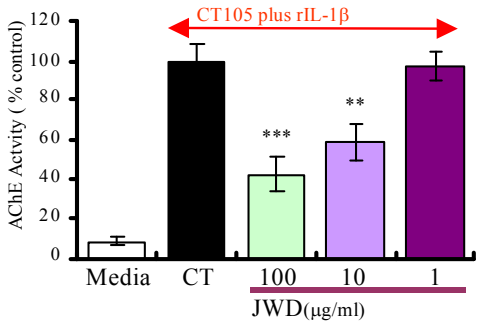


Fig.14. Effect of JWD extract on the AChE activity in CT105 plus rIL-1b stimulated PC-12 cells.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration JWD extract (100, 10 mg/ml) in thepresence CT105 (20 mM) plus rIL-1b (100 ng/ml) for 24 h.The lysate (100 ml,mg/ml) were measured using AChE diagnostic kits (Sigma). The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Media was not treated, CT105 plus rIL-1b was control, CT105 plus rIL-1b + JWD (100 mg/ml), CT105 plus rIL-1b + JWD (10 mg/ml), CT105 plus rIL-1b + JWD (1 mg/ml). Statistically significant value compared with CT105 plus rIL-1b CT(control) group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

② APP의 immunoblotting 분석

PC-12 세포주에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, Fig.15에서 보는 것 처럼 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 投與群에서 APP 단백질 발현이 현저히 억제되었다

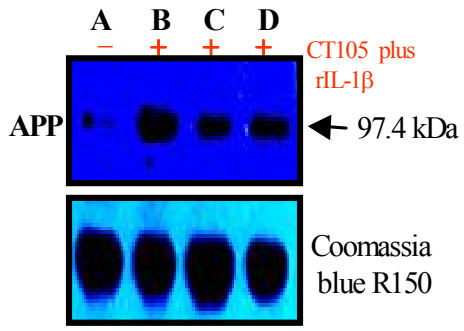


Fig. 15. Suppression effect of JWD extract on the amyloid precursor protein (APP) in PC-12 stimulated CT105 plus rIL-1b by Western blot analysis.
Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration JWD extract in the presence CT105 (20 mM) plus rIL-1b (100 ng/ml) for 24 h. APP expression was measured by immune Western blot assay. Cell lysate (50 mg/lane) were separated by SDS-polyacryamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. RPMI-1640 media control was not treated (A), CT105 20mM plus recombinent IL-1b 100 ng/ml Control (B), JWD 100 mg/ml (C), JWD 10 mg/ml (D)

4. βA로 유도된 AD 病態 생쥐에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과

장원단 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, Table 5에서 보듯이 tacrine 투여군은 4주째에 35.0±6.8(sec)(p<0.01)이었고, 8주째에는 30.7±5.6(sec)(p<0.01)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig.16). 장원단 투여군은 Fig. 16에서 보듯이 4주째에 45.1±6.4(sec)(p<0.01)이었고, 8주째에는 27.7±7.5(sec)(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있는 현저한 감소를 나타내었다 (Table 5).

Table 5. Effect of JWD extract on the βA-induced alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

Treatment	βA	Pre-Training (sec)	Stop-through latency (sec)	
			4 week time (s)	8 week time (s)
Control	+	83.4±6.0	71.0±7.9	67.9±8.0
Tacrine (10mg/kg)	+	84.6±7.3	35.0±6.8**	30.7±5.6**
JWD (73mg/kg)	+	85.5±8.4	45.1±6.4**	27.7±7.5**

C57BL/6 mice were orally administered of JWD extract 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 JWD (73mg/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected bA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); JWD (73 mg/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 bA -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

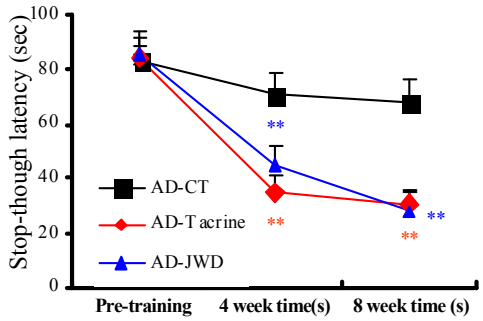


Fig.16. Effects of JWD extract on the bA-induced alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of JWD extract or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of 73JWD (73mg/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected bA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); JWD (73 mg/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 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 운동성 감퇴 효과

약물 투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, Table 6에서 보듯이 장원단 投與群은 4주 후 505±109(㎝)로 對照群에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고 ($p<0.01$), 8주 후 역시 330±85(㎝)로 對照群에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타냈다 ($p<0.01$)(Fig. 17).

Table 6. Effect of JWD extract on the βA-induced alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.

Treatment	βA	Pre-Training (sec)	Distance-though latency (cm) Smdist plus Lardist	
			4 week time (s)	8 week time (s)
Control	+	1560±205	1455±269	1443±286
Tacrine (10mg/kg)	+	1625±265	567±143**	421±113**
JWD (73mg/kg)	+	1688±246	505±109**	330±85**

C57BL/6 mice were orally administered of JWD extract 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 JWD (73mg/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected bA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); JWD (73 mg/kg p.o). 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. Data (Lardist plus Smldist) represent means± S.E (N=10). 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).

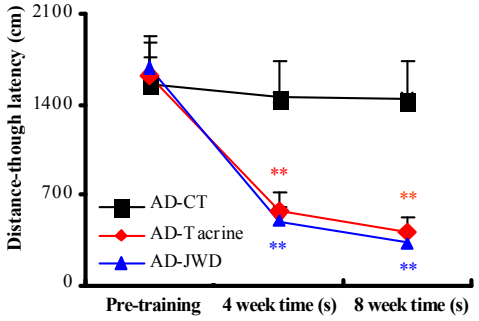


Fig.17. Effects of JWD extract on the bA-induced alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of JWD extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of JWD (73mg/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected bA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); JWD (73 mg/kg p.o). 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. Data (Lardist plus Smldist) represent means± S.E (N=10). 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).

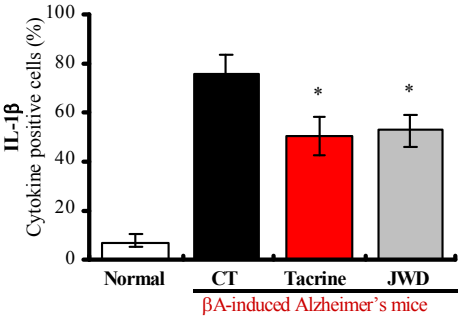


Fig.18. Intracellular staining of IL-1b activity on the brain CD14+cells in bA-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of JWD extract.
C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. continued once a day for 60 days. IL-1b activity 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. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with bA -induced alzheimer's mice group (Control, CT) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

1) AD 病態 생쥐의 microglial 세포에서 세포내면역형광염색

① 세포내 IL-1β 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 IL-1β 발현을 관찰한 결과, Fig. 18에서 보는 것처럼 βA를 뇌에 주입한 對照群이 75.9±8.1 (%), Tacrine을 투여한 陽性對照群이 50.4±7.6 (%)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.05$), 장원단 投與群은 52.5±6.7(%)로 나타나 장원단을 함께 투여한 實驗群에서 그 발현이 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p<0.05$).

② 세포내 TNF-α 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과, Fig. 19에서 보는 것처럼 βA를 뇌에 주입한 對照群이 89.5±6.3 (%), Tacrine을 투여한 陽性對照群이 68.4±5.0(%)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.05$), 장원단 投與群은 62.7±7.9(%)로 나타나 장원단을 함께 투여한 實驗群에서 그 발현이 억제되었다.

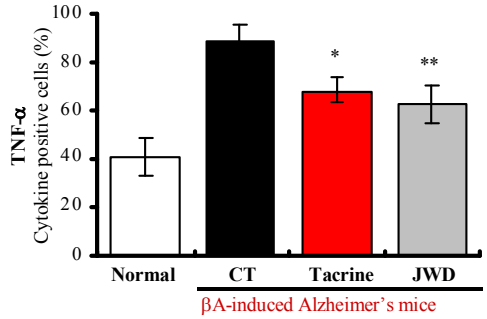


Fig.19. Intracellular staining of TNF-a activity on the brain CD14+cells in bA-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of JWD extract.
C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. continued once a day for 60 days. TNF-a activity 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. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with bA -induced alzheimer's mice group (Control, CT) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

③ 지질과산화도 측정(MDA측정)

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, Table 7에서 보는 것처럼 βA를 뇌에 주입한 對照群이 62.8±8.7 (pg/mg brain tissue), Tacrine을 투여한 陽性對照群이 35.3±6.3 (pg/mg brain tissue)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.01$), 장원단 投與群은 36.3±6.7 (pg/mg brain tissue)로 나타나 장원단을 함께 투여한 實驗群에서 그 발현이 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다($p<0.05$) (Fig.20).

Table 7. Effect of JWD extract on the malondialdehyde value in the brain tissue in βA-alzheimer disease mouse model .

Group	βA	MDA value (pg/mg brain tissue)
Normal	−	14.8 ± 4.6
Control	+	62.8 ± 8.7
Tacrine (10 mg/kg)	+	35.3 ± 6.3 **
JWD (73 mg/kg)	+	36.3 ± 6.7 *

C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Malondialdehyde (MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry., Tissue (mg) in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). 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).

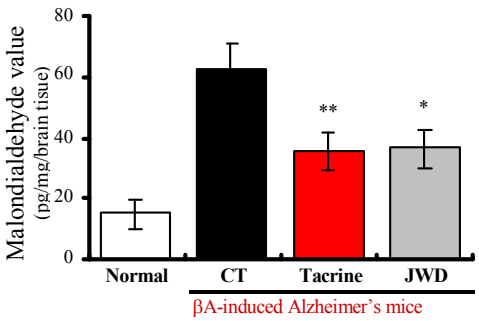


Fig.20. Effect of JWD extract on the malondialdehyde value in the brain tissue in bA-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Malondialdehyde (MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry. Tissue (mg) in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). 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) AD 病態 생쥐의 뇌조직에서 IL-1β와 TNF-α 유전자 발현 억제 효과

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서

IL-1β,와 TNF-α의 mRNA 유전자 발현을 관찰한 결과, Fig. 21에서 보는 것 처럼 IL-1β의 mRNA유전자 발현은 βA를 뇌에 주입한 對照群은 87 (Ht)로 정상군 26 (Ht) 보다 증가하였고, tacrine 투여군은 37 (Ht)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었고, 장원단 投與群은 34 (Ht)로 IL-1β mRNA발현이 현저히 감소했다. TNF-α의 mRNA유전자 발현은 對照群은 155(Ht)이었고, tacrine 투여군에서는 141 (Ht)로 큰변화가 없었고, 장원단 投與群은 82 (Ht)로 대조군에 비하여 현저히 감소하였다.

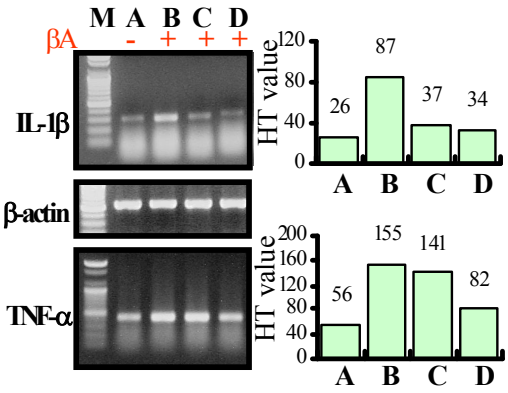


Fig.21. Effects of JWD on the pro-inflammatory mRNA gene expression in brain tissue in normal and bA-alzheimer disease mice. C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal brain tissue (A, not treated group). bA-induced alzheimer's disease mouse brain tissue (B, control). bA-induced alzheimer's disease mouse brain tissue + tacrine (10 mg/kg, p.o C,) treated , and bA-induced alzheimer's disease mouse brain tissue + JWD (73 mg/kg, p.o D, JWD). 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 and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

3) AD 病態 생쥐의 GFAP, CD68/GFAP 발현 세포수 분석

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서 astrocyte세포의 활성표면 분자인 GFAP$^+$가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, Fig 22에서 보듯이 正常群은 1.2 (%), βA를 뇌에 주입한 對照群은 81.4 (%)이었고, 陽性對照群인 tacrine 投與群은 51.3 (%)이었고, 장원단 投與群은 47.6 (%)로 對照群에 비하여 GFAP$^+$이 발현되는 활성세포가 감소한 것으로 나타났다. 그리고 알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서 microglial세포의 활성표면 분자인 CD68$^+$/CD11b$^+$가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, Fig 23에서 보듯이 正常群은 5.5(%), βA를 뇌에 주입한 對照群은 72.7(%)이었고, 陽性對照群인 tacrine 投與群은 41.9(%)이었고, 장원단 投與群은 29.7(%)로 對照群에 비하여 발현되는 활성세포가 현저히 감소한 것으로 나타났다.

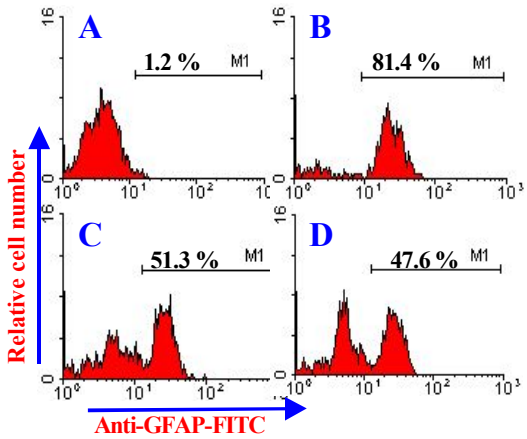


Fig.22. Effects of JWD extract on the percentage of GFAP-gated cells in bA-alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells (5x105 cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, 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. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and normal brain cells (A), bA-induced alzheimer's disease model control GFAP+ (B), tacrine (10 mg/kg, p.o C) treated, and JWD orally administered GFAP+ (D) cell population (%) were measured by analyzed by flow cytometer.

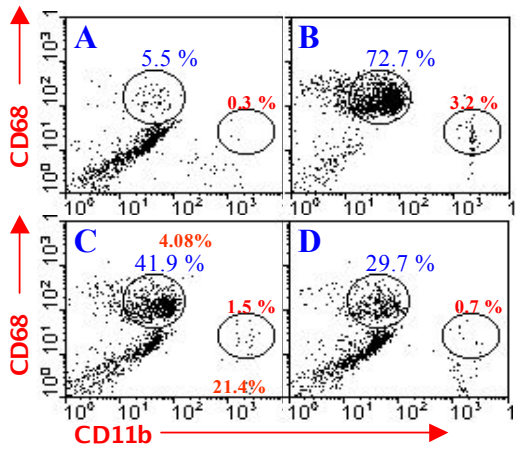


Fig.23. Effects of JWD extract on the percentage of CD68 and CD11b-gated cells in bA-alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells (5x105 cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, 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. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and normal brain cells wild type (A), bA-induced alzheimer's disease model control CD68+ and CD11b+ (B), tacrine (10 mg/kg, p.o C) treated, and JWD orally administered CD68+ and CD11b+ (D) cell population (%) were measured by analyzed by flow cytometer.

6. βA로 유도된 AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 病態 생쥐의 虛血상태에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과, Fig. 24와 Fig. 25에서 보는 것처럼 βA를 뇌에 주입한 對照群에서 虛血의 크기가 95±4.9 (%)이었고, tacrine 투여군은 51.8±8.4 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.001$), 장원단 投與群에서는 48.8±7.6 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p<0.001$).

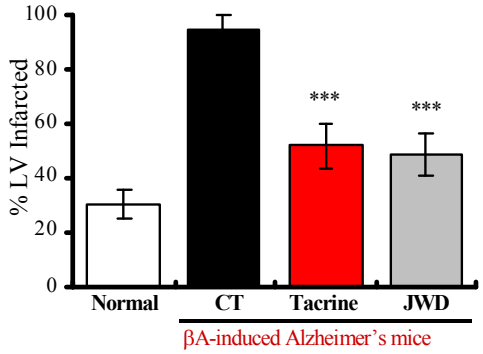


Fig.24. Effects of JWD extract on the infarct size of bA-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73 mg/kg, p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg, p.o). 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). Data represent means± S.E (N=3). 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).

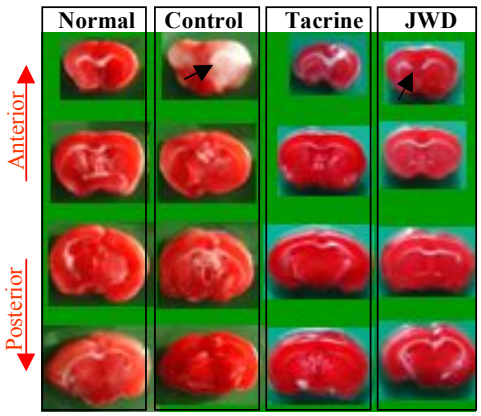


Fig.25. Effects of JWD extract on the coronal section of bA-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of JWD (73 mg/kg, p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg, p.o). 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 localizies at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6-12 mm from frontal pole.

2) AD 病態 생쥐의 조직손상에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 正常群은 Hippocapus와 entorhinal (EC) 그리고 fimbriaformix (FIFX)가 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증과 병변으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 tacrine과 장원단을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있다 (Fig. 26). 그리고 hippocapus의 neuronal line이 正常群은 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증세포와 병변 등으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 tacrine과 장원단을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 hippocapus의 neuronal line를 보이고 있다 (Fig. 27). Hippocapus에 Fig. 28의 B pannel과 같은 조직에 astrocytes와 microglial 세포 (화살표)가 침투되어 neuronal line이 사라지고 병변이 심화된 것을 볼 수 있다. 그리고 tacrine과 장원단을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 astrocytes와 microglial 세포가 Hippocapus로 침투가 억제된 것을 알수 있었다 (Fig. 28). Fig. 29은 Hippocapus 부분의 조직으로 정상군 (A pannel) pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, B pannel은 βA로 유발된 虛血상태로 Hippocampus에서의 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum이 유도되고, oligodendrocytes- like cells와 astrocytes-like cells이 강하게 나타남을 볼 수 있었으나, 장원단 投與群인 D pannel은 對照群에서 뇌의 虛血상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes -like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig.29)

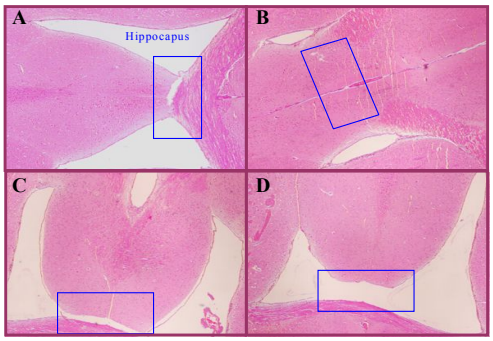


Fig.26. Histological analysis of hippocampal lesions of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of JWD or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); JWD (284 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ( ) at bright microscope (Nikon, x40).

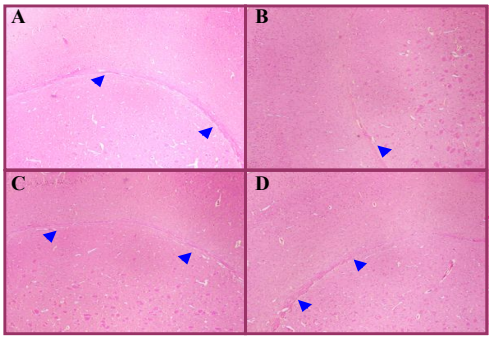


Fig.27. Histological analysis of the neuronal loss of hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of JWD or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); JWD (284 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ( ) at bright microscope (Nikon, x40).

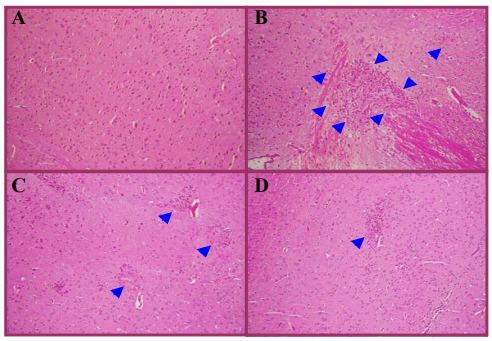


Fig.28. Histological analysis of the presence of macrophage /microglia in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of JWD or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); JWD (284 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ( ) at bright microscope (Nikon, x100).

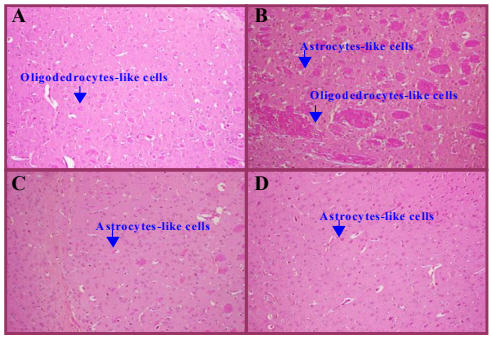


Fig.29. Histological analysis of brain tissue in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of JWD or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); JWD (284 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ( ) at bright microscope (Nikon, x100).

IV. 考 察

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 惹起되는 기억력을 비롯한 認知機能의 저하를 특징으로 하는 症候群으로, 대개 만성적으로 진행하여 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등을 포함하는 高度의 대뇌기능의 障碍를 나타내며[1-3], 일상생활의 營爲에서도 심각한 障碍를 초래하는 데[4], 인간이 傳染病 및 營養失調를 극복하고 사회가 발전해 감에 따라 인간의 수명은 크게 연장되어 노화로 인한 질환, 그 중에서도 특히 痴呆는 심각한 사회문제로 대두되고 있다[1].

이런 癡呆에는 AD, VD, 중독성 치매등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로[5], 뇌의 全般的 萎縮과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[1-2], 發病은 서서히, 경과는 漸進的인 것이 특징이다[2]. 症狀으로는 주위에 대한 無關心, 自發性의 缺如, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緖不安, 騷亂 또는 憂鬱, 無言, 無反應, 大小便失禁 등을 보인다[3]. 生存率은 발병 후 약 10~15년 정도로 보고되고 있고, 보편적으로 東洋보다 西洋에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 頻發하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 疾患에 罹患되는 것으로 力學的 調査에 의해 報告되어 있다[15]. 그리고 혈관성치매는 20-30%정도이고 약물이나 알코올중독에 의한 중독성 치매는 10-20%정도이며, 사고에 의한 뇌의 손상도 癡呆의 원인이 될 수 있다[16].

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS (presenilin), oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는 데[6], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 沈

積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[7].

큰 分子量의 APP가 잘라져서 βA가 유래되는 데, APP는 다양한 molecular weight form이 있어, βA sequence를 포함한 amino acid의 수에 따라 APP695, APP751, APP770 등으로 불린다. 결국 βA는 β-secretase나 ɣ-secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로[10] 一部가 잘라져서 비정상적인 工程科程을 거쳐 βA를 만드는데, 소수성 아미노산 殘期가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 凝集하는 성질을 가지고 있다[17].

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 βA의 蓄積은 AD 유발의 결정적 因子로 amyloid의 蓄積이 점차 커지면서 βA가 신경세포를 손상시켜 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. 그러나 βA는 그 자체가 神經毒性이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉽게 만들어 癡呆의 증상이 유발시키는 것이다[18].

또한 최근에는 APP의 일부분인 CT-105가 βA보다 더 毒性이 있다는 보고와[18], βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[19], βA와 CT-105의 毒性機轉에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌 안에서의 抗酸化作用을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 老人癡을 형성하고 神經毒性을 나타내는 것으로 판단되고 있다[20].

APP는 21번 染色體에 encord되어 있는 단백질으로[21], 21번 染色體가 3개인 다운증후군 환자의 경우 30, 40대에 早期痴呆 현상을 빈번히 나타내고, 그 환자의 뇌에서 老人癡과 신경섬유다발이 발견됨이 보고되고 있는 데, 이는 유전자 수가 증가한 효과에 의해 APP가 과도 생성되었기 때문이라고 추측되고 있으며[17], AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되고 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가된다는 보고로 볼 때, APP가 노화와 痴呆 형성과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[19].

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonine, GABA 등의 수준이 病的으로 낮아지며[9], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[13], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 증거를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[9].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 藥物들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[22]과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[23]이 있는 데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 毒性이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[23].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 神經膠細胞에서 생성되는 염증반응 싸이토카인에 의해 신경세포의 死滅이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 BBB(Blood Brain Barrier)가 손상되면 免疫系 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 염증반응 싸이토카인들을 과다하게

분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 假說로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[10,22,24].

정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 營養因子로서, cytokine들을 微量 분비함으로써 뇌의 生體 恒常性을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 病變 부위에 나타나는 神經膠細胞는 microglial cell로 astrocyte의 主要刺戟因子인 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[10], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF(colony-stimulating factor), IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 活性酸素의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 死滅을 惹起하게 된다[24].

또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 病變 부위에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 염증반응 싸이토카인이 밀접한 관계가 있으리라는 假說에 관심이 집중되고 있다. 특히 βA가 沈積된 老人癡 주변의 microglial cell은 βA에 의해 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 염증반응 싸이토카인을 생성하므로써 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있다[25].

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를 들 수 있는 데, astrocyte는 神經膠細胞로서 microglial cell 등과 함께 생성하는 염증반응 싸이토카인에 의해 신경세포의 死滅를 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이는 데, 이는 神經膠細胞인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 老人癡 형성과 신경변성과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다[26].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴呆[27]', '呆病[28]', '健忘[29]' 등의 範疇에 속하며, 明代 張[27]의 ≪景岳全書·癲狂痴呆≫에서 痴呆에 대한 最初의 記述이 登場하는 데, "痴呆症, ... 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.....", "凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴獃라 되어 있다.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 使用되고 있다[27-8,30].

原因에 대해서는 歷代 文獻에서 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 提示되고 있는데[27-8,30], 현재 中醫學[30]에서는 비록 일관된 治療는 아니지만, AD와 VD로 區分하고, AD를 다시 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 주로 肝腎陰虛 心脾兩傷 腎精虧虛 脾腎陽虛로 辨證하여 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 益氣補血 補益腎精 溫補脾腎 等의 治法을 應用하며, 實證으로는 痰飮과 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內低 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 等의 治法을 應用하고 있다.

장원단은 龔廷賢[31]이 著한 ≪萬病回春≫에 "專補心生血 寧神定志 淸火化痰 臺閣勤政 勞心… 幷健忘怔忡不寐 及不善記 而多忘者 服之能日誦千言" 이라 수록된 처방으로, ≪東醫寶鑑≫[32]에서는 "善忘者 … 宜服壯元丸"이라 하여 이후 醫家들에 의해 健忘에 많이 활용되어 왔으며, 본 方은 養血安神理脾하는 方으로 心血不足으로 氣鬱生痰하고 脾氣不舒하여 된 健忘에 通用되어 온 처방[33]이다.

壯元丹의 구성과 性味를 살펴보면 遠志는 苦辛而微溫하여 寧心安神, 祛痰利竅, 治 健忘驚悸, 神志恍惚하고, 龍眼肉은 甘溫하여 補益心脾, 養血安神, 治氣血不足, 健忘失眠, 血虛萎黃하고, 生地黃은 甘寒하여 淸熱凉血, 養陰生津, 治 陰虛內熱, 內熱消渴하고, 玄蔘은 甘苦鹹寒하여 滋陰淸熱, 治 津傷便秘, 骨蒸勞嗽하고, 石菖蒲는 辛苦溫하여 化濕開胃, 開竅豁痰, 醒神益

智, 治 神昏癲癎, 健忘耳聾하고, 朱砂는 鎭心安神, 定驚解毒, 治心悸易驚, 癲癎發狂, 小兒驚風하고, 人蔘은 甘微苦微溫하여 大補元氣, 固脫生津, 安神, 治勞傷虛損, 食少, 倦怠, 健忘, 小兒慢驚, 一切氣血津液不足하고 白茯神은 甘淡平하여 寧心, 安神, 利水, 治心虛驚悸, 健忘, 驚癎하고, 當歸는 甘辛溫하여 補血和血 治 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺하고, 酸棗仁은 甘酸平하여 補肝, 寧心, 斂汗, 生津, 治虛煩不眠, 驚悸多夢, 體虛多汗하고, 麥門冬은 甘微苦微寒하여 養陰潤肺, 淸心除煩, 益胃生津, 治 虛勞煩熱, 消渴, 熱病傷津하고, 栢子仁은 甘平하여 養心安神, 治虛損失眠, 心悸怔忡의 효능[34]이 있어 氣機不利 후의 痰, 血虛 등이 原因이 되어 발생하는 치매에 응용을 고려해 보았다.

최근 한의학에서의 치매에 대한 연구동향을 살펴보면 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響[35], 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 영향[36], 聰明湯이 健忘誘導 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響에 대한 연구[37]등이 이루어졌으나, 장원단에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 장원단이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 장원단과 CT-105의 細胞毒性을 mLFC와 PC-12 세포주에서 관찰하고, LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 싸이토카인과 CD68/GFAP의 발현, 뇌조직의 虛血상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 먼저 적당한 實驗藥物(장원단)와 處理物質(CT-105)의 농도를 정하기 위하여 細胞毒性을 測定하였는 데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 장원단을 처리한 후 細胞毒性을 측정한 결과, mLFC의 生存率은 對照群에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단 投與群에서는 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 장원단 投與群은 각각 64.3±5.1(%), 76.4±3.2(%)로 감소되었으며, PC-12 세포주의 生存率 역시 對照群에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단 投與群은 변화가 없었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 장원단 投與群은 각각 71.1±5.0(%), 78.1±3.7(%)로 감소되었다(Table 2, Fig. 6). 이러한 결과는 100㎍/㎖이하의 농도로 장원단을 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 細胞毒性이 나타나지 않아 生存率이 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 주로 100㎍/㎖이하의 장원단을 사용하기로 하였다.

실험에 사용된 PC-12 세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 PS-1의 발현이 쉽게 관찰되어 AD의 연구에 상용되는 세포이며, CT-105는 βA를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로, 실험적으로 PC-12 세포주와 cortical neuron에 毒性을 나타내고, 생쥐에 대해 기억력을 감퇴시키고 神經變成을 초래하며 칼슘의 항상성을 파괴하는 작용을 하며, 배양된 microglial cell에서 IL-1, IL-6 유전자를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있다[38].

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 生存率을 관찰한 결과, 對照群에 비해 5μM, 1μM의 CT-105 投與群은 변화가 없었고, 80μM, 40μM, 20μM, 10μM 投與群은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%), 83.1±2.7(%), 92.4±3.4(%)로 감소되어 농도 依存的으로 細胞毒性을 나타내어 이후 PC-12 세포주를 材料로 한 실험에서는 80% 이상의 生存率을 나타낸

20μM 농도의 CT-105를 주로 처리하기로 하였다.

본 실험에서 사용한 THP-1 세포주는 사람의 monocyte cell로, LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태를 나타내어 사람의 primary microglial cell 모델을 제공하며[25], LPS와 βA를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다고 보고가 있어[39], THP-1 세포주에 LPS(2㎍/㎖)을 처리하여 염증반응 싸이토카인을 유발시켜 뒤 서로 다른 농도의 장원단(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)를 6시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, 장원단이 microglial cell의 염증반응 싸이토카인 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하기로 하였다.

THP-1 cell에서 발현된 염증반응 싸이토카인 중, IL-1β 유전자는 LPS만을 투여한 對照群에 비해 장원단을 투여한 實驗群 모두에서 발현이 현저히 억제되었고(Table 4, Fig. 8), IL-6 유전자는 LPS만을 투여한 實驗群에 비해 장원단을 투여한 實驗群 모두에서 IL-6 유전자 발현이 현저히 억제되었으며(Table 4, Fig. 9), TNF-α 유전자 역시 LPS만을 투여한 對照群보다 장원단을 투여한 實驗群의 발현이 현저히 억제되었다(Table 4, Fig. 10). 이것으로 장원단이 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 過剩발현을 顯著히 감소시켰음을 알 수 있는데, 이는 장원단이 AD의 원인 중 하나로 알려진 microglial cell의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 사료된다.

다른 방면으로 AD에 미치는 장원단의 효과를 알아보고자. PC-12 세포주에 20μM의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 후 각각 다른 농도의 장원단(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)를 24시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, APP, AChE, GFAP 유전자 발현에 미치는 억제효과를 平價하였다.

PC-12 세포주의 APP, GFAP 유전자 발현을 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群에 비해 100㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 實驗群에서 발현이 현저하게 억제되었고(Table 5, Fig. 11, 13), AChE 유전자 발현은 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群에 비해 實驗群은 장원단의 농도에 관계없이 발현이 현저하게 억제되었음을 볼 수 있었으니(Table 5, Fig. 12), 이는 장원단이 CT-105와 rIL-1β로 인해 PC-12 세포주에 과도하게 발현되는 APP, AChE, GFAP를 효과적으로 억제시킨 결과로 老人痴 形成에 관여하는 APP, 기억력 장애에 중요한 역할을 하는 AChE, 그리고 astrocyte 활성화의 특징적 표식자인 GFAP를 억제함으로써 AD의 예방과 記憶力 감퇴 등의 증상 치료에 기여할 수 있음을 보여준 것이라 할 수 있겠다.

PC-12 세포주에서의 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20μM의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 뒤 서로 다른 농도의 장원단을 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도는 CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群이 100.0±8.6(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 投與群은 각각 42.5±8.8(%), 59.3±9.1(%), 97.1±7.0(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제효과를 보였는데 (Table 6, Fig. 14), 이를 AChE 유전자 발현 결과와 함께 보면 장원단의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 AChE가 억제되는데, 장원단의 투여가 acetylcholine의 양이 증가시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

APP는 Western blot을 통해 측정하였는데, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 對照群에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 장원단을 함께 투여한 實驗群에서 농도에 따른 유의성 있는 APP 억제효과를 보였다(Fig. 15). 이를 APP 유전자 발현 결과와 함께 보면 장원단의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 APP가 억제된 것으로 장원단의 투

여가 βA의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써 임상적으로 AD의 예방에 사용해 볼 수 있음을 보여 준 것이라 할 수 있겠다.

Morris water maze 과제는 동물의 空間學習과 記憶을 검사하기 위해 사용되며, 空間情報 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 空間準據記憶을 측정하는 것으로[51], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 病態 생쥐에 대한 장원단의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

본 실험에서 김[40]의 논문에서와 같이 CT-105를 사용하지 않고 βA를 통해 AD 病態 생쥐모델을 만든 이유는, CT-105와 βA는 AD 유발에 원인이 되는 peptide 40개의 아미노산 염기로 이루어져 있는 것으로 CT-105는 cloning과정에서 완전정제가 이루어지지 않아 생쥐의 뇌에 주사했을 때 아주 강한 허혈과 원하지 않은 뇌조직의 뇌세포 활성을 나타내었다. 이에 반하여 βA는 완전 정제 순수단백질로 정확하게 hippocampus 주위에 만들어지는 허혈과 plaque, tangle 등이 사람 AD 환자의 그것과 유사하게 만들어져 *in vivo*인 AD 病態 생쥐에서는 CT-105보다 βA사용이 적절하다고 사료되었으며, CT-105는 *in vitro*에서 rIL-1β와 함께 동시 사용하였다.

장원단 투여 4주후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 장원단 投與群은 각각 45.1±6.4(sec), 27.7±7.5(sec)로 모두 對照群에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여(Table 8, Fig. 16), 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제 효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement- through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 장원단 投與群은 4주후 505±109(㎝)로 對照群에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 330±85(㎝)로 對照群에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 현저한 운동성 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다(Table 9, Fig. 17).

결국 Morris water maze의 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 장원단 投與群이 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 장원단을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있었다.

인체 조직의 산화적 손상은 Nakaya 등(1987)에 의해 세포막에서 지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어난다고 하였다.

그러나 다행스럽게도, 미토콘드리아의 기질 및 각 조직에는 Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX), Glutathione Reductase (GRD) 등 산화스트레스 (Oxidative stress)에 대한 항산화효소들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 전자전달계에서 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. 즉, 생체막에서 생성된 지질 과산화(lipid peroxide)의 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격(지질, 단백질이나 효소 등)·변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin축적, 세포 구성에 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다(Tappel, 1973). 따라서 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

지질 과산화 (malonedialdehyde, MDA)의 과정은 메틸기(CH_2)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 PUFA

와 반응할 때 시작된다. 따라서, 형성된 라디칼(peroxyl radical)은 그들이 다음 단계의 연쇄반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있기 때문에 특히 위험하다(Holley et al., 1993)고 할 수 있다. 생체막에서 생성된 지질과산화(lipid peroxide)의 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격(지질, 단백질이나 효소 등)·변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin축적, 세포 구성에 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다(Tappel, 1973). 따라서 운동중에 에너지 요구량의 증가, 특히 유산소성 에너지의 증가는 활동 조직에 수십배의 산소공급을 요구한다. 증가된 산소 소비율은 미토콘드리아에서의 대사를 비례적으로 증가시켜, 산소 자유라디칼과 ROS의 생성 또한 증가시키게 된다. 증가된 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 자유라디칼 생성과 뒤이은 지질 과산화, 즉 막 PUFA의 과산화는 운동중 산소섭취의 상승에 비례하여 증가하고, 골격근 손상에 정적 상관관계가 있다(Kanter et al., 1993; Maxwell et al., 1993; Viguie et al., 1993)고 한 연구처럼 활동에 따른 지질 과산화 정도를 파악하거나, 항산화제 투여에 따른 변화정도를 규명하는 방향으로 연구가 진행되리라 생각하고, 본 연구에서 알츠하이머 생쥐의 병변 뇌에서 지질 과산화와 장원단 투여로 지질 과산화 물질을 억제할 수 있는 지를 규명하고자 하였다.

그 결과 장원단 추출물을 투여로 알츠하이머 생쥐의 병변 뇌부위에 MDA의 양이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 그 원리는 과산화 지질의 분해에 생성되는 MDA의 2 분자와 thiobarbituric acid (TBA)가 결합하여 생성되는 적색물질의 흡광도를 측정하는 원리를 사용하였다.

βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 병변 뇌조직에서의 염증반응 싸이토카인, MDA, CD68/GFAP 및 ROS 발현을 관찰하였는데, 먼저 병변 뇌조직에서의 염증반응 싸이토카인의 일종인 IL-1β 생산량과 IL-1β의 유전자 발현을 관찰한 결과, 正常群에 대해 βA를 뇌에 주입한 對照群에서는 증가되었으나 장원단 投與群에서는 그 발현이 현저히 감소했고(Fig. 16, 19), TNF-α 단백질과 TNF-α의 유전자 발현 역시 正常群에 비해 βA를 뇌에 주입한 對照群은 증가하였으나 장원단 投與群은 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 19, 21).

이는 장원단이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증反應과 관련된 cytokine의 활성화를 세포성 단백질 수준과 유전자 수준 모두 효과적으로 억제한 것으로, 장원단의 투여를 통해 과잉 생산된 염증반응 싸이토카인으로 초래되는 신경세포 死滅을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

AD는 뇌의 특정부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌부분에는 뉴론, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglia 등이 많이 沈積된 특징을 나타낸다.

이러한 병변 부위는 plaques과 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 MAP2(microtubuleassociated protein 2), GFAP, CD11b, CD68, βA-protein 또는 tau 단백질등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuronal, astrocytic, macrophage 그리고 microglial differentiation 등의 세포들은 표지인자(MAP2, GFAP, CD11b and CD68)를 사용하여 확인되었고 또한, 염증유발 싸이토카인(IL-1β, TNF-α) 그리고 ROS도 높은 농도로 蓄積되어있다.

이러한 배경으로 본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 biopy하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포형광분석기로 병변부분의 astrocyte와 microglia 세포수를 측정하기 위하여 두세포의 표면 표지인자인

CD68/GFAP를 관찰하여 對照群에 비하여 장원단 投與群이 현저한 CD68/GFAP 세포수 감소 결과를 얻었다(Fig. 22). 이는 장원단 성분이 BBB막을 통과하였는지 아니면 다른 활성인자로 기인된 것인지는 확인할 수 없었지만 AD 유발 동물의 뇌 병변부위를 이루고 있는 염증세포수가 크게 감소한 결과이고 또한 신경과 뇌세포사 정상으로 회복되었음을 의미하는 것이기도 하다.

AD 病態 생쥐모델 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 對照群에 비해 장원단 投與群은 유의성 있게 虛血의 크기가 작아져(Fig. 22, 23), 장원단이 βA로 유발된 뇌조직의 虛血상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 正常群의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 Hippocampus 주위에 正常群과 비교할 때 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus 등이 현저히 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes -like cells과 astrocytes -like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 장원단 投與群은 對照群에서 뇌의 hippocampus 주위에 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes -like cells, astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 현저히 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 24, 25), 이는 장원단이 뇌 虛血로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 虛血과 관련된 AD의 예방할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다.

이상의 결과를 종합해 보면 장원단은 LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 억제하였고, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP 유전자의 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 억제하였으며, βA로 유도된 AD 病態 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 microglial cell에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현, 과산화 지질도 (MDA)과 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현을 모두 억제하였고, CD68/GFAP와 ROS의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며, 뇌조직의 虛血상태를 개선하고 虛血상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 장원단은 βA의 과다 생성, microglial cell의 염증반응 싸이토카인의 과잉 발현 등으로 인해 惹起될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 惹起되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 장원단의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

장원단이 CT-105와 βA로 유도된 AD 病態 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 장원단은 THP-1 세포주의 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자 발현을 억제하였다.
2. 장원단은 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현을 억제하였다.
3. 장원단은 PC-12 세포주의 AChE의 activity와 APP 발현을 억제하였다.

4. 장원단은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.
5. 장원단은 병변 뇌조직에서의 IL-1β, TNF-α의 발현, MDA와 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현, CD68/GFAP의 세포수를 억제하였다.
6. 장원단은 뇌조직의 虛血 상태를 유의성 있게 개선하였고 虛血로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

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

參 考 文 獻

1. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.8788, 465467, 514518, 600, 1995.
2. 郭隆璨 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.2731, 1992.
3. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 고려의학, pp.225228, 230232, 1992.
4. 이가옥 : 노인생활실태 분석 및 정책과제, 한국보건사회연구원, pp.114132, 1994.
5. Baddeley A.D・Bressi S・Sala S.D・Logie R・Soinnler H : The decline of working memeory in Alzheimer's disease. Brain, 114:25212542, 1991.
6. McGeer EG・McGeer PL : The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol, 33(5):371378, 1998.
7. 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, 593(2):299303, 1992.
8. Trabace L・Cassano T・Steardo L・Pietra C・Villetti G・Kendrick KM・Cuomo V : Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther, 294(1):187194, 2000.
9. 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, 53(9):12631269, 1997.
10. Pyo H・Joe E・Jung S・Lee SH・Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem, 274(49):3458434589, 1999.
11. 尹相鶴, 李相龍 : 健忘症에 對한 東西醫學的 考察, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 9(2):293313, 2001.
12. 文誠秀・李相龍 : 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 11(1):1936, 2000.
13. 정인철・이상룡 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(2):260276, 2001.
14. 金英旭 : 聰明湯이 健忘誘導 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1999.
15. Swash M・Oxbury J : Clinical Neurology,

NewYork, 1:120129, 1991.

16. Refolo LM · Salton SR · Anderson JP · Mehta P · Robakis NK : Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzhiemer amyoid precursor form PC12 cell cultures. Biochem Biophys Res Commun, 164:664670, 1989.
17. Gomez-Isla T · Price JL · McKeel DW J r · Morris JC · Growdon JH · Hyman BT : Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. J Neurosci, 16(14):44914500, 1996.
18. Gridley KE · Green PS · Simpkins JW : Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. Brain Res, 778(1):158165, 1997.
19. Breakefield XO · Geller AI : Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol, 1(4):339371, 1987.
20. Kim HJ · Suh YH · Lee MH · Ryu PD : Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein. Neuroreport, 10(7):14271431, 1999.
21. 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, 338:777782, 1999.
22. Foster NL · Petersen RC · Gracon SI · Lewis K : An enriched-population, double-blind, placebo-controlled, crossover study of tacrine and lecithin in Alzheimer's disease. Dementia, 7(5):260266, 1996.
23. 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, 54(7):836840, 1997.
24. 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, 19(9):34403447, 1999.
25. 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, 74(3):10171025, 2000.
26. Zhao W · Bing-sheng L · Alkon DL · Barker JL · Chang YH · Wu M · Rubinow DR : TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. Neuroreport, 11(2):409412, 2000.
27. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610611, 1978.
28. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
29. 洪元植 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, pp.217218, p.229, 1985.
30. 黃大東 외 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378381, 1989.
31. 龔廷賢 : 增補 萬病回春, 서울, 一中社,

1994, p229-230.
32. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, 1976. 98
33. 尹相鶴, 李相龍 : 健忘症에 對한 東西醫學的 考察, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 9(2):293-313, 2001.
34. 李尙仁 : 本草學, 修書院, 서울. p190-193, 302-303, 489, 493-496, 523-524, 531-532, 578-579, 585-586, 588-589
35. 文誠秀·李相龍 : 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 11(1):1936, 2000.
36. 정인철·이상룡 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(2):260276, 2001.
37. 金英旭 : 聰明湯이 健忘誘導 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1999.
38. Chong YH : Effect of a carboxy - terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. Life Sciences, 61(23):23232333, 1997.
39. Means LW·Edmonds SM : Glucose minimally attenuates scopolamine-but not morphine-induced deficits on a water maze alternation task. J Neural Transm, 105(1012):117185, 1998.
40. 김보경·이상룡 : 安神淸腦湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響, 동의생리병리학회지,