동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 2, 2007

壯元丸加減方 水抽出物이 아밀로이드 전구단백질으로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과

강형원, 김상태*, 이종화, 김태헌, 손형진***, 한평림*, 류영수**

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실, 이화여자대학교 자연대학 나노과학부 뇌신경 분자연구실*
원광대학교 의과대학 소아과학교실**, 이화여자대학교 생명· 약학부 뇌신경연구실***

Inhibitory effect of Alzheimer's in APP-induced Neuro 2A cells by JangWonHwanGagambang(JWHG) water extract

Hyung-Won Kang, Sang-Tae Kim*, Jong-Hwa Lee, Tae-Hyeon Kim, Hyeong-jin Son***, Pyeong-leem Han*, Yeoung-Su Lyu**

Dept. of Neuropsychiaty, Colege of Oriental Medicine, Wonkwang University
Division of Nanoscience, Ewha Womans of University*
Dept. of Pediatrics, College of medicine, Wonkwang university**
Division of BioScience-Pharmacy, Ewha Womans of University***

Abstract

Objective : Recent studies indicate that the deposition of β-amyloid (Aβ) is related in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), but the underlying mechanism is still not clear.

Method : To investigate the potential cellular functions of APP and water extract of the JangwonHwangagambang (JWHG), we use as in vitro model, neuro 2A cells were treated with either JWHG or its oriental medicines, and the effect in APP expression was determined by MTT and LDH assay. JWHG have been shown to be neuroprotective in different model systems. We asked whether JWHG treatment would influence cell survival and AD-like pathology in APP-induced neuronal cells.

Result : JWHG and water extracts of some oriental medicine has attenuated high cell death in vitro. JWHG-treated cells increased percentage of cell survival more longly than controls. JWHG had significantly increas neurite outgrowth in the as compared to control cells.

Conclusion : These results suggest that JWHG prevent APP-induced neurotoxicity through attenuating oxidative stress, and may be useful as potential therapeutic agents for AD.

Key Words : JangwonHwangagambang (JWHG), drosophila, APP, Neuro2A, Alzhemiers disease(AD)

투고일 : 6.9 수정일 : 7/13 채택일 : 7/14
* 교신저자 : 강형원, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
· Tel : 031-390-2762, · E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr

I. 緖 論

痴呆는 보통 腦의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 腦 증후군(syndrome)이며, 이로 인해 기억・사고・지남력・이해・계산・학습능력・언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장해가 있는 것을 말한다[1]. 이 중 Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로[2], 腦 안에 신경반(neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되어지며 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되어지는 병리학적 특징을 가진다[3].

AD의 대표적인 원인설로 현재까지 정확한 병리학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein (APP)으로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein (Aβ)이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 그러나 Aβ의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔다[6].

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 문헌적[7, 8], 임상적 연구[9]이외에 관련 원인설에 기초를 둔 실험적 연구가 다양하게 진행되어 왔다. 즉 단일약물[10] 및 복합처방[11]을 이용하여 腦의 老化와 연계하여 老化를 유발하는 항산화작용에 대한 硏究를 활발하게 진행하여 왔고, 그 외에도 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 硏究[12]와 腦성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1 및 Aβ의 생성의 억제에 관한 연구[13, 14]가 보고되었으며, 최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현세포주에서 주로 한약처방에 대한 연구[15, 16]가 주를 이루었고, 최근 壯元丸이 CT-105를 처리한 PC-12 세포주에서 APP의 발현과 항치매효과를 관찰한 보고가 있으나[17], 임상적으로 활용하고 있는 壯元丸加減方을 이용하여 APP를 Neuro2A 세포주에 직접 주입하여 연구한 보고는 없다. 壯元丸加減方은 『東醫寶鑑・神門』[18]에서 "健忘者 … 宜服壯元丸" "補心生血 寧神定志 且臺閣勤政 勞心燈窓 讀書辛苦 幷健忘怔忡不寐 及不善記而多忘者 服之能日誦千言 胸藏萬卷"이라 하여 여러 醫家들에 의해 心血不足 氣鬱生痰 脾氣不舒에 활용되던 壯元丸 處方에서 중금속 중독에 문제소지가 있는 朱砂를 제거하고 養心安神 補氣養血의 효능이 있는 靈芝를 첨가한 것이다.

이에 저자는 壯元丸加減方(JWHG)이 치매에 미치는 영향을 알아보기 위해 APP형질 조합시킨 Neuro 2A cells 세포주를 배양하여 정상군과 JWHG를 투여 한 그룹을 비교하여 JWHG에 의하여 치매단백질 발현로 인한 신경세포의 세포사가 억제되는 유의성이 발견되었기에 이에 보고하는 바이다

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 機器

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovian serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), anti-rabbit IgG conjugated FITC, anti-rabbit Alexa Fluor594 IgG antibody 및 ECL kit는 Amershrm phamacia에서, 2차 항체인 FITC, Alexa Fluor 594은 Molecular Probe

사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (VS-9108 MS,vision scientific Co.), light microscope(Olympus), confocal immunofluroscence microscope (Olympus)등을 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 壯元丸加減方(JangWonHwangagambang)의 처방구성은 원광대 한의과대학 **한방병원의 처방집에 준하였으며 사용한 약제는 원광대 부속**한방병원 약제과에서 구입한 후 정선하여 사용하였고 처방내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of JWHG

韓藥名	生 藥 名	用 量
遠志 製	Polygalae Radix	12 g
生地黃	Rehmanniae Rhizoma Radix	12 g
龍眼肉	Arillus Longan	12 g
玄蔘	Radix Scrophulariae	12 g
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	12 g
麥門冬	Liriopis Tuber	8 g
酸棗仁 炒	Zizyphi Spinosi Semen	8 g
人蔘	Ginseng Radix	8 g
白茯神	Poria	8 g
栢子仁	Semen Biotae	8 g
當歸	Radix Angelicae Sinens	8 g
靈芝	Ganoderma Lucidum Seu Japonicum	8 g
	Total Amount	116 g

3) 검액제조

본 실험에 사용한 장원환은 원광대 한의과대학 **한방병원에서 수험생클리닉에서 사용 중인 壯元丸加減方 1Kg을 엄선하여 세말한 다음 10,000 mL의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 수추출액의 450 g을 조제한 壯元丸加減方(이하 JWHG이라 명명)을 동결건조한 JWHG 150 g을 사용전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 1mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 實驗 方法

1) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주인 Neuro 2A는 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCMV-APP695의 플라스미드를 본 실험에 사용하였고 세포주를 구축하기 위해 미리 10^3 세포를 6-well plate에 분주하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀차게 배양한 다음 반응액 A로는 pCMV-APP695 2㎍와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100㎕을 혼합하고, 반응액 B로는 lipofectin 10㎕와 SFM 100㎕을 혼합하여 45분간 반응시킨다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한다음 6시간정도 37℃, 5% CO^2 incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450㎍/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 세포 형태학적 관찰

pCMV-APP695 발현 Neuro2A를 10^3세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 JWHG약물군을 50 ㎍/ml 농도로 처리하여 상기 세포주의 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 medium, penicilin / streptomycin을 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포사

관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개 정도의 세포수를 촬영하여 조사하였으며 세포사의 유도양상을 보기 위해 세포사가 억제되는 농도를 선정하여 조사하였다.

3) 세포 생존율 측정

APP 발현 Neuro 2A cell lines을 10^3세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 JWHG와 그의 구성약재를 대상으로 50 ㎍/ml농도별로 4일간 배양한 것과 JWHG을 1, 10, 25, 50, 100 200 ㎍/ml농도별로 처리한 실험군을 MTT(3-[4,5-dimethiozol-2y-]2,5-diphenytetrazolium bromide) 용액 20 ㎕를 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50 ㎕를 첨가하고 실온에서 30분이상 반응을 시켜서 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A540/A630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) LDH활성도 측정

APP 발현 Neuro 2A cell lines을 배양한 96-well multiplate에 Roche Applied Science사에서 제공된 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의경우 세포막을 투과하지 않지만 세포막이 손상을 입을 경우 세포밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 NAD로부터 피루빈산과 NADH를 생성시키며 이때 NAD가 산화됨에 따라 340 nm에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포밖에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있다. 우선 세포수 5x 10^4세포수로 96-well에 분주하고 JWHG을 1, 10, 25, 50, 100 200 ㎍/ml농도별로 처리한 실험군으로 세포에 처리한 후 세포를 분리하여 상등액 100 ㎕과 반응액을 넣고 섞은 후 1N HCl을 더하여 반응을 중단하여 ELISA reader(Emax, USA)로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 다음과 같이 정의하였다.

Cytotoxicity (%) = (실험치-control 치)/(control 치-정상치)x100

5) Neurite outgrowth길이 측정

APP 발현 Neuro 2A cell lines을 8 well 챔브 스라이드에 약물을 처리하여 배양한 후 4% paraformaldehyde로 고정한 다음 axonal marker로 단일클론 항체인 neurofilament-H(NF-H)(희석농도 1:1000)로 표지하고 dendrite 마커인 MAP2(희석농도 1:1000)을 사용하여 2차 항체인 Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse antibody로 표지하였다. 형광 이미지는 형광현미경인 (AX-80, Olympus, Tokyo, Japan)으로 측정하였고 neurite outgrowth 길이는 image software Neurocyte (Kurabo, Osaka, Japan)으로 측정하였다.

6) 통계분석

결과는 평균±S.D로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 *$P<0.05$를 기준으로* 유의성 여부를 판정하였다.

III. 成 績

1. 신경세포의 형태학적 변화

APP발현이 확인된 신경세포에서 JWHG이 APP로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 1에서처럼 JWHG농도가 IC_{50}의 50 ㎍/ml을 처리시 정상군(Wild type; WT)은 세포형태가 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면 (Fig. 1, left panel), APP가 발현된 세포 대조군은 세포사

유도가 거의 진행되었으며 이와 함께 신경돌기가 소실되는 양상이 나타났다 (Fig. 1 middle panel). 이에 반해 JWHG 처리군은 재생이 유도되어 신경돌기가 잘 발달되고 신경세포가 잘 성장하였다(Fig. 1, right panel).

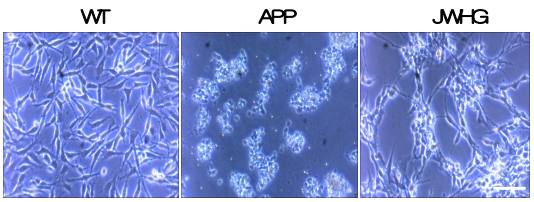


Fig. 1. JWHG prevents neuronal cell death by APP expression. Survival effect of JWHG of oriental medicine water extracts on the APP-induced neurotoxicity in Neuro2A. Fresh cells resuspended in DMEM medium were incubated with prepared as described under `Experimental Procedures'. Bars;25 μm

2. 농도변화에 미치는 영향

JWHG이 APP로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 JWHG와 구성약제별로 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서처럼 정상군을 7.3±0.5%였고 대조군은 91.3±1.6%였으며 玄蔘과 酸棗仁은 78±5%와 82±3.5%정도로 강한 독성을 나타내었고, JWHG, 석창포 영지 그리고 인삼 경우 50 μg/ml농도로 처리시 약 19.6±0.5%, 36±1%, 45±1.5% 그리고 25±0.5%정도였다. 특히 JWHG가 P<0.05 범위내에서 유의성 있게 APP발현에 대해 억제효과로 인해 세포 생존율을 증가시켰다. 또한 현삼과 산조인은 P<0.005 범위내에서 APP발현에 대해 유의성이 거의 변화를 주지 않았다(Fig. 2).

한편 APP발현이 신경세포의 독성에 JWHG 처리농도별로 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서처럼 정상군을 7.3±0.5%였고 대조군은 91.3±1.6%였으며 1, 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml의 JWHG를 처리시 84±0.5%, 56±5.5%, 43±1%, 32±1.5%, 23.3±0.55%, 15.3±3.5% 정도로 강한 세포독성을 억제함을 나타내었고, JWHG의 50 μg/ml 농도에서 P<0.05범위내에 유의성 있게 APP 발현에 대해 억제효과를 나타냈다(Fig. 3).

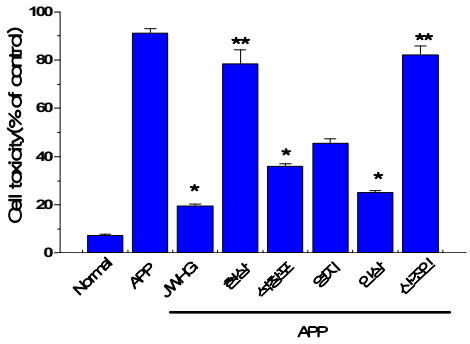


Fig. 2. JWHG inhibits neuronal cell death. Neuro2A cells were cultured for 3 days in vitro and then treated with JWHG in the expression of APP or PBS for 3d. Viable and dead cells were stained with MTT assay as described under "Experimental Procedures". Percentages of specific cell death were determined as described under "Experimental Procedures." The data represent mean values ± S.D. of three different experiments performed in triplicate. *, p<0.05; **, p<0.005 of when compared with APP controls. JWHG inhibits cell death with an IC50 value about 50 μg/ml. Representative data are shown above.

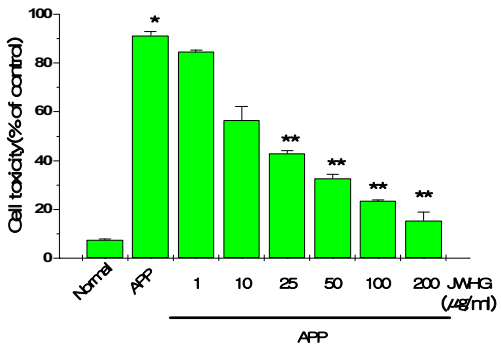


Fig. 3. Influence of cell toxicity on concentration-dependence of JWHG. Neuro2A cells were cultured for 3 days in vitro and then treated with JWHG in the expression of APP or PBS for 3d. Viable and dead cells were stained with MTT assay as described under "Experimental Procedures". Percentages of specific cell death were determined as described under "Experimental Procedures." The data represent mean values ± S.D. of three different experiments performed in triplicate. *, p<0.05; **, p<0.005 of when compared with APP controls. JWHG inhibits cell death with an IC50 value about 50 μg/ml. Representative data are shown above.

3. LDH 활성도에 미치는 영향

JWHG가 농도별로 세포막의 붕괴시 방출되는 LDH의 농도를 측정하므로 새포독성을 억제하는지 알아보기 위해 LDH 활성도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 4에서처럼 정상군을 11±1.5%였고 대조군은 89±3.5%였으며 1, 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml의 JWHG를 처리시 78±1.5%, 54±2.5%, 43±1%, 32.6±3.5%, 23.3±1.5%, 17±2.5% 정도로 강한 세포독성을 억제함을 나타내었고, JWHG의 50 μg/ml이상의 농도에서 P<0.05범위내에 유의성 있게 APP 발현에 대해 세포독성을 억제하였다(Fig. 4).

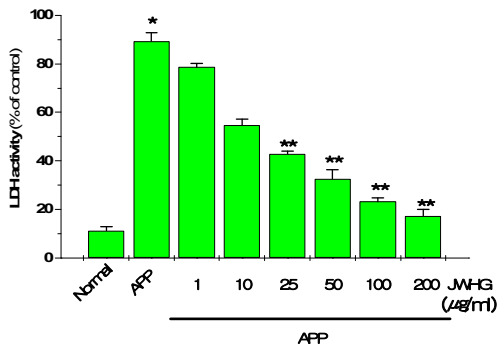


Fig. 4. Influence of the activity of LDH on concentration-dependence of JWHG. The reaction mixtures were prepared, containing different substrates: NADH + pyruvate (NADH+pyr), NADPH + pyruvate (NADPH+pyr), NAD+ + lactate (NAD+lact), NADP+ + lactate (NADP+lact) (see "Experimental Procedures"). In each of these reaction mixtures, the enzyme activity was checked in the absence (ctrl) or presence of 1, 10, 25, 50, 100 and 200 □g/ml JWHG, added immediately before performing the measurement. Data are presented as means ± S.D. (n = 3) versus respective control (ctrl): *, p < 0.05; **, p<0.005

4. neurite outgrowth 신장에 미치는 영향

신경세포의 사멸에 관여하는 APP발현세포주로부터 JWHG의 농도에 대한 신경세포 의 신경돌기와 dendrite의 길이를 확인하기 위해 axonal marker로 단일클론 항체인 neurofilament-H(NF-H)을 측정하였는데 APP가 발현된 세포주에 JWHG 수추출물을 농도별로 1, 10, 25, 50, 100 그리고 200 μg/ml를 처리한 경우에는 세포사멸이 지연되면서 신경돌기의 재생에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5) 특히, JWHG을 농도가 증가될수록 정상세포의 세포 형태와 유사할 정도로 신경돌기가 잘 발달되는 것을 관찰하였는데 neurofilament-H(NF-H)경우 정상군은 960±25μm/cell이고 대조군은 250±16고 1, 10, 25, 50, 100 그리고 200μm/cell에서는 각각 450±11, 720±23, 1000±112, 1203±231, 1270±110 그리고 1590±110μm/cell정도로 생존율에 따라 신경돌기의 신장에도 영향을 미치면서 JWHG 농도 의존적으로 영향을 미쳤다.

또한 dendrite의 marker인 MAP2경우에는 정상군은 430±25μm/cell이고 대조군은 110±12이고 1,10,25,50, 100 그리고 200μm/cell에서는 각각 180±22, 200±14, 210±22, 230±61, 250±22 그리고 262±11μm/cell정도로 대조군과 비교시 미약하게 신장하였다(Fig. 6)

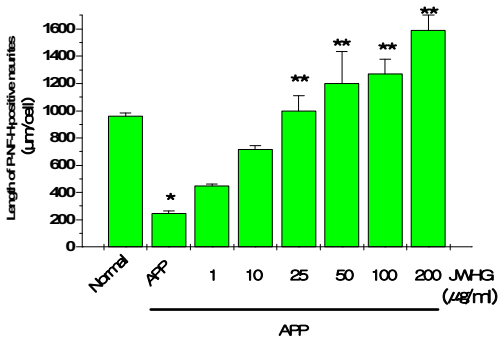


Fig. 5. The effect of JWHG extract on axons after APP-induced cells. Neuro2A cells were cultured for 3 days and were then treated with or without 1,10,25,50, 100 and 200 μg/ml. Five days after treatment, the cells were fixed and immunostained for phosphorylated NF-H. The lengths of NF-H-positive neurites were measured. Qantified data are shown. Values are means±S.D. of data from 15 cells. *<0.05 when compared with normal. ** when compareed with control.

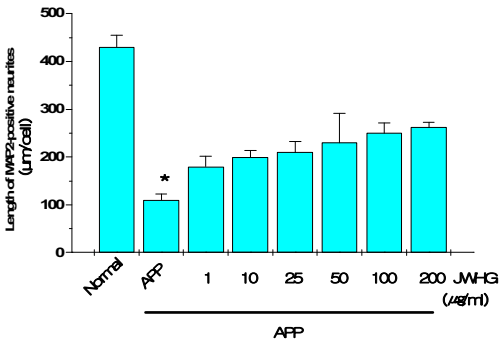


Fig. 6. The effect of JWHG extract on dendrites after APP-induced cells. Neuro2A cells were cultured for 3 days and were then treated with or without 1,10,25,50, 100 and 200 μg/ml. Five days after treatment, the cells were fixed and immunostained for phosphorylated MAP2. The lengths of MAP2-positive neurites were measured. Qantified data are shown. Values are means±S.D. of data from 15 cells. *<0.05 when compared with normal.

Ⅳ. 考 察

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 老化로 인한 腦 증후군으로[1] 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 腦梗塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混在된 混合型 痴呆가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다[1, 2].

AD는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 지능저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며, 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래한다[3].

AD를 유발시키는 원인으로 가설이 다양하게 제시되고 있는데, Aβ, APP, PS, estrogen, apolipoprotein E, oxidants(free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영위인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 이 중에서도 Aβ의 침적으로 생기는 노인반에 의한 신경독성에 의해 신경세포의 파괴가 일어난다는 가설이 대표적이다[3, 19].

APP는 21번 염색체의 single gene에 존재하며, 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반과 신경섬유다발이 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있다. 또한 AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 치매 형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[20-22].

하지만 현재 APP이 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사 과정에 의해서 잘라져서 Aβ을 만들어 내는지는 아직 전혀 모르고 있다. 따라서 Aβ의 형성을 촉진하는 프로테아제(protease)와 이 프로테아제의 유전자를 발현하려는 노력이 현재 연구의 핵심이 되고 있으며, 이 프로테아제 효소 단백질이나 프로테아제 유전자의 발현을 억제하는 약물의 개발이 미래의 약물 개발에 가장 큰 목표가 되고 있다. 그리고 정상에서 이 Aβ의 대사효소(amyloid degrading enzyme: ADE)를 활성화시키는 방법도 중요한 개발 목표가 될 수 있다. 또한 세포막에 붙어 있는 APP들의 세포내 기능과 이 APP에서 잘려나가 형성되어 조직에 침착된 Aβ의 기능이 무엇인지에 대해서도 많은 논란이 제기되고 있다[23].

따라서 이러한 연구 개발을 진행시키기 위하여 필요한 당면 과제는 최신 유전공학적 기법을 이용한 APP 및 Aβ의 발현과 대량 생산, 및 순수정제가 될 것이다. AD가 APP의 Aβ생성기

전에 대포적인 가설로 PS 유전자들의 변이와 APP의 과다생성으로 인해 Aβ가 과량으로 만들어지게 되고 이를 Aβ의 침착으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[24]. AD의 1차 증상인 기억력 감퇴는 choline성 신경계이상이 있다는 증거가 제시되고 있고 acethylcholine를 측정하여 임상소견을 관찰할 수 있다고 알려져 있다[25].

그동안 치매에 대한 연구동향을 보면 임상에서 활용되는 복합처방이 노화 및 항산화과정에 미치는 영향 과 AD병태모델에 미치는 영향에 대한 연구[16], 그리고 장 등[26]에 의해 두견화, 김 등 [27]이 半夏白朮天麻湯, 김 등[28]이 安神淸腦湯에서 PC-12로 생화학적 변화 및 항치매 효과에 대하여 보고하고는 있으나 이들은 실제로 인지능력과 행동능력에 대한 실질적 작용부위인 해마조직에 대해서 연구한 결과가 아니므로 처방이나 단방의 정확한 치매 치료 효과로 평가하기에는 한계가 있다. 물론 이런 APP들의 생체내 기능과 Aβ이 AD 발생 기전에서 차지하는 역할을 정확히 규명할 수는 없으나 어떻게 인지능력과 운동능력을 담당하는 cortex와 hippocampus의 신경세포의 세포독성이 진행되는지는 연구할 수 있을 것이다.

한의학에서 痴呆는 漢代《華佗神醫秘傳·治痴呆神方》에 처음으로 언급되었다는 기록이 있고 그 후 明代 張의 《景岳全書·雜證謨》[29]癲狂篇에서 "痴獃證, 凡平素無痰而或以鬱結, 或而不遂, 或而思慮, 或而疑貳 或而驚狂而漸致痴, 言辭顚倒, 擧動不經, …… 此其逆氣在心, 或肝膽二經……" 이라 하여 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 痴呆의 병인·병기, 그리고 치법·예후에 대해서 설명하였으며, 淸代 陳[30]에 의해 서양의학에서 말하는 痴呆의 槪念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였고, 歷代醫書에서 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 개념이다[7, 8].

뇌의 퇴행성 병변과 관련되어 있는 痴呆의 병인병기는 장부적으로는 肝腎不足이 중요하게 작용하고 痰·瘀血의 생성이 뇌에 정체됨으로 인해 각종 증상이 나타나는 것임을 알 수 있다. 痴呆의 병리학적 연구에서 痴呆의 로화와 유전적 요인이 한의학의 장부적으로는 腎虛와 밀접한 관계를 맺고, Aβ와 tau 단백질과 같은 腦 속의 비정상적인 plaque는 痰濁과 瘀血 등의 한방적 병리산물과 관련된다고 하였다[7].

壯元丸은 龔廷賢이 著術한 萬病回春에서 "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 말한 처방으로 《東醫寶鑑》[17] 에서는 "善忘者 … 宜服壯元丸"이라 하여 이후 醫家들에 의해 활용되어 왔으며 養血安神理脾하는 方으로 心血不足 氣鬱生痰, 脾氣不舒에 활용하는 處方이다. 處方의 구성은 石菖蒲 遠志 酸棗仁·炒는 開竅安神하는 작용을 하며, 麥門冬은 補心淸熱하고, 白茯神 栢子仁은 寧心安神하고, 生地黃 玄蔘은 養陰生津止渴, 龍眼肉 當歸은 補血和血하며, 人蔘은 補脾益氣 生津 寧神益智한다.

壯元丸加減方(JWHG)에는 이러한 효능이 있으므로 치매에서의 효능을 알아보기 위해 기존의 연구방법과 달리 인지능력과 운동능력을 담당하는 cortex와 hippocampus의 신경세포의 세포독성과 이에 대한 壯元丸加減方의 효과를 실험적으로 연구하였다.

APP발현이 확인된 신경세포에서 JWHG이 APP로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰한 결과, APP가 발현된 세포 대조군에서는 세포사 유도가 거의 진행되어 신경돌기가 소실되는 양상이 나타나는 반면, JWHG 처리군은 재생이 유도되어 신경돌기가 잘 발달되고 신경세포가 잘 성장하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

JWHG와 주요 구성약제의 APP로 인한 신경세포의 세포사의 억제을 MTT assay를 측정한 결과, 현삼과 산조인은 78±5%와 82±3.5%정도로 강한 독성을 나타내었고, JWHG, 석창포 영지 그리고 인삼 경우 50 ㎍/ml농도로 처리시 약 19.6±0.5%, 36±1%, 45±1.5% 그리고 25±0.5%정도였고. 특히 JWHG가 $P<0.05$범위내에서 유의성 있게 APP발현에 대해 억제효과로 인해 세포 생존율을 증가시켰다고 사료된다. 하지만 현삼과 산조인은 $P<0.005$범위내에서 APP발현에 대해 유의성이 거의 변화를 주지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2).

한편 APP발현이 신경세포의 독성에 JWHG 처리농도별로 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 측정한 결과 1, 10, 25, 50 ,100, 200 μg/ml의 JWHG를 처리시 84±0.5%, 56±5.5%, 43±1%, 32±1.5%, 23.3±0.55%, 15.3±3.5% 정도로 강한 세포독성을 억제함을 나타내었고, JWHG의 50 μg/ml 농도에서 $P<0.05$범위내에 유의성 있게 APP발현에 대해 억제효과로 인해 세포 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3).

JWHG이 APP로 인한 신경세포의 세포사의 억제가 유도되는 것은 세포사멸을 억제하는데 관여하것으로 사료되는데, JWHG가 농도별로 세포막의 붕괴 시 방출되는 LDH의 농도를 측정하므로 새포독성을 억제하는지 알아보기 위해 LDH 활성도를 측정하였다. 그 결과 JWHG를 처리시 농도의존적으로 강한 세포독성을 억제함을 나타내었고, JWHG의 50 μg/ml이상의 농도에서 $P<0.05$범위 내에 유의성 있게 APP발현에 대해 세포독성을 억제하므로 세포 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4).

신경세포의 사멸에 관여하는 APP발현세포주로부터 JWHG의 농도에 대한 신경세포 의 신경돌기와 dendrite의 길이를 확인하기 위해 axonal marker로 단일클론 항체인 neurofilament-H(NF-H)을 측정한 결과, JWHG을 농도가 증가될수록 정상세포의 세포형태와 유사할 정도로 신경돌기가 잘 발달되는 것을 관찰하였는데, 특히 $P<0.05$범위내에서 유의성 있게 APP발현에 대해 신장효과로 인해 세포 생존율과 유사하게 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 5), 또한 dendrite의 marker인 MAP2 경우에는 대조군과 비교시 미약하게 신장하였지만 유의성은 없었다(Fig. 6)

이상의 결과와 같이 APP으로 유도된 Neuro2A 세포주를 이용하여 만든 신경손상 모델에 대해 JWHG을 이용하여 세포의 형태학적 변화와 생존률, 그리고 신경돌기의 재생 변화를 살펴본 결과 정상군과 같은 유의한 회복을 보였으며 이는 JWHG이 신경 세포 사멸을 억제하는 효능이 있음을 의미한다. 단미에 따른 효과도 JWHG의 효능과 더불어 생각해야 하며 추후 다른 약재 및 처방과도 비교실험을 통해 객관적 진료 표준화가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

APP5발현 Neuro 2A 세포주를 이용한 JWHG의 수추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 세포사를 유도에 대한 抑制와 신경세포 保護效果를 규명하기 위하여 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 神經細胞로부터 APP발현에 의한 세포사 유도는 壯元丸加減方에 의해 감소했다.
2. 壯元丸加減方은 APP발현에 의한 세포사 유도를 抑制했다.
3. 壯元丸加減方은 APP로 인한 신경세포의 생

존도를 50㎍/ml 이상에서 강하게 저해하였다.

4. 壯元丸加減方은 LDH활성도를 유의성 있게 억제하였다.
5. 壯元丸加減方은 APP의 발현을 유도에 대해 농도의존적으로 neurofilament-H(NF-H)의 생성을 유의성 있게 유도하였다.

以上과 같은 結論은 壯元丸加減方이 APP발현 Neuro2A 세포주의 세포사를 效果的으로 抑制하고 신경세포의 증식을 유도하여 세포사의 진행을 억제하여 항치매 효과가 있는 것으로 나타나 痴呆 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 접목 可能할 것으로 思料되며, 향후 이에 대한 분자생물학적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울. 一潮閣. 1994:63-66.
2. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울. 현대의학서적사. 1992:256-271,327-330,663-664.
3. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutuian V, DeMacro L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain, J Neurogenet, 1998;12(1):55-65.
4. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richy P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormailties, Brain Res, 1992;593(2):299-303.
5. 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.
6. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. Science 1990;250: 279-282.
7. 이광규, 최용덕, 강형원, 유영수. 痴呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 동의병리학회지. 1996;13(1):36-45.
8. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):77-94.
9. 현경철, 김종우, 황의완. Vascular Dementia에 관한 한의학적 임상연구. 동의신경정신과학회지, 1999;10(1):147-158.
10. 장현호, 최혁, 양현덕, 김상태, 김태헌, 강형원, 류영수. 조구등 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포상해에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2004;18(6):1810-1820.
11. 鄭智天. 左歸飮과 右歸飮에 의한 活性 酸素類의 消去작용과 抗酸化 酸素系의 活性 增加효과에 대한 硏究. 서울. 大韓韓醫學會誌, 1996;17(1):21-36.
12. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 서울. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
13. 김태헌, 김준한, 강형원, 유영수. 세심탕에 의한 뇌성상세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과. 동의신경정신과학회지.

2001;12(1):137-150.
14. 박진성, 강형원, 유영수. 생체외 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):157-172.
15. 최병만, 이상룡. 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향. 서울. 동의신경정신과학회지. 2000;11(2):23-42.
16. 정인철. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향. 대전대학교 대학원(박사). 2001.
17. 김건진, 정대규, 장원단이 CT105와 Aβ로 유발된 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):91-122.
18. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:法仁文化社. 1999:189-191.
19. Olson JM, Goddard KA, Dudek DM. : The Amyloid Precursor Protein Locus and Very-Late-Onset Alzheimer Disease. Am J Hum Genet. 2001:Aug 7.
20. Steinhoff T, Moritz E, Wollmer MA, Mohajeri MH, Kins S, Nitsch RM. Increased cystatin c in astrocytes of transgenic mice expressing the k670n-m671l mutation of the amyloid precursor protein and deposition in brain amyloid plaques. Neurobiol Dis. 2001:Aug;8(4):647-54
21. De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, Annaert W, Van Broeckhoven C, De Strooper B. Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Aβ secretion and APP C-terminal fragment stability. Hum Mol Genet. 2001:Aug 1;10(16):1665-71.
22. Fishman CE, Cummins DJ, Bales KR, DeLong CA, Esterman MA, Hanson JC, White SL, Paul SM, Jordan WH. Statistical aspects of quantitative image analysis of beta-amyloid in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci Methods. 2001:Jul 30;108(2):145-52.
23. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. Nat Neurosci. 2001:Sep;4(9):887-93.
24. Kawai M, Cras P, Richey P, Tabaton M, Lowery DE, Gonzalez-DeWhitt PA, Greenberg BD, Gambetti P, Perry G.Subcellular localization of amyloid precursor protein in senile plaques of Alzheimer's disease. Am J Pathol. 1992;140(4):947-58.
25. Trabace L, Cassano T, Tucci P, Steardo L, Kendrick KM, Cuomo V. The effects of nitric oxide on striatal serotoninergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat. Brain Res.22. 2004;1008:293-8.
26. 장진실, 정인철, 이상룡. 두견화가 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):75-90.
27. 김수연, 원호영, 최창원, 김경수, 김경옥, 이동원. 반하백출천마탕이 국소 뇌허혈로 인한 치매 병태 백서에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):61-73
28. 김보경, 이상룡. 安神淸腦湯이 치매병태모

델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향.
동의생리병리학회지. 2001;15(5):708-722.
29. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울. 翰成社.
1978:610-611.
30. 陳士鐸. 石室秘錄. 서울. 杏林出版社.
1987:208.