동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 2, 2008

壯元丸加減方인 LMK02가 아밀로이드 前驅蛋白質으로 形質轉換된 초파리에 미치는 효과

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

이화여자대학교 생명 약학부 뇌신경연구실 원광대학교 산본한방병원 신경정신과 & 인암뇌신경센타*

이화여자대학교 자연대학 나노과학부 뇌신경 분자연구*** 원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실** 한풍제약(주)****

Effects of Antidementia on LMK02 in APP-transgenic Fly

Sang-Tae Kim, Hyung-Won Kang*, Pyeong-Leem Han*, Hyoung-Kwon Cho****, Tae-Heon Kim**, Yeoung-Su Lyu**, Hyeong-Jin Son**

Division of BioScience-Pharmacy, Ewha Womans of University

Dept. of Neuropsychiatry and Inam Neuroscience Research Center, Wonkwang University, Sanbon Oriental Medical Center*

Division of Nanoscience, Ewha Womans of University***

Dept. of Neuropsychiaty, Colege of Oriental Medicine, Wonkwang University**

HANPOONG PHARM & FOODS Co, Ltd.****

Abstract

Objective : Recent studies indicate that the deposition of beta-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 LMK02, we use transgenic drosophila as a model was treated with either LMK02, and the effect in APP expression was determined by climbing assay. LMK02 have been shown to be neuroprotective in fly model systems. We asked whether dietary supplementation with LMK02 would influence behavior and AD-like pathology in a transgenic fly model.

Result : LMK02 water extract have attenuated fly death in vivo. LMK02-treated fly increased percentage of flight ability more longly and survival ratio more than controls. APP-GRIM drosophila treated with LMK02 had significantly less accumulation of APP deposition in the eye and brain as compared to control drosophila.

Conclusion : These results suggest that LMK02 prevent APP-induced neurotoxicity through attenuating flies death induced by APP, and may be useful as potential therapeutic agents for AD.

Key Words : drosophila, APP, Alzhemiers disease. LMK02

투고일 : 6/7 수정일 : 7/6 채택일 : 7/15

* 교신저자 : 손형진 주소 : 서울시 서대문구 대현동 11-1 이화여대 생명· 약학부 뇌신경연구실

Tel : 02-3277-4504 E-mail : hjson@ewha.ac.kr

I. 緖 論

痴呆는 우리나라 65세 이상의 노령인구 약 8.2~10.8%에서 나타날 정도로 흔하며 인구의 급속한 고령화와 함께 심각한 사회문제로 대두되고 있는 대표적인 노년기 질환으로[1] 후천적으로 지적능력을 상실하고 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화라는 임상증상을 나타내는 퇴행성질환이다[2].

특히, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 많은 유형의 치매로[3,4] 대뇌 피질(cortex)이나 해마(hippocampus)에 생기는 뇌위축과 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 그리고 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration), 히라노체(Hirano body) 등의 조직학적 소견을 특징으로 하며[5-8], 베타 아밀로이드(β-amyloid, Aβ)는 노인반의 주요 구성성분으로 AD가 발생하는 중요한 원인으로 추정되고, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시켜 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 신경세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다[9].

한의학에서 痴呆는 임상증후상 呆病, 健忘, 癲證, 虛勞 등의 범주에 포함하고, 主要病因으로는 年勞虛衰, 飮食失調, 情志失調, 中毒外傷, 痰飮, 瘀血 등이 관여하며, 辨證으로는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀가 제시되고[10] 治法으로는 補益肝腎, 益氣補血, 豁痰開竅, 活血化瘀通竅를 활용한다[11].

서양의학에서는 AD의 치료방법으로써 신경전달물질인 acetylcholine (ACh)의 감소에 근거한 인지기능 개선[12]을 위한 cholinesterase inhibitor[13]와 NMDA (N - methyl - D - aspartate) receptor antagonist[14] 등의 약물요법이 있고, 행동 심리증상 치료를 위한 항우울제, 진정제등의 향정신성 약물요법[15]과 심리, 인지, 행동, 작업, 재활치료의 비약물요법[16]이 활용되고 있으나, 정확한 원인요법은 아직 없는 실정이고 약물요법 대부분의 부작용으로 인해 천연 한약재에 대한 연구가 필요한 상황이다.

최근 한의학계에선 한약의 AD에 대한 효과를 입증하는 연구들이 많이 진행되고 있는데 單方으로는 山査[17], 遠志[18], 石菖蒲[19], 釣鉤藤[20], 四象方으로는 荊防地黃湯[21], 調胃升淸湯[22] 등이 있고 後世方으로는 六味地黃湯加減[23], 供辰丹[24], 補中益氣湯加味方[25], 聰明湯加減[26], 天王補心丹[27] 등이 있다. 그리고 壯元丸이 CT-105를 처리한 PC-12 세포주에서 APP의 발현과 항치매효과를 관찰한 보고가 있고[28], 강 등[29]이 임상적으로 활용하고 있는 壯元丸加減方을 이용하여 APP를 Neuro2A 세포주에 직접 주입하여 항치매효과를 확인한 연구는 있으나 APP 형질전환 초파리에서 효과를 확인한 연구는 없다.

LMK02는 『東醫寶鑑・神門』[30]의 壯元丸 處方에서 중금속 중독에 문제 소지가 있는 朱砂를 제거한 11가지 단미약재를 바탕으로 실험적 screening test 걸쳐 선정된 7가지 약재로 구성된 특허출원(2008-0068119) 처방이다.

이에 저자는 LMK02가 치매에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 실험에서는 APP 형질전환된 초파리를 이용하여 생존률, 비행상승능력, 비행상승시간, 시신경세포의 형태학적 변화를 정상군과 LMK02를 투여한 그룹과 비교관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 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 BOD incubator (VS - 9108 MS,vision scientific Co.), light microscope (Olympus), confocal immunofluroscence microscope (Olympus) 등을 사용하였다.

2) 藥材 및 검액제조

본 실험에 사용한 LMK02의 처방에 사용된 약재는 유일제약(주)에서 최상품으로 인정된 약재를 엄선하여 한풍제약(주)에서 다음과 같은 제조공정을 걸쳐 얻은 건조엑스 95g를 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 1mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(1) LMK02 단미 총 312g를 정선하여 약전통칙 중 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고

(2) 추출기에 넣은 다음

(3) 정제수(약전) 약2.5L 가량 넣고

(4) 95~100℃에서 3시간 가온 추출한 후

(5) 25㎛필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50~60℃에서 감압 농축한다.

(6) 한약 잔류물에 (3)~(6) 과정을 1회 반복하여 농축액을 전부 합한다.

(7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃이하에서 건조한다.

(8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화한다

(9) 건조엑스 95g를 얻는다. (수득률 약 30.4%)

2. 實驗 方法

1) 초파리 사육배양

본 실험에 사용된 초파리 사육을 위해 과당 600 g, yeast extract 120 g, 옥수수전분 420 g, bokinin 20 ml, propionic acid 30 ml, agar 60 g을 물 6 L에 녹여서 멸균하여 사용한다. 형질전환 초파리모델은 야생형에 뇌신경세포에 잘 발현되도록 GMR-GAL4와 세포사멸에 관여하는 UAS-GRIM 초파리를 교배시킨 후 이를 다시 APP-GAL4 초파리와 재교배를 시킨 다음 유전적으로 잘 발현되는지 genetyping으로 확인하고 25℃ BOD 인큐베이터에서 사육하여 15일마다 배지를 교환하여 정확한 치매모델용 초파리를 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 초파리 생존율 측정

1주일된 성체 APP 발현 drosophila APP-GAL4/UAS-GRIM 25마리를 플라스틱 바이알에 분주하고 2일간 키운다음 100 μM H2O2를 첨가한 상태에서 야생종인 정상군, APP-GAL4/UAS-GRIM와, 여기에 100 μM H2O2를 첨가한 군, 그리고 50 ㎍/ml농도별로 처리하고 15일간 사육한 다음 이를 본 LMK약물군과 그의 구성약제를 대상으로 탐색한 다음 상기 방법에 준하여 APP-GFP형질전환 초파리로부터 생존율을 검정하였다.

3) 공초첨 형광현미경 측정

약물 무처리군, APP 발현군 그리고 APP에

LMK02를 50 ㎍/ml농도로 처리한 군으로 구별하여 사육한 초파리의 head를 취하기 위해 CO2로 마취한 다음 4% paraformaldehyde 와 0.2% Triton X-100이 있는 고정액으로 하룻밤 고정한 다음 PBT (PBS containing 0.2% Triton X-100)으로 세 번 세척한다. 이를 paraffin으로 포매한 다음 이를 microtome (Leica, Japon)으로 25㎛정도의 두께로 절단한 다음 이를 시료로 해서 탈파라핀화시키기 위해 xylen이 들어 있는 피이커에 담근 다음 탈수과정을 통해 blocking buffer (PBS, 5% heat-inactivated normal goat serum, 0.2% Triton X-100)으로 실온에서 1시간동안 block 시킨다. eye disk염색은 eye disc가 있는 whole fly brains을 microscope하에서 수행하고 4% paraformaldehyde에서 30분간 고정하였다. 1시간동안 block시킨 다음 eye disc는 poly (l-lysine)-coated coverslips에 올려놓고 현미경관찰을 수행하였다. 모든 시료는 confocal microscopy와 fluorescence streo-microscopy에서 수행하였다.

4)초파리의 행동학적 분석

초파리의 비행능력은 3-day-old females을 대상으로 18-cm-long vials에서 수행하였는데 이는 APP-에 의해 ROS (활성산소종)가 발생되면서 신경세포의 신경사멸과 근육조직의 미토콘드리아 장애로 인해 운동력의 상실을 야기되므로 일정 높이에서 채공되는 마리수의 채공시간이 APP형질전환 초파리경우 계속 바닥으로 떨어지는 행동으로 올라가는 능력이 저하됨으로 올라가는 행동을 보이지 못하게 되는데 이 APP형질 전환군에 LMK02의 수추출물을 50 ㎍/ml농도로 처리한 군으로 구별하여 채공능력의 증감을 조사하기 위해 실온에서 1시간동안 환경에 적응 시킨 다음 초파리가 완전히 바닥에 앉아 있는 시점을 기준으로 실시하였고 climbing time index(sec)은 시작부위에서 15-cm 말단부위까지 5번 이상 도달하는동안 소요되는 시간을 측정하였는데 5번의 반복실험을 수행하였다. Flight assay는 3-day-old females을 대상으로 Pesah방법을 적용하여 수행하였다[60]. (n > 25) 단 통계는 T-test를 사용하였으며 유의수준(P)은 0.05로 정해 $P<0.05$를, 유의 수준(P)은 $P<0.005$를 유의한 것으로 판단하였다.

5) 통계분석

초파리의 행동관찰 및 세포생존율에서 얻은 결과는 평균±S.D로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 成 績

1. 초파리 생존율에 미치는 영향

APP-grim으로 형질전환된 초파리의 경우 세포사멸에 의해 신경계가 퇴행되고 개체의 생존에 치명적인 손상을 입게 된다. 야생형 초파리 정상군과 APP 형질전환 초파리 대조군, 그리고 LMK 50 ㎍/ml 로 처리하여 생존율을 20일간 관찰한 결과, Fig 1에서 처럼 정상군은 약 19.3±0.5마리, 대조군은 약 2.3±1.5마리, H_2O_2처리군은 약 3.2 ± 0.5마리였으나, APP / GRIM에 LMK02 처리군의 경우 17.5±1.2마리로 생존율이 증가하였고 ($P<0.05$), H_2O_2에 LMK0처리군의 경우도 약 13.2±0.5마리로 대조군에 비해 생존율이 증가하였다($P<0.005$).

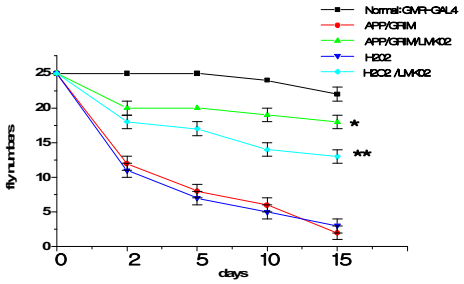


Fig. 1. Increased median life span of APP/GRIM flies. Survival ratio of W/T and UAS-APP/GAL4-GRIM transgenic adult flies after prolonged treatment with LMK02 of the same genotypes. *, p<0.05 of when compared with APP/GRIM; **, p<0.005 of when compared with H2O2. The data represent mean values ± S.D. of three different experiments performed in triplicate.

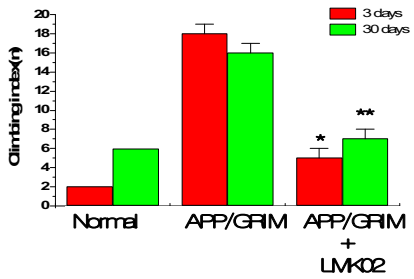


Fig. 2. Climbing time increase by APP induction comparison of climbing rate. (asterisk, P = 0.05 of when compared with APP/GRIM for 3 days, two asterisks, P = 0.005 of when compared with APP/GRIM for 30 days;. Error bars indicate mean±s.d. Details of all the indicated genotypes in this and other figures are described in Methods and Materials.

2. 초파리의 비행횟수에 미치는 영향

초파리는 주지성이 있어서 상승상태에 머무르는 경향성이 있는데 수분공급이나 영양분을 보충하기 위해 바닥에 존재하는 배양배지를 먹으러 바닥에 내려왔다 올라가는 왕복비행을 하게 된다. 이때 APP의 발현에 의해 신경손상이 오면 비행장애가 초래되어 상승하강의 왕복이 잦아지게 된다.

이에 초파리의 Flight assay를 3-day-old females를 대상으로 Pesah 방법을 적용하여 수행하였다(n > 25) [60]. 비행횟수는 5번 이상 도달하는 것을 기준으로 5번의 반복실험을 수행하였다.

그 결과 Fig 2에서처럼 3일 경과 된 초파리를 대상으로 비행정도를 10분 동안 측정하면 정상군은 일반적으로 비행횟수가 2회 정도이며 대조군의 경우는 약 18±1회인데 반해 LMK02 처리군은 4.5±1회로서 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.05$). 30일이 경과한 후 야생형인 정상군에서는 6회정도인데 반해 대조군의 경우는 약 16±1회로서 비행횟수가 늘어남을 알 수 있고 LMK02 처리군은 7±1회로서 정상군과 큰 변화를 보이지 않았는데 LMK02 처리군은 50μg/ml 농도에서 유의성 있게 감소하였다($p<0.005$).

3. 초파리의 상승능력에 미치는 영향

APP-grim 형질전환 초파리군의 비행능력에 대한 LMK02의 효과를 조사하기 위해 초파리의 상승능력을 관찰한 결과, 비행정도가 최초 3일에서 정상군을 100 %로 환산하였을 때, Fig. 3에서처럼 대조군의 경우 약 11±1 %인데 반해 LMK02 처리군은 91±1%로 유의성 있게 증가하였고 ($p<0.05$), 30일이 경과한 후에는 대조군의 경우 약 4±0.5%인데 반해 LMK02 처리군은 90±5%로 3일경과시와 큰 변화를 보이지 않았다($p<0.005$).

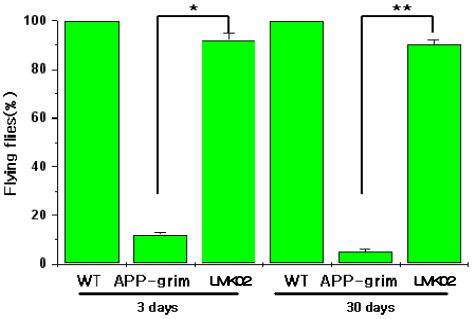


Fig. 3. The percentage of climbers is reduced by APP induction. The percentage of flight ability is decreased by APP induction, but the percentage of flight ability in LMK02 treatment increased as same flies. Comparison of flight ability (asterisk, P = 0.05 of when compared with APP/GRIM for 3days; two asterisks, P = 0.005 of when compared with APP/GRIM for 30 days). Error bars indicate mean± s.d. Details of all the indicated genotypes in this and other figures are described in Methods and Materials.

4. APP-GRIM단백질 발현부위에 미치는 영향

APP가 신경세포의 Notch 신호에 미치는 영향으로 인해 눈의 형태에도 변화를 초래하는데 이를 확인한 결과 야생형인 경우 아무런 변화를 보이지 않는 반면, APP 발현 초파리의 경우 표현형이 시신경의 세포사멸을 나타내었고, LMK02 처리군의 경우 세포사멸정도가 감소하는 형태적 변화를 현미경으로 관찰하였다.

또한 야생형은 눈의 발생이 일정한 패턴을 나타낸 반면(Fig. 4 A, D), APP-grim으로 유도된 경우 눈의 구조가 붕괴되어 조직의 형태가 파괴되는 상태로 존재하였다(Fig. 4 B, E). 이해비해 LMK02로 처리한 경우 야생형에 가까운 표현형을 나타내었다(Fig. 4 C, F).

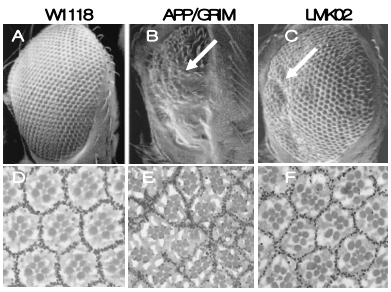


Fig. 4. LMK02 treatment inhibits degeneration of ommatidial in APP/GRIM flies. Flies (7 days old) with dAPP-grim driven by W/T (A, D), GRIM-GAL4 (GRIM-GAL4/UAS-dAPP) were treated without (B, E) or with 50 ug/ml LMK02 with GRIM-GAL4 (GRIM-GAL4/UAS-dAPP) (C, F). Representative images of external eye phenotype of each group are shown by light microscopy (Magnification, x80)(A, B, C). Flies overexpressing APP were treated with LMK02 for 24 h and were observed by scanning electron micrographs of the adult ommatidial pattern at the same magnification (X8000) (D, E, F). Results from lines expressing GRIM-GAL4 driver alone and two independent lines expressing GMR-GAL4/UAS-dAPP/ GRIM-GAL4. Arrows indicate lesions of ommatidial degeneration.

Ⅳ. 考 察

痴呆는 정상적으로 일상생활을 유지하던 사람이 대뇌반구 특히 대뇌겉질 및 해마를 침범하는 여러 질환에 의한 뇌기능 장애로 인해 후천적으로 지적능력의 상실, 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화로 일상생활을 유지하는데 심각한 지장을 초래하는 특정 증후군으로[2] 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[3, 4].

AD의 원인과 발병기전은 분명하진 않지만 다양한 병인적 병리적 인자들이 관련되어 있고[31] AD의 발병과 진행에 관해 유전적 요인, 지발성 또는 비통상적 바이러스, 불완전한 세포막대사, 내인성독소, 자가면역질환, 알루미늄 같은 미량원소에 의한 신경독성등 다양한 요인들이 관련되어 있는 데[31], 그 중에 APP의 비정상적인 분해경로로 인한 Aβ의 과잉생산과 축적으로 노인반(senile plaques)을 형성하여 신경독성으로 신경세포 사멸을 가져온다는 아밀로이드 축적설[32]이 대표적이고 이것의 주된 기전은 oxidative stress로 보고 있다[33].

그 발병 위험인자로는 노화[34], 유전적 요인으로는 APP 유전자의 돌연변이[35]와 presenilin 1,2 유전자 돌연변이[36], apolipoprotein (APO) E4 allele[37], 성별로는 여성이 남성보다 3배가 높고[38], 가족력, 다운증후군(Down syndrom)[39], 두부 외상(head trauma)의 과거력, 낮은 교육수준, 알루미늄(aluminum) 노출[40] 등으로 알려져 있듯이 다양한 요인들로 AD는 발생하는 것을 알 수 있다.

APP는 21번 염색체의 single gene에 존재하며, 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는

조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반(senile plaques)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)이 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 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[41-43].

하지만 현재 APP이 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사 과정에 의해서 잘라져서 Aβ을 만들어 내는지는 아직 알려져 있지 않다. 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[44, 45].

현재 AD의 치료로는 AD의 진행을 억제하거나 완치할 수 있는 치료법은 없지만 AD의 인지장애는 ACh(acetylcholine)의 감소와 연관된 것으로[12] ACh의 증가 목적을 위한 다양한 시도로 acetylcholinesterase 억제제인 tacrine, aricept를 사용하고[13], NMDA receptor 길항제인 memantine[14] 등이 사용되고 있으며 AD의 행동심리증상으로 자주 나타는 우울증에는 최소의 항콜린성 작용약물인 선택적 세로토닌 재흡수 차단제등을 저용량으로 사용하고, 불안과 피해망상(paranoid delusion)에 대한 향정신약물요법[15, 16]으로는 부작용이 적은 신경이완제의 사용을 고려하지만 이들 약물요법들 중 acetylcholinesterase 억제제의 효과는 매우 일시적이고 한정적이며 미약한 수준으로 부교감신경자극을 통해 오심, 구토, 기관지 수축, 우울증, 불면증, 고혈압, 변비 등의 부작용 을 야기하기도 한다[46, 47]. 이런 단점들을 보완한, 오랜 기간 지속적으로 부작용 없이 독성이 낮고 강력한 콜린신경계통 증진효과를 가지며 감퇴된 학습과 기억력을 개선시켜줄 수 있는 뇌보호 및 뇌기능향상에 도움을 주는 소재로 천연물제제를 개발하는 것은 매우 가치 있는 일이라 할 수 있다.

한의학에서는 痴呆는 呆病, 健忘, 癲狂, 虛勞를 근거로 辨證施治하고 있다. 呆病에 대해 明代 張은《景岳全書· 雜證謨》[48] 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, 惑肝膽二經氣有不淸而然……"라 하여 呆病의 원인을 情緖상의 문제로 여겨 병리로 逆氣가 心에 있거나 心膽二經의 氣不淸으로 설명하고 증상에 대하여는 "言辭顚倒 擧動不經 或多汗或善愁 其證則天奇萬怪 無所不至"라 하여 정서 및 행동장애를 언급하고 治法·豫後·治方에 대해서는 "但察其形體强壯 飮食不減 別無虛晩等證 則審宜服蠻煎治之 最穩最妙 然此證有可 者 然不可有愈者 亦在乎胃氣 元氣之强弱 待時而復 非可急也 凡此諸證 若以大悴恐 一時偶傷心膽 而致失神昏亂者 此當以速扶正氣爲主 宜七福飮 惑大補元煎"라 하여 胃氣와 元氣를 중시하였다. 淸代 陣의《石室秘錄》[49]에서는 胸腹의 痰과 七情傷을 呆病의 원인으로 보았으며 증상에 관하여는 현대의학의 치매와 유사한 증상을 상세히 기술하였고 치법으로는 治痰을 제시하였다. 또한 錢鏡湖《辨證奇聞 》[50]에서도 자세한 증상을 기술하면서 病因·病理로는 肝氣之鬱과

胃氣之衰로 胸中의 痰으로 설명하고 治法으로는 開鬱逐痰 健胃通氣를 제시하였다. 치방으로는 洗心湯, 轉呆丹, 啓心救胃湯을 사용했다.

최근 치매에 대한 한의학계의 연구동향을 보면 임상에서 활용되는 복합처방에서 노화 및 항산화과정에 미치는 영향과 AD병태모델에 미치는 영향에 대한 연구[51], 그리고 Neuro2A 세포주[52], PC-12(phenochromocytoma cell lines)[53, 54], SK-N-SH cell lines[55]에서의 항치매 작용에 대하여 보고하고는 있으나, 아직 국내적으로 양, 한의학적 연구에서 APP 형질전환 초파리에서의 치매효과를 확인한 연구는 없었고 본 연구를 통해 세포주 연구나 형질전환 동물에서 문제점으로 야기되는 시간과 발병기전을 해결하는데 좋은 모델로써 특히 비용과 실험결과 정확하게 나타난다는 장점이 있다. 그래서 본 연구에서처럼 APP의 형질전환 초파리모델로부터 약물의 효과를 검정하는 것은 국내에서나 외국에서도 드문 연구모델이다. APP 유발 초파리 모델은 현재로는 인간유전자와 거의 85% 유사한 초파리라는 장점을 가지고 있다[56, 57].

壯元丸은 龔延賢이 著術한 『萬病回春』[58]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 처음으로 언급한 처방으로, 『東醫寶鑑』[30]에서는 "建忘 … 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 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는 補血和血하며, 人蔘은 補脾益氣 生津 寧神益智한다.

壯元丸에는 이러한 기억력 개선 효능이 있으므로 치매치료제로서의 가능성을 알아보기 위해 실험적으로 탐색하여 7가지 약재로 구성된 LMK02 처방을 확정하였다.

이에 저자는 APP로 형질전환된 초파리에서 정상군, APP 형질전환군 그리고 APP 형질전환군에 50 ㎍/ml농도의 LMK02를 처리한 실험군으로 구별하여 초파리 생존률, 비행능력과 비행횟수 그리고 시신경세포의 형태학적 및 단백질 발현을 관찰하였다.

LMK이 치매에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 APP/GRIM초파리의생존율을 야행형 파리의 정상군과 비교하여 15일간 관찰한 결과, APP/GRIM에 LMK02 처리군 경우와 H2O2에LMK0처리군경우가 각각 17.5±1.2마리와 13.2±0.5마리로 생존율이 증가한 것을 확인할수 있었다. 특히 APP/GRIM에 LMK02 처리군 경우 $P<0.05$범위내에서 유의성 있었고 H2O2에 LMK02 처리군 경우 $P<0.005$범위에서 유의성이 있었는데, 이는 LMK02가 APP형질전환 초파리경우와 H2O2에에 대해 개체 생존율을 증가시켰다고 사료된다(Fig 1).

APP에 의해 손상받은 신경장애는 운동신경에 영향을 줄 가능성을 고려하여 Fig 2에서처럼 3일 경과 된 초파리와 30일 경과된 초파리를 대상으로 비행정도를 10분 동안 측정한 결과 LMK02 처리군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig 2). 이는 시간이 경과함에 따라 LMK02에 의해 APP형질전환 초파리의 비행횟수가 감소한 것으로 시간이 경과함에 따라 APP작용이 억제됨으로 해서 어느 정도 신경세포의 재생 및 회복과정을 거치는 것으로 사료된다.

상승하는 走地性을 가진 야생형 초파리를 APP-grim 형질전환 유도 시 APP에 의해 ROS가 발생되어 신경세포사멸과 미토콘드리아의 장애로 인해 운동장애가 나타나 비행능력이 상

실된다. 이는 APP에 의해 신경세포의 사멸을 유도하므로 초파리의 신경계에 많은 스트레스로부터 운동장애를 나타내어 비행능력이 소실 및 상실하게 되는 것이다. 따라서 일정 높이에서 정상군은 체공시간이 길고 APP 형질전환 초파리군은 짧은데 APP 형질전환 초파리군에서 LMK02의 효과에 대한 체공시간을 조사하기 위해 초파리의 climbing 비행능력을 3-day-old females를 대상으로 18-cm-long vials에서 수행하였다. 실온에서 1시간동안 환경에 적응시킨 다음 초파리가 완전히 바닥에 앉아 있는 시점을 기준으로 실시하였고 climbing time은 시작부위에서 15-cm 말단부위까지 5번 이상 도달하는 것으로 하고 5번의 반복실험을 수행하였다. 그 결과 Fig 3에서처럼 비행정도가 최초 3일에서 측정하면 정상군을 100 %로 환산하고 대조군의 경우 약 11±1 %인데 반해 LMK02 처리군은 91±1%로 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$). 30일이 경과한 후에는 대조군의 경우 약 4±0.5%인데 반해 LMK02 처리군은 90±5%로 3일경과시와 큰 변화를 보이지 않는 것은 50μg/ml LMK02 처리군에서 유의성 있게 감소하였으며($p<0.005$), 이는 시간이 경과함에 따라 LMK02에 의해 APP형질전환 초파리의 상승능력이 시간이 경과함에 따라 APP작용이 억제됨으로 해서 어느 정도 신경세포의 재생 내지 개선효과를 가지는 것으로 사료된다.

APP/GRIM으로 형질전환된 초파리에서 나타난 눈의 변화는 Fig. 4에서 야생형은 눈의 발생이 일정한 패턴을 나타낸 반면(Fig 4, A와 D), APP-GRIM으로 유도된 경우 눈의 구조가 붕괴되어 조직의 형태가 파괴되는 상태로 존재하는 것으로 보아 APP가 Notch의 세포사멸을 유도한 결과로 나타냄을 알 수 있다(Fig 4, B와 E). 이에 비해 LMKO2로 처리한 경우 야생형에 가까운 표현형을 나타내어 LMK02가 APP의 시신경세포의 사멸을 억제함을 알 수 있었다(Fig 4, C와 F).

이상과 같이 APP을 유도된 APP/GRIM 형질전환된 초파리를 이용하여 만든 신경손상 모델에 대해 LMK02를 이용하여 초파리의 생존률, 비행 상승능력, 비행횟수, 눈의 형태학적인 변화, APP-GRIM로 형질전환된 초파리의 뇌·광수용체의 변화를 살펴본 결과 정상군과 같은 유의한 회복을 보였으며 이는 LMK02가 신경세포사멸을 억제하는 효능이 있음을 의미한다. 또한 단미에 따른 효과도 LMK02의 효능과 더불어 생각할 수 있으며 추후 다른 약재 및 처방과도 비교실험을 통해 객관적 진료 표준화가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

V. 結　論

APP/GRIM을 이용한 LMK02로부터 치매와 동일한 초파리의 신경세포 사멸을 抑制하고 신경세포 保護效果를 규명하기 위하여 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. LMK02는 APP로 형질전환된 초파리에서 유의성 있게 생존율을 높였다.

2. LMK02는 APP로 형질전환된 초파리에서 신경계 손상에 의한 상승능력과 비행횟수의 운동장애를 유의성 있게 억제하였다.

3. LMK02는 APP발현에 의한 눈의 변성정도를 억제하였다.

以上과 같은 結論은 LMK02는 APP/GRIM의 초파리의 생존율을 效果的으로 촉진시키고 초파리의 신경 세포사멸를 억제하는 것으로 보

아 뇌세포의 사멸에 의한 알쯔하이머 치매를 포함한 다양한 퇴행성 뇌질환에 대해서도 임상적 응용 근거가 될 것으로 기대되며, 향후 좀 더 과학적으로 치매원인 인자를 연결한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 硏究가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(과제고유번호 : B070030)

참 고 문 헌

1. Lee DY, Lee JH, Ju YS, et al : The prevalence of dementia in older people in an urban population of Korea. The Seoul study. J Am Geritar Soc. 2002; 50:1233-1239.
2. 대한신경과학회 : 신경학. 서울. 군자출판사. 2007:406.
3. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울. 一潮閣. 1994:63-66.
4. 김지혁 · 황의완 : 동의정신의학. 서울. 현대의학서적사. 1992.:256-271, 327-330, 663-664.
5. Yankner BA : Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuron. 1996;16:921-923.
6. Alzheimer's disease collaborative group : The structure of the presenilin 1(SI82) gene and idendification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 1995;11(2):219-222.
7. 김승업 : 치매. 알츠하이머병. 서울. 삶과 꿈. 1997:54-80.
8. Smith, A David, Jobst, Kim A : Biological psychiatry. British Medical Bulletin. 1996;52(30):575-586.
9. Selkoe DJ : Amyloid β-protein and the genetics of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. 1996;271:18295-18298.
10. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편 : 한의신경정신과학. 서울. 집문당. 2007:327-328.
11. 陳貴延, 楊思澍 : 實用中西醫結合診斷治療學. 北京. 中國醫藥科技術出版社 1990:824-826.
12. Kaufman D : Aphasia and related disorders. In Clinical Neurology for Psychiatrists W. B. Saunders Philadelphia. 1990:146-171.
13. Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, et al : Oral tetrahydroaminoacridine in long term treatment of senile dementia . Alzheimer type. New Engl. J Med 1986;315:1241-1245.
14. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, et al : Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. N Engl. J Med. 2003;348(14):1333-1341.
15. 이정현, 오병훈, 유계준 : 치매환자에서 동반된 행동정신증상에 대한 새로운 향정신병약물의 치료효과, 대한정신약물학회지. 2000;11(3):232-237.
16. 정영조, 이승환 : 치매의 예방과 관리. 仁濟醫學. 2000;21(1):11-19.
17. 정인철, 이상룡 : 山査肉이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향, 동의생리

병리학회지. 2002;16(2): 279-288.
18. 이상원, 김상호, 김태헌, 강형원, 류영수 : 遠志 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004;18(2): 507-516.
19. 최혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수 : CT105로 유도된 痴呆모델에서 石菖蒲 수추출액이 미치는 영향, 동의신경정신과학회지. 2002;13(2): 173-194.
20. 장현호, 최혁, 양현덕, 김상태, 김태헌, 강형원, 유영수 : 釣鉤藤 디클로로메 탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 2004;18(6): 1810-1820.
21. 조윤숙, 황의완, 김현택, 박순권 : 荊防地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지. 1998;9(1): 1-24.
22. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권 : 調胃升淸湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지. 1997;8(1): 69-79.
23. 심대식, 노삼웅, 이진우, 이은아, 조종운, 배현수, 신민규, 홍무창 : 六味地黃 湯加味方에 의한 흰쥐 기억력 향상과 관련된 Hippocampus 부위의 특이 유전자 발현에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(3): 684-692.
24. 황선미, 정대규 : 供辰丹이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지. 2004;15(2): 103-118.
25. 민상연, 장규태, 김장현 : 補中益氣湯加味方이 흰쥐의 성장과 학습 및 기억 에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(2): 434-440.
26. 하수영, 정인철, 이상룡 : 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1): 59-78.
27. 이준영, 정인철, 이상용 : 天王補心丹이 痴呆병태모델에 미치는 영향. 동의신 경정신과학회지. 2002;13(2): 149-172.
28. 김건진, 정대규, 장원단이 CT105와 Aβ로 유발된 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):91-122.
29. 강형원, 김상태, 이종화, 김태헌, 손형진, 한평림, 류영수, 壯元丸加減方 水抽出物이 아밀로이드 전구단백질으로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 동의신경정신과학회지. 2007;18(2):13-24.
30. 許俊. 東醫寶鑑. 서울. 法仁文化社. 1999:189-191.
31. Markesbery WR and Ehmann WD: Brain trace elements in Alzheimer's disease. In Alzheimer's Disease. neurotoxicology. 1986;7(1):195-206.
32. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK : Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein, Neuroscience. 1999;95(1):1-4.
33. Pratico D : Alzheimer's disease and oxygen radical. new insights. Biochem Pharmachol. 2002;63:563-567.
34. Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A: Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from

EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. EuropeanStudies of Dementia. Neurology 1999;1:78-84.

35. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. : Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature. 1991;349:704-706.
36. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingell W, Yu C, Jondro P, Schmidt S, Wang K, et al. : Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science. 1995;269:973-977.
37. Katzman R : Apolipoprotein E4 as the genetic susceptibility for Alzheimer's disease. In the Alzheimer's Disease. Terry RD. Katzman R. and Bick KL.(eds), Raven Press. New York. 1994:455-457.
38. Bachman DL, Wolf PA, Linn R, et al. : Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. Neurology. 1992;42:115-119.
39. Lai F, Williams RS : A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. Arch Neurol. 1989;46:849-853.
40. Katzman R and Kawas C : Epidermiology of dementia and Alzheimer's disease. In the Alzheimer's Disease. (Terry RD, Katzman R. and Bick KL eds). Raven Press. New York. 1994:105-122.
41. 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;8(4):647-54.
42. 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;10(16):1665-71.
43. 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;30:145-52.
44. Giacobini E: Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. Ann NY Acad Sci. 2000;920: 321-327.
45. 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.
46. Giacobini E: Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. Ann NY Acad Sci. 2000;920:321-327.
47. Amenta F, Parnetti L, Gallai V, Wallin A : Treatment of cognitive dysfunction

associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors: Ineffective treatments or inappropriate approaches Mech Ageing Dev. 2001;122:2025-2040.
48. 張介賓 : 景岳全書. 서울. 一中社. 1992:846.
49. 陳士鐸 : 石室秘錄(下). 서울. 書苑堂. 1984:316-317.
50. 錢鏡湖 : 辨證奇文全書. 臺北. 甘地出版社. 1980:222-225, 223-235.
51. 정인철, 이상룡. 도담익기활혈탕이 치매병 태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15:260-276.
52. 방재선, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상 : 加味寧神丹이 CT105로 유도된 Neuro2A 세포주에서의 抗痴呆효과. 대한한방내과학회지. 2006;27(3): 603-616.
53. 김보경, 이상룡. 안신청뇌탕이 치매병태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미 치는 영향 동의생리병리학회지. 2006;16:240-255.
54. 박지운, 이상용, 정인철 : 日黃連이 痴呆병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1): 87-100.
55. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수 : 遠志와 石菖蒲 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 抗痴呆효과. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):1037-1049.
56. Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y. Dissecting the pathological effects of human Aβ40 and Aβ42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101: 6623 - 6628.
57. Finelli A, Kelkar A, Song HJ, Yang H, Konsolaki M. A model for studying Alzheimer's Aβ42-induced toxicity in Drosophila melanogaster. Mol Cell Neurosci. 2004;26:365 - 375.
58. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울. 一中社. 1994:229-230.