동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 1, 2009

紅蔘 水抽出物이 痴呆蛋白質 APP 形質轉換 초파리에 미치는 影響

김영준, 김진형, 윤종현, 정은영, 김태헌, 유영수, 강형원*
원광대학교 한의과대학 한방신경정신과 교실, 원광대학교 산본한한방병원 신경정신과 & 인암뇌신경센타*

Study of anti-Alzheimer Activities from *Ginseng Radix Rubra* Water Extract by Alzheimer's Protein APP-transgenic Fly

Young-Jun Kim, Jin-Heong, Kim, Jong-Hyun Yun, Ejun-Young Jung, Tae-Heon Kim, Yeoung-Su Lyu, Hyung-Won Kang*
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.
Department of Neuropsychiatry and Inam Neuroscience Research Center, WonKwang University, Sanbon Oriental Medical Center*

Abstract

Objectives :
Ginseng Radix Rubra water extract(RGE) has been used in vivo test for its beneficial effects on neuronal survival and neuroprotective functions, particularly in connection with APP-related dementias and Alzheimer's disease (AD). APP derived from proteolytic processing of the β-amyloid precursor protein (APP), including the amyloid-β peptide (Aβ), plays a critical role in the pathogenesis of Alzheimer's dementia.

Methods :
We determined that RGE inhibits formation of APP, which are the behavior, and possibly causative, feature of AD.

Results and Conclusions :
In the cells, RGE significantly activated antiapoptosis and decreased the activity of APP-grim, a key enzyme in the apoptosis cell-signaling cascade. These results suggest that neuronal damage in AD might be due to two factors: a direct APP toxicity and multiple cellular and molecular neuroprotective mechanisms, including attenuation of apoptosis and direct inhibition of APP, underlie the neuroprotective effects of RGE.

Key Words:
Ginseng Radix Rubra, Drosophila, Alzheimer's disease, Dementia, APP

투고일 : 2/5 수정일 : 3/3 채택일 : 3/8
교신저자 : 강형원, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
Tel : 031-390-2762, E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr

Ⅰ. 서 론

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].

알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 많은 유형의 치매로[3,4] 대뇌 피질이나 해마에 생기는 뇌위축과 노인반, 신경섬유다발 그리고 신경세포의 과립공포변성, Hirano체 등의 조직학적 소견을 특징으로 하며[5-7], 베타 아밀로이드(β-amyloid, Aβ)는 노인반의 주요 구성성분으로 AD가 발생하는 중요한 원인으로 추정되고, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시켜 산화적 스트레스로 인한 신경세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다[8].

한의학에서 痴呆는 임상증후상 呆病, 健忘, 癲狂, 虛勞 등의 범주에 포함되고, 주요병인으로는 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[9] 治法으로는 補益肝腎, 益氣補血, 豁痰開竅, 活血化瘀通竅를 활용한다[10]. 특히 문헌적, 임상적으로 치료와 예후에 있어서 元氣와 胃氣가 중요한 역할을 한다[11,12].

서양의학에서는 AD의 치료방법으로써 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 감소에 근거한 인지기능 개선[13]을 위한 cholinesterase inhibitor[14]와 NMDA(N-methyl- D-aspartate) receptor antagonist[15] 등의 약물요법이 있고, 행동 심리증상 치료를 위한 항우울제, 진정제 등의 향정신성 약물요법[16]과 심리, 인지, 행동, 작업, 재활치료의 비약물요법[17]이 활용되고 있으나, 정확한 원인요법은 아직 없는 실정이고 천연 한약재에 대한 연구가 더욱 필요한 상황이다. 최근 한의학계에선 한약의 AD에 대한 효과를 입증하는 연구들이 많이 진행되고 있는데, 遠志[18,19], 石菖蒲[20], 釣鉤藤[21], 등의 단미제와 調胃升淸湯[22,23], 六味地黃湯加減[24,25], 聰明湯加減[26,27] 등의 복합처방, 그리고 人蔘藥鍼[28]이 기억 학습증진 및 항치매 효과가 있다는 것으로 보고되었다.

본 연구에 사용된 紅蔘은 본래 人蔘(Panax ginseng C.A. Meyer)의 뿌리[29,30]를 장기보관의 목적으로 蒸熟 후 건조하여 제조한 것에서 유래하였으나 현대의 과학적 분석결과 水蔘 혹은 白蔘과는 다른 성분이 생성되어 효능이 우수한 것으로 알려져 있다[31,32].

人蔘의 주요 유효성분으로 알려진 saponin도 紅蔘이 白蔘보다 많고, 紅蔘의 Non-saponin 성분 중 다당체(polysaccharides)는 항암작용을 비롯한 다양한 조절작용이 보고되고 있다[33]. 또한 항산화[34,35], 면역기능강화[36,37] 등의 약리적효능과 중추신경계의 작용으로 학습 및 기억에 관한 작용이 보고[38]되고 있지만 치매 초파리 모델을 통한 紅蔘의 작용에 관한 연구는 아직 없었다. 이에 저자는 紅蔘水抽出物(*Ginseng Radix Rubra* Water Extract, RGE)을 APP(Amyloid precursor protein) 형질 전환한 초파리를 이용하여 초파리의 생존률, 비행 상승 능력, 비행횟수를 정상군과 RGE를 투여한 그룹과 비교 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 DMEM배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), anti-Alexa Fluor 568 mouse IgG 및 ECL kit는 Amershrm pharmacia에서, 2차 항체인 FITC, Alexa Fluor 568은 Molecular Probe사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO_2 incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), confocal immunofluorescence microscope (Olympus), Scanning Electron Microscope (FESEM / EDS, JEOL JSM-6300 F/ LINKeXL) 등을 사용하였다.

2) 紅蔘 水抽出物의 조제

본 실험에 사용한 紅蔘 水抽出物(이하 RGE)은 원광대 한의과대학에서 사용 중인 紅蔘 1 Kg을 엄선하여 세말한 다음 적당량의 3차 증류수 5,000 mL를 첨가하여 65℃에서 8시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 RGE 600 g중에서 동결건조 하여 150 g을 회수하여 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

1) 초파리 형질전환

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 사용하였다. 본 실험에 사용한 형질 전환 초파리모델은 야생형인 Drosophila melano gaster W18에 UAS-GAL4 시스템을 통해서 뇌신경세포에 잘 발현되도록 형질 전환된 elav-GAL4와 세포사멸에 관여하는 UAS-GRIM 초파리를 순차적으로 교배시킨 후 이를 다시 APP-GAL4 초파리와 교차교배를 시킨 다음 치매형질 전환모델인 APP-GAL4/UAS-GRIM을 작제하여 유전적으로 잘 발현되는지 그 유무를 RT-PCR를 수행하여 유전자 염기서열을 확인한 후 정확한 치매모델용 초파리를 선정하여 본 紅蔘 水抽出物을 대상으로 치매 치료제 유효성을 검정하였다.

2) 초파리 생존율 측정

본 실험에 사용한 초파리는 세포사멸이 민감하게 반응하도록 형질 전환된 APP-GAL4 /UAS-GRIM 초파리를 대상으로 수컷 25마리를 2.5 Cm X9.5 Cm의 플라스틱 바이알에 정사각형 1.5 Cm의 여과지에 5% 과당을 첨가하고 산화적 스트레스를 주기 위해 100 μM의 H_2O_2 를 첨가하였다. 紅蔘 水抽出物을 0, 10, 50, 100, 500 ㎍/ml 농도별로 처리하고 또한 50 ㎍/ml농도로 15일간동안 생존수를 관찰하였다.

3) 초파리의 행동학적 분석

초파리의 climbing speed는 야생형인 Drosophila melanogaster W18과 세포사멸이 민감하게 반응하도록 형질 전환된 APP-GAL4/UAS-GRIM 초파리 성체 3-day-old-females을 대상으로 18 cm-long vials에서 수행하였다. 실온에서 1시간동안 환경에 적응 시킨 다음 초파리가 완전히 바닥에 앉아 있는 시점을 기준으로 실시하였고 climbing time은 시작부위에서 15 cm 말단부위까지 5번 이상 도달하는 것으로 5회 반복실험을 수행하였다. Flight assay는 3일된 암컷과 30일된 암컷을 대상으로 Pesah방법을 적용하여 수행하였다. (n>10) 단 통계는 T-test를 사용하였으며 유의수준(P)은 0.05로 정해 $P<0.05$는 유의한 것으로 판단하였다.

3. 통계학적 분석

실험결과는 평균± 표준편차로 나타내었으며 처리에 대한 결과의 유의성 검정은 student's t-test로 분석하였고, $p<0.05$인 경우, 유의성이 있는 것으로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 초파리 생존에 미치는 영향

야생형 초파리 정상군과, APP-grim 형질전환 초파리 대조군, 대조군에 H_2O_2동시처리군, 紅蔘 水抽出物 50 ㎍/ml로 처리한 실험군의 생존율을 15일간 관찰한 결과 개시전에는 각각 25마리였으나 실험 초기경우부터 정상군은 22±0.5 마리로 나타났고, 대조군인 APP/GRIM은 17±0.5마리, APP/GRIM와 H_2O_2 동시 처리군에서는 10±0.5마리였으며 15일경과 후에는 정상군은 19±0.5마리로 나타났고, 대조군인 APP/GRIM은 3±0.5마리, APP/GRIM와 H_2O_2 동시 처리군에서는 2±0.5 마리였으며 紅蔘 水抽出物을 처리한 실험군은 17±0.5마리였는데 특히, 紅蔘 水抽出物이 $p<0.005$ 범위 내에서 유의성 있게 APP 형질전환 초파리에 대한 억제효과로 인해 개체 생존율을 증가시켰다(Fig. 1).

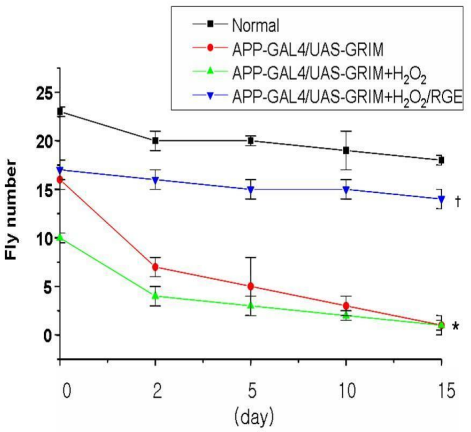


Fig. 1. Increased median life span of RGE-treated flies. Survival ratio of Normal and APP-GAL4/UAS-GRIM transgenic adult flies after prolonged treatment with the RGE, H2O2 and APP-GAL4/UAS-GRIM and of nontreated flies of the same genotypes. *, $p<0.05$ of when compared with normal. †, $p<0.005$ of when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

2. 초파리의 상승능력에 미치는 영향

APP-grim 형질전환 초파리군의 비행능력에 대한 紅蔘 水抽出物의 효과를 조사하기 위해 초파리의 상승능력을 관찰한 결과 비행정도가 최초 3일에서 정상군을 100%로 환산하였을 때, 대조군의 경우 약 11±2%인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 82±3%로 유의성 있게 증가하였고($p<0.005$), 30일이 경과한 후에는 대조군의 경우 약 6±1%인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 79±3%로 30일 경과에는 약간의 감소하는 변화를 보였다($p<0.005$)(Fig. 2).

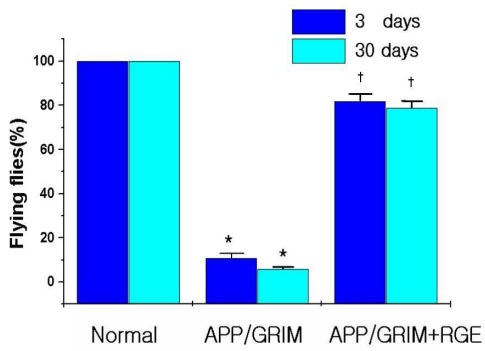


Fig. 2. The percentage of climbers is reduced by APP induction. The percentage of flight ability is decreased by APP induction, but the percentage of flight ability in RGE treatment increased as same flies. Comparison of climbing ability (*, $p<0.05$; †, $p<0.005$). Error bars indicate mean ± S.D. Details of all the indicated genotypes in this and other figures are described in Methods and Materials.

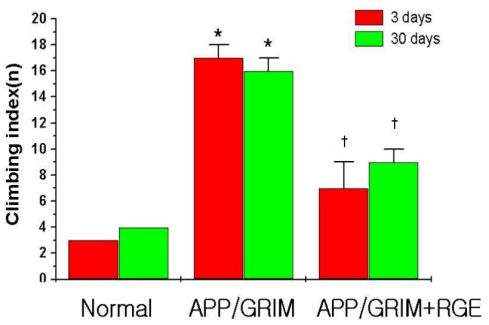


Fig. 3. Climbing time increase by APP induction. Comparison of climbing rate (*, $p<0.05$; †, $p<0.005$). Error bars indicate mean ± S.D. Details of all the indicated genotypes in this and other figures are described in Methods and Materials.

3. 초파리의 비행횟수에 미치는 영향

APP-grim 형질전환 초파리군의 비행능력에 대한 紅蔘 水抽出物의 효과를 조사하기 위해 Flight assay를 수행한 결과 비행시간 10분 동안 정상군은 평균적으로 비행횟수가 3회 정도이며 대조군의 경우 약 17±1회인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 7±1회로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다($p<0.005$). 30일이 경과한 후에는 야생형인 정상군에서 4회인데 반해 대조군의 경우 약 16±1회로 비행횟수가 늘어남을 알 수 있고, 紅蔘 水抽出物 처리군은 9±1회로 대조군에 비해 큰 변화를 보였다($p<0.005$)(Fig. 3).

Ⅳ. 고 찰

痴呆는 정상적으로 일상생활을 유지하던 사람이 대뇌반구 특히 대뇌피질 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] 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매 그리고 兩者가 혼재된 혼합형 치매가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다[3,4].

AD는 가족성 AD(familial AD, FAD)와 산발성 AD(sporadic AD, SAD)로 크게 분류되고 전체 AD 환자의 5-10% 정도를 차지하는 FAD의 경우 원인 유전인자로 알려진 presenilin 1(PS1), APP(amyloid precursor protein) gene, presenilin 2(PS2)에 돌연변이가 일어난 경우 100% AD로 진행되는 것으로 보고되었다[39].

AD 환자의 대부분을 차지하는 SAD의 경우는 특정유전자의 돌연변이에 의해 발병하는 경우는 발견되지 않았으며 apolipoprotein (APO) E4 allele와 같은 위험인자[40]는 알려져 있으나 FAD에서와 같은 전체의 경우를 설명하는 유전학적 근거들은 보고된 바가 없다.

AD의 원인과 발병기전은 분명하진 않지만 다양한 병인적 병리적 인자들이 관련되어 있고[41] AD의 발병과 진행에 관해 유전적 요인, 지발성 또는 비통상적 바이러스, 불완전한 세포막대사, 내인성독소, 자가면역질환, 알루미늄 같은 미량원소에 의한 신경 독성등 다양한 요인들이 관련되어 있다[41].

현재 AD의 치료로는 AD의 진행을 억제하거나 완치할 수 있는 치료법은 없지만 AD의 인지장애는 ACh(acetylcholine)의 감소와 연관된 것으로[13] ACh의 증가 목적을 위한 다양한 시도로 acetylcholinesterase 억제제인 tacrine, aricept를 사용하고[14], NMDA receptor 길항제인 memantine[15] 등이 사용되고 있으며 AD의 행동심리증상으로 자주 나타는 우울증에는 최소의 항콜린성 작용약물인 선택적 세로토닌 재흡수 차단제 등을 저용량으로 사용하고, 불안과 피해망상(paranoid delusion)에 대한 항정신약물 요법[16,17]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 부작용을 야기하기도 한다[42,43]. 현재 전 세계적으로 5종의 痴呆치료제(코그넥스, 아리셉트, 엑셀론, 메만틴)만이 허용되어 시판되고 있으나 대부분 화학적으로 조제된 의약품으로 그 안정성과 부작용, 독성문제가 완전히 밝혀지지 않아 현실적으로 치료에 어려움이 많다. 따라서 부작용이 적으며, 효능이 좋고, 원인적 치료까지 가능한 새로운 기억력 개선 및 치매치료제를 개발하는 것이 절실히 요구되는 현실이다. 결론적으로 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.

최근 치매에 대한 한의학계의 연구동향을 보면 임상에서 활용되는 복합처방에서 노화 및 항산화과정에 미치는 영향과 AD병태모델에 미치는 영향에 대한 연구[44], 그리고 방[45] 등이 加味寧神丹에서 Neuro2A 세포주에서의 항치매효과, 김[46] 등이 安神淸腦湯의 PC-12(phenochromocytoma cell lines)에서의 치매억제효과를 보고하고 단미처방으로는 박[47] 등이 日黃連의 mLFC(mouse lung fibroblast cell lines)과 PC-12에서의 항치매작용과 이[18] 등이 遠志, 石蒼蒲의 SK-N-SH cell lines에서의 항치매 작용에 대하여 보고하고는 있으나 이들은 실제로 세포 실험내에서 이루어진 연구로 복합처방이나 단방의 정확한 치매 치료 효과로 평가하기에는 한계가 있다.

이러한 논의 중 APP 형질전환 초파리를 활용한 치매치료제 개발은 아직 미미하고 이를 직접 이용한 효과 실험은 현재까지 이루어진 바가 없다. 따라서 APP를 분자생물학적으로 조작한 초파리에 대하여 연구해 보는 것은 극히 중요하다고 생각하여 본 연구 실험을 진행하게 되었다.

한의학에서는 痴呆는 呆病, 健忘, 癲狂, 虛勞를 근거로 辨證施治하고 있는데, 역대 문헌적 고찰과 변증치료에서 元氣와 胃氣 그리고 臟腑로는 脾胃의 중요성을 살펴볼 수 있다[1, 12, 48, 49].

한편 痴呆의 대표적 증상인 기억력 장애를

특징으로 하는 健忘에 대해서 김[50] 등은 健忘의 치료 및 처방이 언급된 역대 의서와 최근 한의학 서적 20종을 대상으로 한 健忘의 병인 및 치료에 관한 문헌고찰을 통해 健忘의 치료 처방에 사용된 약물은 총 138종으로 그 중에서도 人蔘이 가장 많이 활용되었음을 밝혔다.

人蔘(Panax ginseng C.A. Mayer)은 五加科에 속하는 다년생 초본인 人蔘의 뿌리로 2,000년 전부터 동아시아에서 중요한 약용식물로 이용되어 왔으며[51] 현재 세계에서 가장 널리 사용되는 약용식물중 하나이다. 人蔘의 한의학적 효능은 大補元氣, 寧神益智, 生津止渴, 補脾益氣, 扶正祛邪, 止咳潤肺, 托瘡生氣 등이 있다[52, 53].

또한 人蔘은 가공방법에 따라서 크게 白蔘(껍질을 벗기거나 벗기지 않고 말린 것)과 紅蔘으로 구분하고 紅蔘은 水蔘을 蒸熟 후 건조하여 제조한 것으로 水蔘을 열처리하는 제조과정 중 성분의 화학적 변화가 일어나 水蔘이나 白蔘에 존재하지 않은 새로운 생리활성물이 증가되는데[32] 紅蔘의 제조과정 중 변화되는 중요성분은 사포닌계열과 비사포닌계열로 폴리아세틸렌(polyacetylen), 산성다당체, 아미노산 등이 있다[52]. 人蔘의 주요 유효성분으로 알려진 사포닌은 별도로 ginsenoside라고 하는데 白蔘보다 紅蔘에서 많아진다.

예를 들어 紅蔘을 제조하면 白蔘에 존재하는 malonyl-ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 malonyl 그룹이 떨어져서 ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd가 되며. ginsenoside의 C-20 위치에서 glycosyl 잔기가 이탈되거나 C-20 위치에서 수산기가 이성화되어 20(S)- ginsenoside Rg3, 20(R)-ginsenoside Rg2, 20(S)-ginsenoside Rb2, 20(R)-ginsenoside Rh1으로 전환된다[31]. 또한 人蔘의 non-saponin계열 중 다당체(polysaccharides)는 항암작용을 비롯한 다양한 조절작용이 보고되어 있다[33]. 여러 연구를 통하여 다당체 성분이 人蔘의 약리효능을 나타내는 중요한 성분임이 입증되고 있으나 화학적 조성과 구조 및 작용기전이 아직 명확히 규명되지 않고 있다[53]. 白蔘에서 분리한 Panaxan A-U의 저혈당작용을 갖는 21종의 다당체 중 산성다당체가 8종이고 나머지는 중성다당체로 산성다당체 함유량이 白蔘보다 紅蔘에 더 많고[54,55] 산성다당체는 면역체계에 미치는 영향이 큰 것으로 보고[56,57] 되고 있다. 이와 같이 다당체의 경우도 白蔘의 다당체와 紅蔘의 다당체는 화학적 성상이 다를 것으로 예상되나 아직 紅蔘으로 분리된 다당체의 구조 및 활성성분에 대한 연구는 미미한 실정이다[58,59].

특히 人蔘의 중추신경계에 대한 국내외 연구를 살펴보면 ginsenoside 일부가 nerve growth factor의 자극을 촉진하고[60] CNS(central nerve system)에서 choline 분비와 같은 metabolism을 증가시키고[61] Ischemia[62], glutamate neurotoxicity[63]에 대한 hippocampal neurons에 대한 보호작용이 알려져 있으며 특히 신경보호 작용에는 Rb1보다 Rg1이 더 뛰어난 효과를 보였다[64]. 이런 신경계에 대한 인삼의 작용은 동물실험에서 기억력과 학습능력을 증진시킬 뿐만 아니라[65] 노화와 허혈성 신경손상에 의한 신경보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다[66]. 더욱이 ginsenosides가 rat에서 뇌신경보호 작용도 있음이 밝혀졌다[67]. 또한 ginsenoside 일부 성분이 AD의 원인으로 추정되는 Aβ에 대한 신경독성에 대한 보호효과[68]가 밝혀지고 최근의 연구에서는 紅蔘의 non-saponin계열 일부 성분이 중추신경세포기능에 미치는 영향이 보고[69]되는 상황에서 독성과 부작용이 화학약물에 비해 적고 임상적 효능이 우수한 천연 한약재인 紅蔘에 대한 항치매효과에 대한 실험적 고찰이 요구된다.

이에 저자는 APP로 형질 전환된 초파리에

서 정상군, APP 형질 전환군 그리고 APP 형질 전환군에 紅蔘水抽出物을 50 ㎍/ml 농도로 처리한 실험군으로 구별하여 생존율과 비행능력, 비행횟수에 미치는 영향을 관찰하였다.

APP-grim으로 형질 전환된 초파리에 있어서 신경세포사멸로 인한 개체 생존의 치명적 손상에 대한 紅蔘 水抽出物의 효과에 대해 야생형 초파리 정상군과 APP -grim 형질전환 초파리 대조군 APP-grim 형질전환 초파리에 H_2O_2 처리한 대조군 그리고 紅蔘 水抽出物 50 ㎍/ml로 처리한 실험군의 생존율을 15일간 관찰한 결과 개시 전에는 각각 25마리였으나 15일경과 후에는 정상군은 19±0.5마리로 나타났고, 대조군인 APP/GRIM은 3±0.5마리, APP/GRIM와 H_2O_2 동시 처리군에서는 2±0.5마리였으며 紅蔘 水抽出物 처리군은 17±0.5마리였는데 특히 紅蔘 水抽出物이 $p<0.005$ 범위 내에서 유의성 있게 APP 형질전환 초파리에 대해 억제효과로 인해 개체 생존율을 증가시켰다(Fig. 1).

상승하는 주지성(走地性)을 가진 야생형 초파리를 APP-grim 형질전환 유도 시 APP에 의해 ROS가 발생되어 신경세포사멸과 미토콘드리아의 장애로 인해 운동장애가 나타나 비행능력이 상실된다. 따라서 일정 높이에서 정상군은 체공시간이 길고 APP 형질전환 초파리군은 짧은데 APP 형질전환 초파리군에서 紅蔘 水抽出物의 효과에 대한 체공시간을 조사하기 위해 초파리의 상승능력을 관찰한 결과 비행정도가 최초 3일에서 정상군 100% , 대조군 약 11±2%인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 82±3%로 유의성 있게 증가하였고($p<0.005$), 30일이 경과한 후에는 대조군 약 6±1%인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 79±3%로 약간의 감소하는 변화를 보였다($p<0.005$)(Fig. 2).

음성 走地性으로 상승상태에 머무르는 경향성을 가진 초파리는 수분공급이나 영양분을 보충하기 위해 바닥의 배양배지를 먹으러 왕복비행을 하게 된다. 이때 APP에 의한 신경손상으로 비행장애로 왕복비행이 잦아지게 된다. 이에 초파리의 Flight assay를 관찰한 결과 비행시간 10분간 평균 비행횟수가 정상군 3회, 대조군 약 17±1회인데 반해 紅蔘 水抽出物 처리군은 7±1회로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다($p<0.005$). 30일 경과 후에는 정상군이 4회인데 반해 대조군의 경우 약 16±1회로 비행횟수가 늘어남을 알 수 있고, 紅蔘 水抽出物 처리군은 9±1회로 대조군에 비해 큰 변화를 보였다 ($p<0.005$)(Fig. 3).

이상의 결과와 같이 APP 형질전환 초파리를 이용하여 만든 신경손상 모델에서 紅蔘 水抽出物의 신경보호효과를 관찰한 결과 紅蔘水抽出物이 APP 형질전환 초파리의 생존율을 높이고 손상된 신경계에 따른 상승능력과 비행횟수의 운동장애를 유의성 있게 억제하여 신경독성에 대한 보호, 치료효과가 있는 것으로 나타나 치매를 포함한 퇴행성 뇌질환에 임상응용의 중요한 근거가 될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 다른 단일 약재 및 복합처방과의 비교실험을 통해 치매에 효과적인 치료제 개발을 위한 지속적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

APP로 형질 전환된 초파리에서 紅蔘 水抽出物을 이용하여 신경세포의 세포사 유도에 대한 억제와 신경세포 보호효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 紅蔘 水抽出物은 $p<0.005$ 범위 내에서 APP로 형질 전환된 초파리에 대한 억제효과로

인해서 유의성 있게 개체 생존율을 증가시켰다.

2. 紅蔘 水抽出物는 APP로 형질 전환된 초파리에서 신경계 손상에 의한 상승능력을 증가시켰다.

3. 紅蔘 水抽出物는 APP로 형질 전환된 초파리에서 비행횟수의 운동장애를 유의성 있게 억제하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면 紅蔘 水抽出物은 APP로 형질전환 된 초파리에서 신경세포의 세포사를 억제하고 신경세포를 보호하므로, 뇌세포의 사멸에 의한 알츠하이머 치매를 포함한 다양한 퇴행성 뇌질환에 대해서도 임상적 근거가 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

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;50:1233-9.
2. 대한신경과학회. 신경학. 군자출판사. 2007:406.
3. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-6.
4. 김지혁・황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256-71, 327-30, 663-4.
5. Yankner BA. Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuron. 1996;16:921-3.
6. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1(SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 1995;11(2):219-22.
7. 김승업. 치매. 알츠하이머병. 서울:삶과 꿈. 1997:54-80.
8. Selkoe DJ. Amyloid β-protein and the genetics of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. 1996;271:18295-8.
9. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. 한의신경정신과학. 서울: 집문당. 2007:327-8.
10. 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 1990:824-6.
11. 張介賓. 景岳全書. 서울:一中社. 1992:846.
12. 錢鏡湖. 辨證奇文全書. 臺北:甘地出版社. 1980:222-5, 223-5.
13. Kaufman D. Aphasia and related disorders. In Clinical Neurology for Psychiatrists W. B. Saunders Philadelphia. 1990:146-71.
14. Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, et al. Oral tetrahydroaminoacridine in long term treatment of senile dementia . Alzheimer type. New Engl. J Med 1986;15:1241-5.
15. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, et al. Memantine in moderate-to-severe

Alzheimer's disease. N Engl. J Med 2003;348(14):1333-41.

16. 이정현, 오병훈, 유계준. 치매환자에서 동반된 행동정신증상에 대한 새로운 향정신병약물의 치료효과, 대한정신약물학회지. 2000;11(3):232-7.
17. 정영조, 이승환. 치매의 예방과 관리. 仁濟醫學. 2000;21(1):11-9.
18. 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- 49.
19. 이상원, 김상호, 김태헌, 강형원, 류영수.遠志 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004;18(2):507-16.
20. 최혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수. CT105로 유도된 痴呆모델에서 石菖蒲 수추출액이 미치는 영향, 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):173-94.
21. 장현호, 최혁, 양현덕, 김상태, 김태헌, 강형원, 유영수. 釣鉤藤 디클로로메 탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004;18(6):1810-20.
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. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권 . 調胃升淸湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1997;8(1):69-79.
24. 박은혜, 정명숙, 박창범, 지상은, 이영혁, 배현수, 신민규, 김현택, 홍무창. 六味地黃湯加減方-1,2가 학습과 기억능력에 미치는 영향에 관한 임상연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(5):976-88.
25. 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):684-92.
26. 이상룡, 정인철. 聰明湯과 山査聰明湯이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):138-48.
27. 안기영, 이성균, 이승희, 김상우, 신진봉, 송봉근, 이언정. 허혈유발 흰쥐에 있어서의 인지 장애에 미치는 加減聰明湯의 효과, 대한한의학회지. 2007;28(2): 01-12.
28. 김민수, 이은용. 人蔘약침이 에탄올 중독 흰쥐의 해마에서 c-fos 생성에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003;20(3): 131-40.
29. 신민교. 臨床本草學. 서울:영림출판사. 1989:166.
30. 신길구. 申氏本草學. 서울:수문사. 1982:2-8.
31. Kim YS, Kang KS and Kim SI. Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fraction from Panax ginseng : comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. Arch Pharm Res. 1990;13(4):330-7.
32. Park KM, Jeong TC, Kim YS, Shin HJ, Nam KY and Park JD. Immunomodulatory effect of acidic polysaccharide fraction from Korean red ginseng (Panax ginsneg). Natural product sciences 2000;6:31-7.
33. Hikino H, Oshima Y, Suzuki Y and Konno C. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans I, J, K and L, glycans of Panax ginseng roots. J

Ethnopharmocol. 1985;14(2-3):255-9.
34. 오미현, 정해영, 양한석, 김규원, 정한영, 오우라히꼬끼치, 요코자와다카꼬. Ginsenoside Rb2가 노화촉진마우스(SAM-R/1)의 항산화물질에 미치는 영향. Korean Biochem J. 1992;25(5):492-8.
35. 성금수, 전철, 권용훈, 김경현, 장재철. 홍삼 추출물 투여가 생쥐간에서 항 산화효소 활성과 지질과산화에 미치는 효과. 고려인삼학회지. 2000;24(1):29-34.
36. 서성옥, 정철헌, 조민영, 손길수. 소화기계 암의 수술후 면역기능에 대한 고려 홍삼의 효과. 고려인삼학회지. 1998;22(1):32-42.
37. 김기환, 정인성, 정희용, 조성기, 윤연숙 . 홍삼다당체의 항암면역증강작용. 고려인삼학회지. 1997;21(2):78-84.
38. Kurimoto H, Nishijo H, Uwano, T, Yamaguchi, H, Zhong, YM, Kawanishi, K and Ono T. effects of nonsaponin fraction of Red Ginseng on learning deficits in aged rats. Physiology & Behavior. 2004;82:345-55.
39. Selkoe DJ. Cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature 1999;399:A23-A31.
40. 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;455-7.
41. Markesbery WR and Ehmann WD. Brain trace elements in Alzheimer's disease. In Alzheimer's Disease. neurotoxicology. 1986;7(1):195-206.
42. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. Ann NY Acad Sci 2000;920:321-7.
43. 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;122:2025-40.
44. 정인철, 이상룡. 도담익기활혈탕이 치매병태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15:260-76.
45. 방재선, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상 . 加味寧神丹이 CT105로 유도된 Neuro2A 세포주에서의 抗痴呆효과. 대한한방내과학회지. 2006;27(3):603-16.
46. 김보경, 이상룡. 안신청뇌탕이 치매병태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;16:240-55.
47. 박지운, 이상용, 정인철. 日黃連이 痴呆병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):87-100.
48. 黃大東 外. 實用中醫內科學, 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-81.
49. 郭字鵬 外. 謝海洲治療腦萎縮經驗, 中醫雜誌. 1997;38(10):586-7.
50. 김성욱, 주승균, 구병수. 健忘의 病因 및 治療에 관한 文獻考察. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):69-84.
51. Attele AS, Wu JA, and Yuan CS, Ginseng Parmacology. multiple constituents and multiple actions. Biochem Pharmacol. 1999;58:1685-93.
52. Park, JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng(Panax ginseng C.A. Meyer) Korean J Sci. 1996;20:389-96.
53. Konno C, Sugiyama K, Kano M, Takahashi M and Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans A, B,

C, D and E, glycans of Panax ginseng roots. Planta Medica 1984;50:443-8.

54. Lee SD, Lee KS, Okuda H and Hwang WI. Inhibitory effect of crude acidic polysaccharide of korea ginseng on lipolutic action oftoxohormone-L from cancerous ascites. Korea J Sci. 1990;14:10-3.
55. Okuda H. Biological activities of non-saponin compounds isolated from Korean red ginseng. Proc. Int'l Ginseng Symp. on Korean Ginseng. The Society for Korean Ginseng. Seoul. Korea. 1990;15-9.
56. Park KM, Kim YS, Jeong TC, Joe CH, Shin HJ, Lee YH, Nam KY and Park JD. Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from Panax ginseng. Planta Medica. 2001;67:122-6.
57. Park JD, Kim YS, Park KM, Shin HJ, Jeong TC, Lee YH and Nam KY. Biological Activities of water soluble non-saponin constituents from Korean red ginseng .- Immunomodulating activities of acidicpolysaccharide. Proc. of '99 Korea-Ginseng Symp. 1999:191-209.
58. Hikino. H, Oshima Y, Suzuki Y and Konno C. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans F, G, H, I, J, K and L, glycans Panax ginseng roots. Shoyakigaku Zasshi 1985;39:331-7.
59. Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. Rhamnogalacturonan II from the leaves of Panax ginseng C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. Carbohydrate Res. 1997;300(3):239-49.
60. Saito H, Suba K, Schwab M and Thoenen H. Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside Rb1 in organ cultures of chick dorsal root ganglia. Jpn J Pharmacol. 1977;27:445-51.
61. Benishin CG. Actions of ginsenoside Rb1 on cholin uptake in central cholinergic nerve ending. Neurochem Int. 1992;21(1):1-5.
62. Lim JH, Wen TC, Matsuda S, Tanaka J, Maeda N, Peng H, Aburaya J, Ishikara K and Sakanaka M. Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. Nurosci Res. 1997;28:191-200.
63. Liu M, Zhang JT. Protective effects ginsenoside Rg1 and Rb1 on cultured hippocampal neurons. Yao Hsueh Pao. 1995;30:674-8.
64. Liao B, Newmark H and Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenoside Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro . Exp Neurol. 2002;173(2):224-34.
65. Choi X, Saji H, Iida Y, Magata Y and Yokoyma A. ginseng pretreatment protects against transient global cerebral ischemia in the rat: measurement of local cerebral glucose utilization by [^{14} C] dexoyglucose autoradiography. Biol Pharm Bull. 1996;19(4):644-6.
66. Min L and Juntian Z. Effects ginsenoside Rb1 and Rg1 on synaptosomal free calcium level, ATPase Calmodulin in rat hippocampus. Chin Med J.

1995;108(7):544-7.

67. Chu GX and Chen X. Protective effect of ginsenosides on acute cerebral ischemia-reperfusion injury of rats. China J Pharmacol Toxicol 1989;3:18-23.
68. 이은아, 주인수, 허균, 묵인희. B103세포에서 베타아밀로이드(25-35) 독성에 대한 Ginsenoside Rb1과 Rg1의 보호효과. 대한신경학회지. 1999;17(5):688 -93.
69. Sohn EH, Do H, Kang NS, Jang SA, Park SK, Lee HR, Rhee DK and Pyo SK. Effects of Non-saponin Red Ginseng Components on the Function of brain cells. Ginseng Res. 2008;32(1):62-6.