동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):191-200

In vitro에서 β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 활성과 amyloid β protein 생산에 대한 聰明湯加味方의 효과

임정화, 정인철*, 임종순†, 김승형‡, 이상룡*

부산대학교 병원 한방진료처 한방신경정신과, 대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실*
대전대학교 한의과대학 생명예방과학교실†, 대전대학교 동서생명과학연구원‡

Effect of *Chongmyung-Tang Prescription Combination* on the Production of Amyloid β protein and β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme Activity in vitro

Jung-Hwa Lim, In-Chul Jung*, Jong-Soon Lim†, Seung-Hyung Kim‡, Sang-Ryong Lee*

Dept. of Neuropsychiatry, Pu-San National University Korean Medicine Hospital
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University*
Dept. of Life Science and Preventative Medicine College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University†
Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Dae-Jeon University‡

Abstract

Objectives :
This experiment was designed to investigate the effect of *Chongmyung-Tang Prescription Combination*(CmTP-C_{1-10}) extract on the production of amyloid β protein and β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme(BACE) activity.

Methods :
The effect of CmTP-C_{1-10} extract on expression of APP mRNA, BACE2 mRNA in BV2 microglia cell line treated by lipopolysacchride(LPS) and amyloid β protein fragment(Aβ fragment) were investigated. The effect of CmTP-C_{1-10} extract on production of amyloid β protein(Aβ) in BV2 microglia cell line treated by LPS and Aβ fragment were investigated. The effect of CmTP-C_{1-10} extract on BACE activity were investigated.

Results :
1. CmTP-C_9 extract the most significantly suppressed the expression of APP mRNA, BACE2 mRNA in BV2 microglia cell line treated by LPS and Aβ fragment.
2. CmTP-C_9 extract significantly suppressed the production of Aβ in BV2 microglia cell line treated by LPS and Aβ fragment.
3. CmTP-C_9 extract the most significantly inhibited BACE activity.

Conclusions :
These results suggest that CmTP-C_9 may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's Disease. Investigation into clinical use of CmTP-C_9 for Alzheimer's Disease is suggested for future research.

Key Words :
Alzheimer's disease, Amyloid β protein(Aβ), β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme(BACE), *Chongmyung-Tang (Cōngmingtāng) Prescription Combination*(CmTP-C_{1-10})

투고 : 2010. 5. 8. 수정 : 2010. 6. 3. 채택 : 2010. 6. 3.
교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel) 042-229-6811, E-mail) 7575np@dju.kr

Ⅰ. 서 론

알츠하이머병(Alzheimer's Disease; AD)은 노인성 치매를 야기하는 대표적인 퇴행성 신경질환으로 노인반점(senile plaques)과 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle)가 병리학적 특징으로 나타난다[1]. 노인반점의 주요 구성 물질인 독성의 아밀로이드 베타 단백질(amyloid β protein; Aβ)은 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein; APP)로부터 생성된다. APP의 대사에는 α-secretase, β-secretase 그리고 γ-secretase라는 단백질 분해효소가 관여하는데, 그 중 β-secretase와 γ-secretase가 작용하여 APP를 차례로 자를 경우 Aβ가 생성된다. 따라서 이 두 가지 효소의 활성저해는 Aβ 생성을 억제하기 위한 중요한 요소가 될 수 있다[2]. 한편, β-secretase(β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme; BACE)와 γ-secretase의 발현 또는 활성을 억제하면 독성 물질인 Aβ의 생성이 감소한다는 사실이 보고되었고[3], β-secretase를 knock out 시킨 생쥐의 경우에는 정상적인 발생 과정을 걸쳐 성체로 성장할 수 있을 뿐 아니라, 정상 쥐와 비교 시 표현형의 차이가 없는 것으로 보고되고 있어 β-secretase의 발현 및 활성 조절이 Aβ생성을 억제하기 위한 약물 개발에 좋은 표적으로 부각되고 있다[4].

聰明湯은 『東醫寶鑑』[5]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술되어 있고, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다[6]. 최근 김[7] 등의 연구에서 聰明湯이 건망유도백서의 학습과 기억에 유의한 효과가 있음이 보고된 이래, 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[8~14]가 진행되었다.

특히 巴戟天과 山査肉은 항콜린작용과 APP 발현 억제효과를 보여[15,16] 두 약물이 치매의 예방과 치료에 활용될 수 있음을 실험적으로 확인하였고, 이후 聰明湯과 巴戟天 혹은 山査肉를 加味한 巴戟天聰明湯, 山査聰明湯에 대한 추가적 연구에서 모두 기억력 감퇴 억제 효과, 항염증효과, 뇌세포 보호효과, 행동개선효과를 확인한 바 있다[8,9]. 이에 본 연구는 종래의 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 加味한 聰明湯加味方의 한약제제 개발을 위한 기초실험 연구로 약물의 다양한 조합 비율 중, APP 유전자 발현, Aβ의 생산, 그리고 BACE2의 유전자 발현과 효소활성 억제 작용에 가장 우수한 조합과 조성비를 찾고자 하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 Fetal bovine serum-alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium (FBS-αMEM; Cellgro, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM(containing collagenase A 5 ㎎/㎖); BM, Indianapoilis, IN, USA)}, lipopolysaccharide(LPS; Sigma, USA), 25 mM synthetic Aβ fragment, residues 25-5 (Bachem California, Torrance, CA), 35 mM calpain protease inhibitor(MDL28170; Sigma, M6690, USA), Taqman PCR Master mix(Applied Biosystems, USA), 그리고 BACE inhibitor screening assay kit(Cayman, Mi, USA)이며 기타 시약은 특급내지 일급 시약을 사용하였다.

기기는 Multi-Detection Microplate Reader (Synergy-HT, Bio-Tak, USA), Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA) 등을 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 약재는 다음과 같고 (주)경방신약으로부터 공급받아 사용하였다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Presciption of *Chongmyung-Tang Prescription Combination*(CmTP-C)

Herbal Name	Galenical Name
石菖蒲	*Acori Graminei Rhizoma*
遠志	*Polygalae Radix*
白茯神	*Hoelen Cum Radix*
山査肉	*Crataeji Fructus*
巴戟天	*Morindae Radix*

2. 실험 방법

1) 세포 배양

본 실험에서 사용된 BV2 cell line은 primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogen을 감염시켜 만들어진 세포주이며, 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary cell과 같다[17]. 동결된 BV2 세포를 해동하여 10% FBS-αMEM 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS-αMEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV2 세포의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS-αMEM 배지에서 안정화시킨 BV2 세포를 *in vitro* 모델로 사용하였다.

2) 聰明湯 조합 및 추출물 수득

미리 선별되고 적절한 크기로 다듬어진 건조 石菖蒲, 건조 遠志, 건조 白茯神, 건조 山査肉 및 건조 巴戟天을 10 가지 조합비율로 제조하였다. 혼합물에 1300 ㎖의 순수를 가하고 100℃에서 3시간 열수추출을 행한 다음 영하 40℃에서 15시간 급속 동결하고, 35시간 이상 진공 건조한 다음 분쇄하여 각각의 聰明湯 조합(CmTP-C_{1-10})을 추출하였다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Compare of CmTP-C and Crude Extract

Herbal Name	*Chongmyung-Tang Prescription Combination*(CmTP-C_{1-10}) amount(g)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
石菖蒲	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0
遠志	2.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	2.0	4.0
白茯神	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	4.0	2.0	4.0	4.0
山査肉	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
巴戟天	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Total	**10.0**	**12.0**	**12.0**	**12.0**	**12.0**	**12.0**	**14.0**	**14.0**	**14.0**	**16.0**
Dry Extract	2.26	2.06	2.04	1.99	2.47	2.58	2.05	1.82	1.99	2.03

3) CmTP-C_{1-10} 추출물의 APP와 BACE2 mRNA 유전자 발현 억제 효과 분석

(1) BV2 세포주에서 RNA 분리

실험에서 사용된 BV2 세포주를 약 2×10^6 cell/㎖의 농도가 되도록 배양한 다음, 상기 세포배양액 1 ㎖ 당 CmTP-C_{1-10} 추출물을 각각 100 ㎍씩 가하고 1시간 후 LPS(10 ㎍/㎖)와 25 μM synthetic Aβ fragment, residues 25-35를 가하였다. 24시간 후 DMEM 배양액으로 세척한 후 새로운 배양액으로 40시간 동안 CO_2 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 배양 상층액을 제거한 후 RNAzol[B] 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하

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

(2) 역전사중합효소 연쇄반응

역전사(Reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 ㎍을 DNase I(10 U/㎖) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시켰고, 이에 2.5 ㎖ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎖ random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 ㎖), RNA inhibitor로서 1 ㎖ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎖ 100 mM DTT, 4.5 ㎖ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1 ㎖의 M-MLV RT(200 U/㎖)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎖가 되도록 하였다. 이 20 ㎖의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 Polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) Real time quantitative PCR

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix(Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 사용하였으며, probe의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Quantitative real-time RT-PCR의 Relative quantitative(RQ) 값은 Witney 등[18]의 공식에 의하여 다음과 같이 계산하여 측정하였다.

$y = x(1+e)n$

(x; starting quantity, y; yield, n; number of cycles, e; efficiency)

사용된 Taqman probe는 아래와 같다(Table Ⅲ).

Table Ⅲ. Alzheimer Mouse Gene Expression Information(Taqman probe)

Mm01344172_m1 (FAM)	ATCATGGCGTGGTGGAGGTCGACGC (APP, amyloid β (A4) precursor protein)
Mm00478664_m1 (FAM)	GCCCCCCACAGACGCTCAACATCCT (BACE1, β-site APP cleaving enzyme 1)
Mm00517133_m1 (FAM)	GCTTTGGCCAAGCCATCAAGCTCTC (BACE2, β-site APP-cleaving enzyme 2)

4) CmTP-C_{1-10} 추출물의 Aβ 생산 억제 효과 분석

배양이 종료된 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 Aβ 생성량을 ELISA로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) BACE 활성 억제 스크리닝을 통한 CmTP-C_{1-10}의 BACE 활성 억제 효능 효과 분석

CmTP-C_{1-10} 추출물의 BACE 활성 억제 효능 측정 실험은 사람 BACE 억제제 스크리닝법을 이용하였다. 사람 재조합 BACE는 영하 80℃에서 보관하였으며, 측정 시 최종농도 5 μM를 사용하였다. 聰明湯 조합추출물은 실험직전 99.9%의 DMSO에 녹여 완충용액으로 농도별로 희석하여 사용 하였으며, 형광물질로 5 μM의 Swedish mutant APP

peptide(EVNLDAEF), fluorophore(EDANS) 그리고 nonfluorescwnt chromophore(Dabcyl)를 사용하였다. 반응과정은 아래와 같다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Piptting Summary

Well	Assay buffer	DMSO	CmT-C	BACE	Substrate
Background	95.0 ㎕	2.5 ㎕	-	-	2.5 ㎕
100% initial activity	92.5 ㎕	2.5 ㎕	-	2.5 ㎕	2.5 ㎕
Sample group	92.5 ㎕	-	2.5 ㎕	2.5 ㎕	2.5 ㎕

각각의 96 well에 최종 양을 100 ㎕로 하여, 실온에서 25℃에서 40분간 방치한 후 형광 분광 분석기로 측정하였다. 동일한 실험을 3회 이상 반복하였다. 형광 분광분석기로 Ex=345 ㎚(slit width=5 ㎚), Em=510 ㎚(slit width=10 ㎚)에서 흡광도를 측정하였다. BACE 활성 억제 정도는 inhibition of activity(%) = [(100% initial activity의 average fluorescence(AF) - Sample group의 AF / 100% initial activity의 AF) x 100%] 방법으로 계산하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, independent t-test 분석방법을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. CmTP-C_{1-10} 추출물에 대한 APP와 BACE2 mRNA 유전자 발현 억제 효과

Fig. 1A와 B는 BV2 세포주에 LPS와 Aβ으로 자극한 실험대조군(Ratio APP mRNA/GAPDH)에 대한 CmTP-C_{1-10} 추출물(100 ㎍/㎖)을 처리한 실험군의 상대 억제율(%)을 나타낸 것이다. 비율을 각각 달리한 聰明湯 조합 추출물 CmTP-C_{1-10}을 BV2 세포주에 가하고 LPS와 Aβ로 자극하여 APP mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 대조군(control)에 비해 Aβ46 and Aβ40/42 생성 억제제인 MDL28170[19]를 처리한 양성대조군(MDL), CmTP-C_2, CmTP-C_7, CmTP-C_8, CmTP-C_9, CmTP-C_{10} 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군에서 유의성 있는 APP mRNA 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1A). 또한 BACE2 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 대조군(control)에 비해 양성대조군(MDL)과 모든 실험군에서 유의성 있는 BACE2 mRNA 발현 억제 효과를 나타냈다(Fig. 1B).

3. CmTP-C_{1-10} 추출물에 대한 Aβ 생산 억제 효과

Fig. 2는 BV2 세포주에 LPS와 Aβ으로 자극한 실험대조군(control)에 대한 CmTP-C_{1-10} 추출물(100 ㎍/㎖)을 처리한 실험군의 Aβ 생산 억제율(%)을 나타낸 것이다. 비율을 각각 달리한 聰明湯 조합 추출물 CmTP-C_{1-10}을 BV2 세포주에 가하고 LPS와 Aβ로 자극하여 Aβ 생산 억제율(%)을 분석한 결과, 대조군(control)보다 양성대조군(MDL)과 CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군에서 유의한 Aβ 생산억제 효과를 나타냈다(Fig. 2).

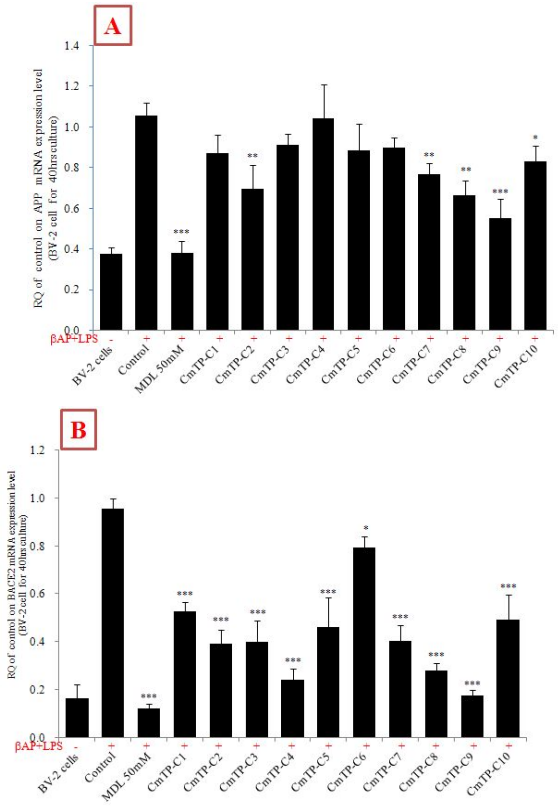


Fig. 1. Inhibitory effects of CmTP-C_{1-10} extract on APP and BACE2 mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cell line were treated with CmTP-C_{1-10} extract (100 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 10 ㎍/㎖) and Aβ fragment (25 μM), or 50 mM calpain protease inhibitor MDL 28170, LPS and Aβ fragment for 40 hrs. APP(A) and BACE2(B) mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent mean ± standard error.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$, compared with control.

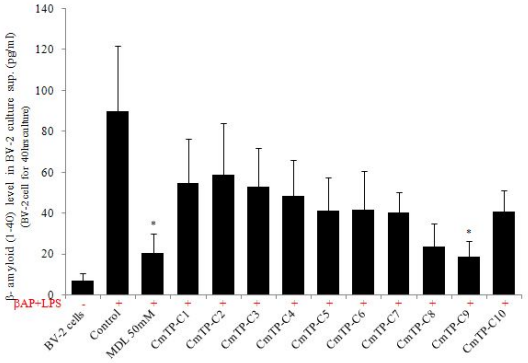


Fig. 2. Inhibitory effect of CmTP-C_{1-10} extract on Aβ production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cell line were treated with CmTP-C_{1-10} extract(100 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) and Aβ fragment (25 μM), or 50 mM calpain protease inhibitor MDL 28170, LPS and Aβ fragment for 40 hrs. Total β-amyloid protein levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data represent mean ± standard error.
* $p<0.05$, compared with control.

4. BACE 활성 억제 스크리닝을 통한 CmTP-C_{1-10}의 BACE 활성 억제 효과

사람 재조합 BACE에 CmTP-C_{1-10} 聰明湯 조합 추출물을 농도별(10, 25, 50 ㎍/㎖)로 처리하여 반응 시킨 후, 형광분광광도계를 사용하여 평균형광광도(average fluorescence; AF)를 대조군(control)에 비교하여 BACE 효소활성억제 정도(inhibition of activity(%))를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비하여 25 ㎍/㎖ 농도의 CmTP-C_6 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군을 제외한 모든 실험군에서 유의성 있는 BACE 효소활성 억제 효과를 나타냈다(Table V).

Table Ⅴ. Inhibition of Activity in Human Recombinant BACE by CmTP-C_{1-10} extract.

Group	Dosage (㎍/㎖)	average fluorescence(AF)	inhibition of activity(%)	Group	Dosage (㎍/㎖)	average fluorescence(AF)	inhibition of activity(%)
Background	-	130.7±0.72	-	Background	-	130.7±0.72	-
control (initial activity 100%)	-	1501.3±51.2	-	control (initial activity 100%)	-	1501.3±51.2	-
CmTP-C_1	10	954.7±22.6	36.4±1.85(***)	CmTP-C_6	10	1179.7±20.0	21.4±1.63(***)
	25	862.7±6.10	42.5±0.50(***)		25	1240±215.1	17.4±1.74
	50	845.3±13.5	43.7±1.10(***)		50	779.7±13.1	48.1±1.07(***)
CmTP-C_2	10	1099.3±18.0	26.8±1.47(***)	CmTP-C_7	10	1022.0±10.3	31.9±0.84(***)
	25	1025.0±14.7	31.7±1.20(***)		25	976.3±12.6	35.0±1.03(***)
	50	908.3±21.4	39.5±1.74(***)		50	784.3±22.9	47.8±1.87(***)
CmTP-C_3	10	804.7±1.40	46.4±0.11(***)	CmTP-C_8	10	956.3±8.7	36.3±0.71(***)
	25	995.7±11.8	33.7±0.96(***)		25	700.7±4.7	53.3±0.39(***)
	50	787.0±7.30	47.6±0.60(***)		50	667.0±21.5	55.6±1.75(***)
CmTP-C_4	10	865.0±24.4	42.4±1.99(***)	CmTP-C_9	10	1021.0±21.6	32.0±1.77(***)
	25	927.0±20.5	38.3±1.67(***)		25	730.3±11.3	51.4±0.92(***)
	50	805.0±10.9	46.4±0.89(***)		50	591.3±42.0	60.6±3.43(***)
CmTP-C_5	10	822.3±5.20	45.2±0.43(***)	CmTP-C_{10}	10	938.0±4.6	37.5±0.38(***)
	25	791.7±15.8	47.3±1.29(***)		25	952.3±8.6	36.6±0.71(***)
	50	758.0±17.1	49.5±1.40(***)		50	714.0±17.0	52.4±1.39(***)

Data represent mean ± standard error.
* p<0.05, ** p<0.01 *** p<0.001, compared with control.

Ⅳ. 고 찰

AD는 50세 이전에 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[20]. AD와 관련되어 나타나는 주요 병리학적 소견으로는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 신경반(neuritic plaque)이 있다[21]. 신경반은 APP로 알려진 큰 막단백질의 가수분해에 의해 생긴 4kDa Aβ peptide로 구성되어 있다[22]. 축적된 Aβ는 주변의 세포들에 염증반응을 일으킴으로써 신경세포가 손상되고 점점 뇌의 정상적인 기능을 유지하는 신경회로망을 훼손하게 된다[23].

APP가 β-secretase와 γ-secretase에 의해 분해되어 Aβ로 생성되는 과정에서 BACE는 APP를 분해하여 C-terminal fragment를 만드는 속도 결정단계 효소로 작용한다[24](Fig. 3).

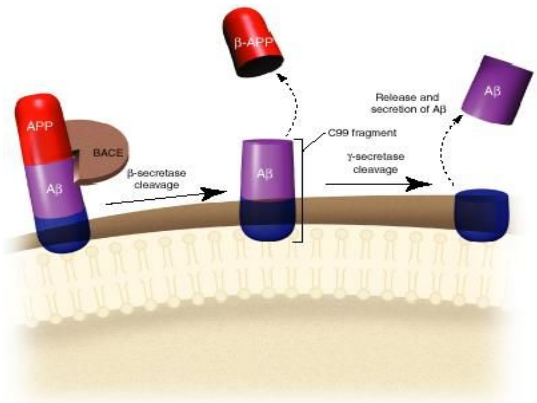


Fig. 3. Amyloid plaque production.
A β-secretase(BACE) cleaves the amyloid precursor protein(APP) and γ-secretase cleaves the membrane-bound C99 fragment to release Aβ from the membrane.

BACE의 기질은 오직 APP 하나임에 비해 γ-secretase는 Notch를 비롯한 여러 막통과 단백질의 processing에 관여한다. 따라서 APP processing을 억제하기 위해 γ-secretase 억제제를 이용하게 되면 다른 정상적인 기능에도 영향을 주므로 BACE를 Aβ의 생성을 억제하는 타겟 효소로 삼고 있으며[25], 최근 연구에서 BACE가 Aβ를 생성하는 첫 번째 단계로 치료제의 표적으로 대두되고 있다[26].

聰明湯은 『東醫寶鑑』[5]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술되어 있고, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다[6]. 최근 한의학계에서 聰明湯이 치매에 효과적인 치료제로 활용 될 수 있다는 연구[8~14] 및 聰明湯에 巴戟天, 山査肉 등을 加味한 방제가 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[8,9,13,14]가 진행되었다.

이에 본 실험에서는 종래의 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가미한 聰明湯加味方의 한약제제 개발을 위한 기초실험 연구로 약물의 다양한 조합비율 중, APP 유전자 발현, Aβ의 생산, BACE2 유전자 발현과 효소활성 억제 작용에 가장 우수한 조합과 조성비를 찾고자, 10 가지의 聰明湯 조합 추출물을 시료로 하여 BV2 세포주에서 APP mRNA와 BACE2 mRNA 유전자 발현 억제 효과를 살피고, 배양상층액에서 Aβ의 생성량 억제 효과를 분석하고, BACE 효소활성 억제 효과를 측정하였다.

CmTP-$C_{1\text{-}10}$을 BV2 세포주에 처리한 후 APP와 BACE2 mRNA 유전자 발현을 살펴본 결과, 대조군에 비하여 CmTP-C_2, CmTP-C_7, CmTP-C_8, CmTP-C_9, CmTP-C_{10} 聰明湯 조합 추출물을 첨가한 실험군에서 유의한 APP mRNA 유전자 발현 억제 효과를 나타냈다. 특히 CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물을 첨가한 실험군에서 가장 큰 억제 효과를 보였다(Fig. 1A). 또한 모든 실험군에서 BACE2 mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 유의하게 억제되었고, 특히 CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물을 처리한 실험군에서 가장 큰 억제 효과를 나타냈다(Fig. 1B). 이러한 결과로 聰明湯 조합 중 CmTP-C_9가 가장 크게 APP와 BACE2 mRNA 유전자 발현을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

배양 상층액에서 Aβ의 생성량 억제 효과를 분석한 결과, CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군에서 유의한 β-amyloid protein 생산 억제 효과를 나타냈다(Fig. 2).

BACE 효소활성 억제 효과를 살펴본 결과, 25 ㎍/㎖ 농도의 CmTP-C_6 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군을 제외한 모든 실험군에서 유의한 BACE 효소활성 억제 효과를 나타내었으며, 그 중 CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물을 가한 실험군에서 가장 두드러진 억제 효과를 보였다(Table Ⅴ).

이상의 실험 결과, APP mRNA와 BACE2 mRNA 유전자 발현, Aβ의 생성량, 그리고 BACE 효소활성에 가장 유의한 억제효능을 지닌 聰明湯 조합은 CmTP-C_9임을 알 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 CmTP-C_9 聰明湯 조합이 βA의 과다 생성과 BACE 효소활성을 억제하는 효과가 있었다.

Ⅴ. 결 론

BV2 세포주에 다양한 조합의 聰明湯加味方인 CmTP-$C_{1\text{-}10}$의 추출물을 가하고 LPS와 Aβ 처리하여 APP, BACE의 유전자 발현과 효소활성, Aβ의 생산에 대해 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물은 APP mRNA와 BACE2 mRNA 유전자 발현을 가장 크게 억제하였다.
2. CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물은 Aβ의 생산을 유의하게 억제하였다.
3. CmTP-C_9 聰明湯 조합 추출물은 가장 두드러지게 BACE 효소활성을 억제하였다.

이상의 결과로 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가한 조합 추출물 중 CmTP-C_9이 BACE 효소활성과 βA의 과다 생성을 억제하는 효과가 있었으며, 정확한 기전, 동물 실험 연구 및 임상적 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호:B090020).

참고문헌

1. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature. 1999; 402:537-40.
2. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1994; 53:438-47.
3. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science. 1999;286:735-41.
4. Roberds SL, Anderson J, Basi G, Michael J, Bienkowski MJ, Branstetter DG, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain : implications for Alzheimer's disease therapeutics. Hum. mol. genet. 2001;10:1317-24.
5. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6.
6. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990: 151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
7. 김영욱, 송태원, 오민석. 총명탕이 건망유도백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1998;8(2):464-79.
8. 하수영, 정인철, 이상룡. 총명탕과 산사총명탕이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):59-78.
9. 임정화, 정인철, 이상룡. 총명탕과 파극천총명탕 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력. 감퇴 병태모델에 미치는 영향, 동의생리병리학회지. 2006;20(4):997-1008.
10. 임정화, 이상룡. 팔미합총명탕 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2008;19(2):95-110.
11. 김현주, 이상룡. 가미보양환오탕과 팔미합총명탕의 microglia 보호, 항산화 및 acetylcholinesterase 억제 효과. 동의신경정신과학회지. 2008;19(2) :65-75.
12. 이승희, 정인철, 이상룡. 歸脾聰明湯 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):921-33.

13. 정인철, 이상룡. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수 추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(2):1200-10.
14. 서승호, 정인철, 이상룡. 聰明湯和山査聰明湯熱水提取物, 超微細粉末劑形的小膠質細胞及記憶力減退 病態模型的影響. 제5회 국제중의약학술연토회의논문집. 2006;325-7.
15. 김현수, 정인철, 이상룡. 파극천이 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):45-58.
16. 채종걸, 정인철, 이상룡. 산사육이 CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(1):79-115.
17. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J. Neuroimmunol. 1990;27(2-3):229-37.
18. Witney AA, Doolan DL, Anthony RM, Weiss WR, Hoffman SL, Carucci DJ. Determining liver stage parasite burden by real time quantitative PCR as a method for evaluating pre-erythrocytic malaria vaccine efficacy. Mol. Biochem. Parasitol. 2001;118(2):233-45.
19. Yunzhou Dong, Jianxin Tan, Mei-Zhen Cui, Guojun Zhao, Guozhang Mao, Neena Singh and Xuemin Xu. Calpain inhibitor MDL28170 modulates Aß formation by inhibiting the formation of intermediate Aß46 and protecting Aß from degradation. The FASEB Journal. 2006;20:331-3.
20. Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, et al. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer' disease. Nature. 2000;408:975-9.
21. Citron M, Diehl TS, Gordon G, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:13170-5.
22. John V, Beck JP, Bienkowski MJ, Sinha S, Heinrikson RL. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. J. Med. Chem. 2003;46(22):4625-30.
23. Je JY, Kim SK. Water-soluble chitosan derivatives as a BACE1 inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005;13:6551-5.
24. Stachel SJ, Coburn CA, Steele TG, Jones KG, Loutzenhiser EF, Gregro AR, Rajapakse HA, Lai MT, Crouthamel MC, Xu M, Tugusheva K, Lineberger JE, Pietrak BL, Espeseth AS, Shi XP, Chen-Dodson E, Holloway MK, Munshi S, Simon AJ, Kuo L, Vacca JP. Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase(BACE-1). J. Med. Chem. 2004;47(26):6447-50.
25. Wolfe MS. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. Nature Reviews Drug Discovery. 2002;1:859-66.
26. Christensen MA, Zhou W, Qing H, Lehman A, Philipesn S, Song W. Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. Mol Cell Biol. 2004;24:865-74.