

## 益精地黃湯이 痴呆病態모델에 미치는 影響

大田大學校 韓醫科大學 神經精神科學教室

崔秉晚 · 李相龍

### I. 緒 論

痴呆현상은 연령과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있는데<sup>1)</sup>, 우리 나라의 전인구 중에서 65세 이상의 노인들이 차지하는 비율은 1990년에는 5.1%였고, 2000년에는 7.1%, 2010년에는 10.0%, 2020년에는 13.2%에 이를 것으로 推算된다. 이에 따라 노화로 인한 질환, 이 중에서도 특히 痴呆로 인한 경제, 의료, 복지, 정신건강 등 사회적 문제가 크게 대두될 것이다<sup>1,2)</sup>.

痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 退行性 變化, 腦血管障礙, 腦의 炎症性障礙, 代謝性疾患, 內分泌疾患, 外傷, 中毒 등<sup>2,4,5)</sup>이며, 이 중 腦의 退行性 變化에 의한 Alzheimer型 痴呆와 腦硬塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混存된 混合型 痴呆가 많은 比率을 차지하고 있다<sup>6,7)</sup>. Alzheimer's Disease(AD)의 유발요인은 베타-아밀로이드 단백질(A $\beta$ )의 침적에 의해 생기는 신경병의 신경독성으로 신경세포사가 일어나는 것, 과산화탄화 타우 단백질의 침적에 의한 신경섬유다발의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것<sup>8,9,10)</sup>, 그리고 presenilin 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 presenilin 대사가 Amyloid Precursor Protein(APP)의 형성을 촉진하는 것이 대표적이다<sup>11)</sup>.

韓醫學에서 "痴呆"라는 用語는 明代 張<sup>12)</sup>의 《景岳全書·癡狂癡呆》에 처음으로 記載되어 있고, 呆病 健忘 등이 이와 類似한 概念이다<sup>13-18)</sup>. 痴呆의 原因은 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足으로 크게 나누어 볼 수 있고<sup>12,14,19-21)</sup>, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 使用되고 있다<sup>12,14,19-21)</sup>.

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 研究가 다양하게 진행

되고 있는데 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구<sup>9,22-27)</sup>, 腦의 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究<sup>25-32)</sup>, 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 影響에 대한 研究<sup>35-43)</sup>가 이루어지고 있으나 益精地黃湯이 白鼠의 行動과 生化學的 變化에 關聯된 研究는 아직 接하지 못하였다.

益精地黃湯은 臨床적으로 腎水不足으로 誘發된 症狀에 應用되는 六味地黃湯<sup>44)</sup>에 肝腎二經을 峻補하는 要藥인 鹿茸<sup>45)</sup>, 脾肺氣虛를 補하여 모든 氣虛와 心神不安의 증을 治療하는 人參<sup>45)</sup>, 그리고 腎精의 不足으로 인한 증에 使用하는 枸杞子, 五味子, 覆盆子, 兔絲子, 車前子<sup>45)</sup>를 加味한 處方이다.

이에 著者는 益精地黃湯의 효과를 알아보고자, mLFC와 PC-12 cell을 分離하여 細胞毒性을 測定하였고, AChE, NOs II의 유전자 발현 및 AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 觀察하였으며 scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 測定하였고, Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)을 통해 行動의 變化를 觀察한 結果 有意한 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

### II. 材料 및 方法

#### 1. 材料

##### 1) 動物

350~400g 30週齡 Sprague Dawley(SD)系 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 供給받아 使用하였고, 30g 6週齡의

International Cancer Research(ICR)系 생쥐와 20g 4週齡의 BALB/c를 韓國化學研究所에서 供給받아 使用하였다. 動物은 實驗室 環境(溫度 23±2°C, 相對濕度 50±10%, 照明時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300 Lux)에 2週日間 適應시켜 體重變化가 一定하고 健康한 動物만을 選別하여 實驗에 使用하였다. 飼料는 固形飼料(粗蛋白質 22.1% 이상, 粗脂肪 8.0% 이하, 粗纖維 5.0% 이하, 粗灰分 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사 Co.)를, 食水는 精製水를 자유로이 攝取케 하였다.

2) 藥材

益精地黃湯은 臨床적으로 腎水不足으로 誘發된 症狀에 應用되는 六味地黃湯<sup>44)</sup>에 鹿茸, 人蔘, 枸杞子, 五味子, 覆盆子, 兔絲子, 車前子<sup>45)</sup>를 加味한 處方으로 大田大學校韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며 處方內容과 1貼의 分量은 다음과 같다.

Prescription of YkJungJiHwangTang(YJJHT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	16.0
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8.0
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	8.0
白茯苓	<i>Poria</i>	6.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6.0
鹿茸	<i>Cervi Pantotrichum Cornu</i>	4.0
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
覆盆子	<i>Rubi Fructus</i>	4.0
兔絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	4.0
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	4.0
Total amount		78.0

3) 檢液의 調製

益精地黃湯 3貼 分量 234g을 깨끗이 씻어 3,000 ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml를 添加하였다. 3時間 加熱 抽出하고 濾過紙를 利用하여 沈澱物을 3回 濾別한 후, 이 濾過液을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland)에서 減壓 濃縮하였다. 이 濃縮液을 -84°C deep freezer(Sanyo Co., Japan)에서 4時間 동안 放置하고 24時間 동안 freeze dryer(Eyela Co., Japan)로 凍結乾燥하여 10g의 粉末을 얻어서 實驗에 必要한 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

4) 試藥 및 機器

試藥 중 Cholinesterase kit, scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), DL-dithiothreitol (DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody (Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1 (Oncogen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2 (Oncogen U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab (Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

器機는 원심분리기(한일과학, Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator(녹십자, Korea), Minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Swissland),

Bio-freezer(Sanyo, Japan), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama Co., Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), roller mixer(Gowon Scientific Technology Co., Korea), vortex(비전과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ELISA Leader(molecular devices, U.S.A.), Videotrack (Viewpoint, France) 등을 使用하였다.

## 2. 方法

### 1) PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

(1) Mouth lung fibroblast cells(mLFC)와 pheochromocytoma cell line(PC-12 cell)의 배양

mLFC는 다음과 같이 만들었다. BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm으로 5분간 원심 분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm으로 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 105cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 培養器에서 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 그리고 10 $\mu$ g/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

### (2) 細胞毒性 측정

細胞毒性 측정방법은 SRB assay법<sup>46)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 2.0 × 10<sup>4</sup>개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 益精地黃湯 추출물(최종 농도 400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml)을 72시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을

버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 $\mu$ 를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 $\mu$ /well로 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA Leader에서 540nm로 흡광도를 측정하였다.

### 2) PC-12 cell의 APP, PS-1, PS-2, AChE 측정

(1) AChE, NOs II mRNA 발현 측정

#### ① mRNA 추출

PC-12 cell은 24 wells plate에 1 × 10<sup>6</sup> 세포로 각 well에 분주하고, 益精地黃湯 추출물(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)을 처리하고 1시간 후 PMA와 rIL-1 $\beta$  (100ng/ml)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 상층액을 회수한 후 RNAzolB를 이용하여 PC-12 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 mRNA는 diethyl pyrocarbonate를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

#### ② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total mRNA 3 $\mu$ g을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 $\mu$ l), RNA inhibitor로써 1 $\mu$ l RNase inhibitor(20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100 mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 × RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

### ③ cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system 을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 $\mu$ l의 cDNA 를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOs II 와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer(20pmole/ $\mu$ l)를 혼합하여 1 $\mu$ l를 가하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu$ l Taq. polymerase(5U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu$ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95 $^{\circ}$ C, 5분), denaturation(95 $^{\circ}$ C), annealing(55 $^{\circ}$ C, 1분), elongation(72 $^{\circ}$ C, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products 는 20 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

#### ② rat AChE

sense oligonucleotide : 5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisense oligonucleotide : 5'-GTACAGGTCTGAGCATCT-3'

#### ⑤ rat NOs II

sense oligonucleotide : 5'-TCCRAATCTggAACAgCCAgCTgg-3'

antisense oligonucleotide

: 5'-gYTCCATgCAGACAgCCACATCCTC-3'

#### ⑥ rat G3PDH

sense oligonucleotide, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisense oligonucleotide, 5'-TCCACCACCTGTGTGCTGTA-3'

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

#### (2) AChE activity 측정 및 Western blot 분석

##### ① 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 益精地黄湯 추출물(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)과 PMA, rIL-1 $\beta$ 를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 益精地黄湯 추출물(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)과 PMA를 동시 배양한 후 3회 D-PBS로 세포를 수세한 후 세포성 lysate를 얻어 Western

blot에 사용하였다.

세포성 lysate를 얻기 위하여 50 $\mu$ l의 lysis 완충용액 (Tris-HCl (200mM: pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 $\mu$ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법<sup>17)</sup>으로 단백질을 정량하였다.

##### ② AChE activity 측정

세포성 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml과 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가 하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 배양시킨 후 ELISA Leader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### ③ APP, PS-1, PS-2의 Western blot 분석

세포 lysate(50 $\mu$ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후, anti-human APP N-terminal antibody, anti-human presenilin-1, 그리고 anti-human presenilin-2을 각각 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab과 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

#### 3) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠모델의 혈액분석

##### (1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

30週齡 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, tacrine(10mg/kg)을 투여한 양성대조군, 益精地黄湯(250mg/kg)을 투여한 실험군으로 하여 각각 scopolamine(1mg/kg)을 7일간 1일 1회 복강 주사하였다.

##### (2) WBC, RBC, PLT의 變化 측정

약물투여 10일 후 SD계 白鼠에서 직접 심장채혈법으로 10ml의 혈액을 포집하였다. 그 중 2ml는 CBC bottle에 넣어 백혈구수, 적혈구수, 혈소판수의 함량을 계산하였고, 계산은 Fonic법에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

(3) Glucose, uric acid의 측정

혈청내 glucose, uric acid의 량은 자동생화학분석기 (Ciba Coring., U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

(4) AChE activity 測定

AChE activity 측정을 위하여 test tube와 blank tube를 labeling하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2ml과 serum 0.2ml을 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution(cat. No.420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 이후 시간을 정확히 기록하여 25°C water bath에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA Leader로 420nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 바탕으로  $\Delta A = ABLANK - ATEST$  공식에 의해 검장선에서 활성도를 측정하였다.

4) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 Morris water maze 실험

(1) ICR계 생쥐의 반복 학습 및 약물 투여

ICR계 생쥐를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28°C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 아무런 처치가 없는 대조군, tacrine(10mg/kg)을 투여한 양성대조군, 益精地黃湯(250mg/kg)을 투여한 실험군으로 분류하였고 계속 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine (1mg/kg)을 복강에 처리한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)으로 행동을 측정하였고 그 결과를 Videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법<sup>18)</sup>을 이용하였다.

Ⅲ. 成 績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 細胞毒性

mLFC의 생존율은 대조군이 100±4.4(%), 실험군의 100µg/ml이하에서 각각 88±3.7, 93±3.1, 97±4.3, 99±5.2(%)로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±3.5(%), 실험군의 100µg/ml이하에서 각각 86±3.2, 89±4.0, 98±2.8, 101±4.9(%)로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았다(Table I, Fig. 1).

Table I. Cytotoxicity of YJJHT Extract on mLFC and PC-12 Cell

Group	Concentration (µg/ml)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell
Control	0	100±4.4 <sup>a)</sup>	100±3.5
	1	99±5.2	101±4.9
	10	97±4.3	98±2.8
	50	93±3.1	89±4.0
	100	88±3.7	86±3.2
	200	77±4.5	76±4.0
YJJHT	400	71±3.4	67±3.8

a) : Mean ± Standard error(N=6).

Control : Non-treatment group.

YJJHT : Group pretreated with various concentration(1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml) of YJJHT extract for 72hrs.

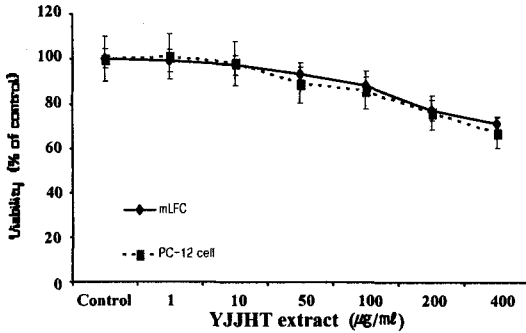


Fig. 1. Cytotoxicity of YJJHT extract on mLFC and PC-12 cells.

Control : Non-treatment group.

YJJHT : Group pretreated with various concentration (1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml) of YJJHT extract for 72hrs.

\* : Statistically significant value compared with control group data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

## 2. PC 12 cell의 APP, PS-1, PS-2, AChE에 대한 영향

### 1) AChE, NOSII mRNA의 발현

AChE mRNA의 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 58(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 µg/ml의 실험군은 각각 18, 55(Ht)로 나타났다(Table II, Fig. 2).

NOSII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)으로 나타났고 대조군은 170(Ht)으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 실험군은 각각 69, 121(Ht)로 나타났다 (Table II, Fig. 3).

Table II. Inhibitory Effects of YJJHT Extract on AChE, NOSII mRNA Expression in PC-12 Cells Cultures after Treatment with PMA and rIL-1β

Drugs	rIL-1β & PMA (ng/ml)	mRNA Expression (Ht)		
		G3PDH	AChE	NOS II
Normal	0	223	25	56
Control	100	224	58	170
YJJ 100	100	225	18	69
HT 10	100	224	55	121

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1β (100ng/ml).

YJJHT : Group pretreated with various concentration (10µg/ml, 100µg/ml) of YJJHT extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration of YJJHT extract in the presence or absence rIL-1β and PMA (100ng/ml) for 6hrs (IL-1β & NOSII mRNA) or 24hrs (AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used for 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

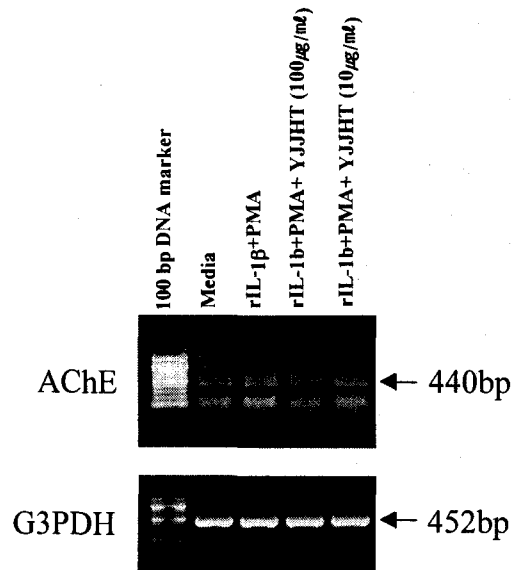


Fig. 2. Inhibitory effects of YJJHT extract on AChE mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and rIL-1β.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1β (100ng/ml).

YJJHT : Group pretreated with various concentration (10µg/ml, 100µg/ml) of YJJHT extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration of YJJHT extract in the presence or absence rIL-1β and PMA (100ng/ml) for 6hrs (IL-1β & NOSII mRNA) or 24hrs (AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and

Methods.

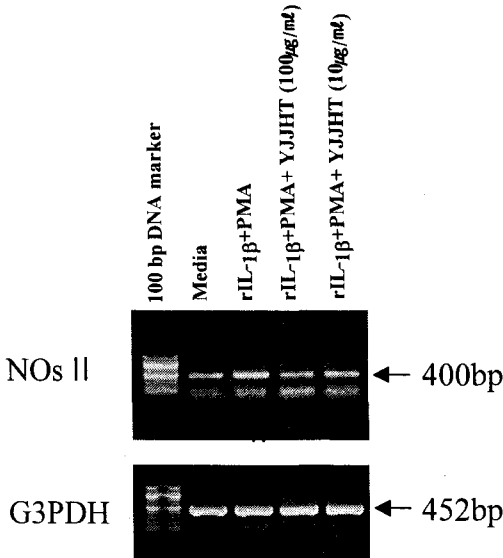


Fig. 3. Inhibitory effects of YJJHT extract on NOsII mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and rIL-1 $\beta$ .

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1 $\beta$  (100ng/ml).

YJJHT : Group pretreated with various concentration(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml) of YJJHT extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration of YJJHT extract in the presence or absence rIL-1 $\beta$  and PMA(100ng/ml) for 6hrs(IL-1 $\beta$  & NOsII mRNA) or 24hrs(AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

2) AChE activity 억제

정상군의 AChE activity는 43 $\pm$ 3.3(%), 대조군은 100 $\pm$ 4.6(%), 100, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 65 $\pm$ 3.5(%), 87 $\pm$ 5.2(%로 나타났다(Table III, Fig. 4).

Table III. Inhibitory Effect of YJJHT Extract on the AChE Activity in PMA and rIL-1 $\beta$  Stimulated PC-12 cells

Drugs	rIL-1 $\beta$ & PMA	Dose ( $\mu$ g/ml)	AChE activity (% of control)
Normal	0	0	43 $\pm$ 3.3 <sup>a)</sup>
Control	100	0	100 $\pm$ 4.6
YJJHT	100	100	65 $\pm$ 3.5 <sup>***</sup>
	10	10	87 $\pm$ 5.2 <sup>**</sup>

a) : Mean  $\pm$  Standard error.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1 $\beta$  (100ng/ml).

YJJHT : Group pretreated with various concentration(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml) of YJJHT extract for 24hrs.

\* : Statistically significant value compared with scopolamine control group data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

PC-12 cells were pretreated with various concentration of YJJHT extract in the presence or absence of rIL-1 $\beta$  (100ng/ml) and PMA(100ng/ml) for 24hrs. The lysate were measured using AChE diagnostic kits(Sigma). Other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

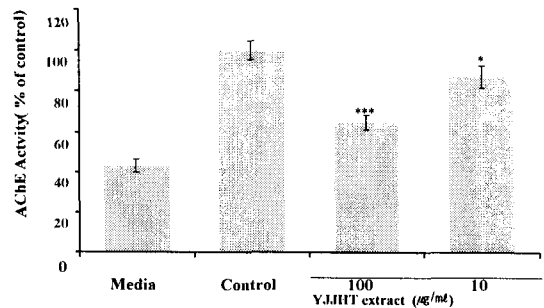


Fig. 4. Inhibitory effect of YJJHT extract on the AChE activity in PMA and rIL-1 $\beta$  stimulated PC-12 cells.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1 $\beta$  (100ng/ml).

YJJHT : Group pretreated with various concentration(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml) of YJJHT extract for 24hrs.

\* : Statistically significant value compared with scopolamine control group data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\*p<0.001).

PC-12 cells were pretreated with various concentration of YJJHT extract in the presence or absence of rIL-1 $\beta$  (100ng/ml) and PMA(100ng/ml) for 24hrs. The lysate were measured using AChE diagnostic kits(Sigma). The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

### 3) APP 발현

APP는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 5).

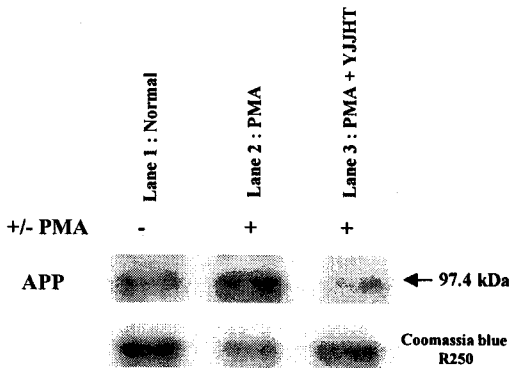


Fig. 5. Suppression effects of YJJHT on APP in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment.  
Lane 2 : PMA(100ng/ml).  
Lane 3 : PMA(100ng/ml) + YJJHT(100 $\mu$ g/ml).

PC-12 cells were pretreated without or with YJJHT(100  $\mu$ g/ml) extract in the presence or absence PMA(100ng/ml). APP expression was measured by immune Western blot assay.

The increase in immunoreactivity of the APP-specific antibody in the presence of PMA was inhibited by YJJHT and internal control Coomassia blue R250 staining.

### 4) PS-1, PS-2 발현

PS-1과 PS-2는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 발현이 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 6).

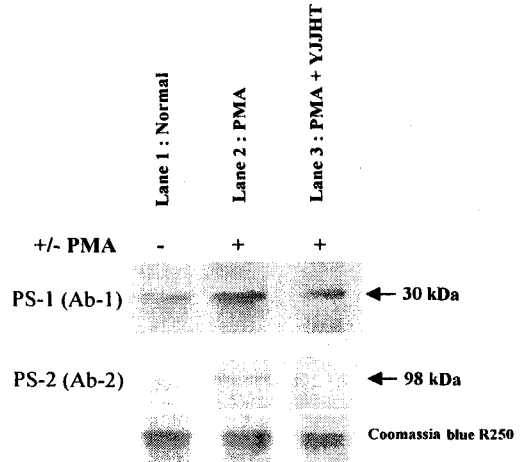


Fig. 6. Suppression effects of YJJHT on PS-1(Ab-1) and PS-2(Ab-2) secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment.  
Lane 2 : PMA(100ng/ml).  
Lane 3 : PMA(100ng/ml) + YJJHT(100 $\mu$ g/ml).

Representive Western blot of PS-1 and PS-2 secretion released in 12hrs. The increase in immunoreactivity of the PS-1-specific antibody in the presence of PMA was inhibited by YJJHT and internal control Coomassia blue R250 staining.

## 3. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠모델의 혈액에 대한 영향

### 1) WBC, RBC, PLT에 미치는 영향

WBC는 정상군이  $11.8 \pm 0.6 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $11.0 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은  $11.6 \pm 0.5$ ,  $8.9 \pm 0.7 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 으로 나타났다. RBC는 정상군이  $8.2 \pm 0.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $8.8 \pm 0.4 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은 각각  $8.2 \pm 0.2$ ,  $8.1 \pm 0.5 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다. PLT는 정상군이  $771 \pm 13.0 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $984 \pm 47.8 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은  $955 \pm 75.9$ ,  $825 \pm 23.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다(Table IV).



Table IV. Effects of YJJHT on the Blood Cells of Scopolamine-induced Memory Deficit Rats.

Group	Normal	Control	Tacrine	YJJHT
WBC ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	11.8 $\pm$ 0.6 <sup>a)</sup>	11.0 $\pm$ 0.5	11.6 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 0.7 <sup>*</sup>
RBC ( $\times 10^3/\text{ml}$ )	8.2 $\pm$ 0.1	8.8 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.5
PLT ( $\times 10^3/\text{ml}$ )	771 $\pm$ 13.0	984 $\pm$ 47.8	955 $\pm$ 75.9	825 $\pm$ 23.9 <sup>**</sup>

a) : Mean  $\pm$  Standard error(N=5).  
 Normal : Non-treatment group.  
 Control : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).  
 Tacrine : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and tacrine(10mg/kg p.o).  
 YJJHT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and YJJHT extract(250mg/kg p.o).  
 \* : Statistically significant value compared with control data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

SD rats were orally administered of YJJHT or Tacrine · HCl and injected scopolamine(1mg/kg) once a day for 7 days. Hematology change was analyzed for hematology change as described in Material and Methods.

2) Glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 영향

Glucose는 정상군이 110.5 $\pm$ 7.9(mg/dl), 대조군이 100.5 $\pm$ 8.6(mg/dl)으로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 138.7 $\pm$ 6.2, 141.0 $\pm$ 5.8(mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 상승을 보여주었다.

Uric acid는 정상군이 1.67 $\pm$ 0.22(mg/dl), 대조군이 2.29 $\pm$ 0.13(mg/dl)으로 나타났고 양성대조군과 실험군은 1.31 $\pm$ 0.09, 1.92 $\pm$ 0.15(mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타냈다.

AChE activity는 정상군이 16.4 $\pm$ 1.3(U/ml), 대조군이 35.3 $\pm$ 1.5(U/ml)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 21.2 $\pm$ 0.7, 24.1 $\pm$ 3.7(U/ml)로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다(Table V).

Table V. Effects of YJJHT on the Serum Level of Memory Deficit Rats induced by Scopolamine

Group	Normal	Control	Tacrine	YJJHT
Glucose (mg/dl)	110.5 $\pm$ 7.9 <sup>a)</sup>	100.5 $\pm$ 8.6	138.7 $\pm$ 6.2 <sup>**</sup>	141.0 $\pm$ 5.8 <sup>***</sup>
Uric acid (mg/dl)	1.67 $\pm$ 0.22	2.29 $\pm$ 0.13	1.31 $\pm$ 0.09 <sup>***</sup>	1.92 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>
AChE (U/ml)	16.4 $\pm$ 1.3	35.3 $\pm$ 1.5	21.2 $\pm$ 0.7 <sup>***</sup>	24.1 $\pm$ 3.7 <sup>**</sup>

a) : Mean  $\pm$  Standard error(N=5).  
 Normal : Non-treatment group.  
 Control : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).  
 Tacrine : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and tacrine(10mg/kg p.o).  
 YJJHT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and YJJHT extract(250mg/kg p.o).  
 \* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

SD rats were orally administered of YJJHT or Tacrine · HCl and the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days. Hematology change was analyzed for serum level as described in Material and Methods.

4. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력감퇴 억제 효과

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이 11.2 $\pm$ 3.4(sec), 대조군이 80.6 $\pm$ 3.9(sec)로 나타났고, 양성대조군은 15.2 $\pm$ 4.0(sec), 실험군은 8.5 $\pm$ 4.2(sec)로 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다. 적은 운동량(small movement : smldist)은 정상군이 182 $\pm$ 25.2(cm), 대조군이 1540 $\pm$ 187(cm)로 나타났고, 양성대조군은 243 $\pm$ 42.4(cm), 실험군은 390 $\pm$ 62.9(cm)로 유의성 있는 감소를 보였으며, 많은 운동량(large movement : lardist)은 정상군이 71 $\pm$ 22.7(cm), 대조군이 751 $\pm$ 79.2(cm)로 나타났고, 양성대조군은 117 $\pm$ 42.1(cm), 실험군은 179 $\pm$ 26.3(cm)으로 유의성 있는 감소를 보였다(Table VI, Fig. 7, 8).

Table VI. Effects of YJJHT on the Scopolamine-induced Impairment of Memory in the Morris Water Maze Test

Result captions	Normal	Control	Tacrine	YJJHT
Stop-through latency(sec)	11.2±3.4 <sup>a)</sup>	80.6±3.9	15.2±4.0 <sup>***</sup>	23.6±3.8 <sup>***</sup>
Smlldist(cm)	182±25.2	1540±187	243±42.4 <sup>***</sup>	390±62.9 <sup>***</sup>
Lardist(cm)	71±22.7	751±79.2	117±42.1 <sup>***</sup>	179±26.3 <sup>***</sup>

a) : Mean ± Standard error(N=20).

Normal : Pretreated group.

Control : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).

Tacrine : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and tacrine(10mg/kg p.o).

YJJHT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and YJJHT extract(250mg/kg p.o).

Stop-through latency : each time the animal moves from entry to platform.

Lardist : the total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : the total distance covered by the animal in small movement.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

ICR mice were orally administered of YJJHT or Tacrine · HCl and the acquisition training trial was continued once a day for 14 days. The videotracking was initiated at 30 min after the injection of scopolamine(1mg/kg) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial.

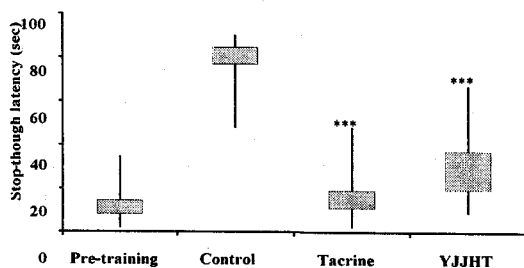


Fig. 7. Effects of YJJHT on the scopolamine-induced impairment of memory in the stop-through type Morris water maze test.

Normal : Pretreated group.

Control : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).

Tacrine : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and tacrine(10mg/kg p.o).

YJJHT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and YJJHT extract(250mg/kg p.o).

Stop-through latency : each time the animal moves from entry to platform.

Lardist : the total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : the total distance covered by the animal in small movement.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

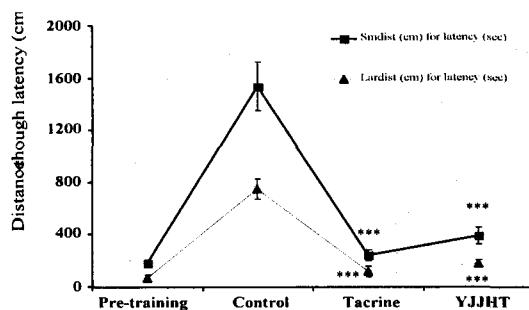


Fig. 8. Effects of YJJHT on the scopolamine-induced impairment of memory in the distance movement-through type Morris water maze test.

Normal : Pretreated group.

Control : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).

Tacrine : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and tacrine(10mg/kg p.o).

YJJHT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and YJJHT extract(250mg/kg p.o).

Stop-through latency : each time the animal moves from entry to platform.

Lardist : the total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : the total distance covered by the animal in small movement.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

#### IV. 考 察

痴呆현상은 연령과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있는데<sup>1)</sup> 우리 국민의 평균 수명은 1990년에 71.3세였고, 2000년에는 74.3세로 증가할 것으로 전망되며, 전인구 중에서 65세 이상의 노인들이 차지하는 비율은 1990년에는

5.0%였고, 2000년에는 6.8%에 이를 것으로 推算된다. 이에 따라 노화로 인한 질환, 이 중에서도 특히 痴呆로 인한 경제, 의료, 복지, 정신건강 등 사회적 문제가 크게 대두될 것이다<sup>12)</sup>.

痴呆는 韓醫學으로 “痴呆<sup>12)</sup>”, “呆病<sup>13,14)</sup>”, “健忘<sup>15-18)</sup>” 등의 範疇에 속하며, 痴呆에 대한 最初의 韓醫學的 記載는 明代 張<sup>12)</sup>의 《景岳全書·癡狂痴呆》중에 “痴呆症, …… 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常……”이다.

清代의 陳<sup>13,14)</sup> 등은 現代醫學의 痴呆의 概念과 類似한 概念으로 “呆病”에 대해 詳細히 敘述하고 있다. 또한 黃帝內經<sup>15,16)</sup>을 비롯하여 많은 歷代醫書<sup>17,18)</sup>에서도 “痴呆”나 “呆病”의 名稱은 없으나 “健忘” 등의 言及에서 類似한 症狀을 제시하고 있다.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠<sup>12,14,19-21)</sup> 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다<sup>12,14,19-21)</sup>. 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다<sup>12,14,19-21)</sup>.

益精地黃湯은 臨床적으로 腎水不足으로 誘發된 症狀에 應用되는 六味地黃湯<sup>41)</sup>에 肝腎二經을 峻補하는 要藥인 鹿茸<sup>45)</sup>, 脾肺氣虛를 補하여 모든 氣虛와 心神不安의 증을 治療하는 人蔘<sup>45)</sup>, 그리고 腎精의 不足으로 인한 증에 使用하는 枸杞子, 五味子, 覆盆子, 兔絲子, 車前子<sup>45)</sup>를 加味한 處方이다.

益精地黃湯의 個別 加味 藥劑에 대한 本草學的 效能을 살펴보면 다음과 같다<sup>45)</sup>.

鹿茸은 肝腎二經을 峻補하는 要藥이 되니 腎臟은 精을 藏하고 骨을 主管하여 腎陽을 强壯케 하고 精血을 補益하며 筋骨을 强하게 하는 良藥이 되며, 人蔘은 脾肺二經에 들어가 脾肺를 補하는 要藥이 되니 모든 氣虛의 證과 脾胃氣虛, 肺氣不足, 心神不安 등 證에 모두 良好한 效能이 있으며, 枸杞子는 肝腎二經에 들어가 腎을 補하여 生精하고, 또한 肝血을 養하여 明目하므로 肝腎을 補益하는 要藥이 되고, 五味子는 肺心腎에 들어가 上으로는 肺

氣를 斂하고, 下로는 또한 腎陰을 滋하며 아울러 滋精止瀉, 生津, 止汗 等の 作用을 가지고 있으며, 覆盆子は 肝腎膀胱經에 들어가며 腎陽을 補하면서 傷陰시키는 效가 없으며, 腎虛로 因한 下焦不固의 證을 治療하는 良藥이 되고, 兔絲子は 肝腎을 平補시키는 良藥이 되며 腎虛로 因한 陽痿와 遺精頻尿 및 肝腎不足으로 因한 兩目昏糊와 脾腎陽虛로 因한 便泄 등 證을 治療하고, 車前子は 性味가 甘寒滑利하고 性이 오로지 降泄하므로 濕熱의 邪氣를 小便을 따라 排出케 함으로써 溫熱이 內蘊되어 나타나는 증을 治療하니 痴呆治療에 活用될 수 있을 것으로 생각되어 본 실험을 실시하였다.

AD는 여러가지 原因에 의해서 유발되는데, A $\beta$ , 에스트로젠, 아포리포단백질 E(ApoE), presenilin, 산화제(oxidants : hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 關여하는 것으로 알려져 있다<sup>51-52)</sup>. 이 중 A $\beta$ 의 침적으로 생기는 SPs의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우 단백질의 침적에 의한 신경섬유다발(NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이다<sup>8-10)</sup>.

AD에 나타나는 병리학적 소견인 NFTs와 신경반은 A $\beta$ 의 침착에 의하여 생겨나는데<sup>26)</sup>, A $\beta$ 은 APP의 비정상적인 공정과정으로 생성된다<sup>22-24)</sup>.  $\beta$ -secretase나 1-secretase에 의해<sup>31,32)</sup> 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질(APP)의 일부가 잘라져서 A $\beta$ 이 생성되는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다<sup>3,27)</sup>.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 A $\beta$ 의 축적은 AD의 유발의 central event이다. 이것은 brain에 amyloid storage disease로 여겨지고 있다. Amyloid의 축적은 cascade에서 시작되어 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다. 다시 말해 Amyloid cascade hypothesis는 A $\beta$ 가 neuron을 손상시킨다는 것이다. A $\beta$ 는 그 자체가 neurotoxic한 것이 아니라 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극시켜 neuron을 상처받기 쉽게 만드는 것으로 생각된다<sup>53-55)</sup>. 최근에는 아밀로이드 전구단백질의 C말단 부위인 C단 단백질이 A $\beta$ 보다 더 독성이 있다고 알려져 있다<sup>56-59)</sup>.

APP는 21번 chromosome의 single gene에 encord되어 있으며<sup>60)</sup> 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30대와 40대에 이르러 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되는 똑같은 NFTs와 신경반이 생긴다. 이러한 병변은 유전자 수가 증가한 효과에 의한 APP의 과다생성 때문에 일어난다고 추측되고 있다<sup>3,27)</sup>. 알츠하이머병 환자의 기저 전뇌와 해마에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고와, 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고와 A $\beta$ 를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화과정, 특히 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다<sup>61)</sup>.

한편, presenilin은 465개의 A.A를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형 AD를 일으키는 인자로 알려져 있다<sup>31,32)</sup>. AD에 있어서 presenilin의 역할은 현재 규명 중에 있으나 APP의 형성을 촉진하고 apoptosis 과정에 관여할 것으로 알려지고 있다. 즉 presenilin 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 presenilin 대사물이 APP의 형성을 촉진하여 AD를 일으키는 것이다<sup>11)</sup>. presenilin 돌연변이는 presenilin-1의 경우, 최소 33종류, presenilin-2의 경우는 3종류 이상이 보고되어져 있으며, 조기(early-onset) AD의 경우 대부분이 presenilin 돌연변이에서 기인한다고 생각되고 있다<sup>25)</sup>.

최근에 PS-1과 PS-2는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하며, 이 유전자의 다양한 돌연변이가 조발성, 가족성 알츠하이머병의 70% 이상의 원인이 되는 것으로 보고되었다<sup>62)</sup>. 이들은 서로 아미노산의 67%가 동일하며 7개 전후의 transmembrane domain을 가지고 있는 45-50 KD의 단백질로 생각되고 있다. 이들 유전자는 C. elegans의 SPE-4 유전자와 구조적으로 유사하며, 이 SPE-4는 spermatogenesis 과정에서 세포내 단백질 운반 및 세포내 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 역시 C. elegans의 분화 과정에서 세포내 신호전달에 관여하는 notch형의 수용체인 lin-12의 기능 돌연변이율을 완화시켜 줄 수 있는 물질로 발견된 sel-12도 PS와 homology가 있는 것이 보고되었다<sup>63,64)</sup>. 이 sel-12는 lin-12에 의한 신호전달의 coreceptor 또는 lin-12를 세포표면으

로 운반하거나 recycling하는 역할을 담당하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 spe-4와 sel-12와 homology가 있는 PS-1과 PS-2도 역시 세포내 단백질 운반이나 세포내 신호전달에 관여할 가능성이 높음을 시사한다<sup>65,66)</sup>.

이상과 같은 사실에서 볼 때 이 유전자들의 돌연변이를 가지고 있는 가족성 AD 환자에서도 APP가 PS-1이나 PS-2에 의해  $\beta$ -secretase가 많이 포함되어 있는 세포내 분획으로 더 많이 이동하여 결국 APP의 처리에 영향을 끼쳐 A $\beta$ 가 과량 만들어짐으로써 신경독성을 나타내고 그에 따라 인지기능 결손이 동반되는 것으로 생각되고 있다<sup>67,68)</sup>. 최근에는 APP와 presenilin 단백질이 서로 결합한다는 사실이 입증됨으로서 이 사실을 더욱 더 뒷받침해주고 있다<sup>69)</sup>. 결국 APP, PS-1, PS-2의 돌연변이는 모두 A $\beta$ 의 양을 증가시키며 이것이 신경세포 사멸의 주원인이라고 생각되고 있다<sup>70)</sup>.

아세틸콜린, 도파민, 세로토닌, GABA의 경우에는 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데<sup>71,72)</sup>, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 콜린성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다<sup>73-75)</sup>. AD 환자에게서 나타나는 기억력 상실과 다른 인식 결함이 신호를 전달해 주는 화학 물질인 아세틸콜린을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있는데, 이 부족 현상은 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린에스테라아제로 더욱 심화된다<sup>73-75)</sup>. 비록 원인적인 치료방법은 아니더라도 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 콜린성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체로 lecithin, 수용체 활성제로 RS-86, nicotine 등이 있으며<sup>76-79)</sup>, 아세틸콜린 분해억제제로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용중인 tacrine과 최근에 승인된 E2020(aricept)등이 있으며 이런 약물들은 아세틸콜린이라고 하는 신경전달물질의 분해를 막아주어 감퇴된 인지기능을 개선시켜주는 효과를 가지고 있다<sup>11,80-83)</sup>. 이들은 비록 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이긴 하지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 알츠하이머병의 치료제로서 효과가 가장 우수한 것으로 알려져 있다<sup>84-87)</sup>.

활성화된 신경교세포들이 면역계에서만 생산될 수 있다고 믿어져 왔던 많은 사이토카인들의 주 원천세포들이라고 인정되고 있다. 더욱이 병원균의 침입 또는 물리적 뇌손상에 의해 손상된 BBB를 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 정상세포 및 마이크로글리아들이 IL-1, IL-6, Tumor necrosis factor 등의 염증반응 사이토카인들을 과다하게 생성하여 뇌에서의 사이토카인 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으킨다는 가설이 최근 많은 연구결과들에 의하여 입증되고 있다<sup>88)</sup>.

痴呆는 여러 가지 原因疾患에 의해 惹起되는 知能低下를 특징으로 하는 症候群<sup>4)</sup>으로, 대개 慢性的으로 進行하여 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등을 포함하는 高度의 大腦機能의 障礙를 나타낸다<sup>2,4-7,49)</sup>.

痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 退行性 變化, 腦血管障礙, 腦의 炎症性障礙, 代謝性疾患, 內分泌疾患, 外傷, 中毒 등<sup>2,4,5)</sup>이며 이 중 腦의 退行性 變化에 의한 Alzheimer型 痴呆와 腦硬塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混存된 混合型 痴呆가 많은 比率를 차지하고 있다<sup>6,7)</sup>.

Alzheimer型 痴呆는 原因不明의 腦의 全般的 萎縮과 特有的 組織學的 所見, 즉 노인반, Alzheimer형 원섬유변화 및 신경세포의 과립공포변성 등과 함께 知能의 低下를 特徵으로 하며<sup>2,49)</sup>, 症狀으로는 記憶力の 손실, 抽象的 思考障礙, 判斷 및 衝動自制障礙 또는 人格의 變化가 나타나며, 半身不遂, 語鈍, 步行障礙, 頭痛 등의 症狀도 나타난다<sup>49)</sup>.

最近의 韓醫學에서의 연구동향을 살펴보면 AD의 原因인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구<sup>22-27)</sup>, 腦의 老化와 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 연구<sup>25-32)</sup>, 臨床에서 使用하는 여러가지 處方이 白鼠의 記憶와 行動에 미치는 영향에 대한 연구<sup>35-43)</sup>가 이루어지고 있으나 益精地黃湯이 白鼠의 行動과 生化學的 變化에 관련된 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 益精地黃湯의 痴呆에 대한 효과를 알아보

고자, mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 細胞毒성을 측정하였고, AChE, NOsII의 유전자 발현 및 AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 발현을 관찰하였으며 scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였고, Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)을 통해 행동의 변화를 관찰하였다.

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 益精地黃湯의 細胞毒성을 측정한 결과 mLFC의 생존율은 대조군이  $100 \pm 4.4(\%)$ 로 나타났고 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군이 각각  $88 \pm 3.7$ ,  $93 \pm 3.1$ ,  $97 \pm 4.3$ ,  $99 \pm 5.2(\%)$ 로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒성이 나타나지 않았고, 400, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군이 각각  $71 \pm 3.4$ ,  $77 \pm 4.5(\%)$ 로 細胞毒성을 나타냈고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이  $100 \pm 3.5(\%)$ 로 나타났고, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군이 각각  $86 \pm 3.2$ ,  $89 \pm 4.0$ ,  $98 \pm 2.8$ ,  $101 \pm 4.9(\%)$ 로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒성이 나타나지 않았고, 400, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군이 각각  $67 \pm 3.8$ ,  $76 \pm 4.0(\%)$ 로 細胞毒성을 나타내어 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하로 실험하였다(Table I, Fig. 1).

PC-12 cell의 AChE mRNA의 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 58(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 益精地黃湯을 처리한 실험군은 각각 18, 55(Ht)로 나타났으니 이는 益精地黃湯의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 대조군에 비해 AChE의 발현을 억제된 것이며(Table II, Fig. 2), NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)으로 나타났고 대조군은 170(Ht)으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 益精地黃湯을 투여한 실험군은 각각 69, 121(Ht)로 나타나 益精地黃湯의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 대조군에 비해 NOsII의 발현을 억제했음을 알 수 있었다(Table II, Fig. 3).

PC-12 cell에서 정상군의 AChE activity는  $43 \pm 3.3(\%)$ , 대조군은  $100 \pm 4.6(\%)$ , 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 益精地黃湯 실험군은  $65 \pm 3.5$ ,  $87 \pm 5.2(\%)$ 로 나타나 유의성 있는 감소를 보였으며(Table III, Fig. 4), APP는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으며, 실험군에서는 감소했음을 볼 수 있었고(Fig. 5), PS-1과

PS-2는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 발현이 감소했음을 알 수 있어(Fig. 6) 신경세포사멸의 주원인으로 알려진 A $\beta$ 의 양을 증가시키는 APP, PS-1, PS-2의 발현을 감소시켜 AD에 대하여 효과가 있음을 알 수 있었다.

WBC는 정상군이  $11.8 \pm 0.6 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $11.0 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 양성대조군은  $11.6 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은  $8.9 \pm 0.7 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 으로 유의성 있는 변화를 보였다. RBC는 정상군이  $8.2 \pm 0.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $8.8 \pm 0.4 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각  $8.2 \pm 0.2$ ,  $8.1 \pm 0.5 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. PLT는 정상군이  $771 \pm 13.0 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $984 \pm 47.8 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 으로 나타났고 양성대조군은  $955 \pm 75.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은  $825 \pm 23.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 유의성 있는 변화를 보였다(Table IV).

AD 환자에서 glucose의 증가는 기억력을 증진시키는 단백질로 알려져 있으며<sup>89)</sup> scopolamine을 주사한 白鼠에서 uric acid의 수치가 증가되었다는 보고가 있고<sup>90)</sup>, scopolamine을 白鼠에 주사하면 AChE가 증가하여 acetylcholine의 양이 급격히 감소하여 기억과 인식의 장애를 유발하게 되므로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 혈청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과를 분석하였다.

Glucose는 정상군이  $110.5 \pm 7.9 (\text{mg}/\text{dl})$ , 대조군이  $100.5 \pm 8.6 (\text{mg}/\text{dl})$ 으로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각  $138.7 \pm 6.2$ ,  $141.0 \pm 5.8 (\text{mg}/\text{dl})$ 로 나타나 모두 유의성 있는 상승이 나타났다. Uric acid는 정상군이  $1.67 \pm 0.22 (\text{mg}/\text{dl})$ , 대조군이  $2.29 \pm 0.13 (\text{mg}/\text{dl})$ 으로 나타났고 양성대조군과 실험군은  $1.31 \pm 0.09$ ,  $1.92 \pm 0.15 (\text{mg}/\text{dl})$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity는 정상군이  $16.4 \pm 1.3 (\text{U}/\text{ml})$ , 대조군이  $35.3 \pm 1.5 (\text{U}/\text{ml})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각  $21.2 \pm 0.7$ ,  $24.1 \pm 3.7 (\text{U}/\text{ml})$ 로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 나타내어 혈청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과가 있음을 알 수 있었다

(Table V).

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이  $11.2 \pm 3.4 (\text{sec})$ , 대조군이  $80.6 \pm 3.9 (\text{sec})$ 로 나타났고, 양성대조군은  $15.2 \pm 4.0 (\text{sec})$ , 실험군은  $8.5 \pm 4.2 (\text{sec})$ 로 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. 적은 운동량(small movement : smldist)은 정상군이  $182 \pm 25.2 (\text{cm})$ , 대조군이  $1540 \pm 187 (\text{cm})$ 로 나타났고, 양성대조군은  $243 \pm 42.4 (\text{cm})$ , 실험군은  $390 \pm 62.9 (\text{cm})$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈으며, 많은 운동량(large movement : lardist)은 정상군이  $71 \pm 22.7 (\text{cm})$ , 대조군이  $751 \pm 79.2 (\text{cm})$ 로 나타났고, 양성대조군은  $117 \pm 42.1 (\text{cm})$ , 실험군은  $179 \pm 26.3 (\text{cm})$ 으로 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 대한 기억력 감퇴 억제효과를 나타내었다(Table VI, Fig. 7, 8).

以上的 내용을 總括해 보면 益精地黃湯은 PC-12 cell에서 AChE, NOs II의 유전자 발현을 억제시켰고, AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 억제시켰다. Scopolamine투여로 유도된 白鼠모델에서 Morris water maze 실험에서는 기억력향상 효과가 있었고, glucose의 증가와 uric acid의 감소, 그리고 AChE 활성의 감소가 나타났다. 益精地黃湯이 항콜린성 약물로 작용하고 있는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 益精地黃湯이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제능력을 시사하는 것으로 생각되는 바, 임상에서 痴呆에 대한 치료에 活用될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

益精地黃湯의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, PC-12 cell에서 AChE, NOs II의 유전자 발현 및 AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 발현을 관찰하고, scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였으며 Videotrack을 통해 행동의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. PC-12 cell에 미치는 영향

1) 益精地黃湯은 AChE, NOs II mRNA의 발현을 유의

성있게 억제하였다.

- 2) 益精地黃湯은 AChE의 활성을 유의성있게 억제하였다.
- 3) 益精地黃湯은 APP와 PS-1 PS-2 발현을 유의성있게 억제하였다.

## 2. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠에 미치는 영향

- 1) 益精地黃湯은 유의성 있는 glucose의 증가, uric acid의 감소, AChE 활성의 감소를 나타내었다.
- 2) 益精地黃湯은 Morris water maze에서 유의성있는 기억력 개선 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 益精地黃湯이 항콜린작용과 APP와 PS-1, PS-2 발현에 대한 억제능력을 보여 痴呆에 대한 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 參 考 文 獻

1. 민성길 : 최신정신의학, 서울, 일조각, p.189, 605, 1999.
2. 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p. 138, pp.216~228, 1988.
3. 보건복지부 : 보건복지통계연보, 제 44호, 서울, 보건복지부, pp.8~9, 1998.
4. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 고려의학, pp.225~228, 230~232, 1992.
5. 이광우·정희원 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.199~210, 1997.
6. 黃義完 외 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp. 256~271, 327~330, 1992.
7. 郭隆燦 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.27~31, 1992.
8. Baddeley AD·Bressi S·Della Sala S·Logie R·Spinnler H : The decline of working memory in Alzheimer's disease : A longitudinal study. Brain, 114 (Pt 6):2521~2542, 1991.
9. Borchelt DR·Thinakaran G·Eckman CB·Lee M K·Davenport F·Ratovitsky T·Prada CM·Kim G·Seekins S·Yager D·Slunt HH·Wang R·Seeger M·Levey AI·Gandy SE·Copeland NG·Jenkins NA·Price DL·Younkin SG·Sisodia SS : Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron, 17(5):1005~1013, 1996.
10. Buxbaum JD·Greengard P : Regulation of APP processing by intra- and intercellular signals. Ann N Y Acad Sci, 17(777):327~331, 1996.
11. Ehlers MR·Riordan JF : Membrane proteins with soluble counterparts : role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. Biochemistry, 30(42):10065~10074, 1991.
12. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610~611, 1978.
13. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
14. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990.
15. 洪元植 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, pp.217~218, p.229, 1985.
16. 洪元植 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.68, 342, 1985.
17. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129~135, p.534, 545, 550, 1982.
18. 趙 佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, pp.822~825, 1987.
19. 楊思澎 외 : 中醫臨床大全, 北京, 北京科學技術出版社, pp.224~230, 1991.
20. 陳 輝 외 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp.242~251, 784~791, 1993.
21. 黃大東 외 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378~381, 1989.
22. Fukuyama R·Chandrasekaran K·Rapoport SI : Nerve growth factor-induced neuronal differentiation is accompanied by differential induction and localization of the amyloid precursor protein (APP) in PC12 cells and

- variant PC12S cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 17(1-2):17-22, 1993.
23. Chakraborti TK · Farrar JD · Pope CN : Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 46(1):219-224, 1993.
  24. Gomez-Isla T · Price JL · McKeel DW Jr · Morris J C · Growdon JH · Hyman BT : Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16(14):4491-4500, 1996.
  25. Hung AY · Haass C · Nitsch RM · Qiu WQ · Citron M · Wurtman RJ · Growdon JH · Selkoe DJ : Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem*, 268(31):22959-22962, 1993.
  26. Altstiel LD · Sperber K : Cytokines in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 15(4):481-495, 1991.
  27. Alzheimer's Disease Collaborative Group : The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet*, 11(2):219-222, 1995.
  28. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구, *釜山大學校藥學研究誌*, 29(2):49-56, 1995.
  29. 이효은 외 : 浮萍草의 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 研究, *釜山大學校藥學研究誌*, 29(2):29-39, 1995.
  30. 蘇敬順 외 : 鹿蓼地黃湯이 抗老化에 미치는 影響, *서울, 慶熙韓醫大論文集*, 18(2):127-148, 1995.
  31. 禹大潤 외 : 人工膜과 Rat의 肝細胞를 利用한 血府逐瘀湯의 抗酸化 作用에 관한 研究, *大韓韓醫學會誌*, 17(1):465-477, 1996.
  32. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 依한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 對한 研究, *大韓韓醫學會誌*, 17(1):21-36, 1996.
  33. 尹哲浩 외 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, *大韓韓方內科學會誌*, 16(1):62-79, 1995.
  34. 尹哲浩 외 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, *大韓韓醫學會誌*, 16(2):348-364, 1995.
  35. 우주영 외 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형미로 학습과 기억에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 8(1):69-80, 1997.
  36. 조윤숙 외 : 行방지황탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 9(1):1-24, 1998.
  37. 유재면 외 : 香附子八物湯이 흰쥐의 방사형 迷路學習과 記憶에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 9(2):1-24, 1998.
  38. 이조희 외 : 麝香蘇合元이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 9(2):37-44, 1998.
  39. 金英旭 : 聰明湯이 健忘誘導 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, *大田大學校大學院*, 1999.
  40. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 10(1):1-16, 1999.
  41. 홍대성 · 김종우 · 황의완 : 麝香蘇合元이 情緒反應性과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 10(1):17-38, 1999.
  42. 강현근 · 김종우 · 황의완 : 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 10(1):39-52, 1999.
  43. 文誠秀 · 李相龍 : 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 11(1):19-36, 2000.
  44. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.147, 449, 1987.
  45. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, p.193, 302, 313, 531, 537, 545, 568, 580, 596, 622, 632, 626, 1992.
  46. Skehan P · Storeng R · Scudiero D · Monk A · McMahon J · Visca D · Warren JT · Kennedy S · Boyd MR : New colorimetric cytotoxicity assay for



- anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107~1112, 1990.
47. Zor T · Selinger Z : Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity : theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236(2):302~308, 1996.
48. 金宇哲 외 : 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp.177~179, 1990.
49. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.87~88, 465~467, 514~518, p.600, 1995.
50. Da Cruz e Silva OA · Iverfeldt K · Oltersdorf T · Sinha S · Lieberburg I · Ramabhadran TV · Suzuki T · Sisodia SS · Gandy S · Greengard P : Regulated cleavage of Alzheimer beta-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience*, 57(4):873~877, 1993.
51. Lemere CA · Lopera F · Kosik KS · Lendon CL · Ossa J · Saïdo TC · Yamaguchi H · Ruiz A · Maritnez A · Madrigal L · Hincapie L · Arango JC · Anthony DC · Koo EH · Goate AM · Selkoe DJ · Arango JC : The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A $\beta$  42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med*, 2(10):1146~1150, 1996.
52. Whitehouse PJ · Price DL · Struble RG · Clark A W · Coyle JT · Delon MR : Alzheimer's disease and senile dementia : loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537):1237~1239, 1982.
53. Guo Z · Ersoz A · Butterfield DA · Mattson MP : Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals : preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron and 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*, 75(1):314~320, 2000.
54. Mattson MP · Guo ZH · Geiger JD : Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem*, 73(2):532~537, 1999.
55. Gridley KE · Green PS · Simpkins JW : Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res*, 778(1):158~165, 1997.
56. Bryan-Sisneros AA · Fraser SP · Suh YH · Djamgoz MB : Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> gradients. *Neuroreport*, 11(15):3357~3360, 2000.
57. Kim HS · Park CH · Cha SH · Lee JH · Lee S · Kim Y · Rah JC · Jeong SJ · Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J*, 14(11):1508~1517, 2000.
59. Lee JP · Chang KA · Kim HS · Kim SS · Jeong S J · Suh YH : APP carboxyl-terminal fragment without or with abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res*, 60(4):565~570, 2000.
60. Hartell NA · Suh YH : Peptide fragments of beta-amyloid precursor protein: effects on parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum. *J Neurochem*, 74(3):1112~1121, 2000.
61. Wolf BA · Wertkin AM · Jolly YC · Yasuda RP · Wolfe BB · Konrad RJ · Manning D · Ravi S · Williamson JR · Lee VM : Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem*, 270(9):4916~4922, 1995.
62. Breakefield XO · Geller AI : Gene transfer into the

- nervous system. *Mol Neurobiol*, 1(4):339~371, 1987.
63. Kowall NW · Beal MF · Busciglio J · Duffy LK · Yankner BA : An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 88(16):7247~7251, 1991.
64. Breakfield XO · DeLuca NA : Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol*, 3(3):203~218, 1991.
65. Kandel ER · Schwartz JH · Jessell TM : Principles of Neural Science 3rd edition, 1991.
66. Selkoe DJ : Aging, amyloid, and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 320(22):1484~1487, 1989.
67. Selkoe DJ : Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am*, 265(5):68~71, 74~76, 78, 1991.
68. Yankner BA · Dawes LR · Fisher S · Villa-Komaroff L · Oster-Granite ML · Neve RL : Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 245(4916):417~420, 1989.
69. Suh YH : An etiological role of amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 68(5):1781~1791, 1997.
70. Weinstein HC · Scheltens P · Hijdra A · van Royen EA : Neuro-imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease. II : Positron and single photon emission tomography. *Clin Neurol Neurosurg*, 95(2):81~91, 1993.
71. Zhang DM · Levitan D · Yu G · Nishimura M · Chen F · Tandon A · Kawarai T · Arawaka S · Supala A · Song YQ · Rogaeva E · Liang Y · Holmes E · Milman P · Sato C · Zhang L · St George-Hyslop P : Mutation of the conserved N-terminal cysteine (Cys92) of human presenilin 1 causes increased A beta42 secretion in mammalian cells but impaired Notch/lin-12 signalling in *C. elegans*. *Neuroreport*, 11(14):3227~3230, 2000.
72. Trabace L · Cassano T · Steardo L · Pietra C · Villetti G · Kendrick KM · Cuomo V : Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1):187~194, 2000.
73. De Vente J · Markerink-van Ittersum M · Van Abeelen J · Emson PC · Axer H · Steinbusch HW : NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci*, 12(2):507~519, 2000.
74. Pandiella A · Massague J : Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem*, 266(9):5769~5773, 1991.
75. Park CH · Kim SH · Choi W · Lee YJ · Kim JS · Kang SS · Suh YH : Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med*, 62(5):405~409, 1996.
76. Refolo LM · Salton SR · Anderson JP · Mehta P · Robakis NK : Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC 12 cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(2):664~670, 1989.
78. Levisohn LF · Isacson O : Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res*, 564(2):230~244, 1991.
79. Kaplan PW · Allen RP · Buchholz DW · Walters JK : A double-blind, placebo-controlled study of the treatment of periodic limb movements in sleep using carbidopa/levodopa and propoxyphene. *Sleep*, 16(8):717~723, 1993.

80. Lukaszewska I : Scopolamine impairs object exploration but not habituation in rats. *Acta Neurobiol Exp(Warsz)*, 53(1):243~250, 1993.
81. Ono S · Kitamura K · Maekawa M · Hirata K · Ano M · Ukai W · Yamafuji T · Narita H : Protective effect of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-(N,N-diethylamino)ethoxy]ethanol hydrochloride (T-588), a novel cerebral activator, against experimental cerebral anoxia. *Jpn J Pharmacol*, 62(1):81~86, 1993.
82. Brambilla A · Ghiorzi A · Pitsikas N · Borsini F : DAU 6215, a novel 5-HT<sub>3</sub>-receptor antagonist, selectively antagonizes scopolamine-induced deficit in a passive-avoidance task, but not scopolamine-induced hypermotility in rats. *J Pharm Pharmacol*, 45(9):841~843, 1993.
83. Dawson GR · Iversen SD : The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. *Behav Brain Res*, 57(2):143~153, 1993.
84. Dennes RP · Barnes JC : Attenuation of scopolamine-induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non-cholinomimetic drugs using a novel task in the 12-arm radial maze. *Psychopharmacology(Berl)*, 111(4):435~441, 1993.
85. Meltzer HY · Chai BL · Thompson PA · Yamamoto BK : Effect of scopolamine on the efflux of dopamine and its metabolites after clozapine, haloperidol or thioridazine. *J Pharmacol Exp Ther*, 268(3):1452~1461, 1994.
86. Saponjic RM · Mueller K · Krug D · Kunko PM : The effects of haloperidol, scopolamine, and MK-801 on amphetamine-induced increases in ascorbic and uric acid as determined by voltammetry in vivo. *Pharmacol Biochem Behav*, 48(1):161~168, 1994.
87. Y Cho · TS Ko · SH Cha · DE Sok : Effects of Nonionic Surfactants on Solubilization and Stability of Mouse Brain Acetylcholinesterase. *Korean Biochem J*, 27(4):308~312, 1994.
88. Stratton KR · Worley PF · Litz JS · Parsons SJ · Haganir RL · Baraban JM : Electroconvulsive treatment induces a rapid and transient increase in tyrosine phosphorylation of a 40-kilodalton protein associated with microtubule-associated protein 2 kinase activity. *J Neurochem*, 56(1):147~152, 1991.
89. Velazquez-Moctezuma J · Aguilar-Garcia A · Diaz-Ruiz O : Behavioral effects of neonatal treatment with clomipramine, scopolamine, and idazoxan in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 46(1):215~217, 1993.
90. Fontana A · Kristensen F · Dubs R · Gerns D · Weber E : Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol*, 129(6):2413~2419, 1983.
91. Means LW · Edmonds SM : Glucose minimally attenuates scopolamine-but not morphine-induced deficits on a water maze alternation task. *J Neural Transm*, 105(10~12):1171~1185, 1998.
92. Mueller K : Voltammetric evidence in vivo of cholinergic modulation of extracellular ascorbic acid and uric acid in rat striatum. *Brain Res*, 408(1~2):313~316, 1987.

= Abstract =

## Effects of YkJungJiHwangTang (YJJHT) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice

**Byongman Choi, Sangryong Lee**

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental  
Medicine, Taejon University

Alzheimer's disease(AD) is progressive neurodegenerative disease, which is pathologically characterized by neuritic plaques and neurofibrillary tangles associated with the acetylcholinesterase, apolipoprotein E and butylcholinesterase, and by mutations in the presenilin genes PS1 and PS2, and amyloid precursor proteins (APP) overexpression.

The present research is to examine the inhibition effect of YJJHT on PS-1, PS-2 and APP overexpression by detected to Western blotting. To verify the Effects of YJJHT on cognitive deficits further, we tested it on the scopolamine-induced amnesia model of the mice using the Morris water maze tests, and there was ameliorative effects of memory impairment as a protection to scopolamine. YJJHT only partially blocked the increase in blood serum level of acetylcholinesterase and Uric acid induced by scopolamine, whereas blood glucose level was shown to attenuate the amnesia induced by scopolamine and increased extracellular serum level compared with only scopolamine injection.

In conclusion, studies of YJJHT that has been know as anti-choline and inhibition abilities of APP overexpression, this could also be used further as a important research data for a preventive and promising symptomatic treatment for Alzheimer's disease.