

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 12. No. 1. 2001

補益清腦湯이 痴呆病態 모델에 미치는 影響

高太濬 · 李相龍

대전대학교 한의과대학 신경정신과 교실

Effects of Boyikcheungnoy-tang (BYCNT) on inhibition of impairment of learning and memory, and acetylcholinesterase in amnesia mice

Tae-Joon Koh, Sang-Ryong Lee

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University, Daejeon, Korea

Alzheimer's disease(AD) is a 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 (APPs)'s overexpression.

The present research is to examine the inhibition effect of BYCNT on PS-1, PS-2 and APPs's overexpression by detected to Western blotting. To verify the effects of BYCNT on cognitive deficits further, we tested it on the scopolamine(1mg/kg)-induced amnesia model of the mice using the Morris water maze tests, and there was ameliorative effects of memory impairment as a protection from scopolamine. BYCNT 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 BYCNT that has been known as anti-choline and inhibition abilities of APPs overexpression, this could also be used further as a important research data for a preventive and promising symptomatic treatment for Alzheimer's disease.

Key Word : Alzheimer's disease, BoYikCheungNoyTang

I. 緒 論

痴呆(dementia)는 漸進的인 記憶力 障礙가 失

語症(aphasia), 失認症(인식불능; agnosia), 失行症(apraxia) 등의 行動的인 障礙와 함께 나타나 社會 職業的 機能의 障礙를 가져오는 것으로¹⁻³⁾, 單一 疾患이기보다는 인지기능(cognitive function)의 低下를 나타내는 여러 질환들에 대한 보다 포괄적인 개념이라 할 수 있다^{4,5)}. 이런 痴呆에는

· 교신저자 : 고태준, 대전광역시 대덕구 대하동 37-12
(Tel. 042-632-4056, Fax. 042-632-4058,
e-mail: ddingu888@netsgo.com)

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 血管性 痴呆(vascular dementia), 中毒性 痴呆 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있다^{6,7)}.

韓醫學에서 “痴呆”는 《景岳全書·雜病模》⁸⁾에서 “癡狂痴呆”라 하여 最初로 言及하였고, 그 후에도 《辨證奇門》⁹⁾과 《石室秘錄》¹⁰⁾에는 痴呆의 類似概念으로 “呆病”을 言及하였다. 痴呆의 原因으로는 思慮過多, 驚恐, 肝氣鬱結, 胃氣衰退, 痰 등이 있으며, 益氣, 健胃, 去痰, 開鬱 등의 治法이 증상에 따라 運用되고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

補益清腦湯은 半夏白朮天麻湯의 加減방인 清腦湯¹¹⁾에 “去痰開竅”安神益智하는 遠志와 石菖蒲¹²⁾, 補肝腎 益精血하는 何首烏¹²⁾를 加하고, 補肺 益氣 寧神益智하는 人蔘과 黃芪¹²⁾를 增量한 處方으로 痴呆의 原因이 老化에 따른 脾胃氣虛 痰氣鬱滯로 인해 發生하는 痴呆에 去痰益氣를 목적으로 사용하고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

最近 韓醫學에서는 痴呆에 관한 研究가 다양하게 進行되고 있는데, 蘇¹³⁾와 손¹⁴⁾ 등의 老化에 대한 研究와 蔘茸地黃湯¹⁵⁾, 洗心湯¹⁶⁾, 還少丹¹⁷⁾, 溫膽湯¹⁸⁾ 등의 抗酸化作用에 對한 研究가 이루어지고 있고, Morris water maze¹⁹⁾와 Radial arm maze²⁰⁾의 두 부분의 課題로 記憶과 行動에 대한 研究가 이루어지고 있으며, AD의 또 다른 原因인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 遺傳子의 過多 發顯에 對한 研究²¹⁾가 이루어지고 있으나, 補益清腦湯이 痴呆모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 接하지 못하였다.

이에 著者는 補益清腦湯이 痴呆治療에 活用될 수 있는지를 實驗的으로 검증하고자, mLFC와 PC-12 cell에 대한 세포독성, PC-12 cell에서 AChE, NOs II의 유전자 발현, AChE의 활성도, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 測定하였고, scopolamine을 복강처리한 白鼠의 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 測定하였으며, Videotrack (animal and human being behaviour analysis system)을 통해 行動의 變化를 觀察하여 有意한 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

350~400g 30週齡의 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/c 생쥐를 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℃, 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 自由로 攝取케 하였다.

2) 藥材

實驗에 使用된 補益清腦湯은 《大田大學校 韓方病院處方集》¹¹⁾에 收載된 清腦湯에 遠志, 石菖蒲, 何首烏를 加하고, 人蔘과 黃芪를 增量한 것으로, 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 BoYikCheungNoyTang(BYCNT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
人參	<i>Ginseng Radix</i>	12.0
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	12.0
白茯苓	<i>Poria</i>	12.0
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	8.0
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	8.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	6.0
赤茯苓	<i>Poria</i>	6.0
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4.0
白朮炒	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6.0
遠志	<i>Carthami Flos</i>	4.0
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	4.0
神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	4.0
麥芽炒	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	3.0
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	3.0
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	2.0
山楂肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6.0
龜板	<i>Testudinis Plastrum</i>	8.0
Total amount		112.0

3) 檢液의 調製

補益清腦湯 3貼 分量 336g을 깨끗이 씻어 3,000ml 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(Buchi 461, Switzerland)에서 減壓 濃縮하였다. 이 濃縮液을 -84℃ 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(β -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 ($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moleoy

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 시약 들은 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 vacuum evaporator(Büchi 461, Switzerland), 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) mLFC와 PC-12 cell의 배양

mLFC(Mouse lung fibroblast cell)는 다음과 같이 만들었다. BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1400 rpm으로 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37°C, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후

D-PBS을 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 well plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 37°C, 5% CO₂ 상태의 培養器에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) 그리고 10 µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 배양하였다.

(2) 細胞毒性 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay²²⁾법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주를 2.0 x 10⁴개의 세포로 96 well plate에 나누고 37°C, 5% CO₂상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 補益清腦湯 추출물(최종 농도 400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 72시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 µl를 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 100µl/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, NOsII mRNA 발현 측정

① mRNA 추출

PC-12 cell은 24 well plate에 1 x 10⁶ 세포로

각 well에 분주하고, 補益清腦湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 PMA와 rIL-1 β (100ng/ml)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 상층액을 회수한 후 RNAzol^B를 이용하여 PC-12 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 mRNA는 diethyl pyrocarbonate를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total mRNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로써 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ 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 system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOsII와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer(20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase(5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종

부피가 30 μ 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 products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

① rat AChE

sence oligonucleotide

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisence oligonucleotide

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

② rat NOsII

sence oligonucleotide :

5'-TCCAATCTgGAACA_gCCA_gCTgg-3'

antisence oligonucleotide :

5'-gTCCATgCAgACA_gCCACATCCTC-3'

③ rat G3PDH

sence oligonucleotide :

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisence oligonucleotide :

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

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

(2) AChE activity 측정 및 Western blot 분석

① 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 補益清腦湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)과 PMA, rIL-1 β 를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 補益清腦湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)과 PMA를 동시 배양한 후 3회 D-PBS로 세포를 수세한 후 세포성 lysate를 얻어 Western blot에 사용하였다.

세포성 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 완

충용액(Tris-HCl (200mM; pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 μ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법²³⁾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 첨가하였다. 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 μ 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 投與 및 scopolamine 注射

30週齡 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 對照群, tacrine(10mg/kg)을 투여한 陽性對照群, 補益淸腦湯(250mg/kg)을 투여한 實驗群으로 하여 각각 scopolamine(1mg/kg)을 7일간 1일 1회 복강 주사하였다.

(2) 백혈구, 적혈구, 혈소판의 變化 측정

藥物投與 10日 後 SD계 白鼠에서 直接 心臟採血法으로 10ml의 血液을 포집하였다. 그 中 2ml는 CBC bottle에 넣어 白血球數, 赤血球數, 血小

板數의 含量을 計算하였고, 計算은 Fonio法에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

(3) Glucose, uric acid의 측정

血清내 glucose, uric acid의 량은 자동생화학 분석기(Ciba Coring., U.S.A.)를 使用하여 測定하였다.

(4) AChE activity 측정

AChE activity 測定하기 위하여 test tube와 blank tube를 labeling하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no: 150-3) 0.2ml과 serum 0.2ml을 넣고 混合하였다. blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution(cat. No.420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 添加하였다. 이후 時間을 正確히 記錄하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 正確히 30分間 배양시킨 後 ELISA Leader로 420nm에서 吸光도를 測定하였다. 그 結果를 使用하여 $\Delta A = A_{BLANK} - A_{REST}$ 公式에 의해 검장선에서 活性도를 測定하였다.

4) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 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 수조에 수온이 28 $^{\circ}$ 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 對照群, tacrine을 투여한 陽性對照群(10mg/kg), 補益淸腦湯을 투여한 實驗群 (250mg/kg)으로 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 방법²⁴⁾을 이용하였다.

III. 成 績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 補益清腦湯의 細胞毒性

mLFC의 生存率은 對照群이 100±4.4(%)로 나타났고 100, 50, 10, 1μg/ml의 實驗群이 90±3.4, 93±4.2, 95±4.6, 99±3.5로 細胞毒性을 나타내지 않았고, 400, 200μg/ml의 實驗群이 48±5.1, 78±3.6로 細胞毒性을 나타냈다. PC-12 cell의 生存率은 對照群이 100±3.5(%)로 나타났고, 100, 50, 10, 1μg/ml의 實驗群이 87±2.5, 96±4.2, 109±5.6, 112±4.3로 細胞毒性을 나타내지 않았고, 400, 200μg/ml의 實驗群이 30±5.1, 52±4.6로 細胞毒性을 나타냈다.(Table I).

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

Group	Concentration (μg/ml)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell
Control	0	100±4.4 ^{a)}	100±3.5
	1	99±3.5	112±4.3
	10	95±4.6	109±5.6
BYCNT	50	93±4.2	96±4.2
	100	90±3.4	87±2.5
	200	78±3.6	52±4.6
	400	48±5.1	30±5.1

a) : Mean ± Standard error.

Control : Non-treatment group.

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

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

1) AChE, NOsII mRNA의 발현

AChE mRNA의 發顯에 있어서 正常群은 25(Ht)로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 rIL-1β 만을 처리한 對照群은 58(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10μg/ml의 補益清腦湯과 100ng/ml의 PMA와 rIL-1β를 함께 처리한 實驗群은 각각 12(Ht), 54(Ht)로 나타났다(Table II).

NOsII mRNA의 發顯에 있어서 正常群은 56(Ht)으로 나타났고, 對照群은 170(Ht)으로 나타났는데 반해, 實驗群은 각각 64(Ht), 149(Ht)로 나타났다(Table II).

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

Drugs	rIL-1β & PMA (ng/ml)	mRNA Expression (Ht)		
		G3PDH	AChE	NOsII
Normal	0	223	25	56
Control	100	224	58	170
BYC 100	100	225	12	64
NT 10	100	223	54	149

Normal : Non-treatment group.

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

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

PC-12 cells were pretreated with various concentration of BYCNT extract in the presence or absence rIL-1β and PMA(100ng/ml) for 6h(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*.

2) AChE activity 억제

正常群의 AChE activity는 $43 \pm 3.3(\%)$ 이었고 對照群은 $100 \pm 4.6(\%)$ 으로 나타났는데, $100, 10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 實驗群은 $47 \pm 4.5(\%), 92 \pm 3.6(\%)$ 로 나타나 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 實驗群에서만 유의성 있는 減少를 보였다(Table III).

Table III. Inhibitory Effect of BYCNT Extract on the AChE Activity in PMA and rIL-1 β Stimulated PC-12 cell

Drugs	rIL-1 β & PMA	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AChE activity (% control)
Normal	0	0	$43 \pm 3.3^{\text{a)}$
Control	100	0	100 ± 4.6
BYC	100	100	$47 \pm 4.5^{***}$
NT	10	10	92 ± 3.6

a) : Mean \pm Standard error.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with PMA and rIL-1 β ($100\text{ng}/\text{ml}$).

BYCNT : Group pretreated with various concentration ($10\mu\text{g}/\text{ml}, 100\mu\text{g}/\text{ml}$) of BYCNT 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 BYCNT extract in the presence or absence of rIL-1 β ($100\text{ng}/\text{ml}$) and PMA ($100\text{ng}/\text{ml}$) for 24hrs. The lysate were measured using AChE diagnostic kits(Sigma). Other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

3) APP 발현 억제

APP는 正常群에 비해 對照群에서 현저하게 발현되었으나, 實驗群에서는 減少했음을 볼 수 있다(Fig. 1).

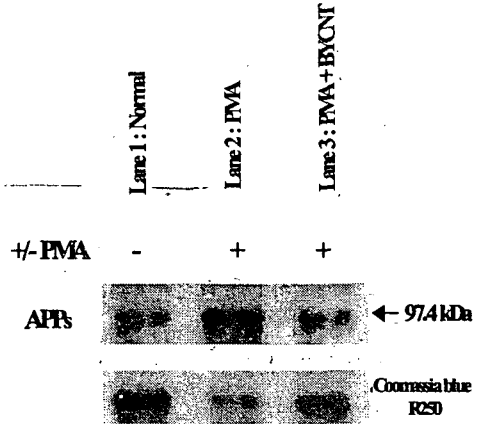


Fig. 1. BYCNT inhibits expression of APP secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment

Lane 2 : PMA($100\text{ng}/\text{ml}$)

Lane 3 : PMA($100\text{ng}/\text{ml}$) + BYCNT($100\mu\text{g}/\text{ml}$)

PC-12 cells were pretreated without or with BYCNT ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) extract in the presence or absence PMA ($100\text{ng}/\text{ml}$). 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 BYCNT and internal control Coomassia blue R250 staining.

4) PS-1, PS-2 발현 억제

PS-1과 PS-2는 正常群에 비해 對照群에서 현저하게 發顯되었으나, 實驗群에서는 發顯이 減少했음을 볼 수 있다(Fig. 2).

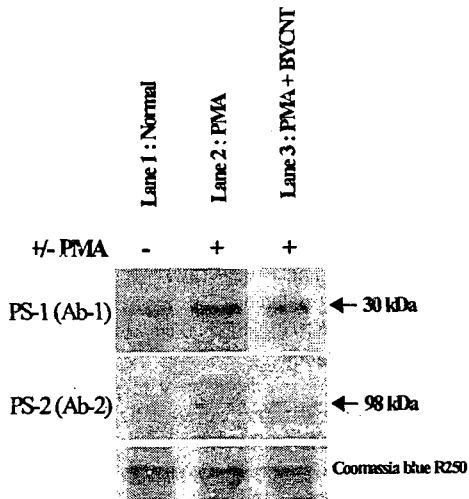


Fig. 2. BYCNT inhibits expression of PS-1(Ab-1) and PS-2(Ab-2) secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment
Lane 2 : PMA(100ng/ml)
Lane 3 : PMA(100ng/ml) + BYCNT(100µg/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 BYCNT and internal control Coomassie blue R250 staining.

3. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 모델의 혈액에 대한 영향

1) 백혈구, 적혈구, 혈소판에 미치는 영향

백혈구는 正常群이 11.8 ± 0.6 , 對照群이 11.0 ± 0.5 로 나타났고, 陽性對照群과 實驗群은 각각 11.6 ± 0.5 , 10.8 ± 0.7 로 나타나 對照群에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

적혈구는 正常群이 8.2 ± 0.1 , 對照群이 8.8 ± 0.4 로 나타났고, 陽性對照群과 實驗群은 각각 8.2 ± 0.2 , 8.4 ± 0.6 로 나타나 對照群에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

혈소판은 正常群이 771 ± 13.0 , 對照群이 984 ± 47.8 으로 나타났고, 陽性對照群은 955 ± 75.9 로 나타나 對照群에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며, 實驗群은 805 ± 21.5 로 유의성 있는 변화를 보였다(Table IV).

Table IV. Effects of BYCNT on the Blood Cells of Scopolamine-induced Amnesia Rat.

Group	Normal	Control	Tacrine	BYCNT
WBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	11.8 ± 0.6^a	11.0 ± 0.5	11.6 ± 0.5	10.8 ± 0.7
RBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.2 ± 0.1	8.8 ± 0.4	8.2 ± 0.2	8.4 ± 0.6
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	771 ± 13.0	984 ± 47.8	955 ± 75.9	$805 \pm 21.5^*$

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).

BYCNT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and BYCNT extract(200mg/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 BYCNT 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 正常群이 110.5 ± 7.9 , 對照群이 100.5 ± 8.6 으로 나타났고, 陽性對照群과 實驗群은 138.7 ± 6.2 , 156.8 ± 3.1 로 유의성 있는 증가를 나타냈다. Uric acid는 正常群이 1.67 ± 0.22 , 對照群이 2.29 ± 0.13 으로 나타났고, 陽性對照群과 實驗群은 1.31 ± 0.09 , 1.88 ± 0.08 로 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity는 正常群이 16.4 ± 1.3 , 對照群이 35.3 ± 1.5 로 나타났고, 陽性對照群과 實驗群은 21.2 ± 0.7 , 22.2 ± 2.3 로 유의성 있는 감소를 나타냈다.(Table V).

Table V. Effects of BYCNT on the Serum Level of Scopolamine-induced Amnesia Rat.

Group	Normal	Control	Tacrine	BYCNT
Glucose (mg/dl)	110.5±7.9 ^{a)}	100.5±8.6	138.7±6.2**	156.8±3.1***
Uric acid (mg/dl)	1.67±0.22	2.29±0.13	1.31±0.09***	1.88±0.08**
AChE (U/ml)	16.4±1.3	35.3±1.5	21.2±0.7***	22.2±2.3***

^{a)} : Mean ± 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.*).

BYCNT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and BYCNT extract(200mg/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 BYCNT or Tacrine·HCl and injected scopolamine(1mg/kg) once a day for 7 days. Hematology change was analyzed for serum level as described in *Material and Methods*.

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

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이 11.2±3.4(sec), 對照群이 80.6±3.9(sec)로 나타났고, 陽性對照群은 15.2±4.0(sec), 實驗群은 24.4±3.2(sec)로 모두 유의성 있는 減少를 보여주었다. 적은 운동량(small movement ; smlldist)은 정상군이 182±25.2(cm), 對照群이 1540±187(cm)로 나타났고, 陽性對照群은 243±42.4(cm), 實驗群은 398±44.5(cm)로 유의성 있는 減少를 보였으며, 많은 운동량(large movement ; lardist)은 정상군이 71±22.7(cm), 對照群이 751±79.2(cm)로 나타났고, 陽性對照群은 117±42.1(cm), 實驗群은 153±26.6(cm)으로 유의성 있는 減少를 보였다(Table VI).

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

Result captions	Normal	Control	Tacrine	BYCNT
Stop-through latency(sec)	11.2±3.4 ^{a)}	80.6±3.9	15.2±4.0***	24.4±3.2**
Smlldist(cm)	182±25.2	1540±187	243±42.4***	398±44.5
Lardist(cm)	71±22.7	751±79.2	117±42.1***	153±26.6

^{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.*).

BYCNT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and BYCNT extract(200mg/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 BYCNT or Tacrine·HCl and the acquisition training trial was continued once a day for 14 days. The videotacking was initiated at 30 min after the injection of scopolamine(1mg/kg) and the retention trial was carried out.

IV. 考 察

痴呆(Dementia)는 腦의 疾患으로 인해 생기는 하나의 症候群으로, 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 등 知的機能의 全體의 障碍를 포함하는 高度의 皮質機能의 多發性 障碍를 의미한다²⁵⁾ 이러한 痴呆에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 血管性 痴呆(vascular dementia), 中毒性 痴呆 등이 있으며, 이 중에서 AD가 50% 이상의 대부분을 차지하고 있고^{6,7)}, 그 외 血管性 痴呆는 20-30%, 藥物이나 알코올중독에 의한 中毒性 痴呆는 10-20% 程度를 차지하고 있다²⁶⁾.

AD는 많은 原因에 의해서 誘發되지만, amyloid β protein 蛋白質(A β)의 沈積(deposition)으로 생기는 신경반(Senile Plaques; SPs)의 神經毒性(neurotoxic)으로 神經細胞의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우 蛋白質(hyperphosphorylation tau protein)의 沈積에 의한 신경섬유다발(Neurofibrillary tangles; NFTs)의 作用으로 神經退行(neurodegeneration)이 생기는 것이 대표적이다²⁷⁾. 이 외에도 에스트로젠(estrogen), 아포리포 단백질 E(apolipoprotein E; apoE), 프리시닐린(presenilin), 酸化劑(oxidants; hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 炎症, 사고에 의한 損傷, 神經傳達物質(neurotransmitter), 神經營養因子(neurotrophic factors) 등 많은 誘發因子가 關與하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. amyloid β protein(A β)은 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein; APP)의 非正常的인 工程過程으로 생성된다²¹⁾. β -secretase나 1-secretase에 의해 큰 分子量의 APP의 一部가 잘라져서 amyloid β protein(A β)이 생성되는데, 소수성 아미노산 殘基가 大部分인 39-43개의 아미노산으로 構成되어 있어 스스로 凝集하는 性質을 가지고 있다²⁷⁾.

APP는 21번 chromosome의 single gene에 encord되어 있으며²⁸⁾ 이 21번 染色體가 3개인 다운증후군 患者도 早期痴呆 現狀을 나타내며 30대와 40대에 이르러 알츠하이머병 患者의 腦에서

發見되는 똑같은 신경섬유다발과 신경반이 생긴다. 이러한 病變은 遺傳子 數가 增加한 效果에 의한 APP의 過度生成 때문에 일어난다고 推測되고 있다²⁷⁾.

또한 presenilin은 465개의 A.A를 가진 蛋白質로서 APP와 類似한 大腦分布를 가지며 家族形 AD를 일으키는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. presenilin 1(PS1)과 presenilin 2(PS2)는 각각 14번과 1번 染色體에 存在하며, 이 遺傳子의 多樣한 突然變異가 早發性, 家族性 알츠하이머병의 70% 이상의 原因이 되는 것으로 報告되었다³⁰⁾. 이들은 서로 아미노산의 67%가 同一하며 7개 前後의 transmembrane domain을 가지고 있는 45-50 KD의 蛋白質로 生覺되고 있다. 이들 遺傳子는 C. elegans의 SPE-4 遺傳子와 構造의 類似하며, 이 SPE-4는 spermatogenesis 過程에서 細胞內 蛋白質 運搬(cytoplasmic partitioning) 및 細胞內 信號傳達(intra-cellular trafficking)에 重要한 役割을 하는 것으로 알려져 있다. 最近 역시 C. elegans의 分化 過程에서 細胞內 信號傳達에 關與하는 notch形의 收容體인 lin-12의 機能 突然變異率을 緩和시켜 줄 수 있는 物質로 發見된 sel-12도 PS와 homology가 있는 것이 報告되었다³¹⁾. 이 sel-12는 lin-12에 의한 信號傳達의 coreceptor 또는 lin-12를 細胞表面으로 運搬하거나 recycling하는 役割을 擔當하는 것으로 生覺된다. 이러한 事實은 spe-4와 sel-12와 homology가 있는 PS-1과 PS-2도 역시 細胞內 蛋白質 運搬이나 細胞內 信號傳達에 關與할 可能性이 높음을 示唆한다³²⁾. 最近에는 APP와 presenilin 蛋白質이 서로 結合한다는 事實이 立證됨으로서 이 事實을 더욱 더 뒷받침해주고 있다³³⁾. 즉 presenilin 突然變異로 인해 非正常的으로 分解된 presenilin 代謝物이 APP의 形成을 促進하여 A β 의 양을 증가시키며, 이것이 神經세포 사멸의 主原因이 되어 AD를 일으키는 것으로 生覺하고 있다³⁴⁾.

AD의 1차 症狀인 記憶力 減退現狀은 콜린성 神經系와 密接한 關係가 있다는 證據가 多樣하게 提示되고 있다³⁵⁾. 아세틸콜린(acetylcholine), 도파민(dopamine), 세로토닌(serotonin), GABA의 經

우에는 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD 환자에게서 나타나는 기억력 상실과 인식 결함은 신호를 전달해 주는 화학 물질인 acetylcholine을 만들어 내는 신경 세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있으며, 이 부족 현상은 acetylcholine을 분해하는 acetylcholinesterase (AChE)로 더욱 심화된다³⁵⁾.

비록 原因의인 治療方法은 아니더라도 위에 前述한 바와 같이 記憶力과 密接한 關聯이 있는 것으로 알려진 減退된 콜린성 神經系를 補充해주고 改善해 줄 수 있는 開發된 藥物들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor)로 lecithin, 수용체 활성제(receptor agonist)로 RS-86, nicotine 등이 있으며³⁶⁾, 아세틸콜린 분해억제제(acetylcholinesterase inhibitor)로 FDA의 承認을 받아 國內에서도 市販 使用중인 tacrine(tacrine)와 最近에 承認된 E2020(aricept)등이 있으며 이런 藥物들은 아세틸콜린이라고 하는 神經傳達物質의 분해를 막아주어 減退된 認知機能을 改善시켜주는 效果를 가지고 있다^{34,37)}. 이들은 비록 效果가 一時的이고 微弱하며 深刻한 毒性 때문에 아직 使用에 論難의 餘地가 많은 狀態이긴 하지만 現在까지 다른 機轉을 갖는 어떤 腦機能 改善制들보다 알츠하이머병의 治療劑로서 效果가 가장 優秀한 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 그러나 아직까지 이 疾患을 根本의으로 治療할 수 있는 藥物들의 開發을 위해서는 時間과 努力이 더 必要할 것으로 思料된다.

韓醫學에서의 痴呆는 明代의 張⁸⁾에 의해서 최초로 言及되었는데, “癡狂痴呆”에서 “痴呆症, 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮 或以疑惑 或以驚恐而漸致痴呆 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”이라 하여 情緒的인 문제로 나타나는 人格 및 行動의 障礙에 대해 言及하였고, 陳¹⁰⁾은 “此等症雖有崇憑之 實亦胸腹之中 無非痰氣...”라 하여 痰이 原因이 됨을 言及하였고, 錢⁹⁾은 “大約其始也 起於肝氣之鬱 其終也 由於胃氣之衰 肝鬱則木克土 而痰不能化... 于是痰積於胸中 ... 使神明不清 而成呆病矣”라 하여 肝氣鬱滯와

胃氣虛가 原因으로 痴呆가 發生한다고 하였다.

痴呆의 治法에 있어서는 張⁸⁾은 “然此證有可愈者 有不可愈者 亦在乎胃氣元氣之強弱...”이라 하여 益氣를, 陳¹⁰⁾은 “治痰則治呆也”라 하여 去痰을 強調하고 있으며, 錢⁹⁾은 “治法開鬱逐痰 健胃通氣”라 하여 消痰開鬱 健胃를 提示하고 있다.

以上과 같이 痴呆의 原因으로는 思慮過多, 驚恐, 肝氣鬱結, 胃氣衰退, 痰 등이 있으며, 益氣, 健胃, 去痰, 開鬱 등의 治法이 症狀에 따라 運用되고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

또한 痴呆의 1차적 症狀인 記憶力 障礙와 關聯性이 있는 健忘을 보면 《靈樞·大惑論》³⁹⁾에서 “上氣不足 下氣有餘 腸胃實而心肺虛 虛則營衛留于下 久之不以時上 故善忘也”라 하여 최초로 言及하고 있으며, 그 이후 文獻들에서도 《濟生方·健忘論治》⁴⁰⁾에서 “常常喜忘是也”라 하였고, 朱⁴¹⁾는 “事有始無終 言談不知首尾 此以爲病之名 此非生成之愚頑 不知人事者”라 하였고, 《萬病回春》⁴²⁾에서 “涉然而忘其事也”라 하여 AD와 유사한 症狀들이 많이 表現되어 있으며, 原因으로는 思慮過度⁴⁰⁾, 心氣不足⁴²⁾, 心腎不交⁴³⁾, 痰⁴¹⁾ 등이 있으며, 治療에 있어서는 養血理脾⁴⁰⁾, 補心生血⁴²⁾, 心腎交通⁴³⁾ 등의 治法을 提示하였다.

補益清腦湯은 半夏白朮天麻湯의 가감방인 清腦湯¹¹⁾에 去痰開竅 安神益智하는 遠志와 石菖蒲¹²⁾, 補肝腎 益精血하는 何首烏¹²⁾를 加하고, 補脾益氣 寧神益智하는 人蔘과 黃芪¹²⁾를 增量한 處方으로 痴呆의 原因이 老化에 따른 脾胃氣虛 痰氣鬱滯로 인해 發生하는 痴呆에 去痰益氣를 목적으로 사용하고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

補益清腦湯의 個別 藥劑에 대한 本草學的 效能을 살펴보면¹²⁾. 大補元氣 補脾益氣 寧神益智하는 人蔘, 黃芪, 白朮, 補肝腎 益精血하는 何首烏, 去痰開竅 安神益智 寧心安神하는 遠志, 石菖蒲, 白茯苓, 消食和胃 散瘀行滯하는 山楂, 神曲, 麥芽, 燥濕健脾 去風濕하는 蒼朮, 溫中回陽 溫肺化痰하는 乾薑, 理氣健脾 燥濕化痰하는 陳皮, 半夏, 利水滲濕하는 澤瀉, 赤茯苓, 息風鎮痙 止頭暈痛하는 天麻, 滋陰潛陽 益腎健骨하는 龜板으로 구성되어 있다.

이에 著者は 補益清腦湯이 痴呆治療에 活用될 수 있을 것으로 生覺되어 본 實驗을 實施하였다.

본 實驗은 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 補益清腦湯의 細胞毒性을 측정하였고, PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯을 RT-PCR로 觀察하였고, PC-12 cell 세포주의 세포성 단백질에서 AChE의 활성도를 측정하였으며, APP, PS-1, PS-2의 발현을 Western blot으로 觀察하였고, 補益清腦湯의 투여와 함께 scopolamine을 복강처리한 SD계 白鼠의 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였으며, 또한 ICR계 생쥐에 補益清腦湯을 투여하고 scopolamine을 복강처리한 후 Videotrack을 통해 행동의 변화를 관찰하여 補益清腦湯의 AD에 대한 豫防 및 治療劑로서의 效能을 實驗적으로 立證하고자 하였다.

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 補益清腦湯의 細胞毒性을 측정하기 위하여 mLFC와 PC-12 세포주를 2.0×10^4 개의 세포로 96 well plate에 나누고 37 °C, 5% CO₂상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 補益清腦湯 추출물(최종 농도 400 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 72시간 동안 처리하여 사용하였다. 측정된 결과를 보면, 400, 200 μ g/ml의 실험군이 mLFC와 PC-12 細胞에서 細胞毒性을 나타내었는데 반해, 100 μ g/ml이하의 實驗群에서는 細胞毒性을 나타내지 않아 100 μ g/ml이하로 실험을 실시하였다(Table I).

PC-12 cell은 24 well plate에 1×10^6 세포로 각 well에 분주하고, 補益清腦湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 PMA와 rIL-1 β (100ng/ml)를 처리한 후 24시간 동안 배양하여 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)과 PMA, rIL-1 β 를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)과 PMA를 동시 배양한 후 3회 D-PBS로 세포를 수세한 후 세포성 lysate를 얻어 Western blot에 사용하였다.

AChE mRNA의 發顯에 있어서 100, 10 μ g/ml의 補益清腦湯과 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 함께 처리한 實驗群은 補益清腦湯의 비율과 관계없

이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 처리한 對照群에 비해 AChE의 發顯을 抑制했으며, NOsII mRNA의 發顯에서도 實驗群은 對照群에 비해 NOsII의 發顯을 抑制했음을 볼 수 있었다(Table II).

PC-12 cell의 AChE activity는 對照群에 비해 100 μ g/ml 實驗群에서만 유의성 있는 減少를 보였으며, APP 發顯 抑制 效果는 正常群에 비해 PMA만을 투여한 對照群에서 현저하게 發顯되었으나, PMA와 補益清腦湯을 함께 처리한 實驗群에서는 發顯이 抑制되었음을 볼 수 있었다. 그리고 PS-1과 PS-2發顯 抑制 效果에서도 正常群에 비해 對照群에서 현저하게 發顯되었으나, 實驗群에서는 發顯이 抑制되었음을 볼 수 있었다(Table III, Fig. 1, Fig. 2).

本 實驗에서 PC-12 세포주에서 PS-1, PS-2와 APP 發顯의 過剩發顯을 觀察하였고, 補益清腦湯을 處理하여 發顯을 抑制하는 效果를 Western blot으로 確認하였다. 그러나 PS의 抑制에 의한 APP 發顯이 cascade 反應으로 줄어드는지는 PKC와 MAPK 機轉을 確認해야 할 것으로 生覺된다.

PMA(phorbol esters)의 刺戟으로 PKC(protein kinase C)가 PC-12 세포주에서 APP(clone ; 22C11)를 分泌를 顯著하게 增加하는 것으로 알려져 있다. 또한 PC-12 세포주는 PS-1 遺傳子가 突然變異로 過剩發顯 (overexpression)되어 cascade로 APP도 發顯이 된다.

AD 患者에서 glucose의 增加는 記憶力を 增進시키는 蛋白質로 알려져 있으며, scopolamine을 注射한 흰쥐에서 uric acid의 數值가 증가되었다는 報告가 있고, scopolamine을 흰쥐에 注射하면 acetylcholinesterase가 증가하여 acetylcholine의 量이 감소하여 記憶과 認識의 障礙를 誘發하게 되므로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 흰쥐의 髓구세포와 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 效果를 분석하였다. 30週齡 SD 계 白鼠 5마리를 1群으로 하여 對照群, tacrine을 투여한 陽性對照群(10mg/kg), 補益清腦湯을 투여한 實驗群(250mg/kg)으로 나누고, 각각 scopolamine

(1mg/kg)을 7日間 1日 1回 腹腔 注射하면서 약물 을 함께 투여하였고, 藥物投與 10日 後 SD계 白鼠에서 直接 心臟採血法으로 10ml의 血液을 포집 하였다. 그 中 2ml는 CBC bottle에 넣어 측정하였으 며, 혈청내 glucose, uric acid의 양과 AChE activity를 측정하였다.

백혈구와 적혈구에서는 對照群, 陽性對照群, 實驗群이 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 혈소판은 對照群과 陽性對照群은 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나, 實驗群은 유의성 있는 감소를 보였다(Table IV).

Glucose는 正常群과 對照群에 비해 陽性對照群과 實驗群은 유의성 있는 상승을 보여주었고, uric acid는 正常群과 對照群에 비해 陽性對照群과 實驗群은 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity에서도 陽性對照群과 實驗群 모두 유의성 있는 감소를 보여주어, 補益淸腦湯이 혈청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과가 있음을 관찰할 수 있었다(Table V).

Scopolamine 투여로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석하기 위하여 ICR계 생쥐를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하여 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 對照群, tacrine을 투여한 陽性對照群(10mg/kg), 補益淸腦湯을 투여한 實驗群(250mg/kg)으로 분류하였고, 계속 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였으며, 훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1mg/kg)을 복강에 처리한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 Videotrack으로 행동을 측정하였고 그 결과를 Videotrack software로 분석하였다. 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 時間은 陽性對照群과 實驗群이 모두 對照群에 비해 유의성 있는 감소를 보여, scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果를 나타내었다(Table VI).

訓練 學習된 생쥐가 pool에서 platform으로 올

라갈 때까지 pool에서 움직이는 運動量을 threshold 로 指定하여 적은 運動量(small movement ; smldist)과 많은 運動量(large movement lardist)을 分析한 結果를 보면 smldist는 正常群에 비해 對照群이 顯著한 運動量 증가를 나타내었는데 반해, 陽性對照群과 實驗群은 모두 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量 감소를 나타내었으며, lardist에서도 對照群이 顯著한 運動量 증가를 나타내었는데 반해, 陽性對照群과 實驗群은 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量 감소를 나타내었다(Table VI).

이상의 實驗結果를 綜合해 보면, PC-12 cell에서 AChE와 NOsII mRNA의 發顯을 抑制 效果와 PC-12 세포주에서 APP, PS-1, PS-2의 發顯 감소 효과에 있어서는 유의성 있는 결과를 보였으며, Morris water maze를 이용한 記憶의 實驗에서 實驗群이 유의성 있는 記憶力 改善 效果를 보여 주었다. 이는 補益淸腦湯이 減退된 콜린성 神經系에 대한 AChE 阻害劑로 作用할 수 있음을 말해주는 것으로, scopolamine을 投與한 환경에서 血清蛋白質을 分析한 結果 對照群(scopolamine만 투여)에 比하여 實驗群에서 glucose의 증가와 uric acid의 감소, 그리고 AChE의 유의성 있는 감소 효과를 보여 주었다. 따라서 補益淸腦湯이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APPs 過剩發顯 抑制能力을 보이는 것으로 보아 AD의 豫防과 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

V. 結 論

參 考 文 獻

補益清腦湯이 健忘症 생쥐모델의 學習과 記憶의 減退 및 항콜린성 作用에 미치는 影響을 검증하기 위해 mLFC와 PC-12 cell에 대한 細胞毒性, PC-12 cell에서 AChE, NOs II의 유전자 발현, AChE의 활성도, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 측정하였고, scopolamine을 복강치리한 흰쥐의 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였으며, Videotrack을 통해 行動의 變化를 觀察하여, AD에 대한 豫防 및 治療劑로서의 效能을 觀察한 결과로 다음과 같은 유의성 있는 結論을 얻었다.

1. 補益清腦湯은 100 μ g/ml이하에서는 mLFC와 PC-12 cell에서 細胞毒性을 나타내지 않았다.
2. 補益清腦湯은 PC-12 cell에서 AChE, NOs II mRNA의 발현을 억제하였다.
3. 補益清腦湯은 PC-12 cell에서 100 μ g/ml 실험군이 AChE의 활성도를 억제하였다.
4. 補益清腦湯은 PC-12 cell에서 APP와 PS-1, PS-2 발현을 억제하였다.
5. 補益清腦湯은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 흰쥐의 혈청을 분석한 결과, 유의성 있는 glucose의 증가와 uric acid의 감소, 그리고 AChE 활성도의 감소를 보여 주었다.
6. 補益清腦湯은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 보여 주었다.

以上の 結果는 補益清腦湯이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 過剩發顯 抑制能力을 보이는 것으로 AD 治療의 豫防과 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

1. Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK : Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cell. Neurosci Lett 128:126~128. 1991
2. Fukuyama R, Chandrasekaran K, Rapoport SI : Nerve growth factor induced neuronal differentiation is accompanied by differentiated induction and localization of the amyloid precursor protein(APP) in PC12 cells and variant PC12S cells. Mol Brain Res 17:17~22. 1993
3. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ : Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. Nature 359:322~325. 1992.
4. 김명호 : 치매(Dementia)의 정의와 분류, 대한신경과학회지, 3(1):1~4, 1985.
5. 박종한 : 치매의 원인과 치료, 대한정신약물학회지, 3(1):33~40, 1992.
6. Bierer L. M., Haroutunian V., Gabriel S., Knott P. J., Carlin L. S., Purohit D. P., Perl D., Dchmeidler J., Kanof P., and Davis K.L.: Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. J. Neurochem. 64:749-760. 1995.
7. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L : Cellular signaling roles of TGF β , TNF α and β APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. Brain Res Rev
8. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 一中社, p.846, 1992.

9. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990
10. 陳士澤 : 石室秘錄(下), 서울, 書苑堂, pp.316~317, 1984.
11. 美術公論社 韓醫學事業部 : 韓方臨床處方大全 大田附屬韓方病院 院內處方篇, 서울, 美術公論社, p.29, 1996.
12. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林出版社, pp.166~167, p.169, 172, 220, 239, 251, pp.252~253, p.260, pp.370~371, 374~375, p.380, 415, 422, 423, pp.424~425, 556~558, p.657, 1989.
13. 蘇敬順 : 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.
14. 손정석 : 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):25~38, 1997.
15. 金保罔 : 蓼茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 9(1):59~72, 1998.
16. 金聖鉉 : 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):39~50, 1997.
17. 徐元熙 : 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 9(1):45~58, 1998.
18. 鄭仁哲 : 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):51~62, 1997.
19. Smith CP, Bores GM, Petko W, Li M, Selk DE, Rush DK, Camacho F, Winslow JT, Fishkin R, Cunningham DM, Brooks KM, Roehr J, Hartman HB, Davis L, Vargas HM : Pharmacological activity and safety profile of P10358, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease, J Pharmacol Exp Ther, 280(2):710~720, 1997.
20. Walsh TJ, Herzog CD, Gandhi C, Stackman RW, Wiley RG : Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits, Brain Res, 726(1~2):69~79, 1996.
21. Gomez-Isla T., Price J. L., McKeel D. W. Jr. Morris J.C., Growdon J.H., and Hyman B.T.: Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. J. Neurosci. 16, 4491~4500, 1996.
22. 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.
23. Zor T · Selinger Z : Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem, 236(2):302~308, 1996.
24. Daniel WW : Biostatistics ; a foundation for analysis in the health science, pp.136~146, 1983.
25. Hamdy RC, Turnbull JM, Clark W, Lancaster MM : Alzheimer's disease : A handbook for caregivers 2nd ed Mosby, 102~116, 1994.
26. Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P: Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA 89:3055~3059, 1992.
27. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS : Familial Alzheimer's disease-linked

- presenilin 1 variants elevate $A\beta_{1-42}$ /1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005~1013, 1996.
28. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez 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.* 2:1146~1150, 1996.
29. 徐敏華 : 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化和 神經細胞의 損傷에 미치는 影響, 圓光大學校大醫院, 1996.
30. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA., An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7247~7251, 1991.
31. Breakfield XO and DeLuca NA, Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol.* 3:203~218, 1991.
32. Selkoe DJ., *Scientific American*, November, 68~72, 1991.
33. Weinstein HC, Scheltens P, Hijdra A., et al., Neuroimaging in the diagnosis of Alzheimer's disease II. Positron and single photon emission tomography. *clinical Neuro. Neurosurg.* 95:81~91, 1993.
34. Echoers MRW, Riorcon JF: Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 30:10065~10074, 1991.
35. Park C. H., Kim S. H., Choi W., Lee Y.J., Kang S. S., Kim J. S., and Suh Y.H.: Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine HCL, A constituent of *Evodia rutaecarpa*, *Planta Medica* 62:405~409, 1996.
36. Lines, C. R., J. H. Ambrose, A. Heald, and M. Traub. : A double-blind, placebo-controlled study of the effects of eptasigmine on scopolamine-induced cognitive deficits in healthy male subjects. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 8:271~278, 1993.
37. Meltzer, H. Y., B. L. Chai, P. A. Thompson, and B. K. Yamamoto. : Effect of scopolamine on the efflux of dopamine and its metabolites after clozapine, haloperidol or thioridazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:1452~1461, 1994.
38. Saponjic, R. M., K. Mueller, D. Krug, and P. M. Kunko. : 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.* 48:161~168, 1994.
39. 洪元植 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.342, 1985.
40. 嚴用和 : 濟生方, 中國醫學大系 中 11卷, 서울, 麗江出版社 影印, p.487, 1980.
41. 朱震亨 : 金匱鉤玄, 서울, 鼎談出版社, p.727, 1992.
42. 龔廷賢 : 萬病回春, 香港, 香港宇宙出版公社, p.225, 1988.
43. 李中梓 : 醫宗必讀, 上海, 上海科學技術出版社, p.323, 324, 1987.