

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 13 No. 1, 2002

加減固本丸이 痴呆病態모델에 미치는 影響

하수영 · 정인철 · 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of KakamGoBonHwan (KGBH) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia mice

Su-Young Ha, In-Cheol Jung, Sang-Ryong Lee

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon 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) overexpression.

The present research is to examine the inhibitory effect of KGBH on PS1, PS2 and APPs overexpression detected by Western blotting. To verify the Effects of KGBH 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 were ameliorative effects on memory impairment as a protection against scopolamine. KGBH only partially blocked the increase in blood serum level of acetylcholinesterase and Uric acid induced by scopolamine, where as blood glucose level was shown to attenuate the amnesia induced by scopolamine and increased extracellular serum level.

In conclusion, studies of KGBH that has been known as anti-choline and inhibitory abilities of APPs overexpression, 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, Herb medicine(KGBH).

緒 論

痴呆란 老年기에 자주 發生하는 腦變性疾患으

로 知能의 喪失을 特徵으로 하는 臨床症候群^{1,2)}이며, 주로 腦質量의 減少, 腦神經細胞數의 減少, 神經細胞內的 沈着物 生成, 血管의 老化 등의 形態學的 變化를 나타낸다³⁾.

痴呆 患者 중 50%가 알츠하이머型이며, 血管性이 22%, 두가지가 동시에 오는 경우가 14%이며, 나머지 14%가 原因的 治療가 可能한 憂鬱性

· 교신저자 : 하수영, 경기도 남양주시 오남면 양지리 96 오남한의원 (Tel. 031-527-1075, Fax 031-527-1075, E-mail: heojun21@hanmail.net)

假性痴呆와 水頭症, 硬膜下血腫, 神經梅毒, 代謝性 및 內分泌疾患으로 誘發되며⁴⁾, 60-65歲的境遇 1000名 당 1名, 65歲 以上에서는 100名 당 4名, 85歲 以上에서는 약 절반 정도의 有病率을 나타내며⁵⁾, 우리나라에서도 痴呆 患者가 老人 人口의 약 10%에 달한다^{6,7)}.

韓醫學에서는 明代 張⁸⁾이 《景岳全書·癲狂癡呆》에 처음으로 “痴呆”라는 病名을 記述하고 있으며, 清代 陳 등이 《辨證奇門》⁹⁾과 《石室秘錄》¹⁰⁾에 痴呆의 類似概念으로 “呆病”을 言及하였고, 《內經》^{11,12)}과 歷代醫書^{13,14)}에서도 健忘 등의 類似한 症狀들을 言及하였으며, 그 原因은 痰飲, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷 등^{8,9,15-17)}으로 要約된다.

加減固本丸은 《東醫寶鑑·神門》¹⁸⁾에 收錄된 加減固本丸에 安神益智하는 白茯神을 加味한 處方으로 臨床에서 주로 老人性 健忘症과 中風後 健忘症 등을 治療하는 데 活用하고 있다.

最近의 韓醫學영역에서의 痴呆研究를 살펴보면 아밀로이드 전구단백질(APP)과 presenilin 遺傳子の 過多 發顯에 對한 研究¹⁹⁻²³⁾, 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究^{24,25)}, 白鼠의 記憶과 行動에 대하여 Morris water maze²⁶⁾와 Radial arm maze²⁷⁾의 두 部分의 課題를 통한 研究가 이루어졌으나 加減固本丸이 痴呆 모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 接하지 못하였다.

이에 著者는 老人性, 中風性 健忘症에 使用되는 加減固本丸¹⁸⁾이 痴呆의 治療에 活用될 수 있는지를 實驗으로 檢證하고자, mLFC와 PC-12 cell을 分離하여 加減固本丸의 細胞毒性을 測定하였고, 加減固本丸과 PMA와 rIL-1 β 를 處理한 후 PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 유전자 발현과, AChE의 활성도, APP, PS-1, 2의 發顯을 測定 및 觀察하였고, 加減固本丸의 投與와 함께 scopolamine을 복강처리한 白鼠의 혈청 중 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, 測定하여 有意한 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

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/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 \pm 2 $^{\circ}$ C, 相對濕度 50 \pm 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

本 實驗에 使用한 加減固本丸의 處方構成은 《東醫寶鑑》¹⁸⁾의 加減固本丸을 基準으로 白茯神을 加味하였으며 使用한 藥劑는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 후 精選하여 使用하였고, 處方 1첩의 內容과 用量은 다음과 같다.

Prescription of KakamGoBonHwan(KGBH)

韓藥名	生藥名	用量(g)
丹 參	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	6.0
熟地黃	<i>Rehmannie Radix Preparat</i>	6.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	6.0
白茯神	<i>Poria</i>	6.0
白茯苓	<i>Poria</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2.0
遠 志	<i>Polygalae Radix</i>	2.0
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	2.0
朱 砂	<i>Cinnabaris</i>	2.0
Total amount		44.0

3) 檢液의 調製

加減固本丸 3貼 分量 132g을 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(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(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, 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), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator (녹십자, Korea), Minos-ST (Cobas Co., France),

centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Swiss), 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 測定

(1) mLFC와 PC-12 cell의 培養

mLFC는 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% CO_2 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 10^5 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 gentamycin이 함유된 배양액에 37°C , 5% CO_2 상태의 培養器에서 배양하였다.

(2) 細胞毒性 測定

세포독성 측정방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell를 2.0×10^4 개의 세포로 96 well plate에 나누고

37 °C, 5% CO₂상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 加減固本丸 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 실온에서 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 測定

(1) AChE, NOsII mRNA 發顯 測定

① mRNA 抽出

PC-12 cell은 24 well plate에 1 x 10⁶ 세포로 각 well에 분주하고, 加減固本丸 추출물(100µg/ml, 10µg/ml)을 처리하고 1시간 후 PMA와 rIL-1β (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 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total mRNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5µl 10 mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides (25pmole/25µl), RNA inhibitor로써 1µl RNase inhibitor(20 U/µl), 1µl 100 mM DTT, 4.5µl 5× RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20µl가 되도록 하였다. 이 20µl의 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 system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOsII와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/µl)와 antisense primer(20pmole/µl)를 혼합하여 1µl를 가하고, 다시 3µl 2.5mM dNTPs, 3µl 10×PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18µl Taq polymerase(5U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30µl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95°C, 5분), denaturation (95°C), annealing(55°C, 1분), elongation(72°C, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20µl씩 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'-TCCRAATCTggAACAgCCAg

CTgg-3'

antisence oligonucleotide :

5'-gYTCcATgCAgACAgCCACAT

CCTC-3'

© rat G3PDH

sence oligonucleotide :

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisense 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 測定 및 Western blot 分析

① 細胞性 蛋白質 抽出

PC-12 cell에 加減固本丸 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, 加減固本丸 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 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 μ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법으로 단백질을 정량하였다.

② AChE activity 測定

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 分析

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 처리하

여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab과 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

3) Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠 모델의 血液分析

(1) 藥物 投與 및 scopolamine 注射

老化(30週齡) SD계 白鼠 5마리를 1群으로 하여 대조군, tacrine을 투여한 양성대조군(10mg/kg), 加減固本丸 투여군(200mg/kg)으로 나누고, 각각 scopolamine(1mg/kg)을 7日間 1日 1回 腹腔注射하면서 약물을 함께 투여하였다.

(2) WBC, RBC, PLT의 變化 測定

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 測定

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

(4) AChE activity 測定

血清내 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 吸光度를 測定하였다. 그 結果를 使用하여 $\Delta A = A_{BLANK} - A_{TEST}$ 公式에 의해 검장선에서 活性度를 測定하였다.

4) Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐 모델의 Morris water maze 實驗을 통한 記憶力減退 抑制 效果 測定

(1) ICR계 생쥐의 反復 學習 및 藥物 投與

ICR계 생쥐를 1주일간 Morris water maze에 서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 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 대조군, tacrine을 투여한 양성대조군(10mg/kg), 加減固本丸 투여군(250mg/kg)으로 분류하였고 계속 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 實驗

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)로 행동을 측정하였고 그 결과를 Videotrack software로 분석하였다.

3. 統計 分析

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 有意性 檢證은 Student's T-test를 이용하였다.

成績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 細胞毒性

mLFCs의 생존율은 대조군이 100±4.4%로 나타났고 100, 50, 10, 1µg/ml의 加減固本丸 투여군이 각각 94±4.1, 93±5.2, 97±4.2, 95±3.2%로 유의성 있는 변화가 없었고, 400, 200µg/ml의 加減固本丸 투여군이 각각 77±3.7, 86±5.5%로 유의성 있는 감소를 나타냈고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±3.5%로 나타났고, 100, 50, 10, 1µg/ml의 加減固本丸 투여군이 각각 92±4.2, 94±6.7, 103±4.3, 101±4.1%로 유의성 있는 변화가 없었고, 400, 200µg/ml의 加減固本丸 투여군이 각각 67±5.0, 75±3.5%로 유의성 있는 감소를 보여 주었다(Fig. 1).

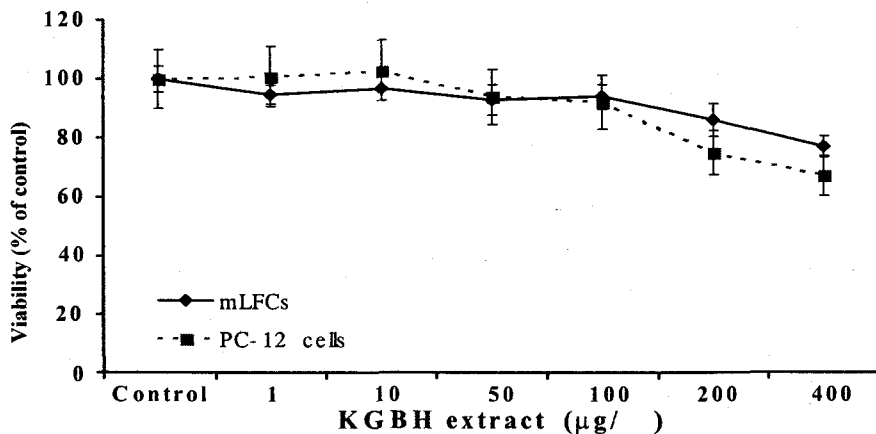


Fig 1. Cytotoxicity of KGBH extract on mLFC and PC-12 cell.

Control : Non-treatment group.

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

* : Statistically significant value compared with control group 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 遺傳子 發顯

AChE 유전자의 발현에 있어서 정상군은 25Ht로 나타났고 rIL-1 β & PMA만을 처리한 대조군은

58Ht로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 μ g/ml의 加減固本丸과 rIL-1 β & PMA를 함께 처리한 투여군은 각각 11, 13Ht로 加減固本丸의 비율과 관계없이 rIL-1 β & PMA를 처리한 대조군에 비해 AChE의 발현이 감소되는 경향이 나타났다(Fig. 2).

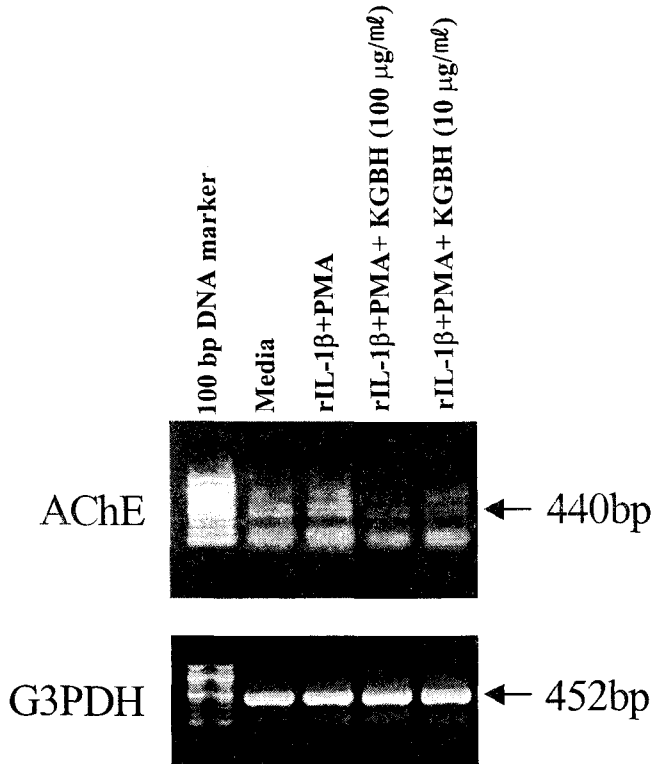


Fig. 2. Inhibitory of effects of KGBH extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with PMA and rIL-1 β .

Normal : Non-treatment group.

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

KGBH : Group pretreated with various concentration (10 μ g/ml, 100 μ g/ml) KGBH extract for 24hrs. PC-12 cells were pretreated with various concentration KGBH extract in the presence or absence rIL-1 β and PMA(100ng/ml) for 6hrs(IL-1 β & 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. Other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 56Ht으로 나타났고 rIL-1 β & PMA만을 처리한 대조군은 170Ht으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 μ g/ml의 加減固本丸과 rIL-1 β & PMA를 함께

처리한 투여군은 각각 58, 65Ht로 加減固本丸의 비율과 관계없이 rIL-1 β & PMA를 처리한 대조군에 비해 NOsII의 발현이 감소되는 경향이 나타났다(Fig. 3).

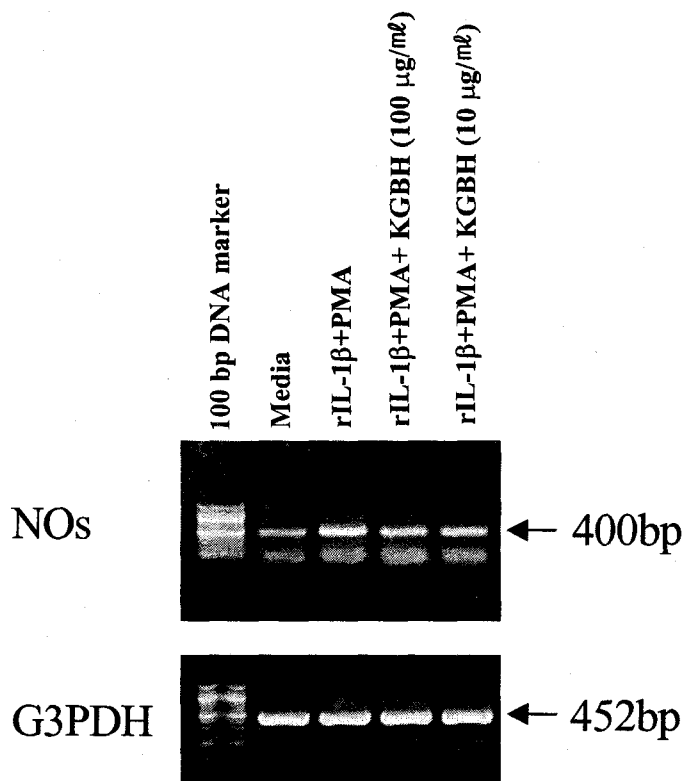


Fig. 3. Inhibitory effects of KGBH extract on NOs II mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with PMA and rIL-1 β .

Normal : Non-treatment group.

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

KGBH : Group pretreated with various concentration (10 μ g/ml, 100 μ g/ml) of KGBH extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration KGBH extract in the presence or absence of rIL-1 β and PMA(100ng/ml) for 6hrs(IL-1 β & 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 抑制
정상군의 AChE activity는 $37 \pm 2.5\%$ 였고 대조
군은 $100 \pm 4.6\%$ 으로 나타났는데, 100, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의

加減固本丸 투여군은 각각 45 ± 3.5 , $57 \pm 2.8\%$ 로
나타나 감소되는 경향을 보였다(Fig. 4).

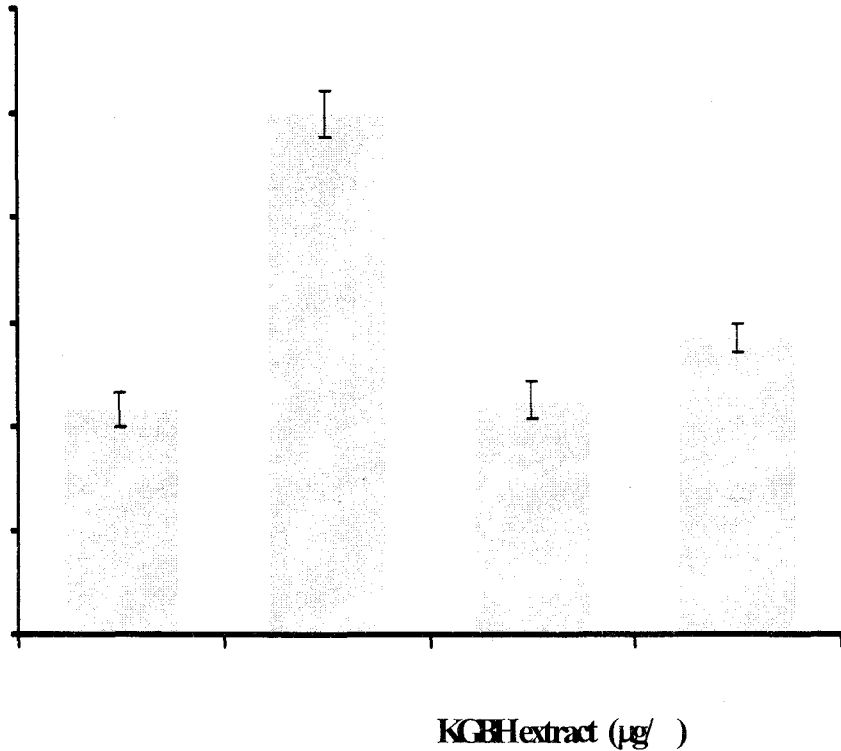


Fig. 4. Inhibitory effect of KGBH extract on the acetylcholinesterase activity in PMA and rIL-1 β stimulated PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

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

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

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

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

3) APP 發顯

APP는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, PMA와 加減固本

丸을 함께 처리한 투여군에서는 감소되는 경향이 나타났다(Fig. 5).

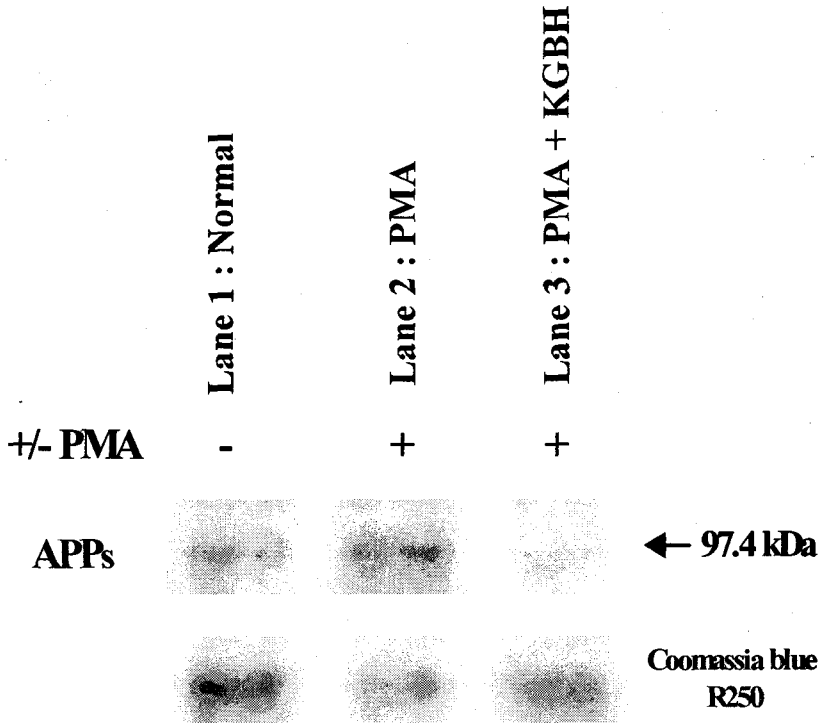


Fig. 5. KGBH inhibits expression of APP secretion in PC-12 cell.

- Lane 1 : non-treatment
- Lane 2 : PMA(100ng/ml)
- Lane 3 : PMA(100ng/ml) + KGBH(100µg/ml)

PC-12 cells were pretreated without or with KGBH(100µg/ml) extract in the presence or in PC-12 cell.

- Lane 1 : non-treatment
- Lane 2 : PMA(100ng/ml)
- Lane 3 : PMA(100ng/ml) + KGBH(100µg/ml)

PC-12 cells were pretreated without or with KGBH(100µg/ml) extract in the presence or absence of 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 KGBH and internal control Coomassia blue R250 staining.

4) PS-1, PS-2 發顯

加減固本丸 투여군에서는 발현이 감소되는 경

향 나타났으나, PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, PMA와

향 나타났다(Fig. 6).

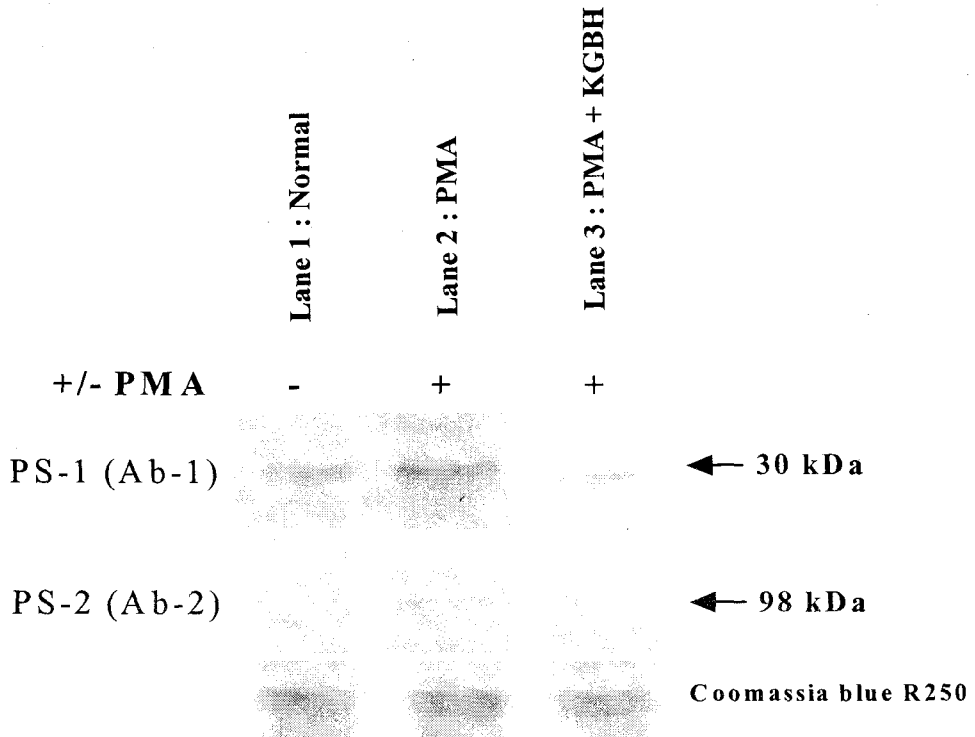


Fig. 6. KGBH inhibits expression of PS-1(Ab-1) and PS-2(Ab-2) secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment

Lane 2 : PMA(100ng/ml)

Lane 3 : PMA(100ng/ml) + KGBH(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 KGBH and internal control Coomassia blue R250 staining.

3. Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠 모델의 血液에 대한 영향

1) WBC, RBC, PLT에 미치는 영향

WBC는 정상군이 $11.8 \pm 0.6 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, 대조군이 $11.0 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 11.6 ± 0.5 , $11.1 \pm 0.9 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 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 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 8.2 ± 0.2 , $8.0 \pm 0.5 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. PLT는 정상군이 $771 \pm 13.0 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $984 \pm 47.8 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군은 $955 \pm 75.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 加減固本丸 투여군은 $799 \pm 24.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 유의성 있는 변화를 보였다(Table 1).

Table 1. Effects of KGBH on the Blood cells of Scopolamine-induced Amnesia Rat.

Group	Normal	Control	Tacrine	KGBH
WBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$11.8 \pm 0.6^a)$	11.0 ± 0.5	11.6 ± 0.5	11.1 ± 0.9
RBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.2 ± 0.1	8.8 ± 0.4	8.2 ± 0.2	8.0 ± 0.5
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	771 ± 13.0	984 ± 47.8	955 ± 75.9	$799 \pm 24.1^{**}$

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.*).

KGBH : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and KGBH 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 KGBH or Tacrine · HCl and were injected scopolamine(1mg/kg) once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed as described in *Material and Methods*.

2) Glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 영향

Glucose는 정상군이 $110.5 \pm 7.9 \text{mg/dl}$, 대조군이 $100.5 \pm 8.6 \text{mg/dl}$ 으로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 138.7 ± 6.2 , $152.2 \pm 3.5 \text{mg/dl}$ 로 나타나 모두 유의성 있는 상승을 보여주었다. Uric acid는 정상군이 $1.67 \pm 0.22 \text{mg/dl}$, 대조군이 $2.29 \pm 0.13 \text{mg/dl}$ 으로 나타났

고 tacrine을 투여한 양성대조군은 $1.31 \pm 0.09 \text{mg/dl}$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈고 加減固本丸 투여군은 $1.74 \pm 0.04 \text{mg/dl}$ 로 역시 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity는 정상군이 $16.4 \pm 1.3 \text{U/ml}$, 대조군이 $35.3 \pm 1.5 \text{U/ml}$ 로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 21.2 ± 0.7 , $24.7 \pm 3.2 \text{U/ml}$ 로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 7~9).

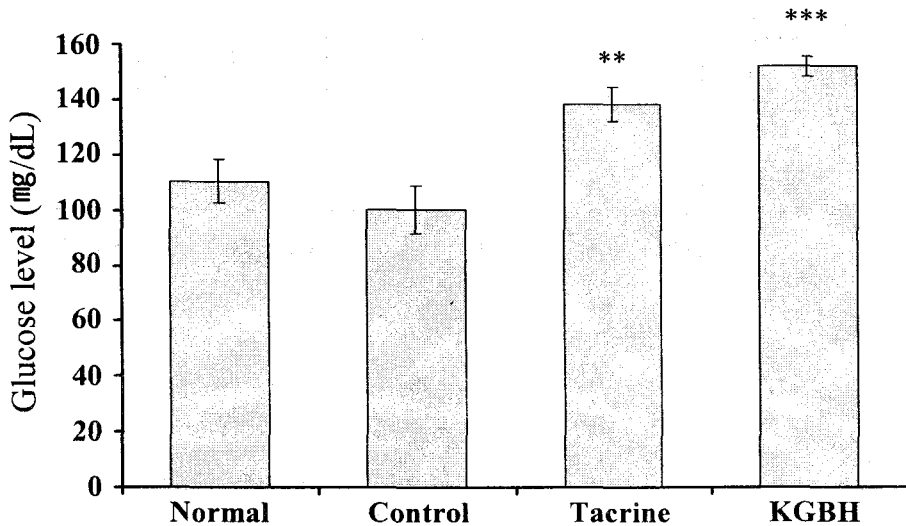


Fig. 7. Effects of KGBH on the glucose in the serum level of scopolamine-induced amnesia rat.

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.*).

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

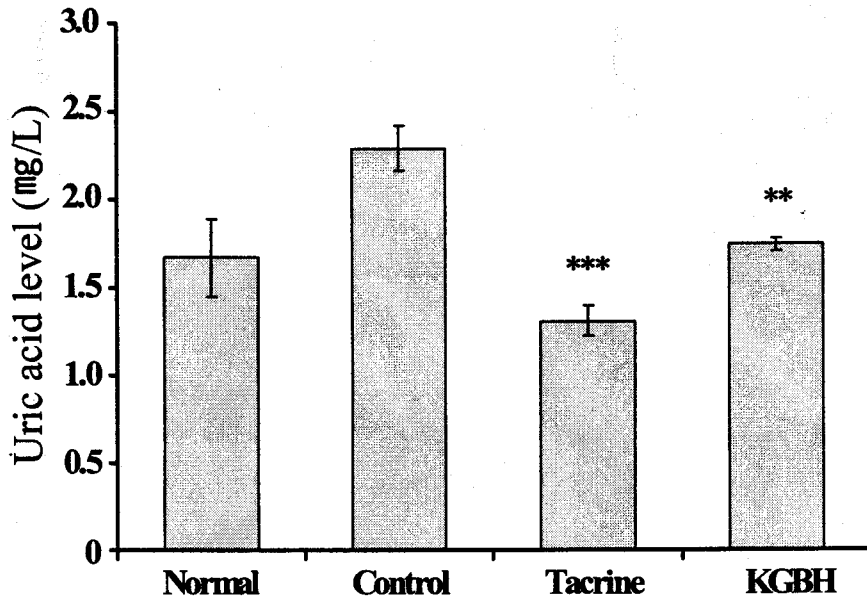


Fig. 8. Effects of KGBH on the Uric acid in serum level of scopolamine-induced amnesia rat.

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.*).

KGBH : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and KGBH 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 KGBH or Tacrine · HCl and the injection of scopolamine(1 mg/kg) continued once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed for serum level as described in *Material and Methods*.

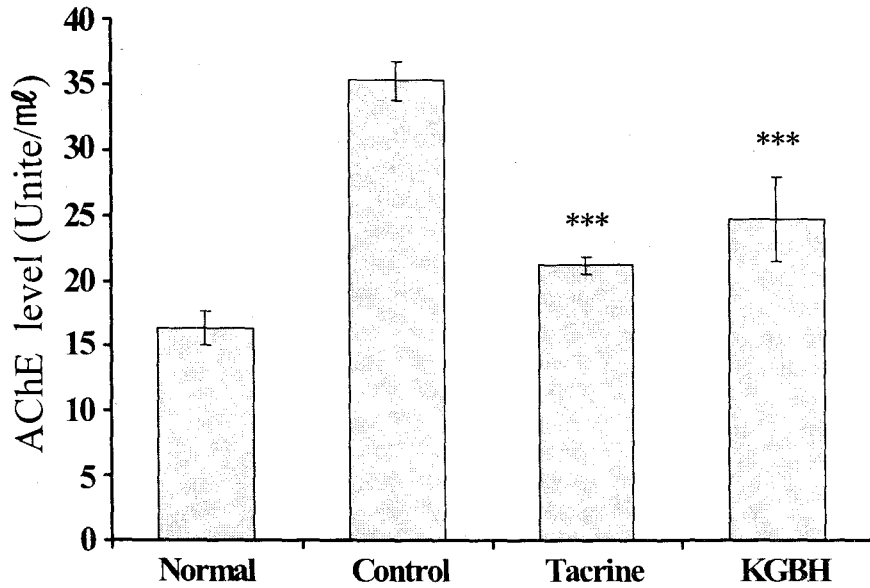


Fig. 9. Effects of KGBH on the AChE in serum level of scopolamine-induced amnesia rat.

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.*).

KGBH : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and KGBH 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 KGBH or Tacrine · HCl and the injection of scopolamine(1 mg/kg) continued once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed for serum level as described in *Material and Methods*.

4. Scopolamine投與로 誘導된 記憶力 減退 생쥐 모델의 Morris water maze 實驗을 통한 記憶力減退 抑制 效果

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 時間은 정상군이 11.2±3.4(sec), 대조군이 80.6±3.9(sec)로 나타났고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 15.2±4.0(sec), 加減固本丸 투여군은 24.5±3.9(sec)로 모두 유의성 있는 감소를 보여 주었다. 적은 운동량(small movement ; smldist)

은 정상군이 182±25.2(cm), 대조군이 1540±187(cm)로 나타났고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 243±42.4(cm), 加減固本丸 투여군은 451±76.9(cm)로 유의성 있는 감소를 보였으며, 많은 운동량(large movement ; lardist)은 정상군이 71±22.7(cm), 대조군이 751±79.2(cm)로 나타났고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 117±42.1(cm), 加減固本丸 투여군은 170±31.3(cm)으로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 10, 11).

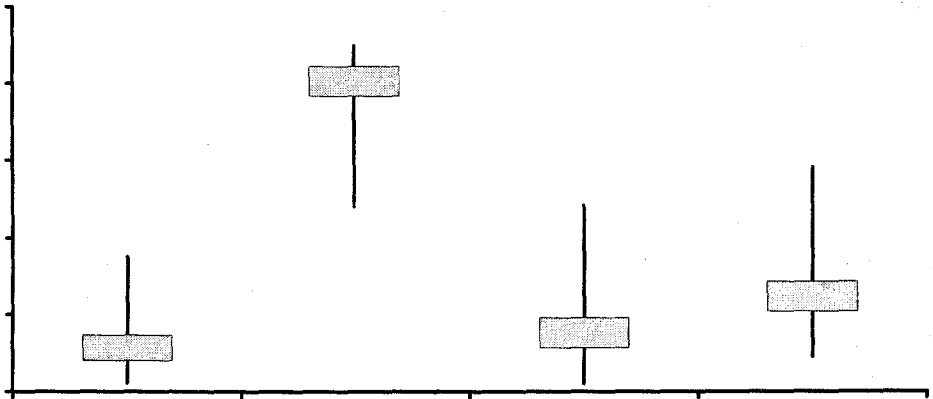


Fig. 10. Effects of KGBH on the scopolamine-induced impairment of memory in the stop-through type Morris water maze test.

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.*).

KGBH : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and KGBH 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.

Smldist : 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 KGBH or Tacrine · HCl and the acquisition training trial 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 after day 7 after the acquisition training trial.

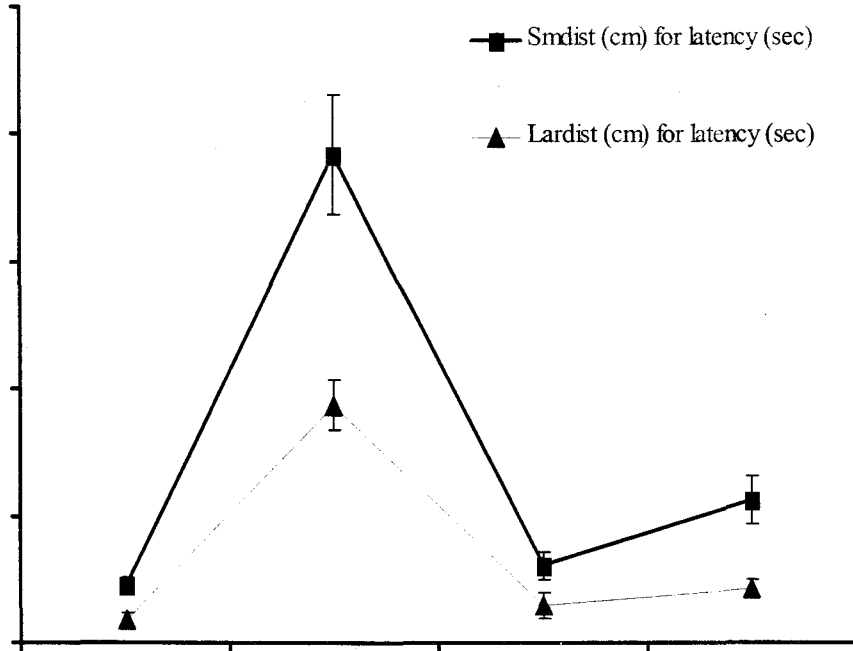


Fig. 11. Effects of KGBH on the scopolamine-induced impairment of memory in the distance movement-through type Morris water maze test.

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.*).

KGBH : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and KGBH 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.

Smdist : 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 KGBH or Tacrine · HCl and the acquisition training trial 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 after the acquisition training trial.

考 察

人間이 점점 環境을 統制하게 되고 특히 傳染病 및 營養失調를 克服하게 됨에 따라 人間の 壽命은 크게 延長되었으며 이로인해 더욱 많은 사람들이 老化라는 損傷過程을 겪게 되었는데 이로인한 老年期 痴呆는 점차 增加趨勢에 있어 深刻한 社會問題로 대두되고 있다²⁸⁾.

痴呆는 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 全體的 障礙를 포함하는 腦疾患에 의한 臨床 症候群이며, 痴呆의 核心的 表現은 抽象的 思考, 判斷, 高位皮質機能, 衝動 制御 障礙, 人格의 損傷이 同伴되는 短期·長期 記憶의 損傷인데^{29,30)}, 漸進的인 記憶力 障礙가 失語症(aphasia), 失認症(認識不能; 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 가져온다^{21,31)}.

이러한 痴呆에는 알츠하이머型 痴呆(Alzheimer's disease; AD), 血管性 痴呆(vascular dementia), 中毒性 痴呆 등이 있으며 이 중에서 알츠하이머병은 50% 이상을 차지하고 있고^{29,30)}, 血管性 痴呆는 20-30% 程度이고 藥物이나 알코올중독에 의한 中毒性 痴呆는 10-20% 程度이며 女性이 男性에 비해서 2-3배정도 더 發病하는 것으로 알려져 있으며³²⁾, 60-65세의 경우 1000명당 1명, 65세 이상에서는 100명당 4명, 85세 이상에서는 약 절반 정도의 有病率을 나타낸다²⁰⁾.

AD(Alzheimer's disease)는 많은 原因에 의해서 誘發되지만 amyloid β protein(A β)의 沈積(deposition)으로 생기는 SPs의 神經毒性(neurotoxic)으로 神經細胞死(neuronal cell death)을 일으키는 것과 과인산화 타우 蛋白質(hyperphosphorylation tau protein)의 沈積에 의한 NFTs의 作用으로 神經退行(neurodegeneration)을 일으키는 것이 대표적³³⁻³⁵⁾인데, 그밖에도 에스트로젠(estrogen), 아포리포단백질 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 있다³⁶⁾.

Amyloid β protein(A β)은 APP의 非正常的인 工程過程으로 생성되는데^{20,21)}, AD의 病理學的 所見인 神經섬유다발(Neurofibrillary tangles; NFTs)과 神經반(neuritic plaque)은 amyloid β protein의 沈着에 의하여 생겨나는 것으로 알려져 있다²²⁾. A β 는 21번 chromosome의 single gene에 编码된 amyloid precursor protein (APP) family로부터 由來되는데, APP는 多樣한 molecular weight form이 있으며 A β sequence를 包含한 가장 풍부한 APP는 含有하고 있는 amino acid의 數에 따라 APP695, APP751, APP770이라고 불린다. APP770은 大部分의 組織에서 dominant(우성) isoform이고 Kunitz protease inhibitor (KPI)와 대단히 비슷한 56-amino-acid domain을 包含하고 있다. APP695는 protease inhibitor domain을 包含하지 않으며 brain에 가장 많이 存在하는 dominant isoform이다. 이러한 組織마다 다른 分布의 原因은 아직 밝혀지지 않았다. 또한 알츠하이머병 患者들과 같은 年齡의 痴呆가 없는 사람들간의 다른 isoform의 APP의 分布도 아직 明確하게 밝혀지지 않았다³⁷⁾. 큰 分子量의 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein ; APP)의 一部分이 β -secretase나 1-secretase에 의해²⁴⁾ 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 있다²³⁾.

최근의 알츠하이머병 患者의 基底 前腦(basal forebrain)와 해마에서 APP의 遺傳子 發顯이 增加되어 있다는 報告, 老化된 纖維亞細胞에서 APP 遺傳子 發顯이 增加되어 있다는 報告, amyloid β protein를 직접 腦에 注射하면 注射部位의 神經細胞가 죽는다는 報告 등을 종합해 볼 때 APP가 老化過程, 특히 痴呆形成 過程에 直接的인 關聯을 가지고 있을 것으로 推論되고 있다³⁸⁾.

AD에 있어서 presenilin의 役割은 現在 糾明 중에 있는데, 지금까지 보고된 바에 의하면 presenilin 突然變異는 presenilin-1의 境遇, 最少 33種類, presenilin-2의 境遇는 3種類 以上이 報告

되어져 있으며, 早期 (early-onset) Alzheimer's disease의 경우 대부분이 presenilin 突然變異에서 起因한다고 生覺되고 있다^{21,25)}. 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 AD를 일으키는 것이다³⁸⁾. 또한 presenilin 1(PS-1)과 presenilin 2(PS-2)이 각각 14번과 1번 染色體에 存在하며, 이 遺傳子의 多様な 突然變異가 早發性, 家族性 알츠하이머병의 70% 以上の 原因임이 報告되었는데³⁹⁾, 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 으로 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 重要な 役割을 하는 것으로 알려져 있다. 最近 역시 C. elegans의 分化 過程에서 細胞內 信號傳達到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되었다⁴⁰⁾. 이 sel-12는 lin-12에 의한 信號傳達の 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 信號傳達到에 關與할 可能性이 높음을 示唆한다⁴¹⁾.

以上과 같은 事實에서 볼 때 이 遺傳子들의 突然變異를 가지고 있는 家族性 AD 患者에서도 APP가 PS-1이나 PS-2에 의해 β -secretase가 많이 包含되어 있는 細胞內 分割으로 더 많이 移動하여 結局 APP의 處理에 影響을 끼쳐 amyloid β protein가 過量 만들어짐으로써 神經毒性을 나타내고 그에 따라 認知機能 缺損이 同伴되는 것으로 生覺되고 있다⁴²⁾. 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 있다⁴²⁾.

AD 患者에게서 나타나는 記憶力 喪失과 다른 認識 缺陷은 信號傳達物質인 아세틸콜린을 만들

어 내는 神經 細胞의 退化 때문이라고 說明할 수 있는데, 이 不足 現狀은 아세틸콜린을 分解하는 아세틸콜린에스테라아제로 인해 더욱 深化되는 것으로 알려졌다. 따라서, 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 있다³⁸⁾. 비록 原因의인 治療方法은 아니더라도 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 있으며⁴³⁾, 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 分해를 막아주어 減退된 認知機能을 改善시켜주는 效果를 가지고 있다⁴⁴⁾. 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 改善劑들보다 알츠하이머병의 治療劑로서 效果가 가장 優秀한 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾.

韓醫學의 痴呆는 “痴呆”⁸⁾, “呆病”^{9,10)} 등의 範疇에 包含되며 痴呆라는 病名에 對한 最初의 韓醫學的 記載은 明代 張⁵⁾의 《景岳全書·癲狂痴呆》中, “痴呆症, 言辭顛倒, 舉動不經, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數.....”이며, 清代의 陳^{9,10)} 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》^{11,12)}을 비롯하여 많은 歷代醫書^{13,14)}에서도 “痴呆”나 “呆病”의 名稱은 없으나 “健忘” 등의 言及에서 類似한 症狀를 제시하고 있다.

痴呆의 原因을 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足^{8,9,15-17)}으로 크게 나누어 볼 수 있으며 症狀는 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^{8,9,15-17)} 등이며 腦血管性 痴呆의 경우는 一般的 痴呆症狀와 함께 半身不遂, 言語蹇澁, 口眼喎斜⁴¹⁾

등의 中風症狀이 나타난다. 痴呆의 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃^{8,9,15-17)} 등이 있다.

加減固本丸은 《東醫寶鑑·神門》¹⁸⁾의 健忘篇에 “治老人昏忘 及中風後健忘 卽風門二蓼丹也”라는 註와 함께 收錄된 加減固本丸에 安神益智하는 效能을 가진 白茯神⁴⁶⁾을 加味한 處方으로 臨床에서 老人性 健忘症과 中風後 健忘症을 치료하는데 活用되고 있다.

加減固本丸의 個別 藥劑에 대한 本草學的 效能을 살펴보면 다음과 같다⁴⁶⁾.

丹蔘은 心 肝 二經에 들어가 活血祛瘀하고 養血安神하는 效能이 있고, 熟地黃은 肝 腎 二經에 들어가 補血調經하고 滋陰補腎하는 效能이 있고, 天門冬은 肺 腎 二經에 들어가 養陰清熱하고 潤燥生津하는 效能이 있고, 白茯神은 心 脾 肺 三經에 들어가 寧心安神하고 利水하는 效能이 있고, 白茯苓은 心 脾 肺 三經에 들어가 利水滲濕하고 健脾補中하며 寧心安神하는 效能이 있고, 麥門冬은 心 肺 胃 三經에 들어가 清心除煩하고 養陰潤肺하며 益胃生津하는 效能이 있고, 甘草는 脾 胃 肺 三經에 들어가 補裨益氣하고 清熱除毒하며 調和諸藥하는 效能이 있고, 人蔘은 脾 肺 二經에 들어가 大補元氣하고 補裨益氣하며 寧神益智하는 效能이 있고, 遠志는 心 腎 二經에 들어가 祛痰利竅하고 安神益智하는 效能이 있고, 石菖蒲는 心 肝 脾 三經에 들어가 開竅安神하고 化痰濕하며 和中辟濁하는 效能이 있고, 朱砂는 心經에 들어가 鎮心安神하고 定驚解毒하는 效能이 있다^{42,43)}. 構成藥物들의 이러한 效能들을 綜合해 볼 때 老化로 인한 健忘뿐만 아니라 痴呆에도 治療效果가 있을 것으로 思料되어 이를 檢證해 보고자 本 實驗을 實施하였다.

이에 著者는 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 加減固本丸의 細胞毒性을 측정하였고, 加減固本丸과 PMA와 rIL-1 β 를 처리한 후 PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 유전자 발현과, PC-12 cell 세포주의 세포성 단백질에서 AChE의 활성도, APP, PS-1, 2의 발현을 측정 및 관찰하였고, 加減固本丸의 투여와 함께 scopolamine을 복강처리한 SD계 白鼠의 혈청 중 acetylcholinesterase

의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였으며, 또한 ICR계 생쥐에 加減固本丸을 투여하고 scopolamine을 복강처리한 후 Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)을 통해 행동의 변화를 관찰, 측정하여 加減固本丸의 AD에 대한 豫防 및 治療劑로서의 價値를 評價하고자 하였다.

mLFC에서는 100, 50, 10, 1 μ g/ml의 加減固本丸 투여군이 유의성 있는 변화가 없었고, 400, 200 μ g/ml의 加減固本丸 투여군이 유의성 있는 감소를 나타냈고, PC-12 cell에서는 100, 50, 10, 1 μ g/ml의 加減固本丸 투여군이 유의성 있는 변화가 없었고, 400, 200 μ g/ml의 加減固本丸 투여군이 유의성 있는 감소를 보여주어 400, 200 μ g/ml의 加減固本丸은 細胞毒性이 있어 실험에 사용하지 않고 100 μ g/ml이하로 실험하였다(Fig. 1).

AChE 遺傳子 발현에 있어서 정상군은 25Ht로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 만을 처리한 대조군은 58Ht로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 μ g/ml의 加減固本丸과 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 함께 처리한 투여군은 각각 11, 13Ht으로 加減固本丸의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 처리한 대조군에 비해 AChE의 발현을 억제했으며(Fig. 2), NOsII 遺傳子 발현에 있어서도 정상군은 56Ht으로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 만을 처리한 대조군은 170Ht으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 μ g/ml의 加減固本丸과 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 함께 처리한 투여군은 각각 58, 65Ht로 加減固本丸의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 β 를 처리한 대조군에 비해 NOsII의 발현을 억제했음을 볼 수 있다(Fig. 3).

PC-12 cell의 AChE activity는 정상군의 경우 43 \pm 3.3%이었고 대조군은 100 \pm 4.6%으로 나타났는데, 100, 10 μ g/ml의 加減固本丸 투여군은 45 \pm 3.5, 57 \pm 2.8%로 나타나 유의성 있는 감소를 보였으며, APP 발현 억제 효과는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, PMA와 加減固本丸을 함께 처리한 투여군에서는 감소했음을 볼 수 있었고, PS-1, PS-2 발현 억제 효과는 정상군에 비해 PMA만을 투여한

대조군에서 현저하게 발현되었으나, PMA와 加減固本丸 투여군에서는 발현이 감소했음을 볼 수 있었다(Fig. 4~6).

本實驗에서 PC-12 세포주에서 PS-1, PS-2와 APP 發顯의 過剩發顯을 觀察하였고, 加減固本丸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) 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.

早期 AD 證候를 보이는 患者의 大部分 原因으로 PS-1과 PS-2의 突然變異를 들고 있고, PS-1은 腦의 記憶과 關聯되어 있는 重要한 神經蛋白質로 PS-1(30kDa, chromosome-14)과 PS-2 (98kDa, chromosome-1)에 位置하는 것으로 알려져 있다. PC-12 세포주는 PS-1 遺傳子가 突然變異로 過剩發顯(overexpression)되어 AD 研究에 좋은 세포주로 알려져 있다.

Scopolamine투여로 誘導된 健忘증 白鼠 혈청내 glucose, uric acid, AChE의 變化를 측정한 結果는 다음과 같았다.

WBC는 정상군이 $11.8 \pm 0.6 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, 대조군이 $11.0 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 11.6 ± 0.5 , $11.1 \pm 0.9 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 變化를 보이지 않았다. RBC는 정상군이 $8.2 \pm 0.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $8.8 \pm 0.4 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 8.2 ± 0.2 , $8.0 \pm 0.5 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 變化를 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 tacrine을 투여한 양성대조군은 $955 \pm 75.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 變化를 보이지 않았으며 加減固本丸 투여군은 $799 \pm 24.1 (\times$

$10^3/\text{mm}^3)$ 로 유의성 있는 變化를 보였으나 白鼠의 혈액성분은 scopolamine에 의한 acetylcholinesterase와 相關關係가 없는 것으로 思料된다(Table 1).

AD 患者에서 glucose의 增加는 記憶力을 增進시키는 蛋白質로 알려져 있으며 scopolamine을 注射한 흰쥐에서 uric acid의 數値가 增加되었다는 報告가 있고, scopolamine을 白鼠에 注射하면 acetylcholinesterase가 增加하여 acetylcholine의 量이 急激히 減少하여 記憶과 認識의 障礙를 誘發하게 되므로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 血청내 Glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 效果를 분석하였다.

Glucose는 정상군이 $110.5 \pm 7.9 \text{mg/dl}$, 대조군이 $100.5 \pm 8.6 \text{mg/dl}$ 으로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 138.7 ± 6.2 , $152.2 \pm 3.5 \text{mg/dl}$ 로 나타나 모두 유의성 있는 상승을 보여주었고, Uric acid는 정상군이 $1.67 \pm 0.22 \text{mg/dl}$, 대조군이 $2.29 \pm 0.13 \text{mg/dl}$ 으로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군은 $1.31 \pm 0.09 \text{mg/dl}$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈고 加減固本丸 투여군은 $1.74 \pm 0.04 \text{mg/dl}$ 로 역시 유의성 있는 감소를 나타냈으며, AChE activity는 정상군이 $16.4 \pm 1.3 \text{U/ml}$, 대조군이 $35.3 \pm 1.5 \text{U/ml}$ 로 나타났고 tacrine을 투여한 양성대조군과 加減固本丸 투여군은 각각 21.2 ± 0.7 , $24.7 \pm 3.2 \text{U/ml}$ 로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 보여주어 加減固本丸이 血청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 效果가 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 7~9).

Scopolamine 投與로 誘導된 記憶力 減退 생쥐 모델의 Morris water maze 實驗을 통한 記憶力 減退 抑制 效果를 分析한 結果는 다음과 같았다. ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 時間은 정상군이 $11.2 \pm 3.4 (\text{sec})$, 대조군이 $80.6 \pm 3.9 (\text{sec})$ 로 나타났고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 $15.2 \pm 4.0 (\text{sec})$, 加減固本丸 투여군은 $24.5 \pm 3.9 (\text{sec})$ 로 모두 유의성 있는 감소를 보여, scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果를 나타내었다(Fig. 10).

訓練 學習된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 運動量을 threshold로 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 정상군이 $182 \pm 25.2(\text{cm})$ 인 데 반해 scopolamine을 복용에 처리한 訓練 學習된 생쥐의 대조군이 $1540 \pm 187(\text{cm})$ 로 顯著한 運動量 增加를 나타내었고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 $243 \pm 42.4(\text{cm})$, 加減固本丸 투여군은 $451 \pm 76.9(\text{cm})$ 로 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量 減少를 나타내었으며, lardist도 정상군이 $71 \pm 22.7(\text{cm})$, 대조군이 $751 \pm 79.2(\text{cm})$ 로 顯著한 運動量 增加를 나타내었고, Tacrine을 투여한 양성대조군은 $117 \pm 42.1(\text{cm})$, 加減固本丸 투여군은 $170 \pm 31.3(\text{cm})$ 으로 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量 減少를 나타내었다(Fig. 11).

以上の 내용을 總括해 보면 加減固本丸이 PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯을 抑制시켰고, AChE의 活性, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 抑制시킴을 알았다. Scopolamine투여로 誘導된 白鼠모델에서 Morris water maze 실험으로 分析하여 經口投與한 加減固本丸이 記憶力向上 效果가 있었고, glucose의 增加와 uric acid의 減少, 그리고 AChE 活性의 減少를 觀察하였으니 結果적으로 加減固本丸이 항콜린성 약물로 作用할 수 있음을 시사하는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과를 加減固本丸이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 過剩發顯 抑制能力을 시사하고 있는 바, 臨床에서 老化和 痴呆에 대한 豫防과 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

結 論

加減固本丸의 效果를 檢證하고자, PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯 및 AChE의 活性, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 觀察하였고, scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 活性 및 glucose, uric acid를 測定하였고, Videotrack을 통해 行動의 變化를 觀察한 結果 다음과 같은 有意性있는 結論을 얻었다.

1. 加減固本丸이 PC-12 cell에 AChE, NOsII mRNA의 發顯을 抑制하였다.

2. 加減固本丸이 PC-12 cell에 AChE의 活性을 抑制하였다.

3. 加減固本丸이 PC-12 cell에 APP와 PS-1 PS-2 發顯을 抑制하였다.

4. 加減固本丸은 scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠의 혈청을 分析한 結果가 有意性 있는 glucose의 增加, uric acid의 減少, AChE 活性의 減少를 보여주었다.

5. 加減固本丸은 scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모델에서 有意性있는 記憶力 改善 效果를 보여주었다.

以上の 結果로 보아 加減固本丸이 항콜린작용과 APP와 PS-1, PS-2 發顯에 대한 抑制能力을 보여 老化和 痴呆에 대한 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 黃義完, 金知赫. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:255-269.
2. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1996:465-468, 514-518, 597.
3. 리정복, 장수학. 평양:과학백과사전출판사. 1987 :41, 44-68, 89.
4. Weiner MF. The dementias, diagnosis and management. Washington, American Psychiatric Press. 1991:77-166, 227-248.
5. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease, FASEB 적 분류 및 주요 치매의 생리적 유병률. 신경정신의학. 1991:30(5): 885-891.
6. 박종한, 고효진. 경북 영일군 어느 면지역

- 노인들에서의 치매의 원인적 분류 및 주요 치매의 상대적 유병률. 신경정신의학. 1991: 30(5):885-891.
7. 우종인, 유형근, 홍진표, 이정희. 한국 노인 인구의 치매의 역학적 특성에 관한 연구. 서울대학교병원 대형 공동 과제 연구 보고서. 1994:1-9.
8. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-611.
9. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990 :222-225, 233-235.
10. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
11. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:217-218, 229.
12. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:68, 342.
13. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982 :129-135, 534, 545, 550.
14. 趙佶. 聖濟總錄 43卷. 北京:人民衛生出版社, 1987:822-825.
15. 楊思澎 외. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社, 1991:224-230.
16. 陳輝외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993 :242-251, 784-791.
17. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-381.
18. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:98, 364.
19. 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. 1993;17:17-22.
20. Chakraborti, T. K., J. D. Farrar, and C. N. Pope. Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adults rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 1993;46:219-224, 1993.
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. 1996: 16:4491-4500.
22. Altstiel LD and Sperber K., Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiat. 1991: 15:481-495.
23. Alzheimer's Disease Collaboratory Group. The structure of the presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. Nature Genetics. 1995;11:219-222.
24. 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 關한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1996:17(1):465-477.
25. 徐敏華. 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1996.
26. Asley S, Fone KC. Galanin fails to alter both acquisition of a two trial per day water maze task and neurochemical markers of cholinergic or serotonergic neurones in adult rats. Brain Res. 1993: 622(1-2):330-336.
27. Beatty WW, Schavalia DA : Rat Spatial memory. Resistance to retroactive interference at long retention interval. Animal Learning & Behavior. 1980;8: 550-552.
28. 김명호. 치매(Dementia)의 정의와 분류. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):1-4.
29. 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. 1995;64:749-760.
30. 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.* 1997;23:47-61.
31. 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.* 1992;359:322-325.
32. 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 U.S.A.* 1992;89:3055-3059.
33. Baddeley A. D., Bressi S., Sala S, D., Logie R., and Soinnler H. The decline of working memory in Alzheimer's disease. *Brain.* 1991;114:2521~2542.
34. 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.* 1996;17:1005-1013.
35. Buxbaum JD, Greengard P. Regulation of APP processing by intra- and intercellular signals. *Ann NY Acad Sci.* 1996;777:3270-331.
36. Da Cruz E, Silva OAB, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Greenbard P. Regulated cleavage of Alzheimer β -amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience.* 1993;57:873-877.
37. Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, Manning D, Ravi S, Williamson JR, Lee VM-Y. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid β -protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem.* 1985;270:4916-4922.
38. Pandiella A, Massague J. Multiple signals activate cleavage of membrane transforming growth factor- α precursor. *J Biol Chem.* 1991;266:5796-5773.
39. 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. U.S.A.* 1991;88:7247-7251.
40. Breakfield XO and DeLuca NA. Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol.* 1991;3:203-218.
41. Selkoe DJ., *N. Engl. J. Med.* 1989;320:1484~1487.
42. Yankner BA, Dawes LR, Fischer S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML and Neve RL., Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. 1989.
43. Levisohn L. F. and Osacson O. Excitotoxic lesions of the ratenorrhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res.* 1991;565:230-244: 1991.
44. Brambilla, A., A. Ghiorzi, N. Pitsicas, and F. Borsini. DAU 6215, a novel 5-HT sub(3)-receptor antagonist, selectively antagonizes scopolamine-induced deficit in a passive-avoidance task, but not scopolamine-induced hypermotility in rats. *Pharm. Pharmacol.* 1993;45:841-843.
45. 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.* 1994;48:161-168.

46. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林出版社, 1989: 166-167, 175-177, 219, 231-232, 361-362, 372-375.