

배양한 대뇌피질세포에서 유발한 신경손상에 대한 콜린에스테라제 억제제의 영향

독고향 · 이광현 · 조정숙[#]

동국대학교 의과대학

(Received March 5, 2002; Revised April 2, 2002)

Effects of Cholinesterase Inhibitors on Neuronal Injuries in Primary Cultured Rat Cortical Cells

Hyang Dok Go, Kwang Heun Lee and Jungsook Cho[#]

College of Medicine, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714

Abstract — Alzheimer's disease (AD) involves neuronal degeneration with impaired cholinergic transmission, particularly in areas of the brain associated with learning and memory. Several cholinesterase inhibitors are widely prescribed to ameliorate the cognitive deficits in AD patients. In an attempt to examine if tacrine and donepezil, two well-known cholinesterase inhibitors, exhibit additional pharmacological actions in primary cultured rat cortical cells, we investigated the effects on neuronal injuries induced by glutamate or N-methyl-D-aspartate (NMDA), β -amyloid fragment ($A_{\beta(25-35)}$), and various oxidative insults. Both tacrine and donepezil did not significantly inhibit the excitotoxic neuronal damage induced by glutamate. However, tacrine inhibited the toxicity induced by NMDA in a concentration-dependent fashion. In addition, tacrine significantly inhibited the $A_{\beta(25-35)}$ -induced neuronal injury at the concentration of 50 μ M. In contrast, donepezil did not reduce the NMDA- nor $A_{\beta(25-35)}$ -induced neuronal injury. Tacrine and donepezil had no effects on oxidative neuronal injuries in cultures nor on lipid peroxidation *in vitro*. These results suggest that, in addition to its anticholinesterase activity, the neuroprotective effects by tacrine against the NMDA- and $A_{\beta(25-35)}$ -induced toxicity may be beneficial for the treatment of AD. In contrast, the potent and selective inhibition of central acetylcholinesterase appears to be the major action mechanism of donepezil.

Keywords □ cholinesterase inhibitors, tacrine, donepezil, neuroprotection, N-methyl-D-aspartic acid, cortical neurons

Alzheimer's disease(AD)는 치매의 약 50~60%를 차지하며 원인적 치료가 불가능한 대표적인 질환이다. 이 질환은 점진적 인지 능력 장애와 더불어 실어증(aphasia), 실인증(agnosia), 실행증(apraxia) 및 수행장애 등이 나타나며, 그 결과로 사회적, 직업적 기능 장애를 초래하는 뇌의 진행성 퇴행 병변이다.¹⁾ 최근 이 질환의 근본적인 원인 규명 및 새로운 치료법 개발을 위한 연구가 국내외적으로 매우 활발하게 진행되고 있어 귀추가 주목된다.

AD 환자의 뇌에서는 대뇌피질, 해마, 속후각 영역, 편도 및 전뇌, 저부 등에서 많은 신경세포 손상이 관찰되며, 특히 콜린계 신경손상이 선택적으로 현저하게 나타난다.^{1,2)} 손상된 신경세포

에서는 과다 인산화된 tau로 이루어진 불용성 신경원섬유가 엉킨 neurofibrillary tangles(NFT)가 관찰되며, NFT는 베타 아밀로이드(A_{β})가 응집된 senile plaques와 함께 AD의 2대 특징으로 여겨진다.^{2,3)} A_{β} 는 아밀로이드 전구단백질로부터 형성되는 40-42 개의 아미노산으로 구성된 펩티드로서 불용성이 매우 강한 섬유상으로 응집하여 신경세포에 독성을 유발한다.³⁻⁵⁾ 또한, A_{β} 는 신경세포와 교세포 간의 신호전달 체계를 변형시켜 교세포에 의한 glutamate(Glu) 재흡수에 영향을 미치고, 그로 인해 Glu에 의한 흥분성 신경독성을 가속화시킨다고 한다.^{5,6)} NFT나 A_{β} 와 같은 요인 외에도 산화적 스트레스는 AD 환자의 뇌에서 신경세포 손상을 가중시킬 뿐만 아니라 A_{β} 에 의한 신경독성을 일부 매개한다고 알려져 있다.^{7,8)}

이와 같이 복잡한 신경퇴행성 질환인 AD를 보다 효과적으로 치료하기 위해서는 신경손상 과정에 관여하는 여러 요인을 복합적으로 제어함이 중요하다고 할 수 있다. 따라서, A_{β} 에 의한 신

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 054-770-2419 (팩스) 054-770-2447
(E-mail) jscho@mail.dongguk.ac.kr

경독성을 직접 또는 간접적으로 차단하는 약물이나 자유분자 단을 효과적으로 제거할 수 있는 항산화성 약물 및 Glu와 같은 흥분성 신경전달물질의 과다작용으로 인한 신경독성을 억제할 수 있는 약물 등은 AD 치료작용을 나타낼 것으로 기대된다. 그러나, 현재 임상에서 사용중인 AD 치료제로는 콜린에스테라제 억제제(ChEI)가 주를 이루고 있다.^{2,5,9)} ChEI는 아세틸콜린의 대사를 억제함으로서 AD 환자의 뇌에서 저하되어 있는 콜린성 활성을 증가시키며, 기억 및 인지능력을 개선시키는 것으로 알려져 있다. ChEI는 이와 같은 주작용 외에도 중추신경 내에서 좀 더 복합적인 작용을 나타냄이 최근의 연구결과에 의해 제시되었다. 그 예로, 아세틸콜린에 선택적으로 작용하는 ChEI의 하나인 huperzine A는 배양 신경세포에서 Glu로 유발한 신경독성을 억제하였으며,¹⁰⁾ huperzine A 및 tacrine, physostigmine 등은 비상경적 NMDA 수용체 길항제인 [³H]MK-801 결합을 강력하게 억제함이 보고되었다.¹¹⁾ 또한, huperzine A는 PC12 세포에서 과산화수소로 유발한 독성과 A_{B(25-35)}로 유발한 독성을 효과적으로 억제하였다.^{12,13)} 이와 같은 부가적 신경세포 보호작용은 주작용으로 알려진 콜린에스테라제 억제작용과 더불어 AD에서 발생하는 신경세포손상의 억제에 기여할 것으로 생각된다.

Tacrine과 donepezil은 AD의 증상 완화 및 병의 진행속도를 지연시킬 목적으로 임상에서 사용되어 온 대표적인 ChEI 제제이다.^{2,5,9)} 본 연구에서는 이 두 약물이 이미 알려진 콜린에스테라제 억제작용이외에 AD의 치료에 기여할 만한 신경세포 보호작용을 나타내는지를 연구하고자 일차배양한 대뇌피질세포에서 유발한 흥분성 신경순상 및 A_{B(25-35)}유발 신경순상 및 산화적 신경순상 등에 대한 영향을 연구하였다.

실험방법

실험재료

임신된 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐와 융성 SD 흰쥐는 대한실험동물로부터 구입하였으며, minimum essential media(MEM, with Earle's salt), fetal bovine serum(FBS) 및 horse serum(HS)은 Gibco BRL로부터, laminin, poly-L-lysine, glucose, L-glutamine, Glu, N-methyl-D-aspartate(NMDA), cytosine arabinoside, lactate dehydrogenase (LDH) assay kit, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), 2-thiobarbituric acid(TBA) 및 tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine)은 Sigma로부터 구입하였다. Amyloid β -protein fragment(25-35) (A_{B(25-35)})는 Bachem으로부터 구입하였고, donepezil((RS)-1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon)-2-yl]-methyl-piperidine, hydrochloride)은 한국에자이 주식회사로부터 제공받아 사용하였다. 세포배양용기는 Falcon에서 구입하였으며, 모든

시약은 특급품을 사용하였다.

흰쥐 대뇌피질세포의 일차배양

임신 16-18일된 SD 흰쥐의 태자에서 얻은 대뇌피질세포의 배양은 Cho 등^{14,15)}의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 대뇌를 적출하여 피질 부분만을 분리하여 뇌막을 제거하고 잘게 자른 후 5% FBS, 5% HS, 2 mM glutamine 및 25 mM glucose를 함유한 MEM(with Earle's salts)에서 알코올 램프로 미리 구멍의 크기를 순차적으로 작게 한 3개의 파스테르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리한 다음 상기 배양액에 혼탁시켜 poly-L-lysine과 laminin으로 미리 코팅해 놓은 배양용기에 24-well plate의 경우 well당 4.5×10⁵, 96-well plate의 경우 5-6×10⁴의 밀도로 이식하였다. 세포는 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C 배양기에서 배양하였으며 1주 2회 배양액을 교환하였다. 배양 1주 후 10 μM cytosine arabinoside로 24-48시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시킨 후 배양 12-14일에 실험에 사용하였다.

배양세포에서 신경세포손상 유발 및 손상정도 측정

배양세포에서 흥분성 신경세포손상 유발 및 손상정도 측정은 Cho 등^{16,17)}의 방법에 준하여 시행하였다. 즉, 배양한 대뇌피질세포를 HEPES control salt solution(HCSS; 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)으로 세척한 다음 300 μM의 Glu 또는 NMDA를 함유하는 Mg²⁺-free HCSS로 실온에서 15분간 처리한 후 25 mM glucose를 함유하는 MEM으로 배양액을 교환하여 20-24시간 동안 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 배양하였다. 산화적 손상은 H₂O₂(100 μM)로 5분간 처리하거나, Fe²⁺ 또는 Zn²⁺로 1시간 처리한 후 20-24시간 동안 배양하여 유발하였으며, A_B에 의한 손상은 25 μM A_{B(25-35)}를 용해시킨 25 mM glucose를 함유하는 MEM으로 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 48시간 동안 처리하여 유발하였다.

유발된 손상에 대한 시험약물(tacrine과 donepezil)의 영향을 연구하기 위해서는 각 손상의 유발과 동시에 적정 농도의 시험약물을 적용하였다. 세포의 손상정도는 배양액으로 유리된 LDH의 활성을 측정하거나 MTT 법¹⁸⁾에 의해 측정하였으며, 세포의 형태학적 변화를 위상차 현미경으로 관찰하여 확인하였다.

지질과산화 억제활성 측정

융성 SD 흰쥐로부터 얻은 뇌 homogenate와 Fe²⁺, ascorbic acid 및 적정농도의 시험약물을 37°C에서 1시간동안 반응시킨 용액에 trichloroacetic acid와 TBA를 차례로 가하여 혼합한 다음

100°C에서 15분간 가열한 후 원심분리하여 얻은 상동액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 과산화지질 형성에 대한 영향을 연구하였다.¹⁹⁾

Data 분석

실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 얻은 값을 평균하여 나타내었으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 검정하였다.

실험결과

Tacrine 및 donepezil의 흥분성 신경세포손상에 대한 작용

흰쥐의 대뇌피질세포를 12-14일간 배양한 후 300 μM Glu 또는 NMDA로 15분간 처리하면 초기에는 신경세포가 서서히 팽창하기 시작하고, 시간이 경과함에 따라 세포손상이 진행되며 결국 20-24시간 후에는 현저한 세포사가 관찰된다. 이와 같이 유발한 흥분성 신경세포손상에 대한 tacrine과 donepezil의 작용을 연구한 결과, 두 약물 모두 10-500 μM의 농도 범위 내에서 Glu로 유발한 신경손상에 대하여 크게 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A). 그러나, NMDA로 유발한 신경손상의 경우 다소 높은 농도에서 이기는 하지만 tacrine에 의해서 현저한 농도의 존적 억제작용을 나타내어 250 μM에서 약 35%, 500 μM에서 약 70%의 억제효과가 관찰되었다(Fig. 1B). 반면에 donepezil에 의해서는 NMDA-유발 신경손상이 전혀 억제되지 않았다(Fig. 1B). 이 결과는 위상차 현미경으로 관찰한 흥태학적 세포 변화에서도 일치하였다(Fig. 2). 즉, NMDA로 유발한 신경손상(B)은 tacrine(300 μM)에 의해 현저히 억제되는 반면(C), 같은 농도의 donepezil에 의해서는 전혀 억제되지 않았다(D).

Tacrine 및 donepezil의 $A_{\beta(25-35)}$ -유발 신경손상에 대한 작용

M^{g2+}-부족한 세포를 25 μM $A_{\beta(25-35)}$ 로 48시간 동안 처리한 후 세포의 생존도를 측정한 결과 약 40-50% 정도의 신경세포가 손상되었고, 배양세포를 $A_{\beta(25-35)}$ 와 tacrine으로 동시에 처리하였을 때, $A_{\beta(25-35)}$ 에 의한 세포손상은 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였으나, 통계적 분석 결과 50 μM에서만 유의한 억제효과($p<0.001$)를 나타내었다(Fig. 3). 한편, donepezil의 경우 $A_{\beta(25-35)}$ -유발 신경독성에 대한 억제작용은 관찰되지 않았다. 시험약물의 농도를 증가시켜 본 결과 tacrine에 의한 억제효과는 순간 감소하였으며, donepezil은 고농도로 장시간(48시간) 동안 적용시 오히려 세포손상을 가중시키는 것으로 나타났다(data not shown).

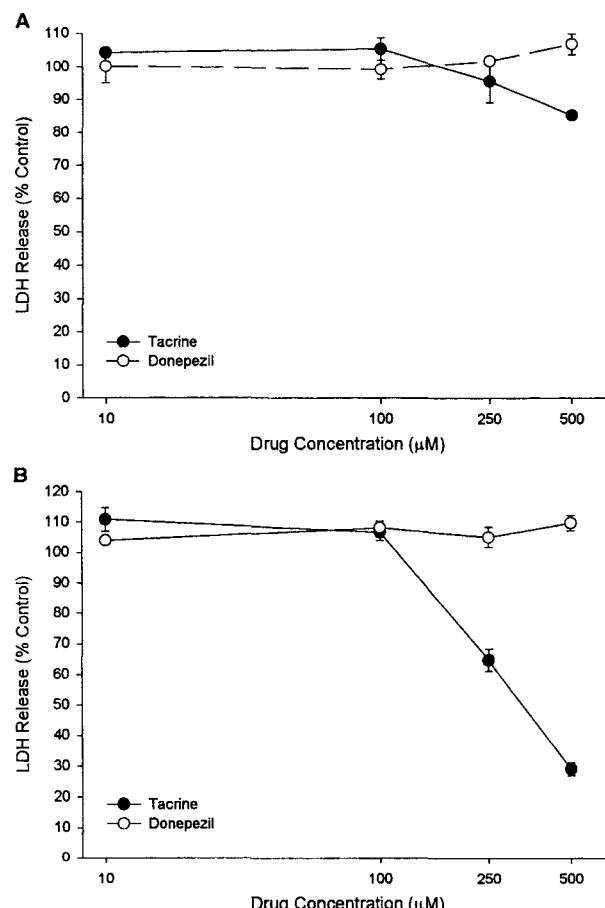


Fig. 1 – Effects of tacrine and donepezil on the glutamate (A)- or NMDA (B)-induced excitotoxic neuronal injury in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed for 15 min to 300 μM glutamate or NMDA in Mg²⁺-free HCSS in the presence of various concentrations of tacrine or donepezil, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. LDH activities released from the damaged neurons into the culture media were measured at 20 h after the exposure. Data were calculated as percent of control LDH activity released into the glutamate- or NMDA-treated culture medium, respectively. Each point represents the mean ± S.D. from 4-6 measurements.

Tacrine 및 donepezil의 산화적 신경손상 및 지질과산화에 대한 작용

다음으로, 배양 신경세포에서 산화적 스트레스에 의해 유발된 손상에 대한 tacrine과 donepezil의 영향을 측정하였다. 배양한 세포를 100 μM H₂O₂로 15분간 처리하거나 200 μM FeCl₂ 또는 100 μM ZnCl₂로 1시간동안 처리한 다음 20-24시간 동안 배양시키면 현저한 신경세포손상이 나타난다. 산화적 손상 유발약물과 50 μM의 tacrine 또는 donepezil을 각각 동시에 적용시킨 결과, H₂O₂, Fe²⁺ 또는 Zn²⁺으로 유발한 신경독성을 거의 억제

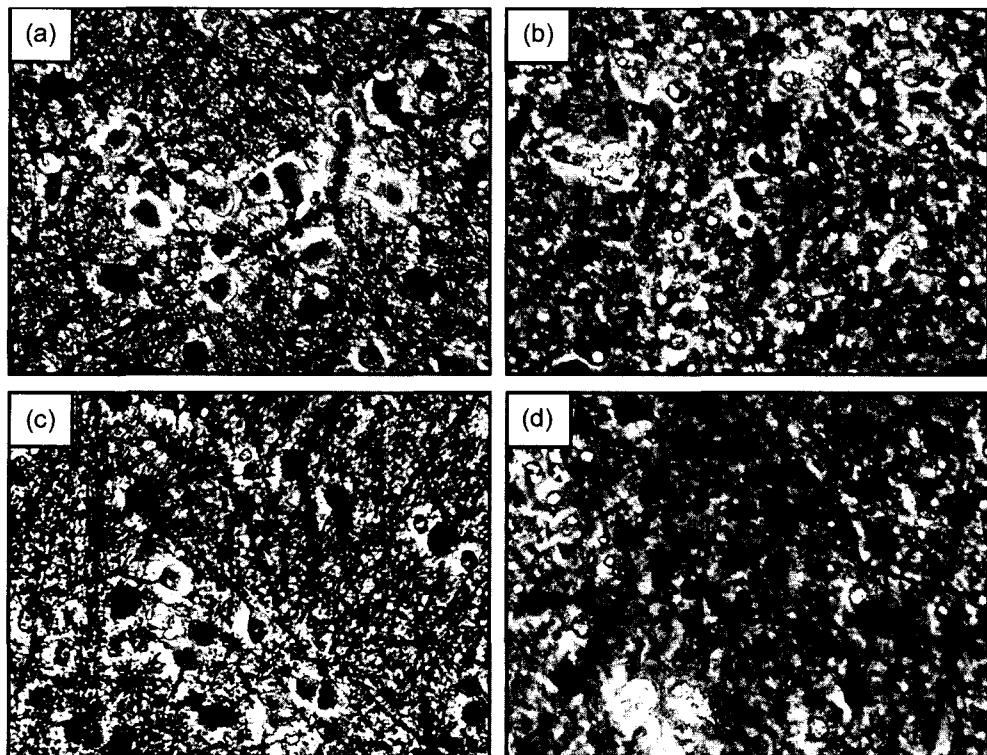


Fig. 2 – Phase-contrast photomicrographs of rat cortical neurons (12 days in culture). Cultures were treated as described in Fig. 1. (a) Control-treated culture in Mg^{2+} -free HCSS; (b) Sister culture exposed to 300 μM NMDA; (c and d) Sister cultures exposed to 300 μM NMDA in the presence of tacrine and donepezil (300 μM), respectively.

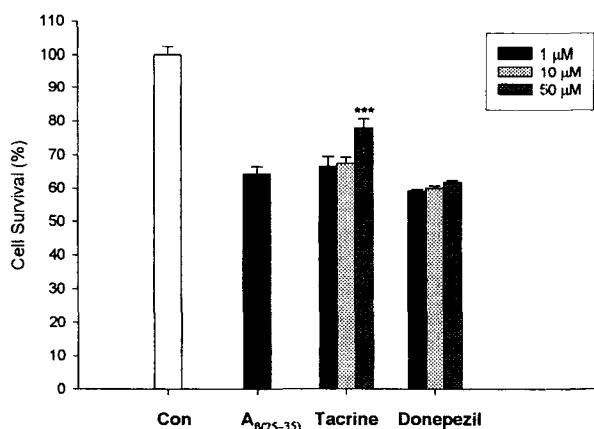


Fig. 3 – Effects of tacrine and donepezil on the $A\beta_{(25-35)}$ -induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed for 48 h to 25 μM $A\beta_{(25-35)}$ in the presence of the indicated concentrations of tacrine or donepezil, and MTT assays were performed as described in the Materials and Methods. Data were calculated as percent of control-treated culture (Con). Each bar represents the mean \pm S.D. from 3 experiments performed in 8 measurements. *** p <0.001 (compared with $A\beta_{(25-35)}$ -treated cultures by Student's t-test).

되지 않았으며(Fig. 4A), 약물의 적용농도를 300 μM 까지 증가시켜도 산화적 신경손상은 억제되지 않는 것으로 나타났다. 또한,

뇌 균질액을 지질원으로 사용한 과산화지질 형성에 대한 영향을 연구한 결과에서도 tacrine은 전혀 영향을 미치지 않았으며, donepezil의 경우 약 15-25% 정도의 미약한 억제작용을 나타내었다(Fig. 4B).

고 찰

AD의 병인은 아직 명확히 알려져 있지는 않으나 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하는 복잡한 질환으로 이해하고 있다. 이 질환의 치료제로 현재 사용되고 있는 약물은 AD에서 나타나는 기억력 장애와 콜린성 기능저하와의 상관관계에 근거한 ChEI가 주를 이루고 있으며, tacrine과 donepezil, rivastigmine 등이 시판되고 있다.^{2,5,9)} 본 연구에서는 AD 환자의 뇌에서 발생하는 신경손상에 직·간접적으로 관여한다고 알려진 요소들에 의해 배양 신경세포에서 유발되는 세포독성에 대한 tacrine과 donepezil의 작용을 비교, 연구하였다.

중추신경계에 존재하는 주요 흥분성 신경전달물질인 Glu는 뇌졸중, 간질 및 치매 등과 같은 급·慢성 퇴행성 신경질환에서 비정상적으로 과다하게 유리되어 이들 질환에서 발생하는 신경세포의 손상에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 널리 알려져 있다.⁶⁾ 이 과정에 관여하는 수용체 중에서 특히 NMDA 수용체는 Ca^{2+}

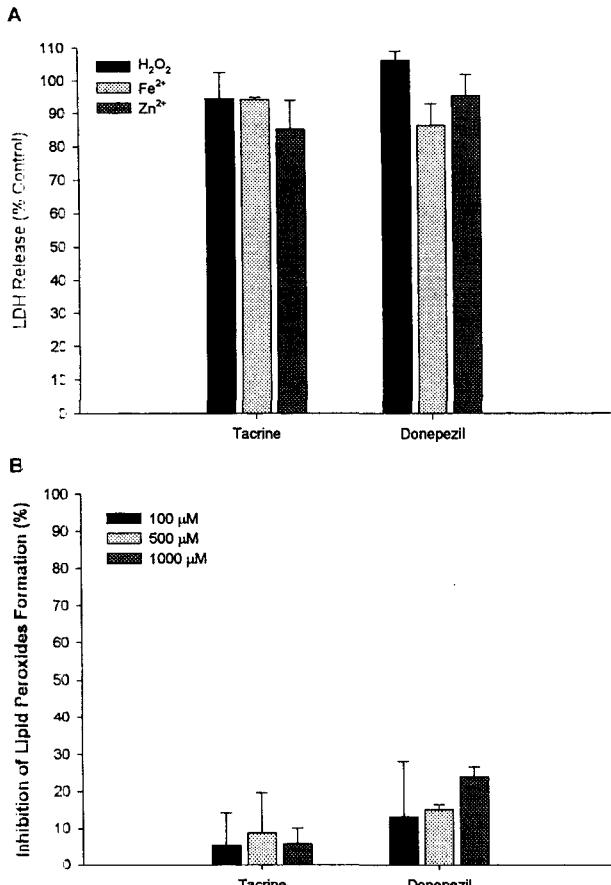


Fig. 4 – (A) Effects of tacrine and donepezil on the H_2O_2 - Fe^{2+} - and Zn^{2+} -induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to 100 μM H_2O_2 for 15 min, 200 μM FeCl_2 for 1h, or 100 μM ZnCl_2 for 1h in the presence of 50 μM tacrine or donepezil. After 20-24 h of the exposure, LDH activities were measured as described in the Materials and Methods. Data were calculated as percent of control LDH activities. Each bar represents the mean \pm S.D. from 4 measurements. (B) Effects of tacrine and donepezil on the formation of lipid peroxides. Rat forebrain homogenates, FeSO_4 , ascorbic acid, and the indicated concentrations of tacrine or donepezil were incubated and percent inhibition of lipid peroxidation was determined by colorimetric measurements at 532 nm as described in the Materials and Methods. Each bar represents the mean \pm S.D. from 3 experiments performed in duplicates.

을 통과시킬 수 있는 이온 채널 형태로서 세포의 손상과정에 있어 더욱 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 배양한 신경세포를 대상으로 Glu 또는 NMDA로 처리하여 유발되는 흥분성 신경독성을 ¹⁴⁻¹⁷에 대한 tacrine 및 donepezil의 작용을 검토한 결과, tacrine은 Glu에 의한 독성을 약간(약 15% 정도) 억제하였으나, NMDA-유발 독성에 대해서는 최대 70% 정도의 강력한 억제작용을 나타내었다(Figs. 1 & 2). 이와 같은 결과로부터, tacrine은 ChEI로서의 작용 외에도 흥분성 신경세포독성 억제 작용이

있으며, 특히 NMDA 수용체가 매개하는 독성을 더 강력하게 선택적으로 억제함을 알 수 있다. Wang 등¹¹은 tacrine이나 huperzine A 또는 donepezil과 같은 ChEI들이 쥐의 대뇌피질에 대한 [³H]MK-801 결합을 억제한다는 사실을 발견함으로써 NMDA 수용체에 대한 길항작용을 보고하였다. 본 연구에서는 배양한 신경세포를 이용하여 tacrine의 흥분성 신경세포독성 억제 작용을 관찰함으로써 NMDA 수용체에 대한 길항작용을 확인하였다. 한편, donepezil은 tacrine과는 달리 배양 신경세포에서 Glu나 NMDA로 유발한 흥분성 신경독성 억제효과를 나타내지 않았다(Figs. 1 & 2). 이 연구결과는 donepezil이 [³H]MK-801 결합 억제작용에 있어서 tacrine의 IC_{50} 값인 33.2 μM 보다 약 4배 높은 135 μM 의 IC_{50} 값을 나타낸 사실¹¹을 고려한 예상과 일치하는 결과라 할 수 있다.

A_β 웨티드는 AD 환자의 뇌에서 신경손상을 유발하는 주요 요인으로 여겨지나 손상이 일어나는 기전은 아직 완전히 이해되고 있지는 않다.^{3,4)} 본 연구에서는 A_β 에서 독성을 유발하는 주요 부분으로 알려진 25-35 위치의 아미노산으로 구성된 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ 를 배양한 신경세포에 적용하여 유발되는 신경독성에 대한 tacrine 및 donepezil의 작용을 연구하였다. Tacrine의 경우 50 μM 을 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ 와 동시에 적용시켰을 때 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ 만으로 처리한 세포군에 비해 독성이 약 40% 정도 억제된 반면, donepezil은 같은 농도로 적용했을 때 독성을 전혀 억제하지 못하였다(Fig. 3). 한편, Svensson과 Nordberg²⁰⁾는 PC12 세포에서 1 μM $\text{A}_{\beta(25-35)}$ 로 유발한 신경독성에 대하여 tacrine이 광범위한 농도(10^{-10} - 10^{-5} M)에서 보호효과를 나타내었음을 보고하였다. 이 연구보고는 tacrine이 A_β 에 의한 독성을 억제한다는 점에서 본 연구 결과와 일치하는 결과로 생각된다. 그러나, Fig. 3에서 제시한 tacrine의 농도 보다 훨씬 더 낮은 농도에서도 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ -유발 신경독성을 억제한다는 점과 donepezil도 약간의 A_β -유발 독성 억제작용을 나타냈다는 점²⁰⁾에서 본 연구결과와는 상이하다. 이는 실험에 사용한 세포의 종류나 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ 의 농도 등 실험조건의 차이로 인한 결과로 생각된다. 결과적으로, 본 연구와 Svensson과 Nordberg의 보고²⁰⁾를 통하여 일차배양한 대뇌피질세포와 PC12 세포에서 공통적으로 입증된 tacrine에 의한 $\text{A}_{\beta(25-35)}$ -유발 신경손상 억제작용은 앞서 관찰한 흥분성 신경손상 억제작용(Figs. 1 & 2)과 함께 AD에서 관찰되는 신경세포손상의 원화에 기여할 것으로 생각된다.

AD 환자의 뇌에서 A_β 는 자체에 의한 신경독성 외에도 신경세포와 교세포 간의 신호전달을 방해하고, 교세포로의 Glu로 재흡수를 억제함으로서 흥분성 신호전달을 가속화시키며 이 과정에서 특히 NMDA 수용체가 중요한 역할을 한다고 한다.⁵⁾ 또한, A_β 는 산화적 스트레스로 인해 형성되는 자유분자단에 의해 옹집력이 증가되며, A_β 자체도 자유분자단을 형성함으로서 신경세포 독성을 가중시킬 것으로 생각된다.^{5,21)} 뿐만 아니라, 흥분성 신경독성 과정에서도 자유분자단이 생성되어 세포사가 촉진된다.^{5,22)}

따라서, 자유분자단을 소거하며 항산화 작용을 나타내는 vitamin E와 selegiline과 같은 약물은 A_{β} 에 의한 독성을 완화시키거나,⁵⁾ AD 환자의 인지능력을 개선시킨다²¹⁾는 보고들은 이와 같은 이론을 뒷받침하는 증거라 할 수 있다. 본 연구에서는 tacrine과 donepezil이 산화적 신경세포손상을 억제시킬 수 있는지를 시험한 결과, 두 약물 모두 항산화작용이 없음을 배양 신경세포와 시험관내 실험을 통해 확인하였다.

이상의 연구결과를 종합해 보면, tacrine은 ChEI로서의 작용뿐만 아니라 NMDA에 의해 야기되는 신경세포독성을 억제하였으며, A_{β} -유발 독성도 억제하는 등 AD 치료효과에 기여할 수 있을 만한 다양한 부가적 신경세포 보호효과를 나타내었다. 반면, donepezil은 흥분성 신경독성 및 A_{β} -유발 독성을 억제하지 않는 것으로 보아 ChEI로서의 작용이 기억 및 인지능력의 향상에 직접적으로 관여하는 주요 기전일 것으로 생각된다. 또한, tacrine과 donepezil의 항산화 작용은 거의 없거나 매우 미약하여 AD의 치료효과에는 거의 기여할 수 없을 것으로 여겨진다.

Tacrine은 말초에서의 부티릴콜린에스테라제로서의 작용이 donepezil보다 훨씬 더 강력할 뿐만 아니라, 간독성과 같은 심각한 부작용을 발현하는 것으로 알려져 있다.²³⁾ 이와는 대조적으로 donepezil은 중추성 아세틸콜린에스테라제에 매우 선택적으로 작용하며 아직 심각한 부작용이 보고된 바 없다.^{24,25)} 한편, donepezil은 PC12 세포에서 산소/포도당 결핍에 의해 유발한 허혈성 세포손상을 억제하여 AD 치료제로서 뿐만 아니라 허혈을 수반하는 퇴행성 뇌질환 치료제로서의 가능성이 제시되기도 하였다.²⁶⁾ 이러한 측면에서 향후 AD 치료제로 개발되는 ChEI로는 뇌 아세틸콜린에 대한 활성이 높고, 다양한 기전에 의한 부가적 신경세포 보호작용을 나타내며, 부작용이 적은 이상적 약물이 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 21세기 프론티어 사업인 자생식물 사업단의 연구비 지원(PE002103-04)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) American Psychiatric Association. *DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*. 4th ed, Washington D. C., p. 171 (1994).
- 2) Parnetti, L., Senin, U., and Mecocci, P. : Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. The way forward. *Drugs* **53**, 752 (1997).
- 3) Hardy, J. and Allsop, D. : Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends*

- Pharmacol. Sci.* **12**, 383 (1991).
- 4) Selkoe, D. J. : The cell-biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 447 (1998).
 - 5) Harkany, T., Hortobagyi, T., Sasvari, M., Konya, C., Penke, B., Luiten, P. G. M., and Nyakas, C. : Neuroprotective approaches in experimental models of β -amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiatr.* **23**, 963 (1999).
 - 6) Choi, D. W. : Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261 (1992).
 - 7) Behl, C. : Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.* **57**, 301 (1999).
 - 8) Coyle, J. T. and Puttfarken, P. : Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689 (1993).
 - 9) Giacobini, E. : Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochem. Int.* **32**, 413 (1998).
 - 10) Ved, H. S., Koenig, M. L., Dave, J. R., and Doctor, B. P. : Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *NeuroReport* **8**, 963 (1997).
 - 11) Wang, X.-D., Chen, X.-Q., Yang, H.-H., and Hu, G.-Y. : Comparison of the effects of cholinesterase inhibitors on [3 H]MK-801 binding in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **272**, 21 (1999).
 - 12) Xiao, X. Q., Yang, J. W., and Tang, X. C. : Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neurosci. Lett.* **275**, 73 (1999).
 - 13) Xiao, X. Q., Wang, R., Han, Y. F., and Tang, X. C. : Protective effects of huperzine A on β -amyloid (25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci. Lett.* **286**, 155 (2000).
 - 14) 조정숙, 양재하, 박창국, 이희순, 김영호: 뇌졸중 치료 생약 추출물의 흥분성 신경독성 억제효과. *약학회지* **44**, 29 (2000).
 - 15) Cho, J., Joo, N.E., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D., and Kang, B.-S.: Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31 (2000).
 - 16) Cho, J., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D., Lee, D. U., and Kang, B.-S.: NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci.* **68**, 1567 (2001).
 - 17) Cho, J., Kim, Y. H., Kong, J.-Y., Yang, C. H., and Park, C. G. : Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci. in press*
 - 18) Hansen, M. B., Nielsen, S. E., and Berg, K. : Re-examination

- and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203 (1989).
- 19) Ng, T. B., Liu, F., and Wang, Z. T. : Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* **66**, 709 (2000).
- 20) Svensson, A.-L. and Nordberg, A. : Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of $A_{\beta(25-35)}$ in rat PC12 cells. *NeuroReport* **9**, 1519 (1998).
- 21) Retz, W., Gsell, W., Munch, G., Rosler, M., and Riederer, P. : Free radicals in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **54**, 221 (1998).
- 22) Sauer, D. and Fagg, G. E. : Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders, In: Krogsgaard-Larsen P, Hansen JJ (Eds), *Excitatory amino acid receptors*. Ellis Horwood, New York, p. 13(1992).
- 23) Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I., and Lewis, K. W. : Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* **271**, 992 (1994).
- 24) Rogers, S. L., Friedhoff, L. T. and the Donepezil Study Group: The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: Results of a US Multicentre, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Dementia* **7**, 293 (1996).
- 25) Doody, R. S. : Clinical benefits of a new piperidine-class AChE inhibitor. *Eur. Neuro-Psychopharmacol.* **9**, S69 (1999).
- 26) Zhou, J., Fu, Y., and Tang, X. C. : Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **306**, 53 (2001).