

巴戟天이 痴呆病態모델에 미치는 影響

김현수 · 정인철 · 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of *Morinda officinalis* (MDOF) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice

Hyunsoo Kim, Inchul Jung, Sangryong Lee

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

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

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

Key Word : Alzheimer's disease, *Morinda officinalis* (MDOF).

I. 緒論

巴戟天(MORIDAE OFFICINALIS RADIX)은 補益藥으로 茜草科(꼭두서니과 ; Rubiaceae)에 속한 多年生 藤本植物인 巴戟天 *Morinda officinalis* How.의 뿌리를 건조한 것으로, 겨울과 봄에 採取하여 鬚根을 除去하고 洗淨하여 乾燥한다¹⁾.

巴戟天의 主治效能에 대하여는 《神農本草經》²⁾에서는 “主大風邪氣 陰痿不起 強筋骨 安五臟 補中增志益氣”라고 하였고, 《名醫別錄》³⁾에서는 “療頭面游風 小腹及陰中相引痛 下氣 補五臟勞 益精”이라 하였으며, 《本草綱目》⁴⁾에서는 “治脚氣 去風疾 補血海”라고 敍述하고 있다.

現代에는 巴戟天을 補益藥 중에서도 補陽藥으로 分類하고 있으며 補腎陽, 壯筋骨, 祛風濕하는 效能이 있어 陽痿遺精, 宮冷不孕, 少腹冷痛, 小便不禁, 風濕痺痛, 腰膝酸痛 등을 治療한다고¹⁾ 하여 腎陽의 不足에 의한 症狀에 活用될 수 있음을 알 수 있다.

痴呆는 다양한 原因에 의하여 記憶力을 비롯한 認知機能의 低下를 나타내는 一種의 症候群^{5,6)}으로, 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 血管性痴呆(vascular dementia; VD), 混合型 痴呆, 中毒性 痴呆 등의 類型이 있으며, 우리 나라의 경우, AD가 61.5%, VD가 12.8%, 混合形이 9%의 比率로 存在한다⁶⁾.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠^{7,8)} 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다^{7,8)}. 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다^{7,8)}.

AD의 誘發인자는 PS 突然變異로 인해 非正常的으로 分解된 PS 代謝物이 Amyloid Precursor Protein(APP)의 形成을 促進하여 AD를 일으키는 것이고⁹⁾, 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 있다^{9~11)}.

最近의 韓醫學영역에서의 痴呆研究를 살펴보면 APP와 PS 遺傳子の 過多 發顯에 對한 研究^{10,11)},

老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究^{12,13)}, 白鼠의 記憶과 行動에 대하여 Morris water maze^{14,15)}와 Radial arm maze^{16,17)}의 두 部分의 課題를 통한 研究, 處方이 痴呆病態모델에 미치는 影響에 對한 研究^{18,19)}가 이루어졌으나 單味藥物인 巴戟天이 痴呆모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 接하지 못하였다.

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

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

350~400g 30週齡 Sprague Dawley(SD)系 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 供給받아 使用하였고, 30g 6週齡의 International Cancer Research(ICR)系 생쥐와 20g 4週齡의 BALB/c를 韓國化學研究所에서 供給받아 使用하였다. 動物은 實驗室 環境(溫度 22±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 자유로이 攝取케 하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 巴戟天(*Morinda officinalis*, MDOF)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 후 精選하여 使用하였다.

3) 檢液의 調製

巴戟天 200g을 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 3회 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℃ 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, RNAzol^B는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody (Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1 (Oncogen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2 (Oncogen U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab (Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

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

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

2. 方法

1) PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

(1) Mouth lung fibroblast cells(mLFC)와 pheochromo- cytoma cell line(PC-12 cell)의 배양 mLFC는 다음과 같이 만들었다. BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm으로 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37℃, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS을(를) 넣어 약 2회 1500rpm으로 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 37℃, 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 (100 μ g/ml) 그리고 10 μ g/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

(2) 細胞毒性 측정

細胞毒性 측정방법은 SRB assay법²⁰⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 2.0 × 10⁴개의 세포로 96 wells plate에 넣고 37℃, 5% CO₂상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 巴戟天 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 72 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을

버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 μ l를 가하고 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 μ l/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 wells plate에 1 \times 10⁶ 세포로 각 well에 분주하고, 巴戟天 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.

④ rat AChE

sence oligonucleotide :

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisence oligonucleotide :

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

⑤ rat NOsII

sence oligonucleotide :

5'-TCCRAATCTggAACAgCCAgCTgg-3'

antisence oligonucleotide :

5'-gYTCCATgCAGACAgCCACATCCTC-3'

⑥ 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 巴戟天 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, 巴戟天 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 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법²¹⁾으로 단백질을 정량하였다.

② AChE activity 측정

세포성 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml와 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml를 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 투여 및 scopolamine 주사

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

(2) WBC, RBC, PLT의 變化 측정

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

(3) Glucose, uric acid의 측정

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

(4) AChE activity 測定

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

4) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 Morris water maze 실험

(1) ICR계 생쥐의 반복 학습 및 약물 투여

ICR계 생쥐를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28 $^{\circ}$ 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 대조군, tacrine(10mg/kg)을 투여한 양성대조군, 巴戟天(250mg/kg)을 투여한 실험군으로 분류하였고 계속 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 측정

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

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법²²⁾을 이용하였다.

III. 成績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 細胞毒性

mLFC의 생존율은 대조군이 100±3.2(%), 실험군의 400µg/ml이하에서 각각 85±4.6, 90±3.8, 93±4.1, 95±4.5, 98±2.5, 98±4.2(%)로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±2.2(%), 실험군의 400µg/ml이하에서 각각 82±2.7, 87±3.5, 91±2.1, 93±3.3, 97±3.0, 99±3.9(%)로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았다(Fig. 1).

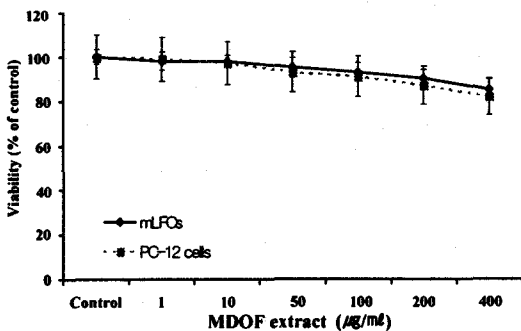


Fig. 1. Cytotoxicity of MDOF extract on mLFC and PC-12 cells. Control : Non-treatment group. MDOF : Group pretreated with various concentration(1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml) of MDOF extract for 72hrs.

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

1) AChE, NOsII mRNA의 발현

AChE mRNA의 발현에 있어서 정상군은 32(Ht)로 나타났고 대조군은 131(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 실험군은 각각 39, 34(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

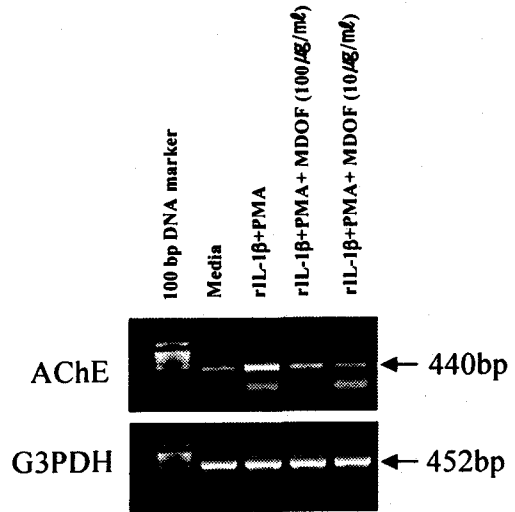


Fig. 2. Inhibitory effects of MDOF extract on AChE mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and rIL-1β.

Normal : Non-treatment group.

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

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

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

NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)으로 나타났고 대조군은 124(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 실험군은 각각 37, 115(Ht)로 나타났다(Fig. 3).

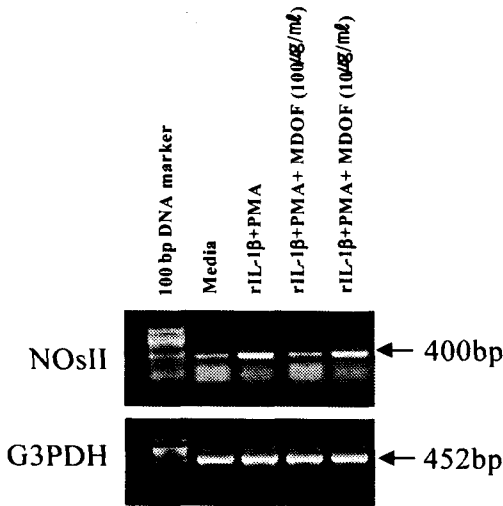


Fig. 3. Inhibitory effects of MDOF extract on NOSII mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and rIL-1 β .

Normal : Non-treatment group.
 Control : Group pretreated with PMA and rIL-1 β (100ng/ml).
 MDOF : Group pretreated with various concentration(10 μ g/ml, 100 μ g/ml) of MDOF extract for 24hrs.
 PC-12 cells were pretreated with various concentration of MDOF extract in the presence or absence rIL-1 β and PMA(100ng/ml) for 6hrs(rIL-1 β & NOSII mRNA) or 24hrs(AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Hi) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

2) AChE activity 억제

정상군의 AChE activity는 48 \pm 2.6(%), 대조군은 100 \pm 2.5(%), 100, 10 μ g/ml의 실험군은 44 \pm 4.6(%), 47 \pm 3.3(%)으로 나타났다(Fig. 4).

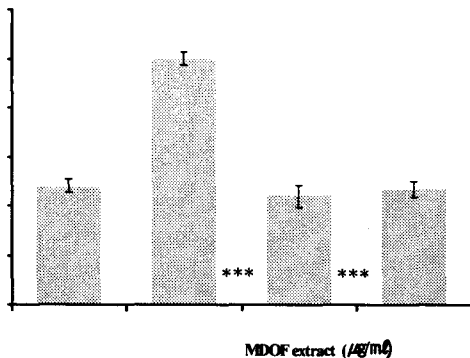


Fig. 4. Inhibitory effect of MDOF extract on the AChE activity in PMA and rIL-1 β stimulated PC-12 cells.

X,Y축 단위 표시, Fig.4 유의성 표시 안됨(Fig.7도 동일)

Normal : Non-treatment group.

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

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

3) APP 발현

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

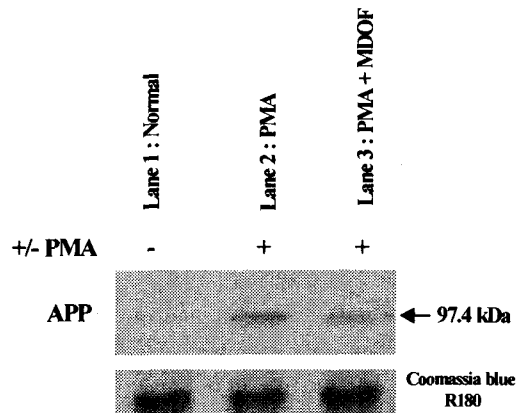


Fig. 5. Suppression effects of MDOF on APP in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment.

Lane 2 : PMA(100ng/ml).

Lane 3 : PMA(100ng/ml) + MDOF(100 μ g/ml).

PC-12 cells were pretreated without or with MDOF(100 μ g/ml)

extract in the presence or absence PMA(100ng/ml). APP

expression was measured by immune Western blot assay.

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

4) PS-1, PS-2 발현

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

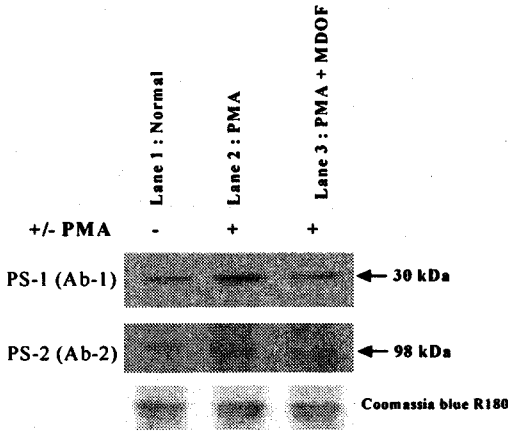


Fig. 6. Suppression effects of MDOF on PS-1(Ab-1) and PS-2(Ab-2) secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment.

Lane 2 : PMA(100ng/ml).

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

3. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴
白鼠모델의 혈액에 대한 영향

1) WBC, RBC, PLT에 미치는 영향

WBC는 정상군이 $10.1 \pm 0.9 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, 대조군이 $12.2 \pm 0.7 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, 양성대조군과 실험군은 $13.7 \pm 0.8, 11.3 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났다. RBC는 정상군이 $8.3 \pm 0.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $8.7 \pm 0.4 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 양성대조군과 실험군은 각각 $8.5 \pm 0.4, 8.5 \pm 0.2 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다. PLT는 정상군이 $752 \pm 33 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $847 \pm 27 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 양성대조군과 실험군은 $836 \pm 46, 790 \pm 31 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다(Table I).

Table I.

Effects of MDOF on the Blood Cells of Scopolamine-induced Memory Deficit Rats.

Group	Normal	Control	Tacrine	MDOF
WBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	10.1 ± 0.9^a	12.2 ± 0.7	13.7 ± 0.8	11.3 ± 0.5
RBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.3 ± 0.3	8.7 ± 0.2	8.5 ± 0.4	8.5 ± 0.2
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	752 ± 133	847 ± 27	836 ± 46	790 ± 31

^{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).

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

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

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

2) Glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 영향

Glucose는 정상군이 $95.8 \pm 4.4 (\text{mg/dl})$, 대조군이 $85.3 \pm 3.1 (\text{mg/dl})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 $120.2 \pm 4.1, 111.0 \pm 3.6 (\text{mg/dl})$ 으로 나타나 모두 유의성 있는 상승을 보여주었다.

Uric acid는 정상군이 $1.77 \pm 0.13 (\text{mg/dl})$, 대조군이 $2.51 \pm 0.07 (\text{mg/dl})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 $1.92 \pm 0.11, 2.02 \pm 0.05 (\text{mg/dl})$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈다.

AChE activity는 정상군이 $13.6 \pm 2.5 (\text{U/ml})$, 대조군이 $48.2 \pm 4.7 (\text{U/ml})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 $19.3 \pm 5.9, 32.0 \pm 4.1 (\text{U/ml})$ 로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다(Table II).

Table II.

Effects of MDOF on the Serum Level of Memory Deficit Rats induced by Scopolamine

Group	Normal	Control	Tacrine	MDOF
ChE (U/dl)	95.8±4.4 ^{al}	85.3±3.1	120.2±4.1***	111.0±3.6***
Acid (U/dl)	1.77±0.13	2.51±0.07	1.92±0.11***	2.02±0.05***
ChE (U/ml)	13.6±2.5	48.2±4.7	19.3±5.9**	32.0±4.1*

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).

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

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

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

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억감퇴 억제 효과

CR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는데 시간은 정상군이 10.1±2.2(sec), 대조군이 14.1±2.4(sec)로 나타났고, 양성대조군은 14.1±3.2(sec), 실험군은 15.4±2.1(sec)로 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다. 작은 운동량(small movement ; smlldist) 정상군이 161±12.4(cm), 대조군이 1644±141(cm)로 나타났고, 양성대조군은 270±35.0(cm), 실험군은 143±14.3(cm)으로 유의성 있는 감소를 보였으며, 많은 운동량(large movement ; lardist)은 정상군이 581±14.3(cm), 대조군이 581±80.1(cm)로 나타났고, 양성대조군은 84±39.1(cm), 실험군은 75±18.9(cm)로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 7, 8).

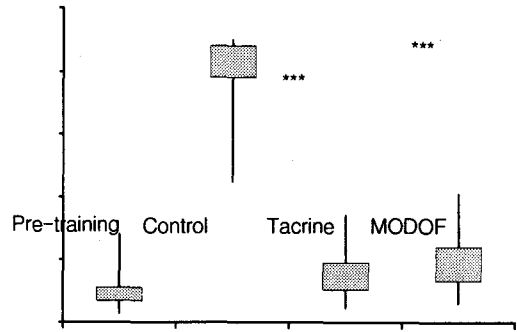


Fig. 7. Effects of MDOF on the scopolamine-induced impairment of memory in the stop-through type Morris water maze test.

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).

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

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

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

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

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

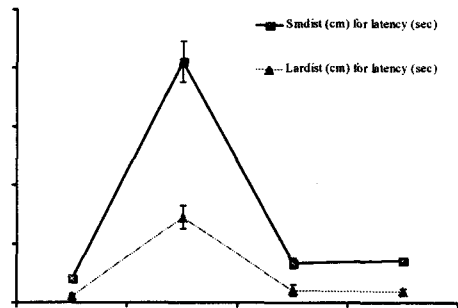


Fig. 8. Effects of MDOF on the scopolamine-induced impairment of memory in the distance movement-through type Morris water maze test.

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).

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

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

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

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).

IV. 考 察

人間的 壽命은 지속적으로 延長되고 있으며 이로 인해 많은 사람들이 老化라는 損傷過程을 겪게 되었는데 이로 인한 老年期 痴呆는 점차 增加趨勢에 있어 深刻한 社會問題로 대두되고 있다²³⁾.

痴呆는 다양한 原因에 의하여 記憶力을 비롯한 認知機能의 低下를 나타내는 一種의 症候群^{5,6)}으로, AD, VD, 混合形 痴呆, 中毒性 痴呆 등의 類型이 있으며, 우리 나라의 경우, AD가 61.5%, VD가 12.8%, 混合形이 9%의 比率로 存在한다⁶⁾.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡薄^{7,8)} 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다^{7,8)}. 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다^{7,8)}.

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며, 증상으로는 기억력의 손실, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화가 나타난다. 발병은 서서히, 경과 는 점진적인 것이 특징이다⁶⁾.

AD를 유발시키는 원인에 대한 가설이 다양하게 제시되고 있는데, Aβ, estrogen,

apolipoprotein E, PS, oxidants(free radicals), 염 증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 대표적이다²⁶⁾.

Aβ는 β-secretase나 γ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되는데, 이 단백질은 소수성 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다^{10,27)}. Amyloid cascade hypothesis에 따르면 Aβ의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로 amyloid의 축적이 점차 커지면서 Aβ가 신경세포를 손상시켜 결국 치태의 증상이 나타나게 된다고 한다. Aβ는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있다²⁸⁾. 또한 최근에는 APP의 c말단 부위인 c단 단백질(carboxyl-terminal fragment protein)이 Aβ보다 더 독성이 있다고 알려지고 있다²⁹⁾. Aβ와 c단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, 특히 활성산소의 형성과 세포내 칼슘 항상성의 저해가 중요한 역할을 할 것으로 믿어지고 있다³⁰⁾.

한편, PS는 465개의 amino acid를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형 AD를 일으키는 인자로 알려져 있다¹³⁾. AD에 있어서 PS의 역할은 현재 규명 중에 있으나 APP의 형성을 촉진하고 apoptosis 과정에 관여할 것으로 알려지고 있다. 즉 PS 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 PS 대사물이 APP의 형성을 촉진하여 AD를 일으키는 것이다⁹⁾. PS 돌연변이는 PS-1의 경우, 최소 33종류, PS-2의 경우는 3종류 이상이 보고되어져 있으며, 조기(early-onset) AD의 경우 대부분이 PS 돌연변이에서 기인한다고 생각되고 있다¹¹⁾.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD의 주증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다³¹⁾.

APP는 21번 염색체의 single gene에 存在하며³²⁾, 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반과 신경섬유다발이 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있다¹⁰⁾. 또한 AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다³³⁾.

AD 환자에서 glucose의 증가는 기억력을 증진시키는 단백질로 알려져 있으며³⁴⁾ scopolamine을 주사한 白鼠에서 uric acid의 수치가 증가되었다는 보고가 있고³⁵⁾, scopolamine을 白鼠에 주사하면 AChE가 증가하여 acetylcholine의 양이 급격히 감소하여 기억과 인식의 장애를 유발하게 된다.

巴戟天의 主治效能에 대하여는 《神農本草經》²⁾에서는 “主大風邪氣 陰痿不起 強筋骨 安五臟 補中增志益氣”라고 하였고, 《名醫別錄》³⁾에서는 “療頭面游風 小腹及陰中相引痛 下氣 補五臟勞 益精”이라 하였으며, 《本草綱目》⁴⁾에서는 “治脚氣 去風疾 補血海”라고 서술하고 있다.

현대에는 巴戟天을 補益藥 중에서도 補陽藥으로 分類하고 있으며 補腎陽, 壯筋骨, 祛風濕하는 效能이 있어 陽痿遺精, 宮冷不孕, 少腹冷痛, 小便不禁, 風濕痺痛, 腰膝酸痛 등을 치료한다고¹⁾ 하여 腎陽의 不足에 의한 症狀에 活用될 수 있음을 알 수 있다.

最近의 韓醫學영역에서의 痴呆研究를 살펴보면 APP와 PS 遺傳子의 過多 發顯에 對한 研究^{10,11)}, 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究^{12,13)}, 白鼠의 記憶과 行動에 대하여 Morris water maze^{14,15)}와 Radial arm maze^{16,17)}의 두 部分의 課題를 통한 研究, 處方이 痴呆病態모델에 미치는 影響에 對한 研究^{18,19)}가 이루어졌으나 單味藥物인 巴戟天이 痴呆모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 接하지 못하였다.

이에 著者는 巴戟天의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 細胞 毒性을 측정하였고, AChE, NOsII의 유전자 발현 및 AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 발현을

관찰하였으며 scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하였고, Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)을 통해 행동의 변화를 관찰하였다.

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 巴戟天의 細胞毒性을 측정한 결과 mLFC의 생존율은 대조군이 100±3.2(%)로 나타났고 400, 200, 100, 50, 10, 1µg/ml의 실험군이 각각 85±4.6, 90±3.8, 93±4.1 95±4.5, 98±2.5 98±4.2(%)로 나타나 400µg/ml 이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒性이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±2.2(%)로 나타났고, 400, 200, 100, 50, 10, 1µg/ml의 실험군이 각각 82±2.7, 87±3.5, 91±2.1, 93±3.3, 97±3.0, 99±3.9(%)로 나타나 400 µg/ml 이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒性이 나타나지 않았고, 실제 실험에서는 100µg/ml 이하로 실험하였다(Fig. 1).

PC-12 cell의 AChE mRNA의 발현에 있어서 정상군은 32(Ht)로 나타났고 대조군은 131(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 巴戟天을 처리한 실험군은 각각 39, 34(Ht)로 나타났으니 이는 巴戟天의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1β를 처리한 대조군에 비해 AChE의 발현을 억제된 것이며(Fig. 2), NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)로 나타났고 대조군은 124(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 巴戟天을 투여한 실험군은 각각 37, 115(Ht)로 나타나 巴戟天의 비율과 관계없이 100ng/ml의 PMA와 rIL-1β를 처리한 대조군에 비해 NOsII의 발현을 억제했음을 알 수 있었다(Fig. 3).

PC-12 cell에서 정상군의 AChE activity는 48±2.6(%), 대조군은 100±2.5(%), 100, 10µg/ml의 巴戟天 실험군은 44±4.6, 47±3.3(%)으로 나타나 유의성 있는 감소를 보였으며(Fig. 4), APP는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 감소했음을 볼 수 있었고(Fig. 5), PS-1과 PS-2는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 발현이 감소했음을 알 수 있어(Fig. 6) 신경세포사멸의 주원인으로 알려

진 Aβ의 양을 증가시키는 APP, PS-1, PS-2의 발현을 감소시켜 AD에 대하여 효과가 있음을 알 수 있었다.

WBC는 정상군이 $10.1 \pm 0.9 (\times 10^6/\text{mm}^3)$, 대조군이 $12.2 \pm 0.7 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 양성대조군은 $13.7 \pm 0.8 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은 $11.3 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 으로 유의성 있는 변화를 보였다. RBC는 정상군이 $8.3 \pm 0.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $8.7 \pm 0.4 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 8.5 ± 0.4 , $8.5 \pm 0.2 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. PLT는 정상군이 $752 \pm 33 (\times 10^3/\text{mm}^3)$, 대조군이 $847 \pm 27 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 양성대조군은 $836 \pm 46 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 으로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은 $836 \pm 46 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 으로 유의성 있는 변화를 보였다 (Table I).

Glucose는 정상군이 $95.8 \pm 4.4 (\text{mg}/\text{dl})$, 대조군이 $85.3 \pm 3.1 (\text{mg}/\text{dl})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 120.2 ± 4.1 , $111.0 \pm 3.6 (\text{mg}/\text{dl})$ 으로 나타나 모두 유의성 있는 상승이 나타났다. Uric acid는 정상군이 $1.77 \pm 0.13 (\text{mg}/\text{dl})$, 대조군이 $2.51 \pm 0.07 (\text{mg}/\text{dl})$ 으로 나타났고 양성대조군과 실험군은 1.92 ± 0.11 , $2.02 \pm 0.05 (\text{mg}/\text{dl})$ 로 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity는 정상군이 $13.6 \pm 2.5 (\text{U}/\text{ml})$, 대조군이 $48.2 \pm 4.7 (\text{U}/\text{ml})$ 로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 19.3 ± 5.9 , $32.0 \pm 4.1 (\text{U}/\text{ml})$ 로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 나타내어 혈청 내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과가 있음을 알 수 있었다 (Table II).

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이 $10.1 \pm 2.2 (\text{sec})$, 대조군이 $84.1 \pm 2.4 (\text{sec})$ 로 나타났고, 양성대조군은 $14.1 \pm 3.2 (\text{sec})$, 실험군은 $15.4 \pm 2.1 (\text{sec})$ 로 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. 적은 운동량(small movement ; smlldist)은 정상군이 $161 \pm 12.4 (\text{cm})$, 대조군이 $1644 \pm 141 (\text{cm})$ 로 나타났고, 양성대조군은 $270 \pm 35.0 (\text{cm})$, 실험군은 $286 \pm 14.3 (\text{cm})$ 으로 유의성 있는 감소를 나타냈으며, 많은 운동량(large movement ; lardist)은 정상군이 $44 \pm 14.3 (\text{cm})$, 대조군이 $581 \pm 80.1 (\text{cm})$ 로 나타났고, 양성대조군은

$84 \pm 39.1 (\text{cm})$, 실험군은 $75 \pm 18.9 (\text{cm})$ 로 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 대한 기억력 감퇴 억제효과를 나타내었다 (Fig. 7, 8).

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

V. 結論

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

1. PC-12 cell에 미치는 영향

- 1) 巴戟天은 AChE, NOsII mRNA의 발현을 유의성있게 억제하였다.
- 2) 巴戟天은 AChE의 활성을 유의성있게 억제하였다.
- 3) 巴戟天은 APP와 PS-1 PS-2 발현을 유의성있게 억제하였다.

2. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠에 미치는 영향

1) 巴戟天은 유의성 있는 glucose의 증가, uric acid의 감소, AChE 활성의 감소를 나타내었다.

2) 巴戟天은 Morris water maze에서 유의성있는 기억력 개선 효과를 나타내었다.

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

參 考 文 獻

1. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1992:549-50.
2. 吳 普. 神農本草經. 北京:新華書店北京發行所. 1982:21.
3. 陶弘景. 名醫別錄. 北京:新華書店北京發行所. 1986:245-6.
4. 李時珍. 本草綱目(上·下卷). 北京:新華書店北京發行所. 1982:747-8.
5. 金知赫, 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256-71, 327-30.
6. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
7. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
8. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
9. Ehlers MR, Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts ; role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry*. 1991;30(42):10065-74.
10. 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 β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996; 17:1005-13.
11. Chakraborti TK, Farrar JD, Pope CN. Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;46(1):219-24.
12. Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK. Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett*. 1991;128:126-8.
13. 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):465-77.
14. 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):330-6.
15. Clark AS, Mitre MC, Brinck-Johnsen T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res*. 1995;679(1):64-71.
16. Beatty WW, Schavalia DA. Rat Spatial memory ; Resistance to retroactive interference at long retention intervals. *Animal Learning & Behavior*. 1980;8:550-2.
17. Beatty WW, Schavalia DA. Spatial memory in Rats ; Time course of walking memory and effect of anesthetics. *Behavioral and Neural Biology*. 1980;28:454-62.
18. 文誠秀, 李相龍. 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2000; 11(1):19-36.
19. 崔秉晚, 李相龍. 益精地黃湯이 痴呆病態모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지, 2000;11(2):23~42.
20. 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.* 1990;82(13):1107-12.
21. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996;236(2):302-8.
22. 金宇哲 외. 統計學概論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
23. 김명호. 치매(Dementia)의 정의와 분류. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):1-4.
24. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 1982;215(4537):1237-9.
25. 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 β 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996;2(10):1146-50.
26. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. *Brain Res.* 1992;593(2):299-303.
27. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutunian V, DeMarco L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E . Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains. *J Neurogenet.* 1998;12(1):55-65.
28. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem.* 1999 ;73(2):532~537.
29. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na⁺/Ca²⁺ gradients. *Neuroreport.* 2000;11(15):3357-60.
30. Kim HJ, Suh YH, Lee MH, Ryu PD. Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein. *Neuroreport.* 1999;10(7):1427-31.
31. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(1):187~194.
32. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S. Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein (APP) gene. *Biochem J.* 1999;338:777-82.
33. Breakefield XO, Geller AI. Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol.* 1987;1(4):339-71.
34. Means LW, Edmonds SM. Glucose minimally attenuates scopolamine-but not morphine-induced deficits on a water maze alternation task. *J Neural Transm.* 1998;105(10~12):1171-85.
35. Mueller K. Voltammetric evidence in vivo of cholinergic modulation of extracellular ascorbic acid and uric acid in rat striatum. *Brain Res.* 1987;408(1~2):313-16.