

## 香附子가 痴呆病態모델에 미치는 影響

윤상학 · 정인철 · 이상룡  
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

### Effects of *Cyperus rotundus* (CPRT) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice

Sanghak Yun, Inchul Jung, Sangryong Lee

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

#### Abstract

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 (APP) overexpression.

The present research is to examine the inhibition effect of CPRT on PS-1, PS-2 and APP overexpression by detected to Western blotting. To verify the Effects of CPRT 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. CPRT 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 CPRT that has been known 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, *Cyperus rotundus* (CPRT), Learning, Memory, Acetylcholinesterase

## I. 緒論

香附子(CYPERI RHIZOMA)는 理氣藥으로 莎草科(방동사니과 ; Cyperaceae)에 속한 多年生草本인 香附子 *Cyperus rotundus* L.의 根莖을 乾燥한 것으로, 가을에 採取하여 毛鬚를 燻去하고 晒乾한다<sup>1)</sup>.

香附子の 主治效能에 대하여는 《名醫別錄》<sup>2)</sup>에서는 “主除胸中熱 充皮毛 久服利人 益氣 長鬚眉”라고 하였고, 《本草綱目》<sup>3)</sup>에서는 “散時氣寒逆 利三焦 解六鬱 消飲食積聚 痰飲痞滿 .....”이라 하였고, 《本草求真》<sup>4)</sup>에서는 “香附 專屬開鬱散氣 與木香行氣 貌同實異 .....”라고 敘述하고 있다.

現代에는 香附子를 理氣藥으로 分類하고 있으며 本草學的 效能이 理氣解鬱, 止痛調經하고 肝胃不和, 氣鬱不舒, 胸腹脇肋脹痛, 痰飲痞滿 등을 治療하니 痴呆의 다양한 原因 중 痰飲과 七情傷을 능히 다스릴 수 있어<sup>1)</sup> 痴呆治療에 活用될 수 있을 것으로 사료되는 本草이다.

痴呆(dementia)는 漸進的인 記憶力 障礙가 失語症(aphasia), 失認症(인식불능; agnosia), 失行症(apraxia) 등의 行動的인 障礙와 함께 나타나 社會 職業的 機能의 障礙를 가져오는 것으로<sup>5-7)</sup>, 單一 疾患이기보다는 인지기능(cognitive function)의 低下를 나타내는 여러 질환들에 대한 보다 포괄적인 개념이라 할 수 있다<sup>8,9)</sup>. 이러한 痴呆에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 血管性 痴呆(vascular dementia), 中毒性 痴呆등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있고<sup>10)</sup>, 주로 痰飲, 痰火, 癆血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 原因이 된다<sup>11,12)</sup>.

西洋醫學적으로 AD의 原因에 대한 假說<sup>13)</sup>은 여러 가지가 있는데, 近來에 amyloid β protein(Aβ)의 沈積으로 老人癥(senile plaque)이 生成되고, presenilin(PS) 遺傳子들의 突然變異가 amyloid precursor protein(APP)의 處理과정에 影響을 끼쳐 Aβ가 過量 生成되어 神經毒性을 나타내 認知障礙가 誘發된다는 假說이 注目받고 있다<sup>14,15)</sup>. 또한 acetylcholine과 같은 神經傳達 物質의 減少는 記憶力을 減少시키며, 認知缺陷은

acetylcholine을 만들어 내는 神經 細胞의 退化와 함께 acetylcholinesterase(AChE)의 增加로 더욱 深化됨도 提示되고 있다<sup>16,17)</sup>.

또한 最近 韓醫學에서의 치매에 대한 연구동향을 살펴보면 AD의 原因인 아밀로이드 전구단백질과 PS 유전자의 過다 발현에 대한 研究<sup>18,19)</sup>, 腦의 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究<sup>20,21)</sup>, 臨床에서 使用하는 여러가지 處方이 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 影響에 대한 研究<sup>22,23)</sup>가 이루어지고 있으나 單味藥物인 香附子가 白鼠의 行動과 生化學的 變化에 관련된 研究은 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 香附子の 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를 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 雌性白鼠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% 이

하, 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

본 實驗에 사용한 香附子(*Cyperus rotundus*, CPRT)는 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

香附子 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 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℃ 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<sub>2</sub>)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moleoy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzol<sup>B</sup>는 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 sceondary 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, Switzerland), Bio-freezer(Sanyo, Japan), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama Co., Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), roller mixer(Gowon Scientific Technology Co., Korea), vortex(비전과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ELISA Leader(molecular devices, U.S.A.), Videotrack(Viewpoint, France) 등을 使用하였다.

## 2. 方法

### 1) PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

(1) 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% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm으로 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 培養

에서 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) 그리고 10µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

(2) 細胞毒性 측정

細胞毒性 측정방법은 SRB assay법<sup>24)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은  $2.0 \times 10^4$ 개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 香附子 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 50µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA Leader에서 540nm로 흡광도를 측정하였다.

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

(1) AChE, NOsII mRNA 발현 측정

① mRNA 추출

PC-12 cell은 24 wells plate에  $1 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 香附子 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<sup>B</sup>를 이용하여 PC-12 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 mRNA는 diethyl pyrocarbonate를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total mRNA 3µg을 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 MgCl<sub>2</sub>)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 MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 µl 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.

④ rat AChE

sence oligonucleotide :

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisence oligonucleotide :

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

⑥ rat NOsII

sence oligonucleotide :

5'-TCCRAATCTggAACAgCCAgCTgg-3'

antisense oligonucleotide :

5'-gYTCCATgCAgACAgCCACATCCTC-3'

⑦ 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 측정 및 Western blot 분석

① 세포성 단백질 추출

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

세포성 lysate를 얻기 위하여 50 $\mu$ l의 lysis 완충액(Tris-HCl (200mM; pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 $\mu$ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법<sup>25)</sup>으로 단백질을 정량하였다.

② AChE activity 측정

세포성 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml과 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 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 $\mu$ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA

로 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, 香附子(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 자동생화학 분석기(Ciba Coring., U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

(4) AChE activity 測定

AChE activity 측정을 위하여 test tube와 blank tube를 labeling하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2ml과 serum 0.2ml을 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution(cat. No.420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 이후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA Leader로 420nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 바탕으로  $\Delta A = A_{BLANK} - A_{TEST}$  公式에 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℃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 아무런 처치가 없는 대조군, tacrine(10mg/kg)을 투여한 양성대조군, 香附子(250mg/kg)을 투여한 실험군으로 분류하였고 계속 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 측정

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

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법<sup>26)</sup>을 이용하였다.

III. 成績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 細胞毒性

mLFC의 생존율은 대조군이 100±2.1(%), 실험군의 200µg/ml이하에서 각각 87±2.2, 90±4.5, 93±3.5, 99±3.0, 102±2.7(%)로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±2.7(%), 실험군의 400µg/ml이하에서 각각 80±4.0, 85±1.5, 88±1.8, 90±3.3, 95±4.2, 96±3.6(%)으로 나타나 細胞毒性이 나타나지 않았다(Fig. 1).

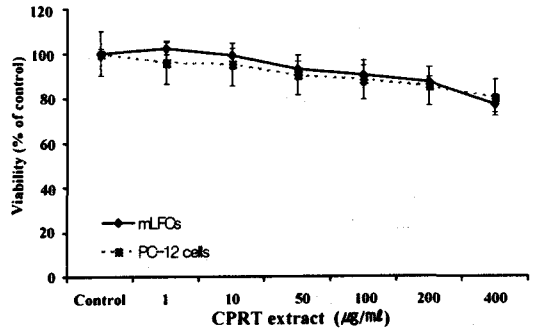


Fig. 1. Cytotoxicity of CPRT extract on mLFC and PC-12 cells.

Control : Non-treatment group.

CPRT : Group pretreated with various concentration(1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml) of CPRT 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 21, 34(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

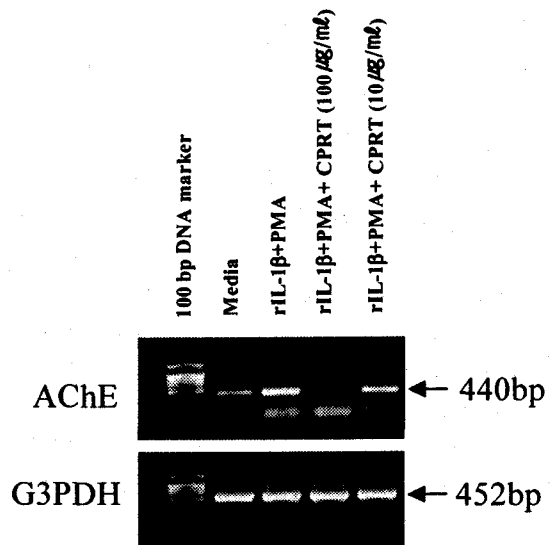


Fig. 2. Inhibitory effects of CPRT extract on AChE mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and

rIL-1 $\beta$ .

Normal : Non-treatment group.

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

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

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

NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)으로 나타났고 대조군은 124(Ht)으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 29, 115(Ht)로 나타났다(Fig. 3).

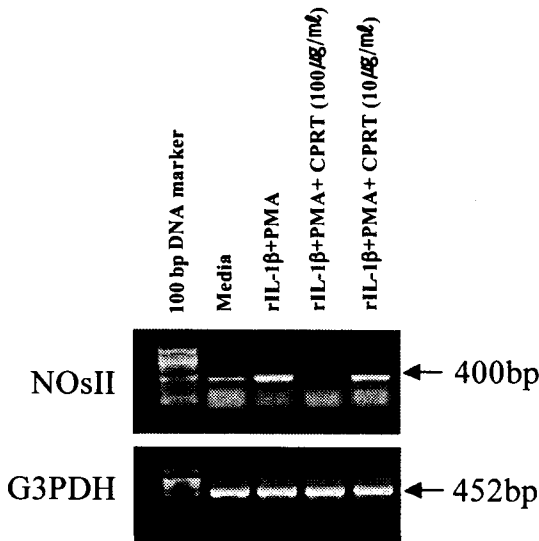


Fig. 3. Inhibitory effects of CPRT extract on NOsII mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and rIL-1 $\beta$ .

Normal : Non-treatment group.

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

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

PC-12 cells were pretreated with various concentration of CPRT extract in the presence or absence rIL-1 $\beta$  and PMA(100ng/ml) for

6hrs(IL-1 $\beta$  & NOsII mRNA) or 24hrs(AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

## 2) AChE activity 억제

정상군의 AChE activity는 48 $\pm$ 2.6(%), 대조군은 100 $\pm$ 2.5(%), 100, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 41 $\pm$ 3.5(%), 69 $\pm$ 5.8(%로 나타났다(Fig. 4).

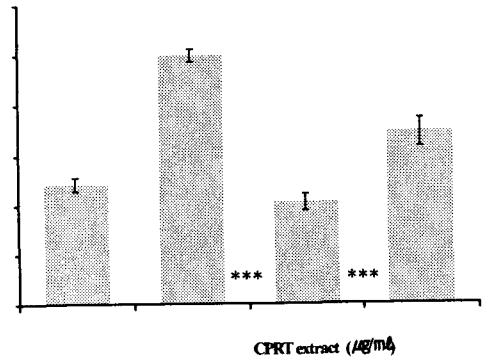


Fig. 4. Inhibitory effect of CPRT extract on the AChE activity in PMA and rIL-1 $\beta$  stimulated PC-12 cells.

Normal : Non-treatment group.

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

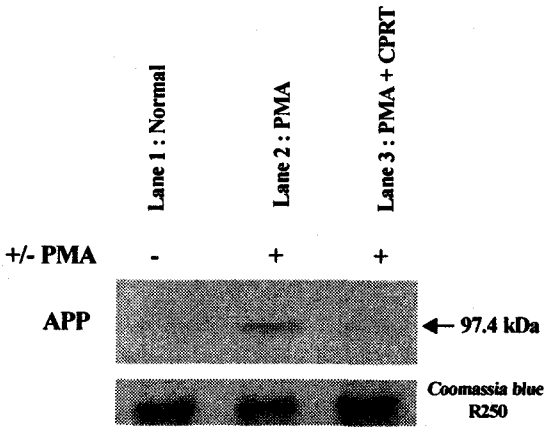
CPRT : Group pretreated with various concentration(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml) of CPRT extract for 24hrs.

\* : 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 CPRT extract in the presence or absence of rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) and PMA(100ng/ml) for 24hrs. The lysate were measured using AChE diagnostic kits(Sigma). The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

## 3) APP 발현

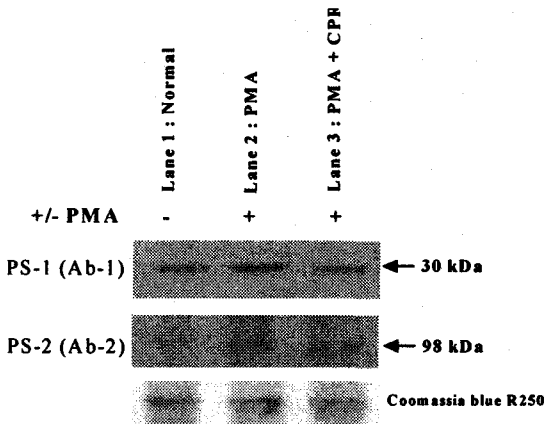
APP는 정상군에 비해 PMA만을 투여한 대조군에서 현저하게 발현되었으나, 실험군에서는 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Suppression effects of CPRT on APP in PC-12 cell.  
 Lane 1 : non-treatment.  
 Lane 2 : PMA(100ng/ml).  
 Lane 3 : PMA(100ng/ml) + CPRT(100µg/ml).  
 PC-12 cells were pretreated without or with CPRT(100µg/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 CPRT 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 CPRT 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) + CPRT(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 CPRT and internal control Coomassia blue R250 staining.

3. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴  
 白鼠모델의 혈액에 대한 영향

1) WBC, RBC, PLT에 미치는 영향

WBC는 정상군이  $10.1 \pm 0.9 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $12.2 \pm 0.7 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은  $13.7 \pm 0.8$ ,  $10.8 \pm 0.3 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 으로 나타났다. RBC는 정상군이  $8.3 \pm 0.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $8.7 \pm 0.2 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은 각각  $8.5 \pm 0.4$ ,  $8.7 \pm 0.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 으로 나타났다. PLT는 정상군이  $752 \pm 33 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 대조군이  $847 \pm 27 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 양성대조군과 실험군은  $836 \pm 46$ ,  $765 \pm 25 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다(Table I).

**Table I.**  
**Effects of CPRT on the Blood Cells of Scopolamine-induced Memory Deficit Rats.**

Group	Normal	Control	Tacrine	CPRT
WBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	10.1 $\pm$ 0.9 <sup>a)</sup>	12.2 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.8	10.8 $\pm$ 0.3*
RBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	8.3 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.2	8.5 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.3
PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	752 $\pm$ 33	847 $\pm$ 27	836 $\pm$ 46	765 $\pm$ 25**

<sup>a)</sup> : 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).

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



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 CPRT 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±4.4(mg/dl), 대조군이 85.3±3.1(mg/dl)으로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 120.2±4.1, 105.4±4.2(mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 상승을 보여주었다.

Uric acid는 정상군이 1.77±0.13(mg/dl), 대조군이 2.51±0.07(mg/dl)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 1.92±0.11, 1.99±0.04(mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타냈다.

AChE activity는 정상군이 13.6±2.5(U/ml), 대조군이 48.2±4.7(U/ml)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 19.3±5.9, 35.8±3.7(U/ml)로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다(Table II).

**Table II.**  
**Effects of CPRT on the Serum Level of Memory Deficit Rats induced by Scopolamine**

Group	Normal	Control	Tacrine	CPRT
Glucose (mg/dl)	95.8±4.4 <sup>a)</sup>	85.3±3.1	120.2±4.1***	105.4±4.2**
Uric acid (mg/dl)	1.77±0.13	2.51±0.07	1.92±0.11***	1.99±0.04***
AChE (U/ml)	13.6±2.5	48.2±4.7	19.3±5.9**	35.8±3.7*

<sup>a)</sup> : 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).

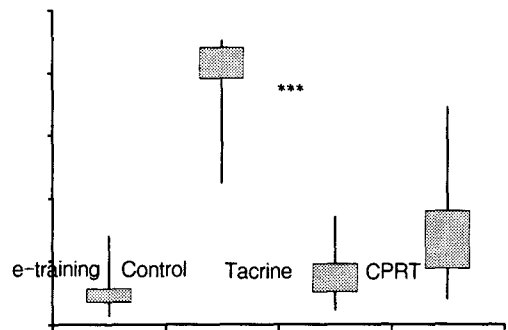
CPRT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and CPRT extract(250mg/kg p.o).

\* : 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 CPRT or Tacrine · HCl and the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days. Hematology change was analyzed for serum level as described in Material and Methods.

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

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이 10.1±2.2(sec), 대조군이 84.1±2.4(sec)로 나타났고, 양성대조군은 14.1±3.2(sec), 실험군은 24.5±3.2(sec)로 모두 유의성 있는 감소를 보여주었다. 적은 운동량(small movement ; smldist)은 정상군이 161±12.4(cm), 대조군이 1644±141(cm)로 나타났고, 양성대조군은 270±35.0(cm), 실험군은 265±37.5(cm)로 유의성 있는 감소를 보였으며, 많은 운동량(large movement ; lardist)은 정상군이 44±14.3(cm), 대조군이 581±80.1(cm)로 나타났고, 양성대조군은 84±39.1(cm), 실험군은 113±22.1(cm)로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 7, 8).



**Fig. 7.** Effects of CPRT 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).

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

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)

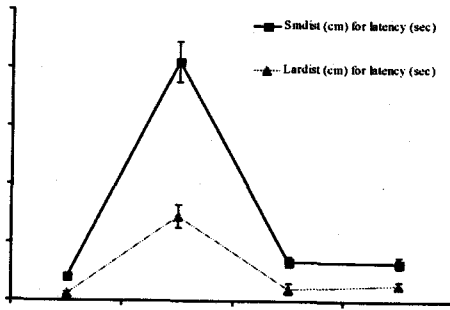


Fig. 8. Effects of CPRT on the scopolamine-induced impairment of memory in the distance movement-through type Morris water maze test.

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).

CPRT : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and CPRT 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이 점점 傳染病 및 營養失調를 克服하게 됨에 따라 人間の 壽命은 크게 延長되었는데<sup>27)</sup>, 우리나라의 경우 1990년 65세 以上 老人 人口는 약 5.0%이며, 2000년에는 약 6.8%, 2020년에는 거의 12% 水準에 이를 것으로 推算된다<sup>28)</sup>. 이에 따라 老化로 인한 疾患, 그 중에서도 특히 痴呆는 深刻한 社會問題로 擡頭되고 있다<sup>27)</sup>.

痴呆는 腦梗塞 등의 腦血管障礙, 退行性 疾患, 中樞神經感染症, 腫瘍性 病變, 慢性硬膜下血腫 등의 外傷性 疾患, 內分泌 疾患, 代謝性 疾患, 藥物中毒 등<sup>27)</sup> 多樣한 原因疾患에 의해 惹起되는 知能低下를 특징으로 하는 症候群<sup>29)</sup>으로, 腦의 萎縮性 變化로 起因한 Alzheimer型 痴呆와 腦梗塞 등에 의한 腦血管性 痴呆가 있으며, Alzheimer型 痴呆는 成人痴呆 中 約50-60%를, 腦血管性 痴呆는 約 20%를 차지하며 이 中 15-20%程度는 함께 나타난다<sup>29)</sup>.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠<sup>11,12)</sup> 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다<sup>11,12)</sup>. 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다<sup>11,12)</sup>.

AD는 뇌의 전반적 위축과 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, 경과는 점진적인 것이 특징이다<sup>30)</sup>.

AD는 Aβ, 에스트로젠, 아포리포단백질 E(ApoE), PS, 산화제(oxidants ; hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>13,31)</sup>. 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 SPs의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과산화 타우 단백질의 침적에 의한 신경섬유다발

(NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이다<sup>18,32)</sup>.

A $\beta$ 는 APP의 비정상적인 공정과정으로 생성되는 것으로<sup>6,19)</sup>,  $\beta$ -secretase나 1-secretase에 의해<sup>21)</sup> 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질(APP)의 일부가 잘라져서 생성되는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다<sup>18)</sup>.

이러한 A $\beta$ 는 그 자체가 neurotoxic 한 것이 아니며 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극시켜 neuron을 상처받기 쉽게 만드는 것으로 생각된다<sup>33)</sup>.

APP는 21번 염색체의 single gene에 존재하며<sup>34)</sup>, 이 21번 염색체가 3개인 다운중후군 환자는 조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반과 신경섬유다발이 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있다<sup>35)</sup>. 또한 AD 환자에서 APP의 유전자 발현이 증가를 기저 전뇌와 해마에서 살펴볼 수 있는 점과 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 노화과정, 특히 치태형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다<sup>36)</sup>.

한편, PS는 465개의 amino acid를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형 AD를 일으키는 인자로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 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 것이다<sup>37)</sup>. PS 돌연변이는 PS-1의 경우, 최소 33종류, PS-2의 경우는 3종류 이상이 보고되어져 있으며, 조기 AD의 경우 대부분이 PS 돌연변이에서 기인한다고 생각되고 있다<sup>37)</sup>.

최근에 PS-1과 PS-2는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하며, 이 유전자의 다양한 돌연변이가 조발성, 가족성 알츠하이머병의 70% 이상의 원인이 되는 것으로 보고되었다<sup>38)</sup>.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA의 경우에는 노화에 따라 감소하는 것으로

알려져 있는데<sup>39)</sup>, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴 현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다<sup>40)</sup>. AD 환자에게서 나타나는 기억력 상실과 다른 인식 결함이 신호를 전달해 주는 화학 물질인 acetylcholine을 만들어 내는 신경 세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있는데, 이 부족 현상은 acetylcholine을 분해하는 AChE로 더욱 심화된다<sup>40)</sup>. 비록 원인적인 치료방법은 아니더라도 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 Choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 개발된 약물들에는 acetylcholine 합성전구체로 lecithin, 수용체 활성제로 RS-86, nicotine 등이 있으며<sup>41)</sup>, acetylcholine 분해억제제(AChE inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용중인 tacrine과 최근에 승인된 E2020등이 있으며 이런 약물들은 acetylcholine의 분해를 막아주어 감퇴된 인지기능을 개선시켜주는 효과를 가지고 있다<sup>37)</sup>. 이들은 비록 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이긴 하지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 치료제로서 효과가 우수한 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>.

활성화된 신경교세포들이 면역계에서만 생산될 수 있다고 믿어져 왔던 많은 cytokine들의 주 원천세포들이라고 인정되고 있다. 더욱이 병원균의 침입 또는 물리적 뇌손상등에 의해 손상된 BBB를 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 정상세포 및 마이크로글리아들이 IL-1, IL-6, Tumor necrosis factor 등의 염증반응 cytokine들을 과다하게 생성하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으킨다는 가설이 최근 많은 연구결과들에 의하여 입증되고 있다<sup>43)</sup>.

香附子の 主治效能에 대하여는 《名醫別錄》<sup>2)</sup>에서는 “主除胸中熱 充皮毛 久服利人 益氣 長鬚眉”라고 하였고, 《本草綱目》<sup>3)</sup>에서는 “散時氣寒逆 利三焦 解六鬱 消飲食積聚 痰飲痞滿 .....”이라 하였고, 《本草求真》<sup>4)</sup>에서는 “香附 專屬開鬱 散氣 與木香行氣 貌同實異 .....”라고 敍述하고 있다.

現代에는 香附子를 理氣藥으로 分類하고 있으

며 本草學의 效能이 理氣解鬱, 止痛調經하고 肝胃不和, 氣鬱不舒, 胸腹脇肋脹痛, 淡飲肥滿 등을 治療하니 痴呆의 다양한 原因 중 痰飲과 七情傷을 능히 다스릴 수 있어<sup>1)</sup> 痴呆治療에 活用될 수 있을 것으로 사료되는 本草이다.

또한 最近 韓醫學에서의 치매에 대한 연구동향을 살펴보면 AD의 原因인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구<sup>18,19)</sup>, 腦의 老化和 連繫하여 老화를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究<sup>20,21)</sup>, 臨床에서 使用하는 여러가지 處方이 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 研究<sup>22,23)</sup>가 이루어지고 있으나 單味藥物인 香附子가 白鼠의 行動과 生化學的 變化에 관련된 研究는 아직 接하지 못하였다.

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

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 분리하여 香附子의 細胞毒성을 측정한 결과 mLFC의 생존율은 대조군이 100±2.1(%)로 나타났고 200, 100, 50, 10, 1µg/ml의 실험군이 각각 87±2.2, 90±4.5, 93±3.5, 99±3.0, 102±2.7(%)로 나타나 200µg/ml 이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒性이 나타나지 않았고, 400µg/ml의 실험군이 각각 77±3.7(%)로 細胞毒성을 나타냈고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100±2.7(%)로 나타났고, 400, 200, 100, 50, 10, 1µg/ml의 실험군이 각각 80±4.0, 85±1.5, 88±1.8, 90±3.3, 95±4.2, 96±3.6(%)로 나타나 400 µg/ml 이하의 농도에서는 정상으로 細胞毒性이 나타나지 않아 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 香附子를 처리한 실험군은 각각 21, 34(Ht)로 나타났으니 이는 香附子의 비율과 관계없이 100ng/ml의

PMA와 rIL-1β를 처리한 대조군에 비해 AChE의 발현을 억제된 것이며(Fig. 2), NOsII mRNA의 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)으로 나타났고 대조군은 124(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10µg/ml의 香附子를 투여한 실험군은 각각 29, 115(Ht)로 나타나 香附子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 香附子 실험군은 41±3.5, 69±5.8(%)로 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 알려진 Aβ의 양을 증가시키는 APP, PS-1, PS-2의 발현을 감소시켜 AD에 대하여 효과가 있음을 알 수 있었다.

WBC는 정상군이 10.1±0.9(×10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>), 대조군이 12.2±0.7(×10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타났고 양성대조군은 13.7±0.8(×10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은 10.8±0.3(×10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)으로 유의성 있는 변화를 보였다. RBC는 정상군이 8.3±0.3(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>), 대조군이 8.7±0.2(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각 8.5±0.4, 8.7±0.3(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)으로 나타나 대조군에 비해 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. PLT는 정상군이 752±33(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>), 대조군이 847±27(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타났고 양성대조군은 836±46(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 실험군은 765±25(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 유의성 있는 변화를 보였다(Table I).

AD 환자에서 glucose의 증가는 기억력을 증진시키는 단백질로 알려져 있으며<sup>44)</sup> scopolamine을 주사한 白鼠에서 uric acid의 수치가 증가되었다는 보고가 있고<sup>45)</sup>, scopolamine을 白鼠에 주사하면 AChE가 증가하여 acetylcholine의 양이 급격

히 감소하여 기억과 인식의 장애를 유발하게 되므로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 혈청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과를 분석하였다.

Glucose는 정상군이  $95.8 \pm 4.4$ (mg/dl), 대조군이  $85.3 \pm 3.1$ (mg/dl)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각  $120.2 \pm 4.1$ ,  $105.4 \pm 4.2$ (mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 상승이 나타났다. Uric acid는 정상군이  $1.77 \pm 0.13$ (mg/dl), 대조군이  $2.51 \pm 0.07$ (mg/dl)로 나타났고 양성대조군과 실험군은  $1.92 \pm 0.11$ ,  $1.99 \pm 0.44$ (mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타냈다. AChE activity는 정상군이  $13.6 \pm 2.5$ (U/ml), 대조군이  $48.2 \pm 4.7$ (U/ml)로 나타났고 양성대조군과 실험군은 각각  $19.3 \pm 5.9$ ,  $35.8 \pm 3.7$ (U/ml)로 나타나 모두 유의성 있는 감소를 나타내어 혈청내 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 효과가 있음을 알 수 있었다(Table II).

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 정상군이  $10.1 \pm 2.2$ (sec), 대조군이  $84.1 \pm 2.4$ (sec)로 나타났고, 양성대조군은  $14.1 \pm 3.2$ (sec), 실험군은  $24.5 \pm 3.2$ (sec)로 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. 적은 운동량(small movement ; smlldist)은 정상군이  $161 \pm 12.4$ (cm), 대조군이  $1644 \pm 141$ (cm)로 나타났고, 양성대조군은  $270 \pm 35.0$ (cm), 실험군은  $265 \pm 37.5$ (cm)로 유의성 있는 감소를 나타냈으며, 많은 운동량 (large movement ; lardist)은 정상군이  $44 \pm 14.3$ (cm), 대조군이  $581 \pm 80.1$ (cm)로 나타났고, 양성대조군은  $84 \pm 39.1$ (cm), 실험군은  $113 \pm 22.1$ (cm)로 유의성 있는 감소를 보여 scopolamine에 대한 기억력 감퇴 억제효과를 나타내었다(Fig. 7, 8).

以上的 내용을 總括해 보면 香附子は PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 유전자 발현을 억제시켰고, AChE의 활성, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 억제시켰다. Scopolamine투여로 유도된 白鼠모델에서 Morris water maze 실험에서는 기억력향상 효과가 있었고, glucose의 증가와 uric acid의 감소, 그리고 AChE 활성의 감소가 나타났으니 香附子가 항콜린성 약물로 작용하고 있는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 香附子가 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

香附子の 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. 香附子가 PC-12 cell에 AChE, NOsII mRNA의 發顯을 抑制하였다.
2. 香附子가 PC-12 cell에 AChE의 活性을 抑制하였다.
3. 香附子가 PC-12 cell에 APP와 PS-1 PS-2 發顯을 抑制하였다.
4. 香附子は scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠의 혈청을 분석한 결과 有意性 있는 glucose의 增加, uric acid의 減少, AChE 活性의 減少를 보여주었다.
5. 香附子は scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모델에서 有意性 있는 記憶力 改善 效果를 보여 주었다.

以上的 結果로 보아 香附子가 항콜린작용과 APP와 PS-1, PS-2 발현에 대한 억제능력을 보여 痴呆에 대한 치료에 活用될 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1992:354-5.
2. 陶弘景. 名醫別錄. 北京:新華書店北京發行所. 1986:154.
3. 李時珍. 本草綱目(上·下卷). 北京:新華書店北京發行所. 1982:888-94.
4. 黃宮繡. 本草求真. 臺北: 宏業書局有限公司. 1981:37-49.
5. Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK. Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cell. *Neurosci Lett.* 1991;128:126-8.
6. Fukuyama R, Chandrasekaran K, Rapoport SI. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation is accompanied by differential induction and localization of the amyloid precursor protein (APP) in PC12 cells and variant PC12S cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993;17(1~2):17~22.
7. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992;359:322-5.
8. 김명호. 치매(Dementia)의 정의와 분류. *대한신경과학회지.* 1985;3(1):1-4.
9. 박종한. 치매의 원인과 치료. *대한정신약물학회지.* 1992;3(1):33-40.
10. Bierer L. M, Haroutunian V, Gabriel S, Knott P. J, Carlin L. S, Purohit D. P, Perl D, Dchmeidler J, Kanof P, Davis K. L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease ; relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 1995;64:749-60.
11. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
12. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
13. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A $\beta$  42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996;2(10):1146-50.
14. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.* 1989;245(4916):417-20.
15. Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998;8(11):447-53.
16. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 1999;52(4):691-99.
17. Costagli C, Galli A. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents ; focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(10):1733-7.
18. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, rice DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron.* 1996;17(5):1005-13.

19. 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.
20. 백봉숙 외. 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구. *釜山大學校藥學研究誌.* 1995;29(2):49-56.
21. 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.
22. 우주영 외. 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響. *동의신경정신과학회지.* 1997;8(1):69-80.
23. 조운숙 외. 형방지황탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지.* 1998;9(1):1~24.
24. 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.
25. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996; 236(2):302-8.
26. 金宇哲 외. 統計學概論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
27. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-28.
28. 보건복지부. 보건사회통계연보. 서울:보건복지부. 1991:236-9, 302-9.
29. 黃義完 외. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256-71, 327-30.
30. 郭隆璨. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27-31.
31. Da Cruz e Silva OA, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Lieberburg I, Ramabhadran TV, Suzuki T, Sisodia SS, Gandy S, Greengard P. Regulated cleavage of Alzheimer beta-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience.* 1993;57(4):873-7.
32. Baddeley AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H. The decline of working memory in Alzheimer's disease ; A longitudinal study. *Brain.* 1991;114(Pt 6):2521-42.
33. Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals ; preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron and 3-nitropropionic acid. *J Neurochem.* 2000; 75(1):314-20.
34. 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.
35. Forsell C, Froelich S, Axelman K, Vestling M, Cowburn RF, Lilius L, Johnston JA, Engvall B, Johansson K, Dahlkild A, Ingelsson M, St. George-Hyslop PH, Lannfelt L. A novel pathogenic mutation(Leu262Phe) found in the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1997;234(1):3-6.
36. Breakefield XO, Geller AI. Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol.* 1987;1(4):339-71.
37. Ehlers MR, Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts ; role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry.* 1991;30(42):10065-74.
38. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991;88(16):7247-51.
39. 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):187-94.
40. Pandiella A, Massague J. Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem.* 1991;266(9):5769-73.
41. Levisohn LF, Isacson O. Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res.* 1991;564(2):230-44.
42. Saponjic RM, Mueller K, Krug D, Kunko PM. The effects of haloperidol, scopolamine, and MK-801 on amphetamine-induced increases in ascorbic and uric acid as determined by voltammetry in vivo. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;48(1):161-8.
43. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol.* 1983;129(6):2413-9.
44. 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):1171~1185.
45. 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):313-6.