

聰明湯과 山查聰明湯이 CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of ChongMyung-Tang and SansaChongMyung-Tang Extract on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105

Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

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

This research investigated the effect of the CMT and SCMT on Alzheimer's disease. The effects of the CMT and SCMT extract on expression of proinflammatory cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) in the THP-1 cell; amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE) mRNA of PC-12 cells treated with CT105; the AChE activity and the APP production of PC-12 cell lysate treated with CT105 were investigated. The CMT and SCMT extract suppressed overexpression of IL-1 β , IL-6, TNF- α in the THP-1 cell treated by LPS; the expression of APP, AChE mRNA in PC-12 cells treated with CT105; the AChE activity and the production of APP in PC-12 cell lysate treated with CT105 significantly. This study suggest that CMT and SCMT may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : ChongMyung-Tang(CMT), SansaChongMyung-Tang(SCMT), Dementia, Alzheimer's disease, CT105, cytokine

서 론

Alzheimer's Disease(AD)는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며, 증상으로는 기억력 저하, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화 등을 보인다¹⁾.

AD의 발생에는 β -amyloid peptide(β A), apolipoprotein E, presenilin(PS), free radicals, 염증, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이 중 β A의 침적은 AD의 중요한 인자로, PS 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 생성되고 이 β A의 침적으로 발생하는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 유력한 AD 기

전의 가설이다³⁾. 또한 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 proinflammatory cytokines를 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다^{4,5)}.

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상에 대해서는 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어⁶⁾, acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다^{7,8)}.

한의학에서 癡呆는 《景岳全書·癡狂癡歌》⁹⁾에서 “癡歌”로, 《石室秘錄》¹⁰⁾, 《辨證奇門》¹¹⁾에 “呆病”으로 언급되었으며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있다¹⁰⁻¹²⁾.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》¹³⁾에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 건망을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 건망 및 치매 등의 병증에 활용되고 있다.

최근 들어 한의학계에는 癡呆와 관련된 다수의 실험적 연구

* 교신저자 : 정인철, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : npjeong@hanmail.net, · Tel : 043-229-3727

· 접수 : 2005/09/05 · 수정 : 2006/01/31 · 채택 : 2006/02/08

¹⁴⁻¹⁷)가 보고되었고, 聰明湯은 김¹⁶) 등의 연구에서 학습과 기억에 유의한 효과가 있음이 보고되었으며, 또한 山査肉은 蔡의 연구¹⁷)에서 AD에 응용 가능하다는 결과가 도출된 바 있어, 聰明湯 및 山査肉을 더해 만든 山査聰明湯은 각각 치매의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 예측될 수 있다.

이에 저자는 聰明湯에 山査肉을 더한 山査聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 聰明湯 단독 사용과 山査肉 加味 사용의 효과를 비교 검토해 보고자, 聰明湯, 山査聰明湯과 CT105의 세포독성을 mLFCs와 PC-12 세포주에서 관찰하고, THP-1 cell에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰하였으며, CT105와 rIL-1 β 를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE (acetylcholinesterase) 유전자 발현과 세포성 단백질에서의 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether), leupetin, N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI 1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl₂)는 Sigma사(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRas사(Japan)제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.)제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.)제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.)제품을 그리고, Agarose는 FMC사(U.S.A.)제품을 사용하였고, β -amyloid peptide(Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14 (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1 β 와 anti-TNF- α (Pharmingen, U.S.A.), 그리고 anti-CD44-PE (Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan), 원심분리기(한 일과학, Korea), Bio-freezer(Sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidine affinity column(Invitrogen, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), stereotaxic frame(Adamec, U.S.A.), CELlection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.),

brain matrix(ASI instruments, Warren, MI., U.S.A.), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전 과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, U.S.A.), CO₂ incubator(Lepco, U.S.A.), Cytometry(BD, U.S.A.), Microscope (Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., U.S.A.) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

본 실험에 사용된 Sprague Dawley(SD)계 雌性白鼠는 대한 실험동물센터에서, BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 사용하였으며 실험당일까지 고형 사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 聰明湯(ChongMyungTang; CMT)의 처방 구성은 《東醫寶鑑》²⁴⁾을 기준으로 하였고 山査聰明湯(SansaChongMyung-Tang; SCMT)은 聰明湯에 山査肉 20g을 가미한 것으로, 사용한 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of ChongMyung-Tang(CMT) & SansaChongMyung-Tang(SCMT)

韓藥名	生藥名	CMT 用量(g)	SCMT 用量(g)
白茯苓	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
山査肉	Crataegus Fructus	0	20
Total amount		36g	56g

4) 검액의 조제

聰明湯(36g)과 山査聰明湯(56g)에 각각 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer 냉동고(-84 $^{\circ}$ C)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

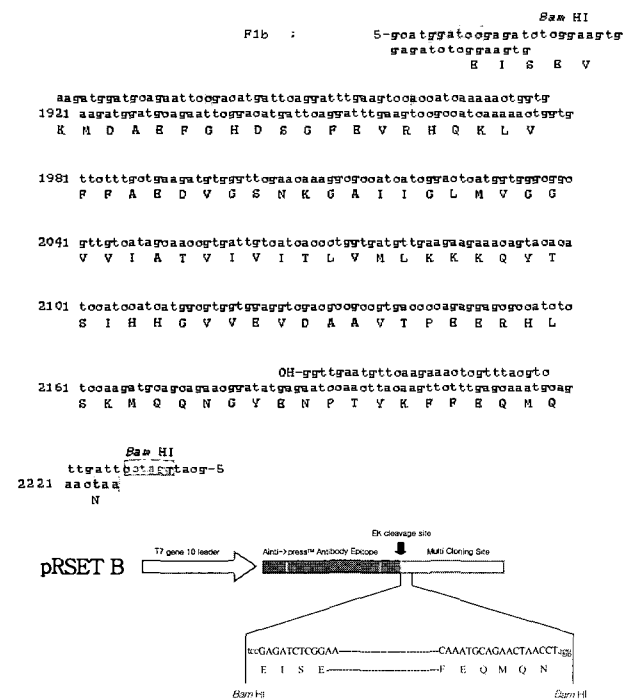
(1) 세포배양

mLFCs는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640(containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I(0.15mg/ml, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml))를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30

분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 105cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다. PC-12 세포주(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL17²¹)는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였고, THP-1 세포주(acute monocytes, ATCC, TIB-202)는 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin(100U/ml), streptomycin(100µg/ml) 그리고 10µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO₂인 37°C 배양기에서 배양하였다.

(2) CT105 복제

CT105를 E. coli에서 발현 정제하기 위해 APP 105 아미노산을 coding하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 Bam HI site를 넣어주었다. PC-12 세포를 LPS로 자극하고 유전자를 추출하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다. 증폭된 절편을 Bam HI로 절단하여 insert를 취해 6×his-tag을 갖는 pRSET B vector의 Bam HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 E. coli BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 E. coli를 획득하였다. 이 E. coli는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트리고 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidine affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT105를 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Construction of pRSET-CT105.

(3) 세포독성(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법¹⁸⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 자란 것을 Trypsin-EDTA 용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×10⁴개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 山査聰明湯 추출물(400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)과 CT105(최종농도 80µM, 40µM, 20µM, 10µM, 5µM, 1µM)를 72시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한, 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) THP-1 세포주와 PC-12 세포주에서의 유전자 발현 분석

(1) THP-1 세포주에서의 약물처리

THP-1 세포주에 LPS(2µg/ml)를 처리하고 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양하여 염증반응 싸이토카인을 유발시키고 聰明湯과 山査聰明湯 추출물을 처리 1시간 전에 HBSS로 세척한 후, 100µg/ml, 10µg/ml의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(2) PC-12 세포주에서의 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10⁶세포를 각각 분주하고 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 聰明湯과 山査聰明湯 추출물을 100µg/ml, 10µg/ml의 농도로 첨가하고, 1시간 후 CT105(20µM)와 rIL-1β(100ng/ml)를 처리하여 5시간 동안 동시 배양하였다.

(3) 유전자 발현 측정

① RNA 추출

배양종료된 PC-12 세포주와 THP-1 세포주를 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 RNAzolB 500µl를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 50µl를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200µl와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3µg을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5µl 10mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides(25pmole/25µl), RNA inhibitor로서 1µl RNase inhibitor(20U/µl), 1µl 100mM

DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(150mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)- α , β -actin, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH를 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 l가 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 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

① human IL-1 β

sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTCCATTAC-3'

② human IL-6

sense oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACGCCACTG-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTCTGTGACTCTAACT-3'

③ human TNF- α

sense oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACAGATTGTTAG-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTGAGCTGTATAGGG-3'

④ human β -actin

sense oligonucleotide	5'-TGGAAATCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

⑤ rat APP

sense oligonucleotide	5'-TCITTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGCTGAGCATCT-3'

⑥ rat AChE

sense oligonucleotide	5'-TCITTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGCTGAGCATCT-3'

⑦ rat G3PDH

sense oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height; Ht)으로 측정하였다.

3) AChE 활성도 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 聰明湯과 山查聰明湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 CT105(20 μ M)와 rIL-1 β (100ng/ml)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 완충용액 {Tris-HCl(200mM; pH 8.0), 150mM 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 염색법¹⁹⁾으로 단백질을 정량하여 50 μ g으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포성 lysate를 label한 후 sodium chloride solution 0.2ml와 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) APP의 western blot 분석

Cell lysate(50 μ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후 anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean \pm standard deviation으로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법²⁰⁾을 이용하여 통계처리하였고, p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

성 적

1. 총명탕 및 산사총명탕과 CT105의 세포독성

1) mLFC에서 총명탕과 산사총명탕의 세포독성

聰明湯과 山查聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 聰明湯 투여군과 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山查聰明湯 투여군에서는 큰 변화가 없었으나, 400 μ g/ml의 聰明湯 투여군은 70.5 \pm 4.6(%)으로 감소되었으며, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山查聰明湯 투여군은 각각 58.7 \pm 4.9(%), 72.9 \pm 5.2(%)로 감소되었다(Fig. 1).

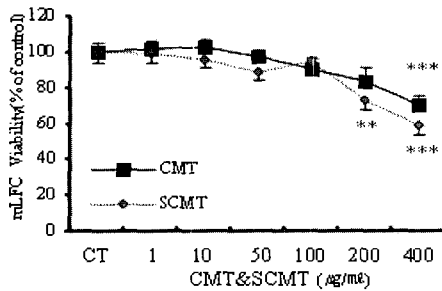


Fig. 1. Cytotoxicity effects of CMT & SCMT extract on mLFCs.

2) PC-12 세포주에서 총명탕과 산사총명탕의 세포독성

聰明湯과 山查聰明湯의 세포독성을 측정 한 결과, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 200μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml의 聰明湯 투여군과 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml의 山查聰明湯 투여군에서는 큰 변화가 없었으나, 400μg/ml의 聰明湯 투여군은 71.5±6.5(%)로 감소되었고 400μg/ml, 200μg/ml의 山查聰明湯 투여군은 각각 68.6±4.9(%), 46.8±7.6(%)로 감소되었다(Fig. 2).

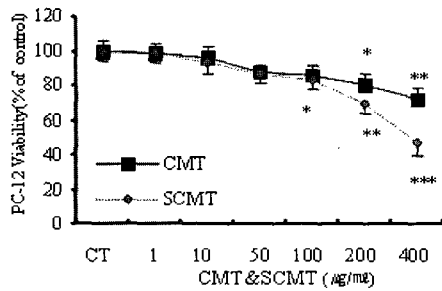


Fig. 2. Cytotoxicity effects of CMT & SCMT extract on PC-12 cell line. mLFCs and PC-12 Cell line were pretreated with various concentration CMT and SCMT extract. The results are expressed the mean±S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) PC-12 세포주에 대한 CT105의 세포독성

CT105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT105 투여군은 큰 변화가 없었고, 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타냈다(Fig. 3).

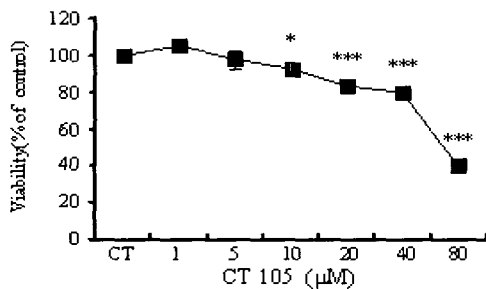


Fig. 3. Cytotoxicity of CT105 in PC-12 cell line. PC-12 cell line were pretreated with 1μM, 5μM, 10μM, 20μM, 40μM, and 80μM of CT105 for 72h. The results are expressed the mean±S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. THP-1 세포주의 염증반응 사이토카인 발현 억제 효과

THP-1 세포주에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰한 결과, IL-1β mRNA 발현에 있어서 대조군이 104(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 30(Ht), 72(Ht), 山查聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 25(Ht), 29(Ht)로 모두 두에서 발현이 억제되었다(Fig. 4).

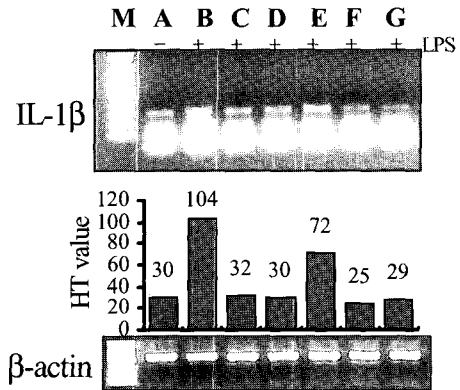


Fig. 4. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on IL-1β gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration SCMT extract(100, 10mg/ml) in the presence LPS(2mg/ml) for 6hrs. IL-1β mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β-actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2mg/ml Control(B), Cyclosporin A(CsA) 10 mg/ml(C), CMT 100mg/ml(D), CMT 10mg/ml(E), SCMT 100mg/ml(F), SCMT 10mg/ml(G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed IL-1β mRNA expression and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

IL-6 mRNA 발현에 있어서는 대조군이 126(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 27(Ht), 30(Ht), 山查聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 16(Ht), 34(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 5).

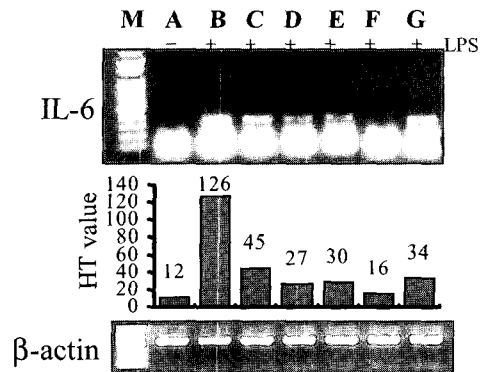


Fig. 5. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on IL-6 gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration SCMT extract(100, 10mg/ml) in the presence LPS(2mg/ml) for 6hrs. IL-6 mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β-actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2mg/ml Control(B), CsA 10mg/ml(C), CMT 100mg/ml(D), CMT 10mg/ml(E), SCMT 100mg/ml(F), SCMT 10mg/ml(G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed IL-6 mRNA expression and internal control(β-actin) in THP-1 cell line.

TNF- α mRNA 발현에 있어서는 대조군이 117(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 32(Ht), 86(Ht), 山查聰明湯 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 31(Ht), 33(Ht)으로 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 6).

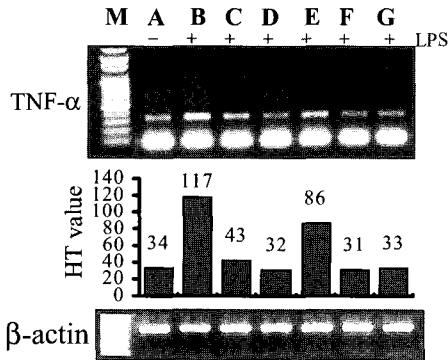


Fig. 6. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on TNF- α gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration SCMT extract(100, 10mg/ml) in the presence LPS(2mg/ml) for 6hrs. TNF- α mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2mg/ml Control(B), Cyclosporin A(CsA) 10 mg/ml (C), CMT 100 μ g/ml (D), CMT 10 μ g/ml (E), SCMT 100 μ g/ml (F), SCMT 10 μ g/ml (G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed TNF- α mRNA expression and internal control(β -actin) in THP-1 cell line.

3. PC-12 세포주의 APP, AChE의 유전자 발현 억제 효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, CT105와 rIL-1 β 만을 처리한 대조군이 136(Ht)인데 비해, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 56(Ht), 117(Ht)이었고, 山查聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 17(Ht), 78(Ht)로 나타나 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 7).

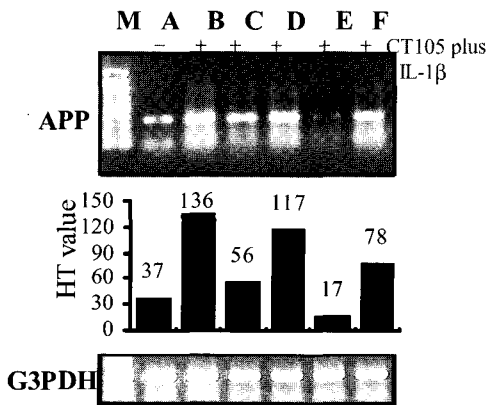


Fig. 7. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1 β . Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and SCMT extract(100, 10 μ g/ml) in the presence CT105(20 μ M) plus recombinant IL-1 β (100ng/ml) for 6h. APP mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT105 20 μ M plus recombinant IL-1 β 100ng/ml Control(B), CMT 100 μ g/ml (C), CMT 10 μ g/ml (D), SCMT 100 μ g/ml (E), SCMT 10 μ g/ml (F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 45(Ht)인데 비해, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 20(Ht), 25(Ht)이었고, 山查聰明湯을 함께 투여한 실험군은 각각 21(Ht), 30(Ht)으로 나타나 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 8).

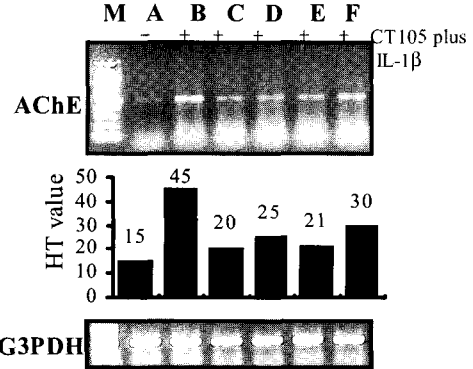


Fig. 8. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1 β . Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and SCMT extract(100, 10 μ g/ml) in the presence CT105(20 μ M) plus recombinant IL-1 β (100ng/ml) for 6h. AChE mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT105 20 μ M plus recombinant IL-1 β 100ng/ml Control(B), CMT 100 μ g/ml (C), CMT 10 μ g/ml (D), SCMT 100 μ g/ml (E), SCMT 10 μ g/ml (F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

4. PC-12 세포주 세포성 단백질의 AChE activity와 APP의 발현 억제효과

1) AChE activity 억제 효과

PC-12 세포주에서의 AChE activity를 측정할 결과, CT105와 rIL-1 β 만을 처리한 대조군이 100.0 \pm 8.6(%)인데 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 聰明湯을 함께 투여한 군은 각각 68.4 \pm 9.5(%), 87.5 \pm 5.9(%)이었고, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 山查聰明湯을 함께 투여한 군은 각각 54.3 \pm 7.6(%), 76.6 \pm 8.2(%)로 100 μ g/ml의 聰明湯 투여군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 山查聰明湯 투여군에서 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였다(Fig. 9).

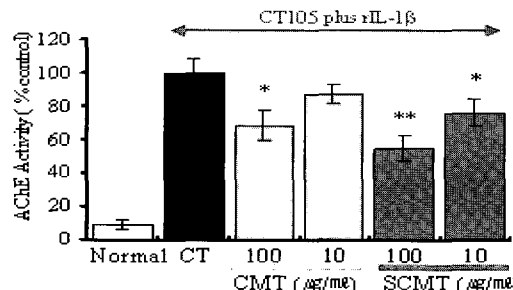


Fig. 9. Inhibitory effects of CMT and SCMT extract on the AChE activity in PC-12 cell lysate. PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and SCMT extract(100, 10 μ g/ml) in the presence CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml) for 24h. The cell lysate(100 μ l, ng/ml) were measured using AChE diagnostic kits. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Media was not treated, CT105 plus rIL-1 β was control, CT105 plus rIL-1 β + CMT and SCMT(100 μ g/ml), and CT105 plus rIL-1 β + CMT and SCMT(10 μ g/ml). Statistically significant value compared with CT105 plus rIL-1 β control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) APP의 발현 억제효과

PC-12 세포주에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, CT105와 rIL-1 β 만을 처리한 대조군에 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 聰明湯과 山查聰明湯을 함께 투여한 군에서 APP 발현이 억제되었다(Fig. 10).

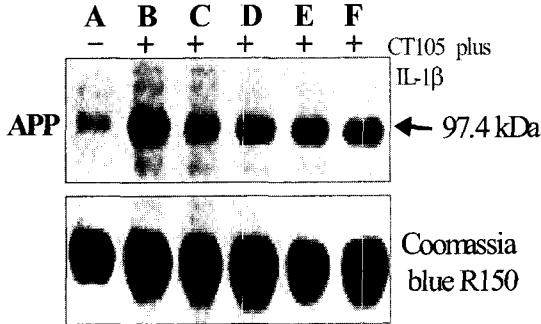


Fig. 10. Suppression effects of CMT and SCMT on APP in PC-12 cell lysate by Western blot analysis. PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and SCMT extract in the presence CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml) for 24h. APP expression was measured by immune Western blot assay. The cell lysate(50mg/lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. RPMI-1640 media control was not treated(A). CT105 20 μ M plus rIL-1 β 100ng/ml Control(B). CMT 100 μ g/ml (C). CMT 10 μ g/ml(D). SCMT 100 μ g/ml (E). SCMT 10 μ g/ml (F).

고찰

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 기능저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능 장애를 나타내며²¹⁾, 높은 유병율과 사망률의 문제 뿐 아니라 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래하는데, 근래 들어 생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명이 크게 연장되어 치매는 점차 증가 추세에 있어 커다란 사회문제로 대두되고 있다²²⁾.

痴呆를 야기하는 원인질환은 뇌의 퇴행성 변화, 뇌혈관장애, 뇌의 염증성장애, 대사성질환, 내분비질환, 외상, 그 외 약물이나 알코올중독 등이며¹⁾, 뇌의 퇴행성 변화에 의한 AD와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성痴呆 그리고 양자가 혼재된 혼합형痴呆가 높은 비율을 차지하고 있다²¹⁾.

AD는 1907년 Alois Alzheimer에 의해 최초로 언급되었는데²³⁾, 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며¹⁾, 증상으로는 병의 초기부터 기억력 저하가 나타나는데, 최근의 기억에 대한 손상이 더욱 크며, 상대적으로 오래된 기억은 보존되는 경향이 있다. 병이 진행되면서, 점차 기억력의 손실, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화가 나타나는데²¹⁾, 구체적으로 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 지남력 감퇴, 정서불안정, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며^{1,24)}, 마지막 단계에서 환자들은 침상에서만 생활하다가 폐염, 욕창, 패혈증 등에 의해

생을 마감하게 된다²⁵⁾. 생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고되고 있으며, 보편적으로 동양보다 서양에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 빈발하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 질환에 이환되는 것으로 역학적 조사에 의해 보고되어 있다²⁶⁾.

AD는 β A, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발 인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데²³⁾, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 만들어지게 되고, 이 β A의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다³⁾.

APP는 21번 염색체에 위치하고 있는 단백질로, 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자의 경우 30~40대에 조기치매 현상을 빈번히 나타내고 그 환자의 뇌에서 노인반과 신경섬유다발이 발견되는데, 이는 유전자 수가 증가한 효과에 의해 APP가 과다생성되었기 때문이라고 추측되며²⁷⁾, AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되고 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가된다는 보고로 볼 때, APP가 노화와 치매 형성과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다²⁸⁾.

큰 분자량의 APP가 잘라져서 β A가 생성되는데, APP는 다양한 molecular weight form이 있어, β A sequence를 포함한 amino acid의 수에 따라 APP695, APP751, APP770 등으로 나뉜다. 결국 β A는 β -secretase나 γ -secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로 일부가 잘라져서 비정상적인 공정과정을 거쳐 β A를 만드는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다²⁷⁾.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 β A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 β A가 신경세포를 손상시켜 결국痴呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. β A는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉬운 상태가 됨으로써 치매의 증상이 유발되는 것이다²⁹⁾.

또한 최근에는 APP의 일부분인 CT105가 β A보다 더 독성이 있다는 보고와³⁰⁾, β A를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등²⁸⁾, β A와 CT105의 독성기전에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있는데, β A의 파인이 뇌 안에서의 항산화 작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다^{31,32)}.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데³³⁾, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonin, GABA 등의 수준이 병적으로 낮아진다^{7,8)}. 특히 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고⁶⁾,

acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 증거를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다^{7,8)}.

비록 원인요법은 아니지만 감소된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등³⁴⁾과 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등^{35,36)}이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다^{35,36)}.

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 Blood Brain Barrier가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 proinflammatory cytokines들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다^{4,5,37)}.

정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 microglial cell로 astrocyte의 주요 자극인자인 IL-1 및 TNF- α 를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고^{4,38)}, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다^{37,39)}.

또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 proinflammatory cytokines가 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다³⁹⁾. 특히 β A가 침적된 노인반 주변의 microglial cell은 β A에 의해 활성화되어 IL-1, TNF- α 등의 proinflammatory cytokines를 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾.

한의학에서 癡呆는 《景岳全書·癡狂癡獸》⁹⁾에 “癡獸”으로, 《石室秘錄》¹⁰⁾, 《辨證奇門》¹¹⁾에서 “呆病”으로 언급되었으며, 《內經》⁴¹⁾과 歷代醫書^{12,42-44)}에서 언급된 健忘 등과 유사한 점을 찾을 수 있다.

현재 癡呆는 呆病과 健忘을 근거로 변증되며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻礙, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있고⁹⁻¹²⁾, 증상은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽怒, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이고, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다^{10,12,44,45)}.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》¹³⁾에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 건강을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 心虛

및 痰濁으로 인한 건망 및 치매 등의 병증에 활용되고 있으며, 김¹⁶⁾ 등은 聰明湯이 건강유도백서의 학습과 기억에 유의한 효과가 있음을 보고한 바 있다.

山查肉은 장미과에 속한 낙엽교목인 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로, 性味는 微溫 無毒, 酸甘하고 脾, 胃, 肝經에 歸하는데⁴⁶⁻⁴⁸⁾, 채¹⁷⁾ 등은 실험적으로 山查肉이 AD 병태 모델에 대해 항치매효과를 나타냈다는 연구결과를 도출한 바 있다.

이에 저자는 聰明湯과 山查肉을 가미한 山查聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명, 비교검토해 보고자, 聰明湯, 山查聰明湯과 CT105의 세포독성을 mLFCs와 PC-12 세포주에서 관찰하고, THP-1 cell에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰하였으며, CT105와 rIL-1 β 를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현과 세포성 단백질에서의 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(聰明湯 및 山查聰明湯)과 처리물질(CT105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 聰明湯 및 山查聰明湯을 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나, 400 μ g/ml의 실험군은 70.5 \pm 4.6(%)로 감소되었으며, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山查聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml의 실험군은 각각 72.9 \pm 5.2(%), 58.7 \pm 4.9(%)로 감소되었고(Fig. 1), PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나 400 μ g/ml의 실험군은 71.5 \pm 6.5(%)로 감소되었으며, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山查聰明湯 실험군에서는 큰 변화가 없었으나 200 μ g/ml, 400 μ g/ml의 실험군은 각각 68.6 \pm 4.9(%), 46.8 \pm 7.6(%)으로 감소되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 주로 100 μ g/ml 이하의 농도로 聰明湯 및 山查聰明湯을 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 세포독성을 보이지 않은 것으로 판단할 수 있는 생존율 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 주로 100 μ g/ml와 10 μ g/ml의 聰明湯 및 山查聰明湯을 사용하기로 하였다.

실험에 사용된 PC-12 세포주는 rat의 pheochromocytoma에서 유래된 세포로 PS-1의 발현이 쉽게 관찰되어 AD의 연구에 사용되는 세포이며⁴⁹⁾, CT105는 β A를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로, 실험적으로 PC-12 세포주와 cortical neuron에 독성을 나타내고, 생쥐에 대해 기억력을 감퇴시키고 신경변성을 초래하며 갈슘의 항상성을 파괴하는 작용을 하고 배양된 microglial cell에서 IL-1, IL-6 유전자를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있다⁵⁰⁾.

CT105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M의 CT105 투여군은 큰 변화가 없었고, 80 μ M, 40 μ M 투여군은 각각 40.0 \pm 1.4(%), 79.5 \pm 3.7(%)로 감소, 세포독성을 나타내어(Fig. 3), 이후 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 20 μ M 농도의 CT105

를 주로 처리하기로 하였다.

THP-1 cell은 사람의 monocyte 세포로, LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태를 나타내므로 사람의 microglial cell의 모델로 사용할 수 있고⁵¹⁾, 또한 LPS와 Aβ를 처리한 THP-1 cell에서 염증반응 사이토카인인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다고 알려져 있다⁵²⁾. 이런 배경에서 THP-1 cell의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰한 결과, IL-1β mRNA 발현에 있어서 대조군이 104(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 30(Ht), 72(Ht), 山査聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 25(Ht), 29(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었고, IL-6 mRNA 발현에 있어서는 대조군이 126(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 27(Ht), 30(Ht), 山査聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 16(Ht), 34(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었으며 TNF-α mRNA 발현에 있어서는 대조군이 117(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 32(Ht), 86(Ht), 山査聰明湯 100μg/ml, 10μg/ml의 실험군은 각각 31(Ht), 33(Ht)으로 역시 발현이 억제되었다(Fig. 4-6). 여기서 聰明湯과 山査聰明湯은 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 과잉발현을 일정정도 감소시켜 AD의 原因 중 하나로 알려진 염증반응 사이토카인의 과잉을 억제하여 항치매효과를 보였으며 聰明湯에 비해 山査聰明湯이 더욱 그 효과가 좋을 것으로 생각된다.

AD에 미치는 聰明湯 및 山査聰明湯의 효과를 알아보고자 PC-12 세포주에 20μM의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1β를 처리한 후 각각 다른 농도의 聰明湯 및 山査聰明湯(100μg/ml, 10μg/ml)를 24시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, APP, AChE 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하였다.

PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, CT105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 聰明湯 및 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군에서 모두 발현이 억제되었는데(Fig. 6, 7), 이는 聰明湯 및 山査聰明湯이 노인반 형성에 관여하는 APP, 기억력장애에 중요한 역할을 하는 AChE를 억제함으로써 AD의 기억력 감퇴 등 증상 치료에 기여할 수 있음을 보여준 것이라 할 수 있겠다.

PC-12 세포주 세포성단백질에서 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20μM의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1β를 처리한 뒤 서로 다른 농도의 聰明湯 및 山査聰明湯을 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도는 CT105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 100.0±8.6(%)인데 비해 100μg/ml의 聰明湯 및 100μg/ml, 10μg/ml 山査聰明湯 실험군은 각각 68.4±9.5(%), 54.3±7.6(%), 76.6±8.2(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제 효과를 보였는데 (Table 4, Fig. 8), 이를 AChE 유전자 발현 결과와 함께 보면 聰明湯 및 山査聰明湯의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 AChE가 억제되는데, 聰明湯 및 山査聰明湯의 투여가 acetylcholine의 양을 증가시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

APP는 Western blot을 통해 측정하였는데, CT105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100μg/ml, 10μg/ml의 聰明湯 및 山査聰明湯을 함께 투여한 실험군에서 억제 효과를 보였다(Fig. 9).

이를 APP 유전자 발현 결과와 함께 보면 聰明湯 및 山査聰明湯의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 APP가 억제된 것으로 聰明湯 및 山査聰明湯의 투여가 βA의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써 임상적으로 AD의 예방에 사용해 볼 수 있음을 보여 준 것이라 할 수 있겠다.

이상의 결과로 聰明湯 및 山査聰明湯은 βA의 과다 생성, microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와, choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 聰明湯 및 山査聰明湯의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

聰明湯 및 山査聰明湯이 CT105로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

聰明湯 및 山査聰明湯은 THP-1 cell에서의 IL-1β, IL-6, TNF-α의 發顯을 모두 抑制하였고 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하였으며 PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE의 활성도와 APP 발현을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯과 山査聰明湯은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전 및 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1988.
2. Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J.C., Anthony, D.C., Koo, E.H., Goate, A.M., Selkoe, D.J., Arango, J.C. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβ 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med*, 2(10):1146-1150, 1996.
3. McGeer, E.G., McGeer, P.L. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol*, 33(5):371-378, 1998.
4. Pyo, H., Joe, E., Jung, S., Lee, S.H., Jou, I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*, 274(49):34584-34589, 1999.
5. Downen, M., Amaral, T.D., Hua, L.L., Zhao, M.L., Lee, S.C. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28(2):114-127, 1999.

6. Trabace, L., Cassano, T., Steardo, L., Pietra, C., Villetti, G., Kendrick, K.M., Cuomo, V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1):187-194, 2000.
7. Kasa, P., Papp, H., Torok, I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience*, 101(1):89-100, 2000.
8. Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(10):2393-2402, 2000.
9. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
10. 陳士鐸 : 石室秘錄, 北京, 中國中醫藥出版社, p 125, 1991.
11. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
12. 黃大東 외 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp 378-381, 1989.
13. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp 55-56, 1996.
14. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 10(1):1-16, 1999.
15. 정인철, 이상룡 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(2):260-276, 2001.
16. 김영옥 외 : 聰明湯이 健忘誘導白鼠의 學習과 記憶에 미치는 영향, 韓方再活醫學科學會誌, 8(2):464-479, 1998.
17. 채종걸, 정인철, 이상룡 : 산사육이 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 16(2):279-288, 2002.
18. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, Warren, J.T., Kennedy, S., Boyd MR : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112, 1990.
19. Zor, T., Selinger, Z : Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236(2):302-308, 1996.
20. 金宇哲 외. 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp 177-179, 1990.
21. 김지현, 황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp 256-271, 327-330, 1992.
22. 이가옥 : 노인생활실태 분석 및 정책과제, 한국보건사회연구원, pp 114-132, 1994.
23. 손운경 : Alzheimer병 신경병리학적 소견과 분자생물학적 연구동향, 계명의대논문집, 16(3):323-338, 1997.
24. 이광우 외 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp 199-210, 1997.
25. Swash, M., Oxbury, J. : *Clinical Neurology*, NewYork, 1:120-129, 1991.
26. Chui, H., Zhang, Q. : Evaluation of dementia: A systematic study of the usefulness of the American Academy of Neurology's Practice Parameters. *Neurology*, 49:925-935, 1997.
27. Reznik-Wolf, H., Machado, J., Haroutunian, V., DeMarco, L., Walter, G.F., Goldman, B., Davidson, M., Johnston, J.A., Lannfelt, L., Dani, S.U., Friedman, E. : Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains. *J Neurogenet*, 12(1):55-65, 1998.
28. Breakefield, X.O., Geller, A.I. Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol*, 1(4):339-371, 1987.
29. Mattson, M.P., Guo, Z.H., Geiger, J.D. 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*, 73(2):532-537, 1999.
30. Bryan-Sisneros, A.A., Fraser, S.P., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na⁺/Ca²⁺ gradients. *Neuroreport*, 11(15):3357-3360, 2000.
31. Kontush, A. Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1120-1131, 2001.
32. Kourie, J.I. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. *Cell - Mol Neurobiol*, 21(3):173-213, 2001.
33. 延炳吉. 치매의 약물요법, 대한의사협회지, 42(10):1010-1014, 1999.
34. Linert, W., Bridge, M.H., Huber, M., Bjugstad, K.B., Grossman, S., Arendash, G.W. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine ; relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1454(2):143-152, 1999.
35. Raskind, M.A., Sadowsky, C.H., Sigmund, W.R., Beitler, P.J., Auster, S.B. Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 54(7):836-840, 1997.
36. Rupniak, N.M., Tye, S.J., Field, M.J. Enhanced performance of spatial and visual recognition memory tasks by the selective acetylcholinesterase inhibitor E2020 in rhesus monkeys. *Psychopharmacology(Berl)*, 131(4):406-410, 1997.
37. Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., Hirsch, E.C. FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*, 19(9):3440-3447, 1999.
38. S.C. Lee, W. Liu, D.W. Dickson, C.F. Brosnan and J.W.

- Berman : Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 150(7):2659-2667, 1993.
39. Selmaj, K., Shafit-Zagardo, B., Aquino, D.A., Farooq, M., Raine, C.S., Norton, W.T., Brosnan, C.F. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem*, 57(3):823-830, 1991.
40. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 74(3):1017-1025, 2000.
41. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院, pp 68-70, 79-96, 134-137, 174, 175, 217-218, 229, 241-243, 342, 1985.
42. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp 129-135, 534, 545, 550, 1982.
43. 趙 佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, pp 822-825, 1987.
44. 陳 輝 외 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp 242-251, 784-791, 1993.
45. 徐 浩 외 : 從痰瘀論治老年期痴呆研究進展, 浙江中醫雜誌, 31(10):474-475, 1996.
46. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, pp 369-370, 1991.
47. 李尙仁 외 : 漢藥臨床應用, 서울, 傳統醫學研究所, pp 485-486, 1993.
48. 김창민 외 역 : 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, pp 2658-2663, 1998.
49. Brambilla, A.A., Ghiorzi, N., Pitsicas, Borsini, F. DAU 6215, a novel 5-HT sub(3)-receptor antagonist, selectively antagonizes scopolamine-induced deficit in a passive-avoidance task, but not scopolamine-induced hypermotility in rats. *Pharm. Pharmacol*, 45:841-843, 1993.
50. Chong, Y.H. Effect of a carboxy-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sciences*, 61(23):2323-2333, 1997.
51. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 74(3):1017-1025, 2000.
52. Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382(6593):685-691, 1996.