

人蔘山查複合方이 Alzheimer성 癡呆와 관련된 유전자 發顯에 미치는 영향

한신희[#], 길기정^{1*}

중부대학교 한방건강관리학과 1: 중부대학교 한약자원학과

Effects of Ginseng Radix plus Crataegi Fructus on the Gene Expression in Relation to Alzheimer's Disease.

Sin-Hee Han[#], Gi-Jung Kil^{1*}

Dept. of Oriental Health Care, Joongbu University, Kumsan 312-702, Korea

1: Dept. of Oriental Medicine Resources, Joongbu University, Kumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : This research was investigated the effect of the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus on the gene expression in relation to Alzheimer's disease.

Methods : Observed gene expression of the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract on IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, and NOS-II mRNA of BV2 microglia cell line treated with lipopolysacchride.

Results : The Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract suppressed the gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS-II mRNA in BV2 microglia cell line treated with lipopolysacchride.

Conclusion : These results suggest that the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key words : Ginseng Radix, Alzheimer's disease, IL-1 β , TNF- α , COX-2.

*교신저자: 길기정, 중부대학교 한약자원학과

· Tel: 041-750-6225 · E-mail: kildosa@joongbu.ac.kr

#제1저자: 한신희, 중부대학교 한방건강관리학과

· Tel: 041-750-6874 · E-mail: herbman@joongbu.ac.kr

· 접수: 2006년 11월 8일 · 수정: 2006년 11월 19일 · 채택: 2006년 12월 20일

서론

癡呆는 여러 가지 원인질환에 의해惹起되는 기억력을 비롯한 認知機能의 저하를 특징으로 하는 症候群으로, 대개 만성적으로 진행하여 여러 가지 방면에서 고도의 대뇌기능의 障礙를 나타내며^{1,6)}, 일상생활의 營爲에서도 심각한 障礙를 초래한다⁷⁾.

癡呆는 알츠하이머병(Alzheimer's disease ; AD), 혈관성치매(vascular dementia ; VD), 중독성치매로 구분되며, 그중에서 AD는 50% 이상의 가장 많은 비율을 차지하고 있는 것으로서^{8,9)}, 뇌의 全般的 萎縮과 특유의 조직학적 소견을 나타내며^{1,2,6)}, 發病은 서서히, 경과는 漸進的인 것이 특징이다¹⁾. 증상으로는 주위에 대한 無關心, 自發性의 缺如, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緒不安, 騷亂, 또는 憂鬱, 無言, 無反應, 大小便失禁 등을 보인다^{2,3,4,5)}.

AD는 β A, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데^{10,12)}, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 만들어지게 되고, 이 β A의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다^{13,15)}.

人蔘은 五加科(두릅나무과; Araliaceae)에 속한 多年生 草本인 人蔘 *Panax ginseng* C.A. MEY. 의 뿌리를 鬚根을 제거하고 乾燥한 것¹⁶⁾으로, 人蔘은 《神農本草經》¹⁷⁾에 脾肺經에 入하여 大補元氣, 生津止渴하는 作用이 있으며, 主補五臟, 安精神, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心益智 등으로 언급되어있다.

山査는 薔薇科(장미과; Rosaceae)에 속한 落葉喬木인 山里紅 *Crataegus pinnatifida* BGE. var. *major* N.E. BR, 山査 *C. pinnatifida* BGE. 또는 野山査 *C. cuneata* SIEB. et ZUCC. 의 成熟한 果實을 乾燥한 것으로 가을에 採取하여 切片해서 乾燥시킨다¹⁶⁾.

山査는 혈관수축으로 인한 혈류장애와 심뇌혈관계 질환에 있어서 혈관의 저항을 개선할 목적으로 응용할 수 있을 것으로 생각된다¹⁸⁾.

최근 癡呆에 대한 연구동향을 살펴보면 2가지 이상의 한약재로 구성된 복합방의 연구가 많이 되고 있고, 복합방이 치매의 치료에 보다 효과가 높다는 보고가 많다^{19,21)}.

본 연구에서는 人蔘의 補氣작용과 山査의 活血작용을 응용한 人蔘山査複合方이 Alzheimer's 癡呆와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 실험적으로 규

명하고자 人蔘山査複合方의 추출액이 lipopolysacchride(LPS)를 처리한 BV2 microglia 세포주에서 염증성 반응에서 중요한 역할을 하는 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 와 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하고 유전자 발현을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐와 BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험당일까지 고형사료(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, 한국)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 人蔘山査複合方(Ginseng Radix plus Crataegi Fructus ; Gin-CF)에 사용한 약재는 금산약재시장에서 금산인삼 4년근과 한국산 山査를 구입하여 중부대학교 한약자원학과 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 사용하였고, 人蔘山査複合方의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Ginseng Radix plus Crataegi Fructus(Gin-CF)

Pharmacognosy Name	Scientific Name	Amount (g)
Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.	15
Crataegi Fructus	<i>Crataegus cuneata</i> Sieb. et Zucc.	15
Total amount		30

2. 방법

1) 檢液의 調製

人蔘 15g, 山査 15g를 합한 人蔘山査複合方 30g에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 250ml 추출액을 여과지(WHATMAN NO. 1)로 1회 여과한 후 감압 농축장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer (-84℃)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) BV2 microglia 세포주에서 proinflammatory 및 anti-proinflammatory cytokine mRNA 發顯에 대한 Quantitative real-time-PCR 分析

BV2 세포주는 미세아교세포(microglia cells)의 phenotypic과 functional을 모두 갖춘 세포주로 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, NY, USA) 으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

(1) 약물처리

BV2 microglia (immortalized murine cell line) 세포주는 미세아교세포(microglia cells)의 phenotypic과 functional을 모두 갖춘 세포주로 Tong H. Joh (Burke Institute, Cornell University, NY, USA)로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

BV2 microglia 세포주는 24 wells plate에 2×10^5 세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 人蔘山査複合方 추출물을 100 μ g/ml, 50 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도로 첨가하고 1시간 후 lipopolysacchride(LPS) 0.1 μ g/ml를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하여 proinflammatory cytokine와 anti-proinflammatory cytokine의 유전자 發顯을 유도하였다.

(2) BV2 microglia 세포주에서 RNA 분리

먼저 BV2 microglia 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 人蔘山査複合方 추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS (0.1 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^B 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간

다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% 에탄올로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다.

추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10U/ μ l) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 μ mole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM 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 2,000rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

사용된 primers는

mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3H)

Forward Primer: 5' TGACCACTCACTCAGCG3

Reverse Primer: 5' CCAACGTCAGAGTCGAG3

: mouse TNF- α

Forward Primer: 5' CIGICACIACAACITCCCGICATCGIC3

Reverse Primer: 5' ATGACATACAAATCCCTCAGCGGICG3

: mouse IL-6

Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGAC 3'

Reverse Primer: 5' G1GTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

: mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG

Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

: mouse COX-2

Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'

Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'

: mouse NOS-II

Forward Primer: GGCACCCCTGTGAGACCTTTG

Reverse Primer: GCATITGGAAGTGAACCGTTTC

염증사이토카인 및 항염증사이토카인 유전자 發顯은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다.

Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50°C, 10min at 94°C, 그리고 40cycles을 0.15min at 95°C, 1min at 60°C에서 수행하였다.

실험군과 對照群은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

$$y = x(1+e)^n$$

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

2) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

성 적

1. Quantitative real-time-PCR on BV2 cell line

BV2 세포주에서 mRNA를 분리하여 real-time PCR로 분석하였다.

Fig. 1의 A는 각각의 실험군에 대한 dissociation 곡선을 그린 것으로 GAPDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II에 대한 분석으로 primer의 design이 정확히 이루어진 상태를 보여주고 있다.

그리고 Fig. 1의 B는 real-time PCR의 실시간 증

폭되는 표준곡선을 보여주는 것으로 40 cycle이 반복되면서 GAPDH와 염증사이토카인의 증폭에 대한 상대정량(RQ)치를 분석한 그림이다.

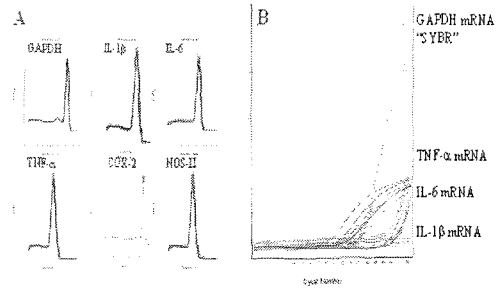


Fig. 1. Dissociation curves (A) and Amplification profiles (B) of inflammatory gene expression in BV2 cell line.

Messenger RNA of GAPDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and NOS-II gene expression in BV2 cells samples were amplified using mouse inflammatory mRNA gene primers by SYBR Green PCR. The dissociation curves (A) for GAPDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and NOS-II mRNA and GAPDH products are shown in panels B, respectively. The Tm values of inflammatory gene and GAPDH amplicons are indicated alongside their corresponding dissociation curves.

1) IL-1β 유전자 發顯에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-1β mRNA 유전자 發顯은 LPS로 활성화시킨 對照群에 대한 실험군의 상대정량(RQ) 값으로 분석하였다. 對照群의 상대정량(RQ) 값이 1 일때 무처리군의 IL-1β mRNA 유전자 發顯의 상대정량(RQ) 값은 0.078이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 人蔘山查複合方 (Gin-CF: 100, 50, 10μg/ml) 처리군의 상대정량(RQ) 값은 각각 0.775, 0.824, 0.965로 나타나 對照群에 비해 농도 의존적으로 유전자 發顯을 억제하였다(Fig. 2).

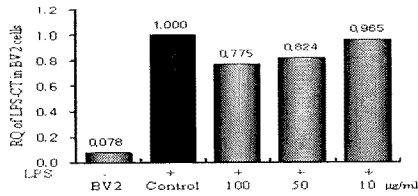


Fig. 2. Inhibitory effects of Gin-CF extract on IL-1β mRNA expression in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 μg/ml) for 6hrs. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

2) IL-6 유전자 發顯에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-6 mRNA 유전자 發顯은 LPS로 활성화시킨 對照群에 대한 실험군의 상대정량(RQ) 값으로 분석하였다. 對照群의 상대정량(RQ) 값이 1 일때 무처리군의 IL-6 mRNA 유전자 發顯의 상대정량(RQ) 값은 0.141이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 人參山查複合方 (Gin-CF: 100, 50, 10 μg/ml) 처리군의 상대정량(RQ) 값은 각각 0.677, 0.785, 0.985로 나타나 對照群에 비해 농도 의존적으로 유전자 發顯을 억제하였다(Fig. 3).

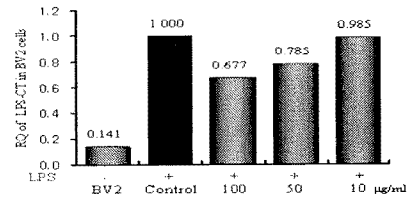


Fig. 3. Inhibitory effects of Gin-CF extract on IL-6 mRNA expression in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 μg/ml) for 6hrs. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

3) TNF-α 유전자 發顯에 미치는 영향

BV2 세포주에서 TNF-α mRNA 유전자 發顯은 LPS로 활성화시킨 對照群에 대한 실험군의 상대정량(RQ) 값으로 분석하였다. 對照群의 상대정량(RQ) 값이 1 일때 무처리군의 TNF-α mRNA 유전자 發顯의 상대정량(RQ) 값은 0.245이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 人參山查複合方 (Gin-CF: 100, 50, 10 μg/ml) 처리군의 상대정량(RQ) 값은 각각 0.858, 0.875, 0.958로 나타나 對照群에 비해 농도 의존적으로 유전자 發顯을 억제하였다(Fig. 4).

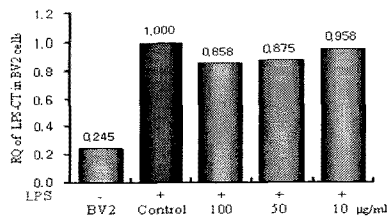


Fig. 4. Inhibitory effects of Gin-CF extract on TNF- α mRNA expression in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. TNF- α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 COX-2 mRNA 유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 對照群에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 對照群의 상대정량(RQ) 값이 1 일때 무처리군의 COX-2 mRNA 유전자 발현의 상대정량(RQ) 값은 0.322이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 人蔘山查複合方 (Gin-CF: 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군의 상대정량(RQ) 값은 각각 0.784, 0.849, 0.896로 나타나 對照群에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

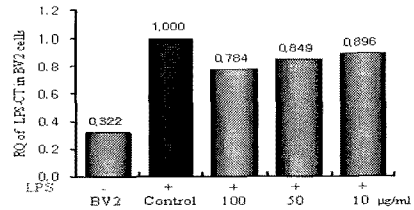


Fig. 5. Inhibitory effects of Gin-CF extract on COX-2 mRNA expression in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. COX-2 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 NOS-II mRNA 유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 對照群에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 對照群의 상대정량(RQ) 값이 1 일때 무처리군의 NOS-II mRNA 유전자 발현의 상대정량(RQ) 값은 0.103이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 人蔘山查複合方 (Gin-CF: 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군의 상대정량(RQ) 값은 각각 0.714, 0.865, 0.947로 나타나 對照群에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

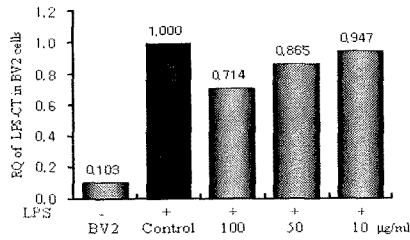


Fig. 6. Inhibitory effects of Gin-CF extract on NOS-II mRNA expression in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, and 10 µg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 µg/ml) for 6hrs. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. NOS-II mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

고찰

현재까지 해외의 연구자들이 밝혀온 癡呆와 관련 되어 나타나는 병리학적 소견으로는 신경섬유 덩어리 (neurofibrillary tangle)와 신경반(neuritic plaque)이 있다²²⁾.

신경섬유 덩어리와 신경반은 아밀로이드 베타 펩티드(Aβ)의 침착에 의하여 생겨난다.

Aβ는 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질 (Amyloid Precursor Protein: APP)의 일부가 잘라져서 생겨나는데 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다.

APP는 21번 염색체에 위치하고 있으며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30대와 40대에 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되는 똑같은 신경섬유 덩어리와 신경반이 생긴다. 이러한 病變은 유전자 수가 증가한 효과에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 생각하고 있다.

한편 알츠하이머병 환자의 기저전뇌(basal

forebrain)와 해마에서 APP의 유전자 發顯이 증가되어 있다고 보고하고 있고, 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 發顯이 증가되어 있다는 보고와 Aβ를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화과정, 특히 癡呆형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 생각되고 있다²³⁾.

韓醫學的으로 癡呆는 '癡呆²⁴⁾', '呆病²⁵⁾', '健忘' 등의 範疇에 속하며, 明代 張²¹⁾의 《景岳全書·癡狂癡呆》에서 癡呆에 대한 最初의 記述이 登場하는데, "癡呆症, 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....", "凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴狀" 라 되어 있다.

癡呆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 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 使用되고 있다^{24) 27)}.

人參山查複合方은 人參과 山查를 合한 것으로 人參은 《神農本草經》¹⁷⁾에는 人參이 五臟의 陽氣를 培구어 주는 主藥으로 使用되고, 정신을 安정시키고, 五臟六腑로 進입하는 病邪를 제거하여 주며, 눈을 밝게 하고 지혜롭게 하고, 오래 복용하면 몸이 가벼워지고 長壽한다고 기술되어 있다. 또한 性味는 甘微苦, 微溫하며 無毒하고 脾, 肺, 心經에 歸하며 大補元氣, 安神, 健忘의 效능¹⁶⁾이 있다.

《中藥大辭典》²⁸⁾에서 山查는 化血塊, 氣塊, 活血의 效능이 있어 食積을 삭히고, 오랜 氣滯를 풀어주며, 氣가 몰린 것을 잘 돌아가게 하는데 使用하는 것으로 알려져 있어 瘀血로 인한 實證의 AD에 응용할 수 있을 것으로 사료되었다.

본 실험에서 사용한 BV2 세포주는 생쥐의 소신경교세포(microglial cell)로 primary microglial cell 모델을 제공하며³⁰⁾, LPS를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 사이토카인인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다고 보고가 있어^{31,32)}, BV2 세포주에 LPS(0.1 µg/ml)을 처리하여 염증반응 사이토카인을 유발시켜 뒤 서로 다른 농도의 人參山查複合方(100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml)을 6시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, 人參山查複合方이 소신경교세포의 염증반응 사이토카인 유전자 發顯에 미치는 억제효과를 평가하기로 하였다.

BV2 cell에서 發顯된 炎症반응 사이토카인 중, IL-1β 유전자는 LPS만을 投與한 對照群에 比해 人參山查複合方을 投與한 實驗群 모두에서 發顯이 현저히

억제되었고, IL-6 유전자는 LPS만을 투여한 실험군에 비해 人蔘山查複合方を 투여한 실험군 모두에서 IL-6 유전자 발현이 현저히 억제되었으며, TNF- α 유전자 역시 LPS만을 투여한 對照群보다 人蔘山查複合方を 투여한 실험군의 발현이 현저히 억제되었다.

이것으로 人蔘山查複合方이 IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자의 과잉 발현을 현저히 감소시켰음을 알 수 있는데, 이는 人蔘山查複合方이 AD의 원인 중 하나로 알려진 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 人蔘山查複合方은 LPS를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS-II mRNA 유전자 발현을 억제하는 효능이 뚜렷한 것으로 나타났다.

결론

人蔘山查複合方이 β A로 유도된 AD 병態 모델에서 치료 효과를 보이는 작용기전을 알아보기 위하여 AD에서 중요한 역할을 하는 microglial cell line인 BV2 세포주를 사용하여 염증성 사이토카인들의 유전자 발현 등을 관찰한 결과 LPS를 처리한 BV2 세포주에서 농도가 진할수록 IL-1 β , IL-6, mTNF- α , COX-2, NOS-II mRNA 유전자 발현은 억제되었다.

이러한 결과는 人蔘山查複合方이 Alzheimer's성 癡呆 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

- 郭隆琛. 圖解腦神經外科學. 서울:第 醫學社. 1992:27-31.
- 金知赫, 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256-330.
- 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울:고려의학. 1992:225-232.
- 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
- 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:133, 216-228.
- 李定均. 精神醫學. 서울:潮閣. 1995:87-88, 465-467, 514-518, 600.
- 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994:114-132.
- Altstiel LD and Sperber K., Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiat. 1991;15:481-495.
- Alzheimer's Disease Collaboratory Group, The structure of the presenilin 1(S182) gene and

identification of six novel mutations in early onset AD families, Nature Genetics 1995;11:219-222.

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 β A1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, Neuron, 1996;17:1005-1013.

11. Breakfield XO and DeLuca NA, Herpes simplex virus for gene delivery to neurons, New Biol, 1991;3:203-218.

12. Breakfield XO and Geller AI, Gene transfer into the nervous system, Mol Neurobiol, 1989;1:339-371.

13. Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M., Principles of Neural Science 3rd edition, 1991.

14. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA., An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88:7247-7251.

15. Selkoe DJ., N. Engl. J. Med. 1989;320:1484-1487.

16. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 2004.

17. 孫星衍 輯. 神農本草經. 臺北:문광도서유한공사. 1979:40-41.

18. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 臺北:甘地出版社. 1990:222-225, 233-235.

19. 고대준. 補益清腦湯이 癡呆病態모델에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 2001.

20. 김보경. 安神清腦湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 2001.

21. 엄효진. 초기 알츠하이머형 치매환자에 대한 健腦湯의 效能. 경희대학교 대학원. 2005.

22. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA., An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88:7247-7251.

23. Yoo-Hun Suh, "An etiological role of amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the b-amyloid precursor protein in Alzhiemr's

- disease", J. Neurochem. in press.
24. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-611.
 25. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
 26. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242-251, 784-791.
 27. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-381.
 28. 김창민 외. 中藥대사전. 서울:정담출판사. 1998:2658-2660.
 29. Brambilla AA, 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, 1993;45:841-843.
 30. Chong YH : Effect of a carboxy-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells, Life Sciences, 1997;61(23):2323-2333.
 31. Foster NL, Petersen RC, Gracon SI, Lewis K : An enriched-population, double-blind, placebo-controlled, crossover study of tacrine and lecithin in Alzheimer's disease, Dementia, 1996;7(5):260-266.