

人蔘山植複合方이 Alzheimer성 치매의 치료 효과에 대한 연구

한신희[‡], 길기정^{1*}

중부대학교 한방건강관리학과 1: 중부대학교 한약자원학과

A Study on the Therapeutic Effect of Alzheimer's Disease of Ginseng Radix plus Crataegi Fructus.

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 *in vitro* research was conducted to investigate the effect of the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus. on the cytokine protein release and Nitric oxide release in related to Alzheimer's disease.

Methods : Specifically, the effects of the Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract on IL-1 β , IL-6, TNF- α of BV2 microglia cell line treated with lipopolysacchride.

Results : The Ginseng Radix plus Crataegi Fructus extract suppressed the production of inflammatory cytokine protein IL-1 β , IL-6, TNF- α and 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 Gin-CIF extract for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key words : Ginseng Radix, Crataegi Fructus, Alzheimer's disease

#제1저자, : 한신희, 중부대학교 한방건강관리학과
· Tel: 041-750-6874 · E-mail: herbman@joongbu.ac.kr

*교신저자 : 길기정, 중부대학교 한약자원학과
· Tel: 041-750-6225 · E-mail: kildosa@joongbu.ac.kr

· 접수 : 2007년 02월 24일 · 수정 : 2007년 03월 06일 · 채택 : 2007년 03월 20일

서론

《中藥大辭典》에서 사람이 잘 잊지 않고 기억하는 것은 心이 기억을 다스리고 脾가 思를 다스리기 때문이며 心, 脾의 정기가 충족되어 있으면 기억이 잘 되어 잊지 않는 것이다. 人蔘은 건망증을 없애주고 智力을 높이며, 정신력을 증강시키고 사고력과 영적 활동을 높이며, 집중력과 기억력 감퇴, 智力 손상 등에 유효하며. 원기를 크게 보하고 폐를 튼튼하게 하며, 脾臟을 좋게 하고, 심장을 편안하게 해주는 효능이 나타나 있으며, 산사는 化血塊, 氣塊, 活血의 효능이 있어 食積을 삭히고, 오랜 氣滯를 풀어주며, 氣가 몰린 것을 잘 돌아가게 하는데 사용되고 있다¹⁾.

우리나라의 평균수명은 1990년 남자 67.7세, 여자 75.7세이던 것이 2020년에는 남자 74.5세, 여자 81.7세가 될 전망이다²⁾.

이로 인해 노인관련 질환이 증가할 것이며, Alzheimer's disease(AD)는 노인인구의 증가로 인해 새롭게 등장할 수 있는 사회 문제 중의 대표적인 질환이라고 말할 수 있다³⁾.

AD는 β amyloid peptide(β A), estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며⁴⁾, 또한, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 염증반응 cytokine을 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다⁵⁾.

따라서 본 연구에서는 人蔘山植複合方이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 人蔘山植複合方の 세포독성을 mouse lung fibroblast cells(mLFC) 세포에서 관찰하였고, lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 BV2 세포주에서 염증성 cytokine 및 nitric oxide의 생성량 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 動物

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐와

BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험당일 까지 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±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 人蔘山植複合方(Ginseng plus Crataegi Fructus ; Gin-CF)에 사용한 약재는 금산약재시장에서 금산인삼 4년근과 한국산 山植를 구입하여 사용하였고, 人蔘山植複合方の 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

細胞柱는 韓國細胞柱銀行에서 購入한 急性白血病細胞柱인 L1210 細胞柱를 사용하였다.

Table 1. Prescription of Ginseng 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, 山植 15g를 합한 人蔘山植複合方 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) mLFC에 대한 세포독성 측정

정상 생쥐의 폐 조직 세포(mouse lung fibroblast cell ; mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cold D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심

분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.), DNase I(0.15mg/ml, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25µg/ml))을 넣고 37°C CO2 배양기에서 2시간 동안 배양한다.

0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양한다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주한다.

배양액에 농도별로 人蔘山植複合方을 처리한 후 48시간 배양 후 생존하는 세포를 Trypan blue로 염색하여 세포독성을 측정하였다.

3) BV2 세포주 배양상층액내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglia세포주를 실험 3일전에 subculture (1×10⁵cells/ml) 하여 96 well plate에 2×10³ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시킨다. 人蔘山植複合方 (100, 50µg/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS (0.1µg/ml)를 각각의 well에 첨가한다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 人蔘山植複合方 (100, 50 µg/ml)을 처리하고 48시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한다.

배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA leader로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100µl (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100µl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100µl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

BV2 microglia 세포주를 96 well plate에 2×10⁴ 세포로 분주하였다. 여기에 人蔘山植複合方 추출물 (100, 50, 10µg/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS (0.1µg/ml)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다.

배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5% H₃PO₄)를 1:1로 혼합하여 처리하였다.

다시 배양 상층액 100µl를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100µl를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계처리

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

결과 및 고찰

1. 人蔘山植複合方에 대한 세포독성

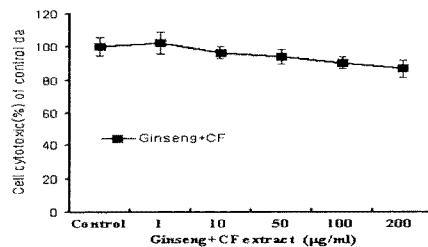


Fig. 1. Cytotoxicity of Gin-CF extract on mLFCs.

mLFCs were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract. The data (% cytotoxicity) in the Figure are expressed as the mean ± SEM. Comparison between Gin-CF-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher (*p < 0.05).

mLFCs에 대한 세포독성은 人蔘山植複合方 200, 100, 50, 10, 1µg/ml 농도에서 각각 86.8±5.1, 90.4±3.5, 94.2±4.6, 96.5 ±3.5, 102.3±6.5%로 대조군에 비해 人蔘山植複合方の 농도가 진할수록 약간의 독성이 나타나으나 통계적인 유의차는 없었다(Fig. 1).

2. cytokine 단백질 생성량에 미치는 영향

1) BV2 세포주 배양상층액에서 IL-1 β 생성량

배양상층액에서 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 31.3 \pm 11.3 (pg/ml)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 633 \pm 64.1 (pg/ml)로 나타났다. Gin-CF 투여군은 50 μ g/ml에서 589 \pm 25.4 (pg/ml)로 나타났고, 100 μ g/ml에서는 516 \pm 30.2 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비해 IL-1 β 생성량이 약간 줄어드는 경향이나 통계적 유의차는 없었다(Fig. 2).

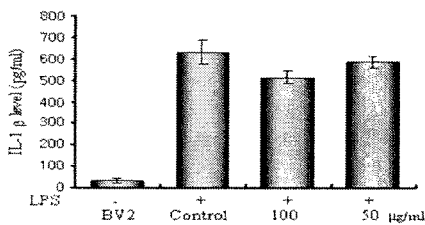


Fig. 2. The effect of Gin-CF extract on IL-1 β production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, and 50 μ g/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 μ g/ml) for 6hrs. Total IL-1 β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

2) BV2 세포주 배양상층액에서 IL-6 생성량

배양상층액에서 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 168 \pm 35.6 (pg/ml)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 5,896 \pm 470 (pg/ml)로 나타났다. Gin-CF 투여군은 50 μ g/ml에서 5,556 \pm 336 (pg/ml)로 나타났고, 100 μ g/ml에서는 4,883 \pm 323 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비해 IL-6 생성량이 약간 줄어드는 경향이나 통계적 유의차는 없었다(Fig. 3).

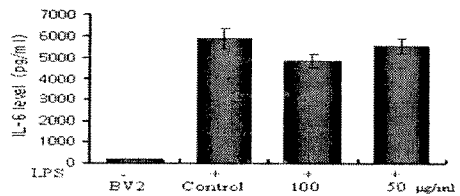


Fig. 3. The effect of Gin-CF extract on IL-6 production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, and 50 μ g/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 μ g/ml) for 6hrs. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

3) BV2 세포주 배양상층액에서 TNF- α 생성량

배양상층액에서 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 455 \pm 3 (pg/ml)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 2,664 \pm 204 (pg/ml)로 나타났다. Gin-CF 투여군은 50 μ g/ml에서 2,584 \pm 178 (pg/ml)로 나타났고, 100 μ g/ml에서는 2,331 \pm 125 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비해 TNF- α 생성량이 약간 줄어드는 경향이나 통계적 유의차는 없었다(Fig. 4).

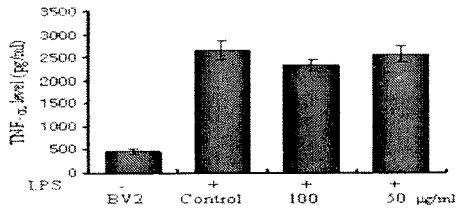


Fig. 4. The effect of Gin-CF extract on TNF- α production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. Total TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (** $p < 0.01$).

3. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

BV2 세포주에서 NO 생성량을 세포배양 상층액에서 측정하였다. 검량선은 sodium nitrite를 이용하여 정량하였다. BV2 세포주 정상군의 NO 생성량은 9.4 ± 2.2 (μM)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군의 NO 생성량은 65.4 ± 3.2 (μM)로 나타났다. Gin-CF 추출물 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 NO 생성량은 각각 50.2 ± 4.5 , 56.5 ± 2.5 , 그리고 60.3 ± 5.4 (μM)로 나타나 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.01$), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$)의 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였으나, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 5

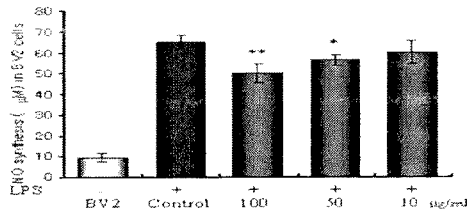


Fig. 5. Inhibitory effect of Gin-CF extract on the Nitric oxide release in BV2 cell line.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of Gin-CF extract (100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of ipopolysacchride (LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48hrs. The culture supernatant was collected 24hrs. later and NO (nitric oxide) concentration in the supernatent was assayed. The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

βA 가 沈積된 老人癡 주변에서는 활성화된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 외부 자극인자들에 의하여 활성화된 microglial cell이 IL-1 β 및 TNF- α 등의 염증반응 cytokine을 생산하며, 이들 염증반응 cytokine은 성상세포를 활성화시켜 NO를 생산하고 있는 ROS의 일종인 peroxynitrite으로 유도되어 신경세포 死를 야기시킨다고 알려져 있어⁶⁾, βA 와 염증반응 cytokine의 상관성이 주목되고 있다⁷⁾.

이상의 결과를 종합해 보면 人參山植複合方은 cytokine 단백질 생성을 억제하고 Nitric oxide의 생성을 억제하여 Alzheimer성 치매의 치료 효과를 높이는 것으로 나타났다.

따라서 人參山植複合方은 mLFC 세포에서 독성도 나타나지 않았고, cytokine 단백질 생성을 억제하여 대조군에 비하여 人參山植複合方의 투여군에서 감소하는 결과로 나타났으며, Nitric oxide 생성량에서는 人參山植複合方의 투여군에서 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 염증반응 cytokine이 과다하게 생성되어 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 야기될 수 있는 Alzheimer성 치매에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 人參山植複合方의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

人蔘山積複合方이 Alzheimer성 치매에서 cytokine 단백질 및 NO생성량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 AD에서 중요한 역할을 하는 microglial cell line인 BV2 세포주를 사용하여 배양상층액에서 IL-1 β 생성량, IL-6 생성량, TNF- α 생성량 및 NO 생성량에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 人蔘山積複合方은 LPS를 처리한 BV2 microglia 세포주에서 염증성 cytokine 단백질 중의 하나인 IL-1 β 생성을 억제하였다.
2. 人蔘山積複合方은 LPS를 처리한 BV2 microglia 세포주에서 염증성 cytokine 단백질 중의 하나인 IL-6 생성을 억제하였다.
3. 人蔘山積複合方은 LPS를 처리한 BV2 microglia 세포주에서 염증성 cytokine의 단백질 중의 하나인 TNF- α 생성을 억제하였다.
4. 人蔘山積複合方은 LPS를 처리한 BV2 microglia 세포주에서 염증성반응에서 중요한 역할을 하는 Nitric oxide의 생성을 억제하였다.

참고문헌

1. 김창민 외. 중약대사전. 서울:정담출판사. 1999:2660, 4490-4497.
2. 통계청. 장래인구추계. 2001.
3. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994:114-132.
4. Breakfield XO, and DeLuca NA. Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol.* 1991;3:203-218.
5. Selkoe DJ. *Scientific American.* November. 1991:68-72.
6. 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.
7. On SK, Kitamura M, Maekawa K, Hirata M, Ano W, Ukai T, Yamafuji and Narita H. Protective effects of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[(N,N-diethylamino)ethoxy]-ethanol hydrochloride (T-588), a novel cerebral activator, against experimental cerebral anoxia. *Jap. Pharmacol.* 1988;62:81-86.
8. Dickson DW, Ksiazak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, and Yen SH. Immunocytochemistry of

neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein ; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. *Acta Neuropathol.* 1992;84(6):596-605.

9. 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.
10. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G. and Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. *Brain Res.* 1992;593(2):299-303.
11. 김승업. 치매·알츠하이머병. 서울:삶과 꿈. 1997:22-25.
12. 민성길. 최신 정신의학. 서울:일조각. 1999:186-187.