

LMK02의 품질규격화와 Aβ 올리고머에 의해 유도된 흰쥐해마 H19-7세포주에 미치는 항치매효과

강형원^{1,5} · 김상태² · 손형진² · 한평림³ · 조형권⁴ · 이영재⁴ · 류영수^{1*}

1: 원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실, 2: 이화여자대학교 자연대학 나노과학부 뇌신경 분자연구실,
3: 이화여자대학교 생명·약학부 뇌신경연구실, 4: 한풍제약(유), 5: 원광대학교 산본병원 인암뇌신경센터

Standardization of Quality and Inhibitory Effect of Alzheimer in Aβ Oligomer-induced H19-7 Cells by LMK02

Hyung Won Kang^{1,5}, Sang Tae Kim², Hyeong Jin Son², Pyeong Leem Han³,
Hyoung Kwon Cho⁴, Young Jae Lee⁴, Yeoung Su Lyu^{1*}

1: Department of Neuropsychiaty, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2: Division of Nanoscience, 3: Division of Life & Pharmaceutical, Ewha Womans of University,
4: Hanpoong Pharm. Research Center, 5: Inam Neuroscience Research Center, Wonkwang University, Sanbon Medical Center

For standardization of LMK02 quality, Ginsenoside Rg3 of Red Ginseng and Decursin of Angelica gigas Nakai in the constituents of LMK02 were estimated as indicative components. From LMK02 water extract, has been used in vitro test for its beneficial effects on neuronal survival and neuroprotective functions, particularly in connection with APP-related dementias and Alzheimer's disease (AD). Aβ oligomer derived from proteolytic processing of the β-amyloid precursor protein (APP), including the amyloid-β peptide (Aβ), play a critical role in the pathogenesis of Alzheimer's dementia. We determined that oligomer amyloid-β (Aβ) have a profound attenuation in the increase in rat hippocampus H19-7 cells from. Experimental evidence indicates that LMK02 protects against neuronal damage from cells, but its cellular and molecular mechanisms remain unknown. Using a hippocampus cell line on Aβ oligomer-induced neuronal cytotoxicity, we demonstrated that LMK02 inhibits formation of Aβ oligomer, which are the behavior, and possibly causative, feature of AD. In the Red Ginseng, the average amounts of Ginsenoside Rg3 were 47.04 μg/g and 42.3 μg/g, 90 % of its weight were set as a standard value. And, in the Angelica gigas Nakai, the average amounts of Decursin were 2.71mg/g and 2.44mg/g, 90 % of its weight were also set as a standard value. The attenuated Aβ oligomer in the presence of LMK02 was observed in the conditioned medium of this Aβ oligomer-induced cells under in vitro. In the cells, LMK02 significantly activated antiapoptosis and decreased the production of ROS. These results suggest that neuronal damage in AD might be due to two factors: a direct Aβ oligomer toxicity and multiple cellular and molecular neuroprotective mechanisms, including attenuation of apoptosis and direct inhibition of Aβ oligomer, underlie the neuroprotective effects of LMK02 treatment.

Key words : Aβ oligomer, H19-7, hippocampus, alzheimers disease, LMK02, ginsenoside Rg3, decursin

서 론

癡呆는 우리나라 65세 이상의 노령인구 약 8.2~10.8%에서 나타날 정도로 흔하며 인구의 급속한 고령화와 함께 심각한 사

* 교신저자 : 류영수, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : yslu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-270-1021

· 접수 : 2009/02/26 · 수정 : 2009/03/18 · 채택 : 2009/04/01

회문제로 대두되고 있는 대표적인 노년기 질환으로¹⁾ 후천적으로 지적능력을 상실하고 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화라는 임상증상을 나타내는 퇴행성질환이다²⁾.

특히, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 많은 유형의 치매로^{3,4)} 대뇌 피질(cortex)이나 해마(hippocampus)에 생기는 뇌위축과 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 그리고 신경세포의 파립공포변성

(granulovacuolar degeneration), 히라노체(Hirano body) 등의 조직학적 소견을 특징으로 하며^{5,6}), 베타 아밀로이드(β -amyloid, A β)는 노인반의 주요 구성성분으로 AD가 발생하는 중요한 원인으로 추정되고, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시켜 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 신경세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다⁷.

한의학에서 癡呆는 임상증후상 呆病, 健忘, 癡證, 虛勞 등의 범주에 포함하고, 主要病因으로는 年勞虛衰, 飲食失調, 情志失調, 中毒外傷, 痰飲, 瘀血 등이 관여하며, 辨證으로는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀가 제시되고⁸) 治法으로는 補益肝腎, 益氣補血, 豁痰開竅, 活血化瘀通竅를 활용한다⁹.

서양의학에서는 AD의 치료방법으로써 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 감소에 근거한 인지기능 개선을 위한 cholinesterase inhibitor¹⁰)와 NMDA(N-methyl-D-aspartate) receptor antagonist¹¹) 등의 약물요법이 있고, 행동 심리증상 치료를 위한 항우울제, 진정제등의 향정신성 약물요법¹²)과 심리, 인지, 행동, 작업, 재활치료의 비약물요법¹³)이 활용되고 있으나, 정확한 원인요법은 아직 없는 실정이고 약물요법 대부분의 부작용으로 인해 천연 한약재에 대한 연구가 필요한 상황이다.

최근 한의학계에선 한약의 AD에 대한 효과를 입증하는 연구들이 많이 진행되고 있는데 調胃升清湯¹⁴), 六味地黃湯加減¹⁵), 供辰丹¹⁶), 聰明湯加減¹⁷), 壯元丸¹⁸), 壯元丸加減方¹⁹) 등이 있고 조성물인 LMK02가 A β oligomer에 의해 해마세포주인 H19-7에서²⁰) 항치매효과를 확인하고 제품화를 위한 품질규격화를 위한 연구는 보고된바 없다.

LMK02는 『東醫寶鑑·神門』²¹)의 壯元丸 處方에서 시작하여 실험과 임상적 선별 과정을 거쳐 紅蓼, 當歸 등의 7가지로 구성된 補腎益氣醒腦 효능의 복합한약제제이다(특허 제 10-0871518).

이에 저자는 LMK02의 품질규격화를 확립하고 항치매 효과를 확인하게 위해 A β oligomer에 의해 해마세포주인 H19-7를 이용하여 세포 생존률, LDH활성도, NO content, Neurite outgrowth, ROS 농도를 정산군, 대조군 및 LMK02 투여 그룹과 비교관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), anti-rabbit IgG conjugated FITC, anti-rabbit Alexa Fluor594 IgG antibody, 2차 항체인 FITC, Alexa Fluor 594는 Molecular Probe사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (vision scientific Co.), light microscope (Olympus), confocal immunofluorescence microscope (Olympus), HPLC System (Waters 2695 Alliance)

등을 사용하였다.

2) 약재 및 검액제조

본 실험에 사용한 LMK02의 처방에 사용된 약재는 유일제약(주)에서 최상품으로 인정된 약재를 엄선하여 한풍제약(주)에서 다음과 같은 제조공정을 거쳐 얻은 건조엑스 95 g를 사용 전 -8 0°C에 보관하여 3차 증류수로 1 mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

- (1) LMK02 단미 총 312 g를 정선하여 약전통칙 중 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고
- (2) 추출기에 넣은 다음
- (3) 정제수(약전) 약2.5 L 가량 넣고
- (4) 95~100°C에서 3시간 가운 추출한 후
- (5) 25 μ m필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50~60°C에서 감압 농축한다.
- (6) 한약 잔류물에 (3)~(6) 과정을 1회 반복하여 농축액을 전부 합한다.
- (7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60°C이하에서 건조한다.
- (8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화한다
- (9) 건조엑스 95 g를 얻는다. (수득률 약30.4%)

2. 실험방법

1) LMK02 품질규격화

(1) 홍삼 중 Ginsenoside Rg3

① 표준액의 조제

진세노사이드 Rg3 표준품 2.0 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 정확하게 10 ml로 하여 표준원액을 준비한 다음 이 표준액을 2 ml를 정확하게 취하여 메탄올을 넣고 정확하게 10 ml로 한 액(20 μ g/ml)을 표준액으로 하였다.

② LMK02 검액의 제조

진세노사이드 Rg3로서 약 2.0 mg에 해당하는 LMK02 일정한량을 달아 메탄올 50 ml를 넣어 1시간 환류 추출한 다음 여과하여 농축한다. 농축액을 물 10 ml에 녹인 후 미리 활성화시킨 Sep-Pak(C18)에 서서히 통과시킨다. 물 20 ml와 50% 메탄올 5 ml를 순서대로 통과시켜 세척하고 90% 메탄올 20 ml로 서서히 용출하여 이를 검액으로 한다.

Table 1. HPLC conditions of the LMK02-Ginsenoside Rg3

Column	μ -Bondapak NH2 (5 μ m, 4.6 X 150 mm column)
Detector	UV DETECTOR (203 nm)
Mobile phase	ACN : H ₂ O (92:8)의 혼합액
Flow rate	1.0 ml/min
Temperature	30°C
Injection volume	20 μ l

(2) 당귀 중 총 데쿠르신(데쿠르신 및 데쿠르시놀안젤레이트)

① 표준액의 조제

데쿠르신 표준품 10.0 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 정확하게 100 ml로 하여 표준액으로 하였다.

② LMK02의 제조

총데쿠르신(데쿠르신 및 데쿠르시놀안젤레이트)으로서 약

10.0 mg에 해당하는 LMK02 일정량을 달아 환류냉각기를 달고 메탄올 70 ml를 넣어 2시간 환류 추출하고 식힌 다음 여과한다. 여액을 감압 농축하고 잔류물에 메탄올을 넣어 녹여 정확히 50 ml로 하여 여과한 액을 검액으로 한다.

Table 2. HPLC conditions of the LMK02-Total Decursin

Column	CAPCELL PAK C18 (5 μm, 4.6 X 250 mm column)
Detector	UV DETECTOR (280 nm)
Mobile phase	ACN : H ₂ O (52:48)
Flow rate	0.7 ml/min
Temperature	30°C
Injection volume	10 μl

3) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주인 흰쥐 해마세포주인 H19-7를 계대 배양시켜 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask 내지 cell culture용 dish에 배양하였다. 미리 10⁴ 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80% 정도 조밀하게 배양한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지한 후 상기 약물을 처리하고 Aβ oligomer를 12시간정도 처리하고 배양하였다.

4) 세포 생존율 측정

흰쥐 해마세포주인 H19-772를 10⁴세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 LMK02를 0, 1, 10, 25, 50, 100, 250 μg/ml 농도별로 4일간 배양한 것과 LMK02에 Aβ를 1, 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml 농도별로 처리한 실험군을 MTT (3-[4,5-dimethiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20 μl를 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50 μl를 첨가하고 실온에서 30분 이상 반응을 시켜서 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A540/A630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 세포 형태학적 관찰

흰쥐 해마세포주인 H19-7를 계대 배양시켜 10⁴세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 LMK02를 50 μg/ml 농도로 처리하여 상기 세포주의 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개 정도의 세포수를 촬영하여 조사하였으며 세포사의 유도양상을 보기 위해 세포사가 억제되는 농도를 선정하여 조사하였다.

6) ROS량 측정

Aβ oligomer 최종농도가 1 μM이 되게 H19-7 cell lines를 10³ 세포수로 laminin coated slab cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 oxidative stress를 주기 위해 100 μM의 H₂O₂를 첨가하고 동시에 LMK02를 0, 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 자극을 가한 다음 약물 무처리군, oligomer 처리군 그리고 oligomer 처리군에 LMK02를 0, 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리하여 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate: Sigma Co. USA)를 이용하여 spectrofluorometer로 측정하였는데 H₂O₂에 의해 산화성 DCF-DA는 형광성 dichlorofluorescein (DCF)으로 전환되는 원리를 이용하여 측정하였다. 자세히 설명하면 DMF (N,N-dimethyl-formamide)으로 최종농도가 2 μM DCF-DA이 되게 하여 50분 동안 세포에 처리한 다음 3회 PBS으

로 세척하고 CytoFluor 4000 fluorescence spectrophotometer으로 485 nm/535 nm하에서 ROS양을 측정하였다.

7) LDH 활성도 측정

Aβ oligomer 최종농도가 1 μM이 되게 H19-7 cell lines를 배양한 96-well multiplate에 Roche Applied Science사에서 제공된 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상인 경우 세포막을 투과하지 않지만 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 NAD로부터 피루빈산과 NADH를 생성시키며 이때 NAD가 산화됨에 따라 340 nm에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포막에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있다. 우선 세포수 5x10⁴ 세포수로 96-well에 분주하고 LMK02를 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리한 실험군으로 세포에 처리한 후 세포를 분리하여 상등액 100 μl과 반응액을 넣고 섞은 후 1 N HCl을 더하여 반응을 중단하여 ELISA reader(Emax, USA)로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = (\text{실험치-control치}) / (\text{control 치-정상치}) \times 100$$

8) 통계분석

결과는 평균±S.D로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 P<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결 과

1. LMK02 - 홍삼 중 Ginsenoside Rg3 및 당귀 중 총데쿠르신의 함량

LMK02 건조엑스 3Lot 실험결과 홍삼 중 Ginsenoside Rg3의 함량은 평균 47.04 μg/g이었으며, 그 값의 90%인 42.3을 기준으로 설정하였다(Fig. 1, Table 3). LMK02 건조엑스 3Lot 실험결과 당귀 중 총데쿠르신(데쿠르신 및 데쿠르시놀안젤레이트)의 함량은 평균 2.71 mg/g이었으며, 그 값의 90%인 2.44 mg을 기준으로 설정하였다(Fig. 2, Table 3).

Table 3. LMK02-홍삼 중 Ginsenoside Rg3 및 당귀 중 총데쿠르신의 함량

Lot	성분	홍삼 중 Ginsenoside Rg3 (μg/g)	당귀 중 총데쿠르신 (mg/g)
Lot 1	1	47.46	2.73
	2	47.05	2.72
	3	46.97	2.70
Lot 2	1	47.22	2.72
	2	46.32	2.72
	3	46.70	2.70
Lot 3	1	47.07	2.72
	2	47.77	2.70
	3	46.79	2.69
평균		47.04	2.71

2. 신경세포 형태학적 변화

Aβ oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에서 LMK 시리즈로 신경세포의 세포사 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학

적인 변화를 관찰하였다. 그 결과 형태학적인 판정에 의거하여 정상군(Wild type, 이하 WT)은 세포형태가 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라는 반면, Aβ oligomer를 처리한 대조군은 세포사유도가 거의 진행되었으며 이와 함께 신경돌기가 소실되는 양상이 나타났다(Fig. 3). 한편 대조약물인 curcumin에 대해서는 약한 세포생존 양상을 보인 반면 LMK01(杜元丸去朱砂), LMK02 그리고 LMK03(3가지 단미제 구성처방) 경우 농도가 50 μg/ml로 처리시 현미경학적으로 세포생존 양상이 우수하였고 특히 LMK02와 LMK03 처리군은 다소 세포사멸도 일어났으나 신경재생이 유도되고 세포 생존율이 증가되면서 신경돌기가 잘 발달되고 신경세포의 증식이 잘 진행되었다(Fig. 3).

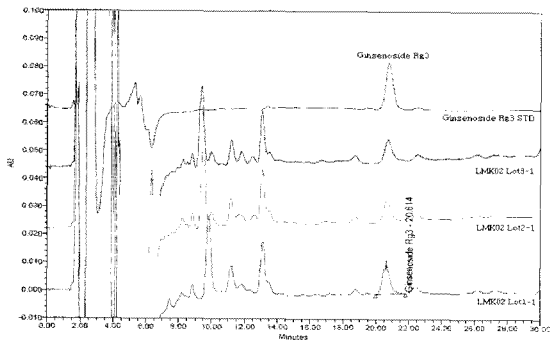


Fig. 1. Ginsenoside Rg3 Chromatograms of LMK02

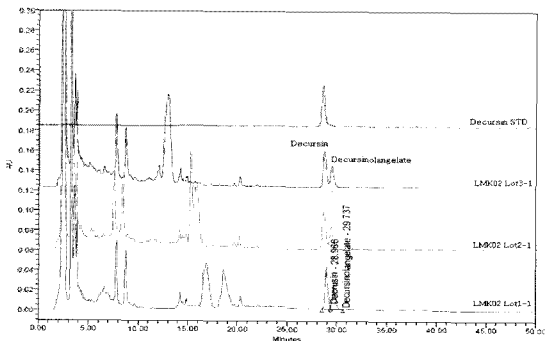


Fig. 2. Total Decursin chromatograms of LMK02

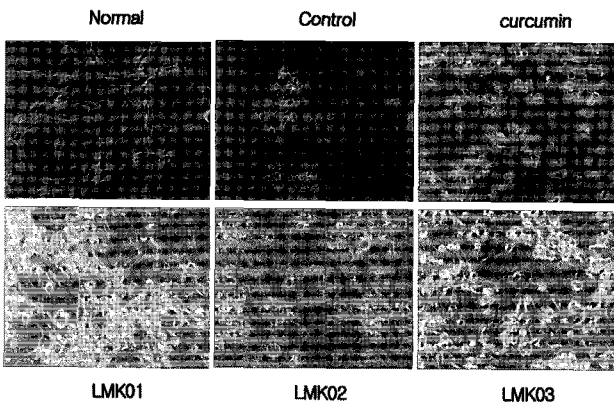


Fig. 3. LMK series prevents neuronal cell death by APP expression. Survival effect of LMK of oriental medicine extracts on the Aβ oligomer-induced neurotoxicity in H19-7 cells. Fresh cells resuspended in DMEM medium were incubated with prepared as described under 'Experimental Procedures'. (Scale bar, 25 μm)

3. 신경세포 생존율에 미치는 영향

세포생존율을 간접적인 관찰로 더 정확히 측정하기 위해 신경세포의 사멸에 관여하는 Aβ oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에 대해 LMK 시리즈 경우 세포사멸의 억제 즉, 증식도를 측정하였다. H19-7 해마세포의 생존율을 측정한 결과 Fig. 4에서처럼 정상군, 대조군, 양성대조군인 curcumin과 LMK01, 02, 03 처리군은 50μg/ml 농도에서 각각 96±2%, 4.2±1.3 %, 40.6±4.0%, 80.2±7.4%, 88.6±0.8%, 그리고 84.4±4.8%정도로 생존율을 나타내었는데, 이중 LMK02가 가장 높은 생존율을 보여 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 Aβ oligomer에 대한 억제효과를 나타냈다(Fig. 4).

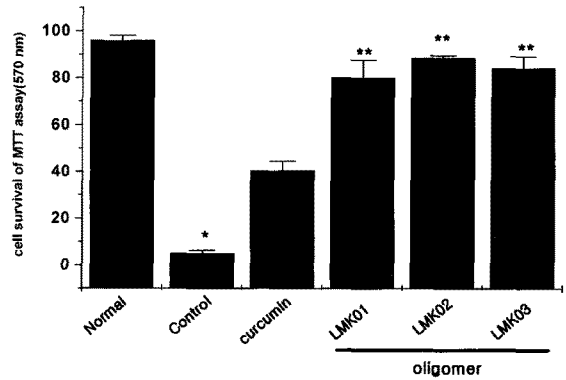


Fig. 4. Cell survival of H19-7 cells on LMK series against Aβ oligomer treatment. H19-7 cells were cultured for 3 days in vitro and then added with LMK02 in the treatment of Aβ oligomer or PBS. Viable and dead cells were stained with MTT assay as described under "Experimental Procedures". Percentages of specific cell death were determined as described under "Experimental Procedures." The data represent mean values ± S.D. of three different experiments performed in triplicate. Representative data are shown above.* P < 0.05 compared with normal (ANOVA and t-test analysis).** P < 0.005 compared with control (ANOVA and t-test analysis).

4. 신경세포내 ROS변화에 미치는 영향

Aβ oligomer 최종농도가 1 μM이 되게 H19-7 cell lines를 처리하여 하룻밤 배양한 다음 oxidative stress가 얼마나 미토콘드리아 주변부에서 ROS량이 증가되었는지 확인하였는데, Fig. 5에서처럼 DCF의 변화는 CytoFluor 4000 fluorescence spectrophotometer로 변화정도를 정량화하였는데, 정상군은 약 7±2%였고 Aβ oligomer를 처리한 대조군은 약 100%였으나 LMK02 처리군은 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도 의존적으로 각각 88±1%, 67±4.5%, 34±2%, 22±1%, 16±3%정도의 ROS양이 나타나 LMK02가 약 50 μg/ml이상의 농도에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 Aβ oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제한 것으로 나타났다(Fig. 5).

5. 신경세포내 LDH 활성도에 미치는 영향

Oligomer로 처리한 다음 oxidative stress가 미토콘드리아 주변부에서 ROS량을 증가시키면 세포사멸이 유도되므로 이로 인해 미토콘드리아의 손상으로 인해 세포 밖으로 분비되는 LDH 활성도(lactate dehydrogenase)를 확인하였는데 Fig. 6에서처럼 농도 의존적으로 LMK02의 0, 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도에 따라 LDH

활성도는 정상군 경우 약 11±3%였고 Aβ oligomer를 처리한 대조군은 약 100%였으나 LMK02 처리군은 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml 농도 의존적으로 각각 87±2%, 67±2%, 44±5%, 34±2%, 21±1% 정도의 LDH 활성도가 감소하였는데 이는 LMK02가 약 50 μg/ml 이상의 농도에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 Aβ oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

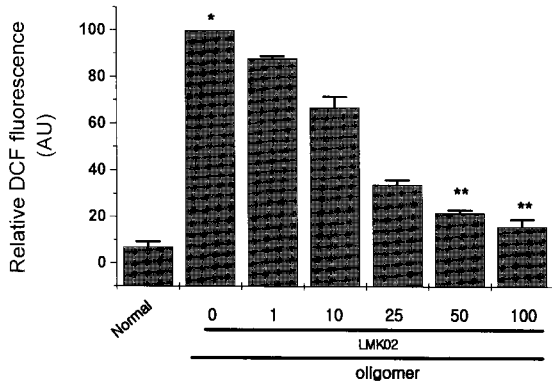


Fig. 5. LMK02 decreases ROS production in cultured rat hippocampal H19-7 cells on Aβ oligomer treatment. Aβ oligomer (1 μM), the various concentration of LMK02 treatment or PBS (normal) was added to hippocampal cultures for 12 hr, and intracellular ROS levels were assayed using DCF (10 M) as described in Materials and Methods. The results represent the means±SD of four separate experiments. * P < 0.05 compared with normal (ANOVA and t-test analysis). ** P < 0.005 compared with control (ANOVA and t-test analysis).

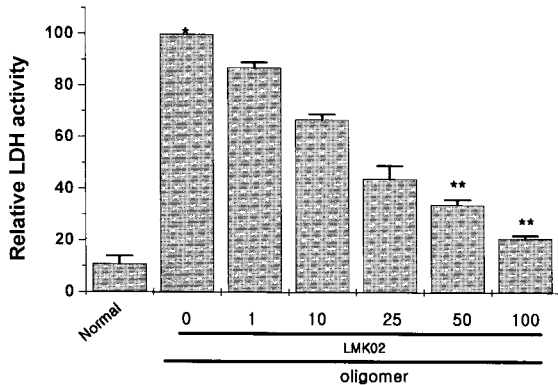


Fig. 6. LMK02 decreases LDH release in cultured rat hippocampal H19-7 cells on Aβ oligomer treatment. Aβ oligomer (1 μM), the various concentration of LMK02 treatment or PBS (normal) was added to hippocampal cultures for 12 hr, and LDH release were assayed using pyruvate level as described in Materials and Methods. The results represent the means±SD of four separate experiments. * P < 0.05 compared with normal (ANOVA and t-test analysis). ** P < 0.005 compared with control (ANOVA and t-test analysis).

고찰

痴呆는 정상적으로 일상생활을 유지하던 사람이 대뇌반구 특히 대뇌겉질 및 해마를 침범하는 여러 질환에 의한 뇌기능 장애로 인해 후천적으로 지적능력의 상실, 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화로 일상생활을 유지하는데 심각한 지장을 초래하는 특정 중후군으로²⁾ 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 腦梗塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가

混在된 混合型 痴呆가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다^{3,4)}.

AD의 원인과 발병기전은 분명하진 않지만 다양한 병리적 병리적 인자들이 관련되어 있고 AD의 발병과 진행에 관해 유전적 요인, 지발성 또는 비통상적 바이러스, 불완전한 세포막대사, 내인성독소, 자가면역질환, 알루미늄 같은 미량원소에 의한 신경독성 등 다양한 요인들이 관련되어 있는데²⁾, 그 중에 APP의 비정상적인 분해경로로 인한 Aβ의 과잉생산과 축적으로 노인반(senile plaques)을 형성하여 신경독성으로 신경세포 사멸을 가져온다는 아밀로이드 축적설²³⁾이 대표적이고 이것의 주된 기전은 oxidative stress로 보고 있다²⁴⁾.

그 발병 위험인자로는 노화²⁵⁾, 유전적 요인으로는 APP 유전자의 돌연변이²⁶⁾와 presenilin 1,2 유전자 돌연변이²⁷⁾, apolipoprotein(APO) E4 allele²⁸⁾, 성별로는 여성이 남성보다 3배가 높고²⁹⁾, 가족력, 다운증후군(Down syndrom)³⁰⁾, 두부 외상(head trauma)의 과거력, 낮은 교육수준, 알루미늄(aluminum) 노출³¹⁾ 등으로 알려져 있듯이 다양한 요인들로 AD는 발생하는 것을 알 수 있다.

APP는 21번 염색체의 single gene에 존재하며, 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반(senile plaques)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)이 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과다생성 때문으로 추측되고 있다. 또한 AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다³²⁻³⁴⁾.

하지만 현재 APP이 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사 과정에 의해서 잘라져서 Aβ를 만들어 내는지는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 Aβ의 형성을 촉진하는 프로테아제(protease)와 이 프로테아제의 유전자를 발현하려는 노력이 현재 연구의 핵심이 되고 있으며, 이 프로테아제 효소 단백질이나 프로테아제 유전자의 발현을 억제하는 약물의 개발이 미래의 약물 개발에 가장 큰 목표가 되고 있다. 그리고 정상에서 이 Aβ의 대사효소(amyloid degrading enzyme: ADE)를 활성화시키는 방법도 중요한 개발 목표가 될 수 있다. 또한 세포막에 붙어 있는 APP들의 세포내 기능과 이 APP에서 잘려나가 형성되어 조직에 침착된 Aβ의 기능이 무엇인지에 대해서도 많은 논란이 제기되고 있다^{35,36)}.

현재 AD의 치료로는 AD의 진행을 억제하거나 완치할 수 있는 치료법은 없지만 AD의 인지장애는 ACh(acetylcholine)의 감소와 연관된 것으로 ACh의 증가 목적을 위한 다양한 시도로 acetylcholinesterase 억제제인 tacrine, aricept를 사용하고¹⁰⁾, NMDA receptor 길항제인 memantine¹¹⁾ 등이 사용되고 있으며 AD의 행동심리증상으로 자주 나타는 우울증에는 최소의 항콜린성 작용약물인 선택적 세로토닌 재흡수 차단제등을 저용량으로 사용하고, 불안과 피해망상(paranoid delusion)에 대한 항정신약물요법¹²⁾으로는 부작용이 적은 신경이완제의 사용을 고려하지만 이들 약물요법들 중 acetylcholinesterase 억제제의 효과는 매우

일시적이고 한정적이며 미약한 수준으로 부교감신경자극을 통해 오심, 구토, 기관지 수축, 우울증, 불면증, 고혈압, 변비 등의 부작용을 야기하기도 한다^{37,38}). 이런 단점들을 보완한, 오랜 기간 지속적으로 부작용 없이 독성이 낮고 강력한 콜린신경계통 증진효과를 가지며 감퇴된 학습과 기억력을 개선시켜줄 수 있는 뇌보호 및 뇌기능향상에 도움을 주는 소재로 천연물제제를 개발하는 것은 매우 가치 있는 일이라 할 수 있다.

한의학에서는 痴呆는 呆病, 健忘, 癡狂, 虛勞를 근거로 辨證施治하고 있다. 呆病에 대해 明代 張은 《景岳全書·雜證謨》³⁹ 癡狂篇에서 “痴狀證, 凡平素無痰而或以鬱結, 或而不遂, 或而思慮, 或而疑貳 或而驚狂而漸致痴, 言辭顛倒, 舉動不經, …… 此其逆氣在心, 惑肝膽二經氣有不清而然……”라 하여 呆病의 원인을 情緒상의 문제로 여겨 병리로 逆氣가 心에 있거나 心膽二經의 氣不清으로 설명하고 증상에 대하여는 “言辭顛倒 舉動不經 或多汗或善愁 其證則天奇萬怪 無所不至”라 하여 怔忡 및 행동 장애를 언급하고 治法· 豫後· 治方에 대해서는 “但察其形體強壯 飲食不減 別無虛晚等證 則審宜服蠶煎治之 最穩最妙 然此證有可者 然不可有愈者 亦在乎胃氣 元氣之強弱 待時而復 非可急也 凡此諸證 若以大恚恐 一時偶傷心膽 而致失神昏亂者 此當以速扶正氣爲主 宜七福飲 惑大補元煎”라 하여 胃氣와 元氣를 중시하였다. 清代 陣의 《石室秘錄》⁴⁰에서는 胸腹의 痰과 七情傷을 呆病의 원인으로 보았으며 증상에 관하여는 현대의학의 치매와 유사한 증상을 상세히 기술하였고 처방으로는 治痰을 제시하였다. 또한 錢鏡湖《辨證奇聞》⁴¹에서도 자세한 증상을 기술하면서 病因· 病理로는 肝氣之鬱과 胃氣之衰로 胸中의 痰으로 설명하고 治法으로는 開鬱逐痰 健胃通氣를 제시하였다. 처방으로는 洗心湯, 轉呆丹, 啓心救胃湯을 사용했다.

최근 치매에 대한 한의학계의 연구동향을 보면 임상에서 활용되는 복합처방에서 노화 및 항산화과정에 미치는 영향과 AD 병태모델에 미치는 영향에 대한 연구⁴²), 그리고 Neuro2A 세포주⁴³), PC-12(phenochromocytoma cell lines)^{44,45}), SK-N-SH cell lines⁴⁶)에서의 항치매 작용에 대하여 보고하고는 있으나, 인지능력과 행동능력에 대한 실질적 작용부위인 해마조직에서의 관련 연구는 없다.

壯元丸은 龔延賢이 著術한 『萬病回春』⁴⁷에서 “專補心主血 寧神定志 清火化痰 臺閣勤政 勞心… 并健忘怔忡不寐 及不善記而多忘者 服之能日誦千言”이라 처음으로 언급한 처방으로, 『東醫寶鑑』²¹)에서는 “建忘… 宜服壯元丸”, “補心主血 寧神定志 且臺閣勤政 勞心燈窓 讀書辛苦 并健忘怔忡不寐 及不善記而多忘者 服之能日誦千言 胸藏萬卷”이라 하여 이후 醫家들에 의해 활용되어 왔으며 養血安神理脾하는 方으로 心血不足 氣鬱生痰, 脾氣不舒에 활용하는 處方이다. 處方의 구성은 石菖蒲 遠志 酸棗仁는 開竅安神하는 작용을 하며, 麥門冬은 補心清熱하고, 白茯苓 栝子仁은 寧心安神하고, 生地黃 玄蔘은 養陰生津止渴, 龍眼肉 當歸는 補血和血하며, 人蔘은 補脾益氣 生津 寧神益智한다.

따라서 상기 결과에서처럼 壯元丸에는 이러한 효능이 있으므로 치매에서의 효능을 알아보기 위해 실험적 탐색을 걸쳐 홍삼, 당귀 등의 7가지 약재로 구성된 壯元丸加減方인 LMK02을

본 실험에 사용하였다.

LMK02의 7가지 복합한약제제의 품질규격화를 위해 홍삼 중 Ginsenoside Rg3와 당귀 중 총데쿠르신을 지표성분을 잡고 함량을 측정하였다. 그 결과 홍삼 중 Ginsenoside Rg3의 함량은 평균 47.04 $\mu\text{g/g}$ 이었으며, 그 값의 90%인 42.3 μg 을 기준으로 설정하였고, 당귀 중 총데쿠르신(데쿠르신 및 데쿠르시놀안겔레이트)의 함량은 평균 2.71 mg/g이었으며, 그 값의 90%인 2.44 mg을 기준으로 설정하였다(Fig. 1 & 2, Table 3).

또한 LMK02의 항치매 효과에 대한 세포학적 연구에서는 A β oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에서 형태학적 변화를 관찰한 결과 정상군(Wild type, 이하 WT)은 세포형태가 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라는 반면, A β oligomer를 처리한 대조군은 세포사 유도거 거의 진행되었으며 이와 함께 신경돌기가 소실되는 양상이 나타났다(Fig. 3). 한편 대조약물인 curcumin에 대해서는 약한 세포생존 양상을 보인 반면 LMK01(壯元丸去朱砂), LMK02 그리고 LMK03(3가지 단미제 구성처방)의 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리시 현미경학적으로 세포생존 양상이 우수하였고 특히, LMK02와 LMK03처리군은 다소 세포사멸도 일어났으나 신경재생이 유도되고 세포 생존율이 증가되면서 신경돌기가 잘 발달되고 신경세포의 증식이 잘 진행되었다(Fig. 3).

따라서 세포생존율을 간접적인 관찰로 더 정확히 측정하기 위해 신경세포의 사멸에 관여하는 A β oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에 대해 LMK시리즈경우 세포사멸의 억제 즉 증식도를 측정하였는데 Fig. 4에서처럼 LMK02 가장 높은 생존율을 보였는데, 이는 A β oligomer에 대한 억제효과가 뛰어난 것으로 사료되었다(Fig. 4).

Oxidative stress가 얼마나 미토콘드리아 주변부에서 ROS량이 증가되었는지 확인하기 위해 CytoFluor 4000 fluorescence spectrophotometer로 변화정도를 정량화하여 DCF 변화를 관찰한 결과 LMK02처리군은 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의존적으로 ROS양이 감소하였는데, 이는 LMK02가 A β oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제하여 상기 결과에서처럼 세포 생존율을 증가시킨 것으로 사료되었다(Fig. 5).

세포사멸 유도로 인한 미토콘드리아의 손상으로 인해 세포 밖으로 분비되는 LDH 활성도(lactate dehydrogenase)에서는 농도의존적으로 감소하였는데 이는 LMK02가 약 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 $p < 0.005$ 범위 내에서 유의성 있게 A β oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

이러한 결과로 유추해보면 oligomer의 개입은 미토콘드리아 내의 ROS증가를 인해 세포사멸의 유도가 발생되고 미토콘드리아의 LDH가 세포 밖에서 활성화되는데, LMK02가 농도 의존적으로 LDH 활성도를 억제하는 것으로 나타나 세포사멸을 억제하는 유효성분이 LMK02에 함유됨을 시사하고 있다.

따라서 LMK02가 세포사멸을 유도하는 특정 단백질과 반응하여 세포사를 억제하거나 ROS의 생성을 차단하여 LDH활성도를 감소시켜 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료되며, 이는 LMK02가 A β oligomer의 내포화를 억제하므로 응집이 일어나는 것을 차단하기 때문에 세포사멸의 지연 내지 억제하는 경

항이라 사료된다.

이상과 같이 LMK02가 Aβ oligomer로 유도된 H19-7세포주를 이용하여 만든 치매 신경손상 모델에 대해 치매 세포주의 형태학적, 생존율, ROS감소, LDH활성도 변화를 살펴본 결과 정상군과 같은 유의한 회복을 보였으며 이는 LMK02이 신경 세포사멸을 억제하는 효능이 있음을 의미하는 것으로 향후 처방 구성 단미제에 따른 효과 비교실험을 통해 더 주효능 단미제와 기전 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

결론

Aβ를 이용한 H19-7세포주에서 LMK02로부터 신경세포 사멸을 억제하고 신경세포 보호효과를 규명하기 위하여 實驗한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

LMK02의 지표성분은 홍삼 중 Ginsenoside Rg3와 당귀 중 총 데쿠르신으로 Ginsenoside Rg3의 함량은 평균 47.04 μg/g이었으며, 그 값의 90%인 42.3 μg을 기준으로 설정하였고, 총데쿠르신의 함량은 평균 2.71 mg/g이었으며, 그 값의 90%인 2.44 mg을 기준으로 설정하였다. LMK02는 Aβ oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에서 형태학적인 변화를 관찰한 결과, 대조군은 신경돌기가 소실되는 반면, 대조약물인 curcumin에 대해서는 약한 세포생존 양상을 보였고, LMK02처리군은 세포 생존율이 증가되면서 신경돌기가 잘 발달되고 신경 세포 증식이 잘 일어났다. LMK02는 Aβ oligomer를 처리한 H19-7 해마세포에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 세포 생존율을 증가시켰다. LMK02는 약 50 μg/ml이상의 농도에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 Aβ oligomer에 대한 ROS의 생성을 억제하였다. LMK02는 약 50 μg/ml이상의 농도에서 p<0.005 범위 내에서 유의성 있게 농도의존적으로 LDH 활성도를 감소시켰다.

이상과 같은 결론은 LMK02을 홍삼의 Ginsenoside Rg3와 당귀의 데쿠르신으로 지표설정하여 품질규격화하였고, Aβ oligomer로부터 해마세포주에서의 신경사멸에 대한 효과적으로 억제하는 것으로 보아 좀 더 과학적으로 치매원인 인자를 연결한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 연구를 행하므로 癡呆 등의 다양한 뇌질환에 림상응용을 위한 제품화가 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(과제고유번호 : B070030)

참고문헌

1. Lee, D.Y., Lee, J.H., Ju, Y.S. et al. The prevalence of dementia in older people in an urban population of Korea. The Seoul study. J Am Geriatr Soc. 50: 1233-1239, 2002.
2. 대한신경과학회. 신경학. 서울, 군자출판사, p 406, 2007.

3. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울, 一潮閣, pp 63-66, 1994.
4. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울, 현대의학서적사, pp 256-271, 327-330, 663-664, 1992.
5. Yankner, B.A. Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuron. 16: 921-923, 1996.
6. Alzheimer's disease collaborative group : The structure of the presenilin 1(SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 11(2):219-222, 1995.
7. Selkoe, D.J. Amyloid β-protein and the genetics of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. 271: 18295-18298, 1996.
8. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. 한의신경정신과학. 서울, 집문당, pp 327-328, 2007.
9. 陳貴延, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 824-826, 1990.
10. Summers, W.K., Majovski, L.V., Marsh, G.M. et al. Oral tetrahydroaminoacridine in long term treatment of senile dementia. Alzheimer type. New Engl. J Med 315: 1241-1245, 1986.
11. Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A. et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. N Engl. J Med. 348(14):1333-1341, 2003.
12. 이정현, 오병훈, 유계준. 치매환자에서 동반된 행동정신증상에 대한 새로운 항정신병약물의 치료효과, 대한정신약물학회지 11(3):232-237, 2000.
13. 정영조, 이승환. 치매의 예방과 관리. 仁濟醫學, 21(1):11-19, 2000.
14. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 8(1):69-79, 1997.
15. 심대식, 노삼웅, 이진우, 이은아, 조종운, 배현수, 신민규, 홍무창. 六味地黃湯加味方에 의한 흰쥐 기억력 향상과 관련된 Hippocampus 부위의 특이 유전자 발현에 대한 연구. 동의생리병리학회지 17(3):684-692, 2003.
16. 황선미, 정대규. 供辰丹이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 15(2):103-118, 2004.
17. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山查聰明湯이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(1):59-78, 2006.
18. 김건진, 정대규. 장원단이 CT105와 Aβ로 유발된 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(2):91-122, 2006.
19. 강형원, 김상태, 이종화, 김태현, 손형진, 한평립, 류영수. 壯元丸加減方 水抽出物이 아밀로이드 전구단백질으로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 동의신경정신과학회지 18(2):13-24, 2007.
20. Ray, J., Peterson, D.A., Schinstine, M., Gage, F.H.

- Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3602-3606, 1993.
21. 許俊. 東醫寶鑑. 서울, 法仁文化社, pp 189-191, 1999.
 22. Markesbery, W.R. and Ehmann, W.D. Brain trace elements in Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Disease. neurotoxicology*. 7(1):195-206, 1986.
 23. Li, W.Y., Butler, J.P., Hale, J.E., McClure, D.B., Little, S.P., Czilli, D.L., Simmons, L.K. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein, *Neuroscience*. 95(1):1-4, 1999.
 24. Pratico, D. Alzheimer's disease and oxygen radical. new insights. *Biochem Pharmacol*. 63: 563-567, 2002.
 25. Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L.A., Brayne, C., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Lobo, A., Martinez-Lage, J.M., Stijnen, T., Hofman, A. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology* 1: 78-84, 1999.
 26. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349: 704-706, 1991.
 27. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D., Oshima, J., Pettingell, W., Yu, C., Jondro, P., Schmidt, S., Wang, K. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269: 973-977, 1995.
 28. Katzman, R. Apolipoprotein E4 as the genetic susceptibility for Alzheimer's disease. In *the Alzheimer's Disease*. Terry RD, Katzman R. and Bick KL.(eds), Raven Press. New York. pp 455-457, 1994.
 29. Bachman, D.L., Wolf, P.A., Linn, R. et al. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology*. 42: 115-119, 1992.
 30. Lai, F., Williams, R.S. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol*. 46: 849-853, 1989.
 31. Katzman, R. and Kawas, C. Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. In *the Alzheimer's Disease*. (Terry RD, Katzman R. and Bick KL eds). Raven Press. New York. pp 105-122, 1994.
 32. Steinhoff, T., Moritz, E., Wollmer, M.A., Mohajeri, M.H., Kins, S., Nitsch, R.M. Increased cystatin c in astrocytes of transgenic mice expressing the K670N-M671L mutation of the amyloid precursor protein and deposition in brain amyloid plaques. *Neurobiol Dis*. 8(4):647-654, 2001.
 33. De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., De Strooper, B. Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect A β secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet*. 10(16):1665-1671, 2001.
 34. Fishman, C.E., Cummins, D.J., Bales, K.R., DeLong, C.A., Esterman, M.A., Hanson, J.C., White, S.L., Paul, S.M., Jordan, W.H. Statistical aspects of quantitative image analysis of beta-amyloid in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*. 30: 145-152, 2001.
 35. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 920: 321-327, 2000.
 36. Kawai, M., Cras, P., Richey, P., Tabaton, M., Lowery, D.E., Gonzalez-DeWhitt, P.A., Greenberg, B.D., Gambetti, P., Perry, G. Subcellular localization of amyloid precursor protein in senile plaques of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 140(4):947-958, 1992.
 37. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 920: 321-327, 2000.
 38. Amenta, F., Parnetti, L., Gallai, V., Wallin, A. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors: Ineffective treatments or inappropriate approaches *Mech Ageing Dev*. 122: 2025-2040, 2001.
 39. 張介賓. 景岳全書. 서울, 一中社, p 846, 1992.
 40. 陳士鐸. 石室秘錄(下). 서울, 書苑堂, pp 316-317, 1984.
 41. 錢鏡湖. 辨證奇文全書. 臺北, 甘地出版社, pp 222-225, 223-235, 1980.
 42. 정인철, 이상룡. 도담익기활혈탕이 치매병태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 15: 260-276, 2001.
 43. 방재선, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상. 加味寧神丹이 CT105 로 유도된 Neuro2A 세포주에서의 抗痴呆효과. *대한한방내과학회지* 27(3):603-616, 2006.
 44. 김보경, 이상룡. 안신청뇌탕이 치매병태모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 16: 240-255, 2006.
 45. 박지운, 이상용, 정인철. 日黃連이 痴呆병태모델에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지* 15(1):87-100, 2004.
 46. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수. 遠志와 石菖蒲 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포인 세포주에 대한 抗痴呆효과. *동의생리병리학회지* 17(4):1037-1049, 2003.
 47. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울, 一中社, pp 229-230, 1994.