

다빈도 한약 처방 50종의 아세틸콜린 분해 효소 활성 및 아밀로이드 베타 단백질 응집 억제 효능 비교 연구

임혜선¹ · 김윤주¹ · 김온순¹ · 정수진^{1,2*}

¹한국한의학연구원 한의약융합연구부, ²과학기술연합대학원대학교 한의생명과학전공

Screening of 50 Korean Herbal formulas with Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity and Amyloid- β Aggregation

Hye-Sun Lim¹, Yoonju Kim¹, Ohn Soon Kim¹ and Soo-Jin Jeong^{1,2*}

¹Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Korea

²Korean Medicine Life Science, University of Science & Technology, Daejeon 34113, Korea

Abstract – Acetylcholinesterase (AChE) activation and amyloid- β (A β) aggregation are major biological markers of Alzheimer's disease. In the present study, we evaluated the inhibitory effects of 50 kinds of herbal formulas on AChE activity and A β aggregation. Among them, Hwanglyeonhaedok-tang, Cheonwangbosim-dan, Makmundong-tang, and Gamisoyo-san had a potent effects on the inhibition of AChE activity. Sosiho-tang, Samsoeum, Cheonsimyeunjaeum, and Bunsimgieum exerted to have the inhibitory activity on A β aggregation. In addition, these 8 herbal formulas showed the 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity, indicating their antioxidant activities.

Key words – Dementia, Acetylcholinesterase, Amyloid- β , Antioxidant, Herbal formula

우리나라를 포함한 전 세계 대부분의 국가들은 초 고령화 사회로의 진입이 빨라지면서 노인성 질환에 대응하는 기술 개발이 요구되고 있다.¹⁾ 여러 가지 노인성 질환 중 치매 환자의 수의 증가 폭이 가장 높으며, 이와 함께 치매로 인한 의료비 지출 규모도 점차 증가되고 있는 추세이다.^{2,3)} 국내 치매 환자 중 알츠하이머성 치매의 비중이 가장 높으며, 이는 알츠하이머성 치매는 신경세포 손상 및 senile plaque와 neurofibrillary tangle(NFT) 농축으로 인한 인지기능 장애로 정의된다. 알츠하이머성 치매의 발병 기전에 대하여 정확히 알려진 바는 없으나, 현재까지는 신경전달물질인 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase) 활성화와 아밀로이드 베타(amyloid- β) 응집이 주요 원인으로 알려져 있으며, Tau 과산화, 산화적 스트레스 등도 관여하는 것으로 보고되었다.⁴⁾

한의학에서도 한약을 이용한 치매 치료에 대한 비임상 및 임상 연구 결과가 꾸준히 발표되고 있으며, 그 중 치매 효능 한약 처방에 대한 연구도 많은 부분을 차지하고 있다.^{5,6)} 서 등이 발표한 치매 치료 한약 처방 연구 논문 분석에 따

르면, 억간산(抑肝散)을 사용한 논문들이 가장 많았고, 다음으로 당귀수산(當歸鬚散)과 조등산(鈞藤散), 가미온담탕(加味溫膽湯), 황련해독탕(黃連解毒湯)의 순으로 나타났다.⁵⁾

본 연구에서는 한의계에서 가장 많이 사용되는 다빈도 한약처방 50종을 대상으로, 치매 병리기전 중 주요 생리지표인 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase) 활성 및 아밀로이드 베타(amyloid- β) 단백질 응집에 대한 효능과 자유 라디칼 소거능 측정을 통한 항산화 효능을 *in vitro*에서 검색하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구의 한약 처방은 한국한의학연구원 K-herb 연구단으로부터 추출물을 제공받아 사용하였다. 한약 처방 추출 방법은 다음과 같다. 각각의 처방에 따라 약재를 배합한 후 이의 10배에 해당하는 양의 증류수와 함께 100 °C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법(추출기: 경서메디텍 COSMOS-660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 sieve를 사용하여 거른 후 동결건조기(일신 동결건조기 PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 분말을 얻었다.

*교신저자(E-mail): sjjeong@kiom.re.kr
(Tel): +82-42-868-9651

아세틸콜린 분해효소 활성 저해 효능 탐색 - 아세틸콜린 분해효소 저해 활성은 Ellman법⁷⁾을 변형하여 분광 광도법으로 측정하였다. 활성 분석을 위한 완충용액은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.3, 이하 A-buffer)을 사용하였고, 아세틸콜린 분해효소는 0.1% bovine serum albumin/H₂O 용액에 25 U/mL 농도로 일정량씩 분주하여 -80°C에 보관하고, 실험 시 assay buffer에 녹여 최종 농도 35.2 mU/mL로 하여 사용하였다. 기질인 acetylthiocholine iodide와 발색 시약 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)는 A-buffer에 각각 10 mM의 농도로 일정량씩 분주하여 -80°C에 보관하고, 실험 시 최종 농도 0.5 mM로 하여 사용하였다. 시료는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여 최종 농도 100 µg/mL이 되도록 사용하였다. 효소 반응은 다음과 같이 전개하였다. 50 µL의 시료와 50 µL의 기질과 발색 시약 혼합액을 섞어주고, 10 분간 preincubation한 후, 아세틸콜린 분해효소를 처리하고 60 분간 상온에서 반응시켰다. 흡광도는 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT)를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 대조약물로는 아세틸콜린 분해효소 저해 약물로 잘 알려진 berberine⁸⁾을 사용하였고, 결과는 control군에 대한 %로 표시하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - \{(S - S') / (C - C')\}] \times 100$$

S: samples(sample solution, A-buffer with DTNB, substrate, and enzyme)

S': samples(sample solution, A-buffer with DTNB and substrate, without enzyme)

C: control(0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0), A-buffer with DTNB, substrate, and enzyme)

C': control(0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0), A-buffer with DTNB and substrate, without enzyme)

아밀로이드 베타(Aβ₁₋₄₂) 응집 저해 효능 탐색 - 아밀로이드 베타의 응집 저해 측정은 형광 분석법⁹⁾을 이용한 SensoLyte[®] Thioflavin T β-Amyloid(1-42) Aggregation Kit (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 아밀로이드 베타(Aβ₁₋₄₂) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종 농도는 100 µg/mL로 사용하였다. 형광물질로 사용하는 thioflavin T는 assay buffer (50 mM Tris/150 mM NaCl(pH=7.2), 20 mM HEPES/150 mM NaCl(pH=7.2), 10 mM phosphate/150 mM NaCl(pH=8.0))에 녹여 제조하여 2 mM 농도로 사용하였다. 시료는 assay buffer에 녹여 최종 농도 100 µg/mL로 사용하였다. Aβ₁₋₄₂ 응집억제 정도를 측정하기 위하여 96 well plate(black microplate)에 thioflavin T 10 µL와 Aβ₁₋₄₂ 85 µL를 넣은 후

일정 농도로 만든 시료 5 µL와 혼합하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 이때 사용한 형광 분광 분석기의 파장값은 440 nm/484 nm(excitation/emission)이며, 37°C에서 20분 간격으로 총 2시간 측정하였다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 morin 을 사용하였고, 응집 저해능 50%에 해당하는 시료농도(IC₅₀)를 계산하였다.

ABTS 자유 라디칼 소거능 측정 - 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS+· cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다.¹⁰⁾ 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+·를 형성시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS+· 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, Epoch Microplate Spectrophotometer를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타냈다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 vitamin C를 사용하였다.

통계처리 - 실험값은 mean±S.E.M.으로 표시하였다. 실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

치매는 주로 노인 인구에서 발생하는 인지기능 및 기억력 상실을 동반하는 대표적 신경퇴행성 질환이며, 특히 알츠하이머성 치매는 전체 노인성 치매의 약 20-50%를 차지하고 있다. 최근 노인 인구의 증가와 함께 치매 예방 및 치료에 대한 수요가 점차 증가하고 있다. 현재 처방되는 치매 치료제로는 아세틸콜린 분해효소 억제제인 donepezil, galantamine, rivastigmine, huperzine A와 NMDA 수용체 길항제인 memantine이 미국 Food and Drug Administration (FDA)의 승인을 받아 임상적으로 적용되고 있다.^{11,12)} 그러나, 이들 약물들은 행동장애 경감과 같은 일시적 증상 완화 또는 질병 진행의 일부 지연의 효과만 있는 것으로 알려져 있고, 치매 치료제(disease modifying therapeutics)에 대한 미충족 수요가 높은 실정이다. 치매는 장기적인 치료가 요구되는 질환이며, 그 병리기전 또한 복잡하여 단일 화합물 보다는 다양한 한약재들이 복합적으로 구성된 한약 처방을 이용한 한의학적 접근이 필요한 시점이다. 이러한 측면에서 구 등³⁾은 치매 한약 처방 논문 분석을 통하여 치매 치료에 대한 한약 처방 적용 가능성을 제시하였다.

본 연구에서는 우리나라에서 사용빈도가 높은 다빈도 한

Table I. Inhibitory activity of the water extracts of the 50 herbal formulas on AChE activity and amyloid- β aggregation *in vitro* (at 100 $\mu\text{g/mL}$)

Code No.	Herbal formula	AChE activity inhibition (%)	Amyloid- β aggregation inhibition (%)	ABTS radical scavenging activity (%)
KE-01	자음강화탕(滋陰降火湯)	9.69 \pm 1.3	24.9 \pm 10.5	45.5 \pm 2.3
KE-02	갈근탕(葛根湯)	-0.07 \pm 1.2	43.1 \pm 13.9	82.4 \pm 0.3
KE-03	십전대보탕(十全大補湯)	-2.75 \pm 2.1	19.7 \pm 3.0	52.1 \pm 0.9
KE-04	오적산(五積散)	-2.74 \pm 2.3	35.5 \pm 2.0	59.3 \pm 0.6
KE-05	팔물탕(八物湯)	-2.86 \pm 1.6	33.4 \pm 2.0	55.9 \pm 0.5
KE-06	삼출건비탕(參朮健脾湯)	-0.89 \pm 2.1	3.8 \pm 16.6	64.9 \pm 0.7
KE-07	육미지황탕(六味地黃湯)	-9.14 \pm 2.0	-3.5 \pm 3.7	55.1 \pm 3.4
KE-08	이진탕(二陳湯)	1.69 \pm 0.7	14.6 \pm 10.6	66.2 \pm 0.6
KE-11	반하백출천마탕(半夏白朮天麻湯)	1.19 \pm 1.5	-6.9 \pm 2.2	46.5 \pm 0.5
KE-12	보중익기탕(補中益氣湯)	-1.00 \pm 0.3	36.4 \pm 4.1	55.4 \pm 1.9
KE-13	소청룡탕(小青龍湯)	-0.21 \pm 0.6	25.7 \pm 7.9	36.1 \pm 1.0
KE-14	인삼패독산(人蔘敗毒散)	-0.84 \pm 0.7	42.6 \pm 19.5	50.0 \pm 1.1
KE-16	구미강활탕(九味羌活湯)	5.34 \pm 1.6	41.6 \pm 3.4	51.8 \pm 4.8
KE-17	오령산(五苓散)	-2.17 \pm 1.5	9.7 \pm 4.1	27.4 \pm 1.7
KE-18	평위산(平胃散)	-0.53 \pm 0.7	23.9 \pm 10.7	49.0 \pm 1.2
KE-19	이중탕(理中湯)	2.73 \pm 2.1	27.7 \pm 21.1	46.9 \pm 5.7
KE-20	황련해독탕(黃連解毒湯)	90.14 \pm 0.4	29.3 \pm 7.8	99.4 \pm 0.3
KE-21	쌍화탕(雙和湯)	0.58 \pm 0.9	39.1 \pm 18.4	96.8 \pm 0.4
KE-22	귀비탕(歸脾湯)	-2.79 \pm 1.9	48.8 \pm 16.9	34.8 \pm 0.7
KE-23	방풍통성산(防風通聖散)	-0.69 \pm 0.7	22.9 \pm 5.0	90.7 \pm 1.5
KE-24	사군자탕(四君子湯)	-9.29 \pm 1.3	6.9 \pm 12.3	48.6 \pm 0.3
KE-25	사물탕(四物湯)	-7.40 \pm 2.3	39.4 \pm 8.1	63.6 \pm 0.1
KE-26	소시호탕(小柴胡湯)	-3.26 \pm 0.6	57.9 \pm 3.5	93.3 \pm 0.2
KE-27	오약순기산(烏藥順氣散)	-4.71 \pm 2.4	46.1 \pm 9.2	65.2 \pm 2.4
KE-28	삼소음(參蘇飲)	-7.81 \pm 1.0	55.5 \pm 4.2	92.6 \pm 1.6
KE-31	계지복령환(桂枝茯苓丸)	0.30 \pm 1.8	32.5 \pm 4.9	87.2 \pm 1.4
KE-32	곽향정기산(藿香正氣散)	-2.92 \pm 4.4	31.2 \pm 4.5	51.5 \pm 0.7
KE-33	당귀수산(當歸鬚散)	-3.97 \pm 1.6	36.4 \pm 11.7	71.3 \pm 0.9
KE-34	천왕보심단(天王補心丹)	94.43 \pm 0.1	29.7 \pm 9.4	57.7 \pm 2.5
KE-35	팔미지황환(八味地黃丸)	4.92 \pm 1.8	-14.3 \pm 4.5	42.1 \pm 2.6
KE-36	향사육군자탕(香砂六君子湯)	-1.44 \pm 3.3	-11.8 \pm 1.1	46.6 \pm 0.9
KE-37	맥문동탕(麥門冬湯)	76.73 \pm 0.4	46.3 \pm 4.3	81.2 \pm 0.9
KE-38	반하사심탕(半夏瀉心湯)	-7.29 \pm 3.7	32.0 \pm 26.1	65.5 \pm 3.5
KE-39	삼령백출산(參苓白朮散)	-6.16 \pm 0.6	4.9 \pm 3.8	22.1 \pm 3.8
KE-40	생맥산(生脈散)	-6.31 \pm 3.9	-21.5 \pm 12.7	8.8 \pm 3.9
KE-41	온경탕(溫經湯)	-6.67 \pm 5.0	-16.3 \pm 12.8	44.3 \pm 2.6
KE-42	작약감초탕(芍藥甘草湯)	7.85 \pm 0.6	-15.7 \pm 10.6	87.7 \pm 0.9
KE-43	청심연자음(淸心蓮子飲)	-2.21 \pm 3.0	56.3 \pm 23.9	77.7 \pm 1.4
KE-44	향소산(香蘇散)	-2.72 \pm 4.4	6.2 \pm 14.4	49.1 \pm 3.5
KE-45	가미소요산(加味逍遙散)	63.51 \pm 2.0	-2.7 \pm 6.7	35.7 \pm 3.8
KE-46	계지탕(桂枝湯)	2.80 \pm 2.9	4.7 \pm 9.6	66.6 \pm 3.9

Table I. Continued

Code No.	Herbal formula	AChE activity inhibition (%)	Amyloid-β aggregation inhibition (%)	ABTS radical scavenging activity (%)
KE-47	마황탕(麻黃湯)	-3.79±2.9	22.4±7.1	64.9±0.8
KE-48	영계출감탕(苓桂朮甘湯)	-2.57±1.3	7.8±2.7	24.4±1.9
KE-49	용담사간탕(龍膽瀉肝湯)	-3.15±1.2	45.7±7.5	52.7±3.3
KE-50	위령탕(胃苓湯)	0.88±1.9	46.9±12.1	50.2±0.9
KE-51	향사평위산(香砂平胃散)	0.13±0.7	43.0±7.3	55.6±1.6
KE-52	내소산(內消散)	0.51±3.3	41.0±7.4	54.8±1.2
KE-53	대영진(大營煎)	-2.54±1.9	37.6±3.7	54.7±2.7
KE-54	분심기음(分心氣飲)	-1.61±1.4	57.6±5.5	72.0±1.1
KE-55	불환금정기산(不換金正氣散)	-2.43±1.7	23.6±12.4	53.4±1.0
	Berberine	60.63±0.6		
	Morin		68.3±6.2	
	Ascorbic acid			75.9±1.8

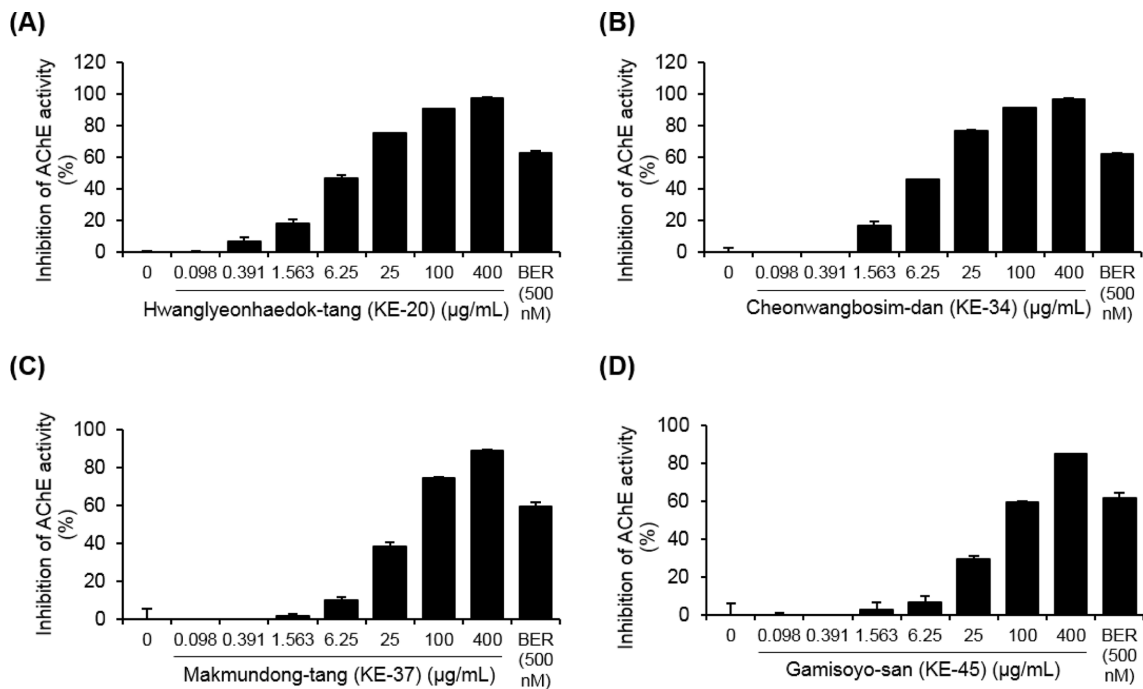


Fig. 1. Inhibitory effects of water extracts of herbal formulas on acetylcholinesterase (AChE) activity. (A) Hwanglyeonhaedok-tang, (B) Cheonwangbosim-dan, (C) Makmundong-tang, and (D) Gamisoyo-san.

약 처방 중 우선 순위 50종의 치매 효능을 탐색하였다. 다빈도 한약처방의 선정은 보험급여대상 복합제제화 권장 처방연구,¹³⁾ 한약처방의 종류 및 조제 방법에 관한 규정에 의한 처방 100종,¹⁴⁾ 한방 의료기관 다빈도 처방자료¹⁵⁾를 종합하여 선정하였다. 치매 효능 평가를 위해서는 치매 병리 기전에서 중요한 생리지표인 아세틸콜린 분해 효소 활성 및 아밀로이드 베타 응집에 대한 억제 효능을 측정하였다. 각각 양성 대조 약물인 berberine과 morin의 억제율을 근거로

하여, 한약 처방 추출물의 저해 효능이 50% 이상인 것을 효능이 있다고 판단하였다.

아세틸콜린 분해 효소 활성은 대조 약물 berberine(500 nM)의 경우 60.63±0.56% 저해 효능을 보였다. 50종 처방 농도 100 μg/mL에서 효소 활성 억제 효능은 황련해독탕, 천왕보심단, 맥문동탕, 가미소요산이 각각 90.14±0.40%, 94.43±0.11%, 76.73±0.44%, 63.51±2.00% 저해하여 다른 처방에 비하여 높은 효능을 나타내었다. 이들 처방을 다양한

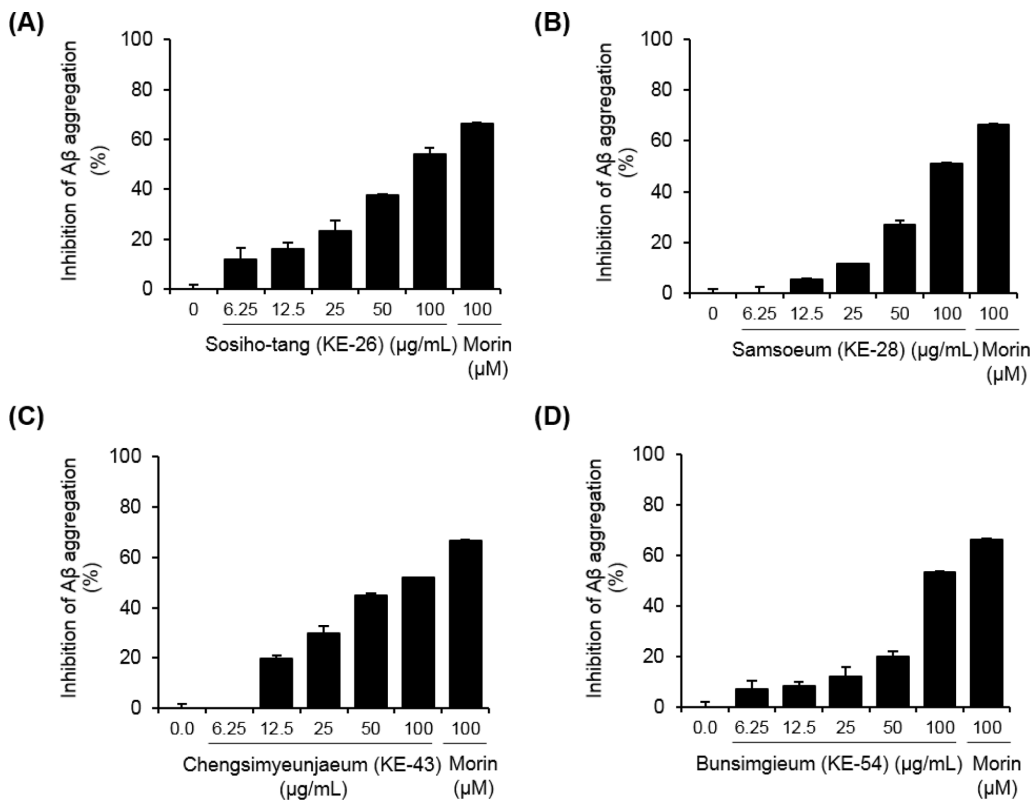


Fig. 2. Inhibitory effects of water extracts of herbal formulas on amyloid-β (Aβ) aggregation. (A) Sosiho-tang, (B) Samssoeum, (C) Chengsimyeunjaeum, and (D) Bunsimgieum.

농도로 준비하여 아세틸콜린 분해 효소 활성을 측정 한 다음 각각의 IC₅₀ 값을 계산한 결과, 7.10, 6.64, 32.7, 62.5 μg/mL이었다.

황련해독탕은 청열사화해독(淸熱瀉火解毒)의 대표적인 처방이며, 한의 임상에서 고혈압, 뇌출혈, 치매, 심혈관 질환, 피부 질환 등 열증에 해당하는 환자에게 처방된다.¹⁶⁾ 치매와 관련된 황련해독탕의 연구 논문으로는 glucose deprivation으로 유발된 PC-12 세포 손상에 대한 보호 효과가 보고되었다.¹⁷⁾ 천왕보심단은 불안, 초조 및 건망증 등의 증상과 같은 음허혈소(陰虛血少)를 치료하는 방제이며, 전임상 연구 모델에서 항치매 효능이 보고된 바 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 맥문동탕은 동의보감(東醫寶鑑) 및 방약합편(方藥合編)에 수록된 처방이며, 기관지 천식, 기관지염과 같은 호흡기 질환에 적용되며, 치매와 관련한 효능은 보고된 바 없다. 가미소요산은 소요산의 소간해울(疎肝解鬱) 작용을 강화한 처방으로 주로 부인과 질환 치료에 많이 사용되고 있으며,²¹⁾ 치매 관련 효능은 보고된 바 없다.

아밀로이드 베타 응집에 대한 평가에서 양성 대조 약물인 morin(100 μM)의 경우 68.4±6.2의 억제 효능을 나타내었다. 사용한 50개 처방 중 아밀로이드 베타 응집 억제 효능이 높은 것들은 소시호탕, 삼소음, 청심연자음, 분심기음이 각각

57.9±3.5%, 55.5±4.2%, 56.3±23.9%, 57.6±5.5%의 억제 효능을 확인하였다. 이들 처방 또한 다양한 농도에서 아밀로이드 베타 응집에 대한 효능을 측정 한 다음 억제율에 대한 IC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과 소시호탕, 삼소음, 청심연자음, 분심기음은 각각 84.2 μg/mL, 97.7 μg/mL, 84.8 μg/mL, 96.2 μg/mL의 농도임이 확인되었다.

소시호탕은 소양증을 치료하는 제제로 사기에 영향을 받은 간담열(肝膽熱)을 제거함과 동시에 간담열로 인해 손상된 비위(脾胃)를 보해주는 방법을 함께 사용하는 화해제(和劑)의 하나이다. 소시호탕 효능이 치매와 직접적으로 관련된 연구 결과는 없으나, 뇌교경색을 동반한 파킨슨병 환자의 치험예가 보고된 바 있다.²²⁾ 삼소음은 기허의 습담(濕痰) 및 비허습곤(脾虛濕困)에 대한 처방으로 평소에 위장허약한 사람이 감기 등이 오래 지속될 경우 쓰이며, 치매 관련 연구 논문은 발표된 바 없다. 청심연자음은 동의보감에서 소갈(消渴) 치료 처방으로 기재되어 있지만, 이 외에도 남성 전립선 질환, 여성 비뇨생식계의 질환, 갑상선 질환, 호흡기질환 등에도 처방한다. C6 신경아교세포를 활용한 연구에서 glutamate에 의한 세포 사멸에 대한 보호 효과가 보고되었다.²³⁾ 분심기음은 태평हे민화제국방에 처음 소개되었으며, 칠정(七情)으로 인한 신경성 소화 장애, 식욕 부진 등

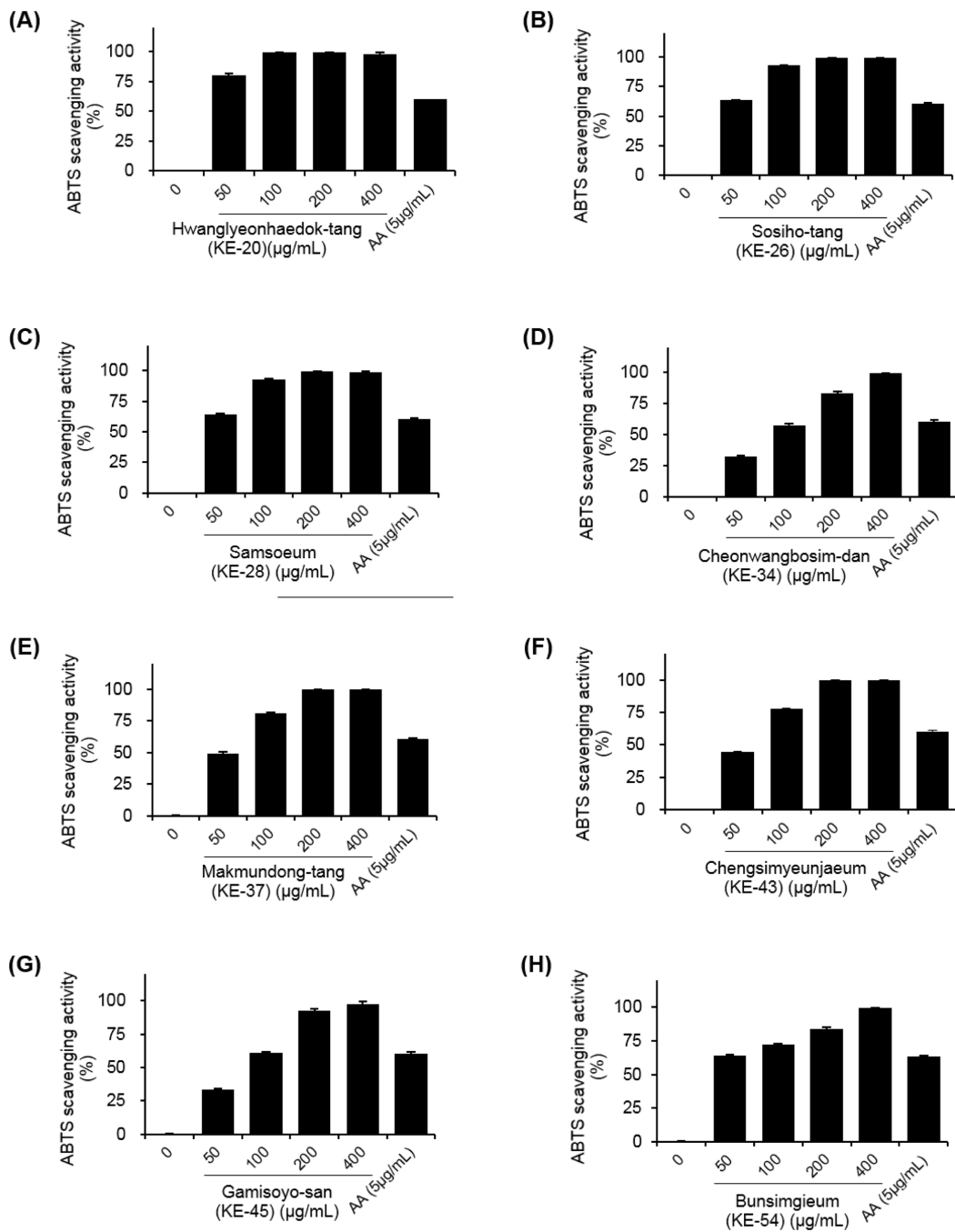


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of water extracts of herbal formulas. (A) Hwanglyeonhaedok-tang, (B) Soshiho-tang, (C) Samsoeum, (D) Cheonwangbosim-dan, (E) Makmundong-tang, (F) Cheongsimyeunjaeum, (G) Gamisoyo-san, and (H) Bunsimgieum.

을 치료하며, 대변을 잘 보게 하고 소변을 잘 통하게 하여 병을 치료하는 처방이다.²⁴⁾ 스트레스로 인한 우울증 관련 증상에 대한 효능에 관한 연구 결과가 많이 보고되었으며,^{25,26)} 그 외에도 비만, 암에 대한 효능 결과도 발표되었다.^{27,28)} 또한 김 등은 SH-SY5Y 신경아세포종(neuroblastoma) 및 증뇌 세포에서 도파민 세포 독성에 대한 보호 효능이 있음을

보고하였다.²⁹⁾

본 연구에서 확인된 유효 처방의 생약재의 지표성분의 아세틸콜린에스테라제 활성 억제 또는 아밀로이드 베타 응집 저해에 대한 결과들이 발표된바 있다. 황금의 성분인 baicalein,³⁰⁾ 인삼의 성분인 ginsenoside Rg1,³¹⁾ 황련 또는 황백의 성분인 berberine³²⁾ 등이 아세틸콜린에스테라제 활성

억제능이 보고되었다. 또한 감초의 성분인 glycyrrhizic acid와 glycyrrhetic acid³³⁾과 당귀의 성분인 decursin³⁴⁾이 아밀로이드 베타 응집을 저해하는 효능이 있음이 보고되었다.

한약 처방은 다수의 한약재로 구성되는데 유효성분을 분리하여 특정 표적을 치료하는 양약과 달리 단일 처방 안에서도 복합적인 효능을 나타낼 수 있다. 아밀로이드 베타의 응집은 아세틸콜린에스테라제 활성 증가에 의하여 촉진된다.³⁵⁾ 본 연구의 결과에서 아세틸콜린에스테라제 활성 억제에 대한 효능 처방과 아밀로이드 베타 응집 저해에 대한 효능 처방은 중복 없이 각각 다르게 나타났다. 이는 한약 처방에 따라 치매의 분자 기전의 타겟과 작용하는 단계가 다른 것으로 판단되며, 양약의 경우도 두 가지 단계에서 동시에 효능을 나타내는 약물은 극히 드물다. 아세틸콜린에스테라제에 작용하는 처방의 경우 신경세포 presynapse의 아세틸콜린을 증가를 통하여 치매 증상을 치료할 수 있을 것이다. 아밀로이드 베타 응집 억제 효능 한약처방의 경우는 아밀로이드 베타의 강한 신경독성 완화를 통한 치료의 가능성이 있을 것으로 사료된다. 향후, 각각 단계에 대한 유효한 약 처방 및 처방의 구성 약재들의 특성에 대한 분석이 필요할 것이다.

치매는 뇌 부위의 자유 라디칼에 과다 생성으로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)가 하나의 중요한 원인임이 잘 알려져 있다.³⁶⁾ 따라서 본 연구에 사용된 한약 처방들의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 항산화 효능을 평가하였다. 표 1에서와 같이 생맥산(KE-40)을 제외한 모든 한약 처방은 ABTS 라디칼 소거 활성이 20% 이상인 것으로 확인되었다. 아세틸콜린 분해 효소 활성과 아밀로이드 베타 응집에 대한 억제 효능이 높은 처방들(황련해독탕, 천왕보심단, 맥문동탕, 가미소요산, 소시호탕, 삼소음, 청심연자음, 분심기음) 모두 ABTS 라디칼 소거 활성이 높았다. 이들 처방은 높은 항산화 효능과 함께 치매의 주요 생리지표 조절을 통한 항치매 효능의 잠재성이 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 다빈도 한약 처방 50종의 아세틸콜린 분해 효소 활성 및 아밀로이드 베타 단백질 응집 억제 효능에 관하여 평가하였다. 50종의 한약 처방 중에서 황련해독탕, 천왕보심단, 맥문동탕, 가미소요산은 아세틸콜린분해 효소 활성 저해 효능을 보였고, 소시호탕, 삼소음, 청심연자음, 분심기음은 아밀로이드 베타 단백질 응집 억제 효능을 나타내었다. 또한, 이 8종의 한약 처방은 높은 항산화 효능이 있음을 확인하였다. 본 연구의 결과는 주요 지표 자체에 대한 영향을 평가한 연구이며, 향후 신경세포 및 치매 동물 모델을 활용한 추가 실험을 통하여 한약 처방의 치매에 대한 예방 또는 치료제로서의 효능에 대한 과학적 근거의 확보가

요구된다. 또한 맥문동탕, 가미소요산, 삼소음과 같은 처방들은 치매 또는 신경세포 보호와 관련된 보고가 없어 이에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요할 것이다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원 기관고유사업(K16293)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 본 연구에 사용된 한약처방 추출물은 한국한의학연구원 K-herb 연구단으로부터 분양 제공되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Korea National Statistical Office. Population Projections for Korea : 2010-2060. Daejeon: Statistics Korea (2011) available from: <http://www.kosos.kr/pj2011.pdf>.
2. Kang, I. O., Lee, S. Y., Kim, S. Y. and Park, C. Y. (2007) Economic cost of dementia patients according to the limitation of the activities of daily living in Korea. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **22**: 675-681.
3. Wimo, A. and Prince, M. (2010) World Alzheimer Report The Global Economic Impact of Dementia (London: Alzheimer's Disease International). 1-56.
4. Vetrivel, K. S. and Thinakaran, G. (2006) Amyloidogenic processing of beta amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* **66**: S69-73.
5. Koo, J. S., Seo, B. I., Park, J. H. and Roh, S. S. (2010) Analysis of papers on Oriental herbal medicines (prescriptions and herbs) for dementia. *Kor. J. Herbology* **25**: 131-137.
6. Kim, W., Jeon, W., Heo, E., Park, S. and Han, C. (2011) Literature review and suggestions : dementia clinical studies in Korean Oriental Medicine. *Kor. J. Orient. Med.* **17**: 39-46.
7. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
8. Habtemariam, S. (2011) The therapeutic potential of Berberis darwinii stem-bark: quantification of berberine and *in vitro* evidence for Alzheimer's disease therapy. *Nat. Prod. Commun.* **6**: 1089-1090.
9. Hellstrand, E., Boland, B., Walsh, D. M. and Linse, S. (2010) Amyloid β -protein aggregation produces highly reproducible kinetic data and occurs by a two-phase process. *ACS Chem. Neurosci.* **1**: 13-18.
10. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
11. Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G. and Lockridge, O. (2002) Acetylcholinesterase knock-

- outs establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* **110**: 627-639.
12. Naik, R. S., Hartmann, J., Kiewert, C., Duysen, E. G., Lockridge, O. and Klein, J. (2009) Effects of rivastigmine and donepezil on brain acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **12**: 79-85.
 13. 보건복지부 고시 제1999-23호 (1999) 8. 1.
 14. 보건복지부 고시 제1995-15호 (1995) 3. 15.
 15. 한국인의 한약 복용 실태 조사 연구 (2006) 식품의약품 안전청.
 16. Tang, S. L. and Tang, M. (2010) The clinical research of Huanglianjiadu-tang. *Practical Clinical J. Integrated Traditional Chinese and Western Med.* **10**: 90-92.
 17. Kim, H. Y., Shin, S. H. and Lee, I. (2008) Neuroprotective effect of Hwangryunhaedok-tang against glucose-deprivation induced cytotoxicity in PC-12 Cells. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **22**: 1462-1469.
 18. Lee, J., Jung, I. and Lee, S. (2002) Effects of ChenWhang-BosinDan(CWBSD) on inhibition of impairment of learning and memory, and acetylcholinesterase in amnesia mice. *J. Orient. Neuropsych.* **13**: 149-1471.
 19. Choi, K. W. and Jung, I. C. (2008) The effects of ChenwhangBosindan(CBD) hot water extract & ultra-fine powder on the Alzheimer's disease model. *J. Orient. Neuropsych.* **19**: 77-93.
 20. Park, J. H., Bae, C. W., Jun, H. S., Hong, S. Y. and Park, S. D. (2004) Antidepressant effect of chunwangboshimdan and its influence on monoamines. *Kor. J. Orient. Med. Prescript.* **12**: 77-93.
 21. 윤갑용 (1998) 동의방제와 처방해설, 411. 의성당, 서울.
 22. Yang, J. C., Kim, S. K., Lee, K. Y., Kim, J. Y. and Koo, B. M. (2007) A clinical study about the effects of Soshiho-tang on a case of Parkinson's disease with pontine infarction. *J. Kor. Orient. Med.* **28**: 34-43.
 23. Ko, S. J., Shin, Y. J., Jang, W. S., Ha, Y. J., Lee, S. A., Ahn, M. S., Kwon, O. S. and Shin, S. H. (2010) Protective effects of Chungsimyeonja-eum on glutamate-induced apoptosis in C6 glial cells. *J. Kor. Orient. Intern. Med.* **31b** 54-65.
 24. 류경원 (1985) 점교. 태평해민화제국방. 1114. 北京: 인민위생출판사.
 25. Yi, H. J., Kim, S. H., Lee, S. R., Kang, W. C. and Jung, I. C. (2009) Interim report about the effect of Bunsimgium(Fenxingiyin) on the chest discomfort of Hwa-byung's major symptom. *J. Orient. Neuropsych.* **20**: 169-188.
 26. Ji, S. Y. and Jeong, D. G. (1992) An experimental study on the change of stress-related hormone contents by prescription of Bunsimgium. *J. Orient. Neuropsych.* **3**: 49-63.
 27. Shin, M. S. and Choi, J. B. (2003) A clinical study on the effect on reducing of body weight through medication of *Buhnsimgi-eum (Fenxingiyin)* for 20 patients with obesity and partial-obesity. *J. Oriental Rehab. Med.* **13**: 1-10.
 28. Kim, J. S., Yoon, S. H., Ryu, B. H., Ryu, K. W. and Yeo, D. W. (2003) Experimental studies on antitumor effect and immune responses of Bunsimgium. *J. Kor. Orient. Intern. Med.* **24**: 315-328.
 29. Kim, R. S., Lee, C. H., Lee, J. M. Cho, J. H., Jang, J. B. and Lee, K. S. (2009) Neuroprotective effects of Bunsimgium. *J. Korean Obstet. Gynecol.* **22**: 119-131.
 30. Qi, Z., Xu, Y., Liang, Z., Li, S., Wang, J., Wei, Y. and Dong, B. (2015) Baicalein alters PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway in rats with diabetes-associated cognitive deficits. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**: 1993-2000.
 31. Wang, Q., Sun, L. H., Jia, W., Liu, X. M., Dang, H. X., Mai, W. L., Wang, N., Steinmetz, A., Wang, Y. Q. and Xu, C. J. (2010) Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Phytother. Res.* **24**: 1748-1754.
 32. Abd El-Wahab, A. E., Ghareeb, D. A., Sarhan, E. E., Abu-Serie, M. M. and El Demellawy, M. A. (2013) *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**: 218.
 33. Link, P., Wetterauer, B., Fu, Y. and Wink, M. (2015) Extracts of *Glycyrrhiza uralensis* and isoliquiritigenin counteract amyloid- β toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* **81**: 357-362.
 34. Li, L., Li, W., Jung, S. W., Lee, Y. W. and Kim, Y. H. (2011) Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid β -protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line: the role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 434-442.
 35. Alvarez, A., Opazo, C., Alarcón, R., Garrido, J. and Inestrosa, N. C. (1997) Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* **272**: 348-361.
 36. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7915-7922.
- (2016. 6. 23 접수; 2016. 7. 27 심사; 2016. 8. 16 게재확정)