

治呆飲이 해마손상 백서의 기억기능회복에 미치는 영향

지규용*

동의대학교 한의과대학, 한방바이오연구센터

Improving Effects of Chimae-eum on Learning and Memory Function in the Hippocampal Damaged Rat

Gyoo Yong Chi*

Department of Oriental Medicine, Biomedical Research Center of Oriental Medicine, Dongeui University

In order to make an efficient prescription and cope with dementia, learning and memory functions of Sprague-Dawley model rats were tested with Morris water maze. And to evaluate the effect of the sample drug(CHM) on choline acetyltransferase and acetylcholine esterase, immunoreactive measurement and enzymatic activity measuring were carried out. Rats were injected with ibotenic acid through hippocampus CA1 and CA3 area. The results are as following. CHM improves the learning ability in the acquisition test and memory function in the retention test significantly. And CHM increases the the level of AChE which is resolving acetylcholine. Though it doesn't increase the level of ChAT significantly which is synthesizing acetylcholine, but it shows the tendency of increase. So these results show that CHM improve the cholinergic catabolism and anabolism, and the increment of metabolic activity of cholinergic system. Thus it can be concluded that CHM will be helpful to cholinergic brain disease induced by primary or senile reduction of acetylcholine secretive activity

Key words : Dementia, learning, memory, choline acetyltransferase, acetylcholine esterase, chimae-eum

서 론

痴呆가 老化過程에서 자연적으로 일어나는 현상이 아니라 병리적인 과정이라는 점은 의학적으로 이미 밝혀졌지만¹⁾ 그래도 노령기의 인구가 상대적으로 증가하게 되면 痴呆 유병률은 자연히 증가하게 된다²⁾. 痴呆를 일으키는 가장 흔한 질환은 알츠하이머병과 혈관성 痴呆인데 우리나라는 전자가 61.5%, 후자가 12.8%이고 이 둘의 혼합형이 9% 정도³⁾여서 원발성 痴呆의 비중이 가장 크다는 것을 알 수 있다. 이 질환들은 광범위한 영역의 신경세포 퇴화나 혹은 多發病巢性 장애를 일으키는데 이는 痴呆의 공통적인 양상이다. 그리고 초기 증상도 신경세포의 손상이 시작되는 부위에 따라 결정되지만 역으로 손상된 신경세포의 위치나 숫자를 가지고 痴呆 여부를 말하기는 어렵다⁴⁾. 일반적으로 노화가 진행되면서 뇌실질의 위축이나 뇌중량 감소 등이 일어나

는데 痴呆의 원발질환이 없으면 지적 기능의 감소를 나타내는 중요한 징후들은 일치하여 나타나지 않는 경우가 많다. 痴呆 증상을 나타내는 환자의 뇌에 나타나는 가장 중요한 병리특징은 신경섬유농축(neurofibrillary tangle, NFT)이며 알츠하이머병에서도 특징적이긴 하지만 특이적인 지표는 아니다⁵⁾. 병리해부학적으로 알츠하이머 痴呆의 주요한 병변으로 알려진 신경반(neuritic plaque, NP)은 상대적으로 특이적이어서 그 주성분인 amyloid β protein(A β)의 축적에 대해 많은 연구가 진행되고 있다^{6,7)}. 그렇지만 그 독성과 손상기전에 대해서는 아직도 여러 이론이 활발히 제시되고 있는 중이다. 예컨대 서⁸⁾등은 A β 의 신경독성이 APP의 amyloidogenic carboxyl terminal fragment인 CT105보다 적으며 AD의 병리진행에도 더 잘 부합된다고 하였으며 Chong⁹⁾은 염증과정이나 신경퇴화(neurodegeneration)에서도 역시 그러하다고 하였다. 독성기전에 대해서도 Lashuel¹⁰⁾이 세균독소(bacterial toxin)에 의해 세포막에 구멍이 뚫리듯이 amyloid pore가 생겨 신경세포를 사멸시킨다는 주장이 제기되었지만 아직 불확실하다. 또 흑자¹¹⁾는 amyloid vaccine의 예방 및

* 교신저자 : 지규용, 부산광역시 진구 양정동 45-1, 동의대학교 한의과대학
E-mail : cgyu@dongeui.ac.kr, Tel : 051-850-8659
· 접수 : 2002/09/23 · 수정 : 2002/10/30 · 채택 : 2002/12/05

치료적 이용을 주창하는 반면 혹자¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾는 그 위험성을 경고하기도 하는 등 아직 모호한 부분이 많다. 따라서 한의학 영역에서 치매에 대한 실질적인 연구는 amyloid에 대한 것보다 인지기능과 직접적인 관련을 갖는 부분에 집중하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 치매를 임상적으로 분류하는 방법은 손상이 피질 혹은 피질하의 어느 영역에서 일어났는가에 달려있다. AD와 같은 피질성 치매(cortical dementia)는 언어 지각 계산과 같은 인지기능의 손실을 가져오고, 피질하성 치매는 인지정보처리가 늦어지고 무감동하거나 동기유발과 감정표출에 장애가 생기며 기억은 양자 모두 손상된다. 또한 이 두 영역은 서로 연관되어 있어서 혼합되어 나타나기도 한다³⁾. 특히 기억기능 손상은 해마(hippocampus)에서의 콜린신경계 활성(cholinergic activity)이 감퇴하는 것과 관련되어 있는데 동시에 norepinephrine, serotonin, dopamine, glutamate, somatostatin 등의 신경전달물질도 감소된다. 또한 이러한 변화들은 뇌혈류가 줄어들고 산소 및 당대사량이 감소되는 것과 수반되어 나타난다³⁾. 따라서 치매에서 흔히 나타나는 기억력과 학습능력을 회복하기 위해서는 기억과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 choline성 신경계의 대사활성을 촉진할 수 있는 방법이나 약물의 개발이 필요한 실정이다¹⁵⁾. 한편 혈관성 치매와는 다른 병리기전을 갖는 알츠하이머병이 발생하는 과정에는 순환기계의 기능과 밀접한 관계가 있다는 여러 연구결과¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾에 근거하여 혈액순환을 활성화하기 위한 임의의 방제를 구성하여 개선효능을 평가하고자 하였다. 따라서 본 연구는 안전성이 높은 치매의 예방 및 치료 약물을 개발하고자, acetylcholine성 신경세포가 있는 해마부위에 acetylcholine성 신경세포를 선택적으로 손상시키는 ibotenic acid를 투여한 기억력 손상모델을 만들고 기억증진효과를 보이는 유용한 약제 조성물의 효과를 Morris 수중미로에서 choline acetyltransferase (ChAT)와 acetylcholine esterase(AChE)에 대한 면역조직화학기법을 이용하여 학습과 기억 및 콜린성 뉴런의 보호작용에 미치는 영향을 살펴보았으며 실험결과 유의한 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약재

250~300g의 Sprague Dawley(SD)系 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 供給받아 使用하였다. 動物은 實驗室 環境(溫度 22±1℃, 濕度 50±5%)에 2週日間 適應시킨 후 健康한 白鼠만을 實驗에 使用하였다. Feeding은 固形飼料(三養社, Korea)와 精製水를 자유로이 攝取하게 하였다. 實驗에 使用된 藥材는 광명제약(주)에서 購入한 규격한약품을 精選하여 使用하였으며 治呆飲의 處方構成은 Table 1과 같다.

2. 檢液의 調製

치매음 3첩 분량 510g을 3,000ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml를 添加하였다. 원료약재를 3時間 동안 加熱 抽出하고 濾過紙를 利用하여 沈澱物을 제거하였다. 이 濾過液을 rotary

vacuum evaporator를 이용하여 減壓 濃縮하고 이 濃縮液을 -84℃ deep freezer에서 4時間 동안 放置하였다가 24時間 동안 freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末을 얻었으며 이를 적당히 희석하여 實驗에 使用하였다.

Table 1. Prescription of chimae-eum

韓藥名	生藥名	用量(g)
人參	Ginseng Radix	15.0
當歸	Angelicae gigantis Radix	15.0
川芎	Cnidii Rhizoma	15.0
芍藥	Paeoniae Radix alba	15.0
熟地黃	Rehmanniae Radix	15.0
菟絲子	Cuacutae Semen	15.0
鬱金	Curcumae Radix	10.0
南星	Arisaematis Rhizoma	10.0
遠志	Polygalae Radix	10.0
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	10.0
山楂	Crataegi Fructus	20.0
水蛭	Hirudo	5.0
益智仁	Alpiniae oxyphyllae Fructus	15.0

3. 頭部 手術

Male Sprague-Dawley rat을 sodium pentobarbital로 복강주사하여 마취하고 Koff microinjecter가 부착된 stereotaxic frame에 5μl Hamilton syringe를 올려 ibotenic acid(Sigma, phosphate-buffered saline에 6μg/6μl로 희석)를 hippocampus의 CA1 부위에 5분(0.2ml/min)동안 1μl를 주입하여 신경세포를 손상시키고 실험에 이용하였다. 2일의 회복기간 후 치매음(100mg/kg, 100mg/ml)을 총 28일간 1일 1회 경구투여하고 29일째에 모리스 수중미로(Morris water maze)에 의한 공간 학습 및 기억력 측정을 시작하였으며 수중미로훈련을 시행하는 7일간에도 시행 30분 전에 치매음을 경구 투여하였다.

4. 획득시험과 기억시험

실험 동물은 총 7일간 훈련을 시행하는데 먼저 획득 시험(acquisition test)은 6일간에 걸쳐 하루에 4행씩(four trial) 훈련하였고 측정항목은 180초 동안 출발에서부터 도피대에 올라가는데 걸린 시간(latency)과 거리(path length)를 기준으로 하였다. 획득 시험(acquisition test) 실시 후, 기억 시험(retention test)은 7일째 자유수영검사로 시행하였는데 도피대를 치웠을 때 90초 동안 도피대의 2배 직경 안에서 동물들이 머무는 시간과 거리를 측정하였다. 수중미로를 설치한 수조는 직경이 1.8m-2m인 원형 스테인레스 재질이며 27±2℃ 되는 물을 약 30cm 깊이로 채운 후 무독성 흰물감이나 우유로 물의 속을 볼 수 없게 하였고 4개의 동일한 사분원으로 나누어 북동, 북서, 남동, 남서방향으로 구분하고 가상의 四分圖 중심부에 도피대(escape platform)를 수면보다 1~1.5cm 낮게 설치하였다.

5. ChAT Immunohistochemistry

획득시험과 기억시험이 끝난 직후 백서를 sodium pentobarbital(100 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml와 4% formalin 용액 900ml를 심장에 관류되도록 처음 고정액 200ml는 5

분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml는 25 분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2-3 시간 동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직을 背側과 腹側의 海馬, medial septum 및 diagonal band 부위에서 30 μ m의 두께로 자른다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 다음에 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody (Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO)로 2000 배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서 72시간 동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간 동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine을 사용하여 발현시켰다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatin coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버 글라스를 덮은 후 현미경으로 200배 확대하여 medial septum내 ChAT-immunoreactive한 신경세포수를 측정하였다. AChE와 ChAT의 activity 측정부위는 CA1-3이다.(hippocampus CA1 coordinate: AP=-3.8mm, ML=±2.0mm, DV=-3.2mm. CA3 coordinate: AP=-5.3mm, ML=±5.0mm, DV=-6.0mm)²⁰.

6. AChE의 Activity 측정

Sodium pentobarbital(100mg/kg, 복강주사)로 실험 동물을 마취한 상태에서 0.9% 생리 식염수(100ml)와 4% formalin 인산 완충액(500ml)을 심장을 경유하여 관류시킨 다음 뇌를 적출하여 4% formalin-인산완충액(고정액)에 2-3시간 담가둔 후 20% sucrose를 함유한 인산완충액(PBST)에 담고 4℃에서 12시간 저장하였다. 다음 날 뇌를 급속히 냉동한 후 microtome을 이용하여 30 μ m의 절편을 제작한 다음 몇 개의 절편은 cresyl violet 염색을 거쳐 위치와 손상부위를 microscope로 확인하고 먼저 20ml 0.2M PBST에 10 μ l의 Acetylcholine과 2% normal goat serum(NGS 400 μ l) 8 drop과 0.15% sodium azide(Sigma, St.Louis, MO, 20mg)를 넣어 primary antibody용액을 만들었다. 뇌조직 절편을 24-well plate에 각각 담고 primary antibody용액을 500 μ l 정도 넣어 4℃ cold chamber에서 73시간 숙성하였다. 그리고 20ml 0.2M PBST에 1% goat blacking serum 4drop과 biotinylated anti-rabbit made in goat(200:1)을 넣어 secondary antibody용액을 만들었다. 1차항체와 결합시킨 뇌조직을 PBST에 3회 씻어낸 후 secondary antibody 용액을 500 μ l 정도 넣어 상온에서 2시간 숙성한 다음 20ml 0.2M PBST에 ABC kit의 A 8 drop과 B 8 drop을 넣어 ABC 용액을 만들고 2차 항체와 결합시킨 뇌조직을 PBS에 3회 씻고 ABC 용액에 넣어 상온에서 2시간 숙

성하였다. 마지막으로 200 μ l NiCl(nickel chloride 8%, 80mg/ml H₂O)와 67ml hydrogen peroxide(3%, 30% H₂O₂에 190 μ l)와 20ml 0.1M Tris(1.55g Trimza/100ml H₂O, pH=7.2)를 10mg DAB (diaminobenzidene)에 넣어 DAB 용액을 만든 다음 뇌조직을 PBS에 3회 씻고 DAB 용액에 2분간 담구었다가 microscope로 AChE 密度를 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과는 MS Excel 97을 이용하였으며 정상군과 실험군 및 실험군간에 표현되는 특성차이의 유의성에 대한 분석은 Student's t-test와 시간을 단일변수로 하는 분산분석법 (repeated one-way ANOVA)을 사용하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

실험결과

1. 치매음 투여군에 대한 Morris 수중미로의 획득검사결과

각 군의 수중미로학습에 의한 도피대에 도달하기까지의 시간변화는 Table 2.의 acquisition test 결과와 같다. 6일 동안 180초내 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 정상군(무시술군), 모의시술군, ibotenic acid손상군, ibotenic acid손상+B약물투여군의 집단간 차이가 있었으며 학습이 진행됨에 따라 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 집단간 차이를 보였다. 측정일에 따른 집단별 사후검정(LSD) 결과, 제1일째부터 모의시술군에 비해 ibotenic acid손상군의 학습능력이 현저히 저하되었다(p<0.05). 이에 비해, 치매음 투여군에서는 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, ibotenic acid손상군에 비해 1일째부터(p<0.05) 학습수행에 유의한 증진효과가 나타났으며 획득시행동안 도피대에 도달하는 시간이 감소하는 경향이 관찰되었다.

Table 2. Effect of Chimae-eum(CHM) on the acquisition test and the retention test of water maze task.

Group	acquisition test			
	1day	2day	3day	4day
normal	78.1±11.87 ^a	76.9±8.93	31.60±5.62	40.6±4.29
sham	108.9±12.76	94.3±11.94	29.5±7.89	19.4±4.68
lesion	150.1±13.21	120.8±13.35	101.5±16.39	52.3±5.55
CHM	114.9±28.07	83.8±20.67	67.7±23.88	47.1±13.08

Group	acquisition test		retention test
	5day	6day	7day
normal	21.8±2.18	16.8±3.89	11.9±2.02
sham	22.8±4.48	20.2±3.54	10.9±1.07
lesion	37.6±7.97	35.4±6.68	6.0±0.61
CHM	39.4±15.89	25.6±7.79	12.3±0.81

Comparison of acquisition performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. Mean swimming time traveled per trial. Mean values of the four trials per day for 6 days for each of the four groups are shown. Comparison of retention performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. Means time spent in annulus(twice the size of platform). Repeated measures of ANOVA of swimming time between the sham and ibotenic acid lesion group. a : Mean ± Standard Error

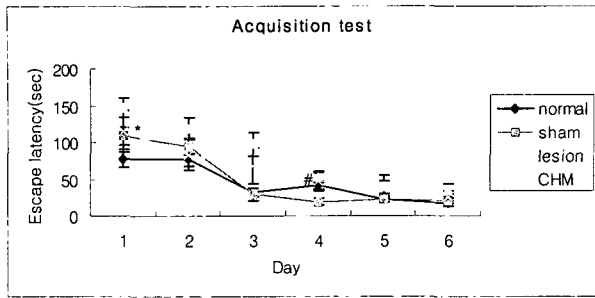


Fig. 1. Acquisition of the water escape task in a circular pool by normal rats, sham-operated rats, rats after bilateral injections of 6µg/µl ibotenic acid into the hippocampus(CA1) and CHM-treated rats. Session means and standard errors of the means(S.E.M) of the latency to escape onto a submerged platform. Data were analyzed by repeated ANOVA and followed by LSD test. #, P<0.05 vs sham group *, P<0.05 vs lesion group

2. 치매음 투여군에 대한 Morris 수중미로의 파지검사결과 각 군의 수중 미로 학습에서 파지시행에 의한 도피대에 머무르는 시간은 Table 2.의 retention test과 같다. 마지막 날인 제 7일 재에 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 정상군, 모의시술군, ibotenic acid손상군, ibotenic acid손상+CHM투여군간 도피대에 머무르는 정도의 유의한 차이가 나타났으며 ibotenic acid손상+CHM투여군에서 ibotenic acid손상군에 비해 학습수행에 증진효과를 보였다 (P<0.05).

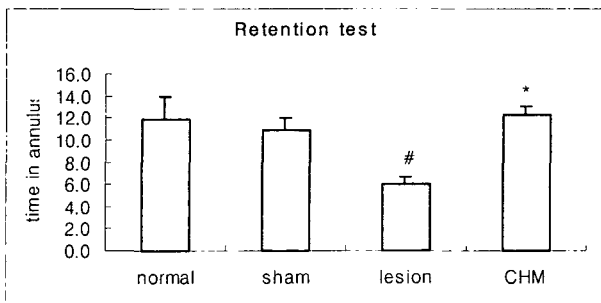


Fig. 2. Effect of normal, sham surgery, bilateral hippocampal lesions, CHM on the performance of rats in the spatial morris water escape task during the probe trial. The lesions were induce ibotenic acid. Means and standard errors of the means (S.E.M) of the time speant in annulus(twice the size of platform). Data were analyzed by repeated ANOVA and followed by LSD test. #, P<0.05 vs sham group *, P<0.05 vs lesion group

3. Hippocampus에서의 ChAT 발현량

해마의 CA1부위와 CA3부위에서 학습능력의 지표로 이용되는 ChAT를 이용하여 acetylcholine성 신경세포를 염색한 결과는 Table 3.와 같다. 모의시술군, ibotenic acid 손상군, ibotenic acid 손상+CHM투여군의 집단간 사후검정(LSD) 결과 모의시술군에 비해 ibotenic acid손상군에서 ChAT성 신경세포가 유의하게 감소했으나 (p<0.05), CA1부위와 CA3부위에서 모의시술군과 ibotenic acid손상군, ibotenic acid손상+CHM 투여군간의 ChAT 발현량의 차이는 유의성이 나타나지 않았다. ibotenic acid손상

+CHM 투여군이 모의시술군과 ibotenic acid손상군에 비하여 ChAT 발현이 감소한 경향이 관찰되었다.

Table3. ChAT activity and AChE activity of hippocampus

Experimental group	ChAT		AChE	
	CA1	CA3	CA1	CA3
sham	22.72±0.98a	23.16±0.41	126.11±2.94	122.5±3.59
lesion	19.94±0.94	18.77±1.21	114.94±1.99	116.22±2.41
CHM	18.66±1.13	18.25±1.27	118.25±2.49	122.5±1.51

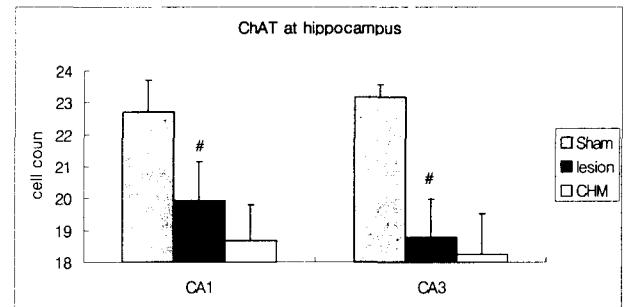


Fig. 3. The mean(±SEM) values of quantities of ChAT immunostained nuclei in the hippocampus(CA3) of the experimental groups after water maze learning task 7 days post-operatively. The ChAT results were analysed by performing separate one way ANOVA of neurons among the groups followed by post hoc comparisons using the least significant difference(LSD). #, p<0.05 as compared with the corresponding data of sham group. *, p<0.05 as compared with the corresponding data of ibotenic acid lesion group

4. Hippocampus에서 AChE 발현량

해마의 CA1부위와 CA3에서 AChE 발현의 결과는 Table2.와 같다. 모의시술군, ibotenic acid손상군, ibotenic acid손상+CHM투여군의 그룹간 사후검정(LSD) 결과 ibotenic acid손상군은 모의시술군에 비해 AChE 발현의 차이는 유의하게 나타났고 (각 p<0.05), ibotenic acid손상+CHM투여군이 모의시술군과 ibotenic acid손상군에 대한 유의성은 나타나지 않았다. CA1에서 AChE 발현은 유의미한 차이가 없었으나 CA3부위에서는 CHM 투여군이 ibotenic acid손상군에 비하여 AChE발현이 유의성 있게 증가되었다.

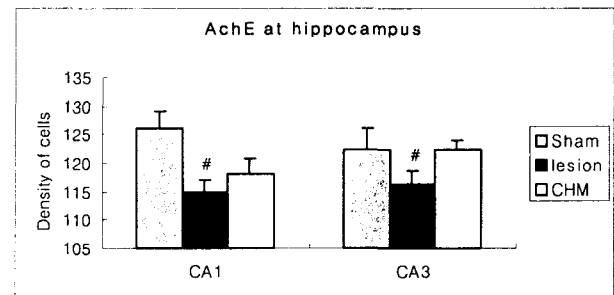


Fig. 4. The percentage(±SEM) of sham values of density of acetylcholine esterase (AChE) stained nuclei in the different hippocampal formation areas of the experimental groups after water maze learning task 7 days post-operatively. The AChE results were analysed by performing separate one way ANOVA of neurons among the groups followed by post hoc comparisons using the least significant difference(LSD). #, p<0.05 as compared with the corresponding data of sham group. *, p<0.05 as compared with the corresponding data of ibotenic acid lesion group.

총괄 및 고찰

우리나라를 비롯한 주요 선진국에서는 의료기술의 발전과 함께 人間의 평균壽命이 延長되고 출생률이 감소하면서 老齡者의 비율이 급격히 증가하고 있으며, 그 중에서도 痴呆환자의 care에 소요되는 막대한 인력과 비용으로 인해 深刻한 社會問題가 되고 있다²¹⁾²²⁾. 때문에 치매질환에 좀 더 체계적으로 대처하기 위해서는 조기진단에 의한 발견을 높이는 동시에 예방효과를 갖는 치료제를 개발하는 것이 가장 효과적일 수 있다²³⁾. 치매질환의 공통적 특징은 기억력 장애, 판단력 상실 등 인지적 결함을 동반한다는 것인데 생리학적으로는 뇌가 위축되고²⁴⁾ 대뇌피질부위의 콜린성 신경 입력통로인 마이너르트 기저핵(nucleus basalis of Meynert)의 신경세포 수가 급격히 감소되며, 해마(hippocampus)와 대뇌피질에서 choline uptake 및 아세틸콜린의 합성량과 ChAT의 활성도가 감소하고, 니코틴성²⁵⁾ 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체의 감소²⁶⁾, 아세틸콜린과 AChE의 함량 감소 등을 동반²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾한다. 이들 콜린성 신경의 손상은 basal forebrain neurons의 손상을 의미하며 감소 정도는 AD의 인지손상 정도와 관계되는데 특히 기억력 장애는 노인에서 가장 빈번히 호소되는 인지증상으로 감각 기억(sensory memory)의 저하, 작업기억(working memory)의 저하, 응고화(consolidation)기능 저하, 간섭에 대한 감수성(susceptibility to interference) 증가 등으로 나타난다. 그리고 복잡한 운동이나 동작의 수행능력이 저하되고 동작성 지능이 감소되는 경향을 보이는 것은 복잡한 행동 과제에 대한 시작, 계획 및 평가(initiation, planning and evaluation) 기능이 저하되는 것으로 생각되고 있고 전두엽 및 변연계의 기능이 변화된다는 것을 시사해준다³⁰⁾³¹⁾³²⁾. 따라서 choline성 神經系의 활성을 改善하기 위한 藥物들로서 현재까지 개발된 藥物들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor, 수용체 효능물질(receptor agonist)³³⁾³⁴⁾, 아세틸콜린분해 억제제(acetylcholinesterase inhibitor) 등³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾이 있다. 예를 들면 acetylcholine 합성의 전구체인 lecithin³⁸⁾, Muscarinic Receptor Agonist인 RS86³⁹⁾(Novartis, Switzerland), nicotine 등과, acetylcholine 분해억제제(AChE inhibitor)로 FDA의 승인을 받은 tacrine⁴⁰⁾과 E202041 등이다. 비록 Tacrine과 Aricept 등이 AD의 治療劑로서 아직까지는 效果가 優秀한 것으로 알려져 있지만 效果가 일시적이고 미약하며 간독성과 오심, 구토 등 말초의 choline성 증상을 나타내는 부작용 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이며⁴²⁾ 이러한 부작용을 최소화할 수 있는 치료제의 개발이 남은 과제이다. 한편 흥분성 독성 신경 전달물질인 glutamate와 구조적으로 유사한 ibotenic acid는 신경세포를 손상시키는 물질이며 stereotaxic 방법을 이용하여 뇌에 주입하면 콜린성 신경 섬유가 손상된 동물 모델을 만들 수 있다⁴³⁾⁴⁴⁾. Yamasaki 등은 medial septum, nucleus basalis magnocellularis에 주입된 ibotenic acid는 해마 및 frontal cortex에서 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성도를 감소시켰으며 모의수술군(Sham-operated group)에 비해 기억 획득에 손상이 있었다고 하였다⁴⁵⁾. 따라서 본 실험에서는 아세틸콜린성 신경세포가 주로 위

치하는 해마에 흥분성 신경독소인 ibotenic acid를 주입함으로써 해마의 신경세포를 손상시켜 유도된 치매 모델에서의 새로운 복합방의 효과를 보고자 하였다. 韓醫學에서 痴呆는 ‘痴獸’⁴⁶⁾, ‘呆病’⁴⁷⁾라는 이름으로 설명되었다. 張景岳은 『景岳全書·癡狂痴獸』에서 “痴獸症은 ... 말하는 것이 뒤죽박죽이며 행동거지가 엉뚱하고 간혹 땀을 많이 흘리거나 졸곤 근심에 빠지기도 하는 등 그 증상이 하도 기괴하여 못하는 것이 없다. 脈은 必히 弦數하거나 大小가 일정치 않고 항상 변한다” 라고 하였고 陳士鏞은 <石室秘錄·呆病>⁴⁸⁾에서 “呆病은 흡사 天痴와 같아서 멍한 표정으로 아무 말 없이 있으며 배가 고파도 멍하니 있어서 정신나간 것처럼 보인다. 의식은 꼭 지랄병을 떨 것 같지만 그러지는 못하고 정신이 발광할 것 같아도 역시 그러지는 않는다. 때로는 잠자기를 數日동안 하여도 깨나질 않으며 때로는 앉아 있기를 數日동안 하여도 잠을 안자고 때로는 제몸에 걸친 옷을 가지고 촘촘히 꿰매며 때로는 남의 물건을 가지고 깊숙이 감추기도 한다. 다른 사람과 마주서서 대화할 때는 말없이 엉뚱한 데 정신 팔고 있다가 그 사람과 등지고 말할 때는 ‘낮은 소리로 훌쩍거리면서 하소연하듯 한다. 밥이라도 졸라 하면 야박하게 냉대하다가도 밥을 안주면 숯을 먹으면서 좋아한다”고 하여 대뇌교위활동 장애에 의한 기억, 사고, 판단, 지남력, 언어, 행동, 인격장애 등의 다양한 양상을 표현하고 있다. 이러한 기괴한 증후가 생기는 기전에 관해서 陳士鏞은 <辨證錄>⁴⁹⁾에서 “대부분 그 시초는 肝氣가 울체된 데서 비롯되고 마지막엔 胃氣가 衰하게 된다. 肝鬱하면 木克土하므로 痰이 생기게 되고 胃衰하면 土가 制水하지 못하여 痰을 제거하지 못한다. 그러므로 痰이 胸中에 쌓이고 心外에 단단히 뭉쳐 神明을 맑지 못하게 하여 치매를 형성하는 것이다”라고 설명하였다. 痴呆의 변증논치에 대해 <中醫症狀鑑別診斷學>⁵⁰⁾에서는 濕痰阻竅, 氣鬱血虛, 肝腎虧虛, 先天髓海不足 등을 들고 있고, 치매의 治法에 대한 김세길⁵¹⁾의 문헌조사에 의하면 補心脾法이 39.5%, 化痰이 14%, 補腎과 化痰가 각각 11.6%였으며 治方으로는 歸脾湯이 10.3%로 가장 많이 사용되었다고 보고하였다. 따라서 이상의 여러 내용을 종합하여 본 연구에서는 補血과 活血을 목적으로 四物湯에 山楂와 水蛭을 가하고 祛痰하기 위해 遠志, 菖蒲와 南星을 가하였으며 補氣理氣를 위해 人蔘과 鬱金を 가하고 補腎을 위해 菟絲子와 益智仁을 가하여 治呆飲을 구성하였다. 치매음에 대한 실험결과 학습능력을 검사하기 위한 수중미로학습의 획득시행동안 치매음 투여군이 ibotenic acid손상군에 비하여 도피대에 도달하는 시간이 감소되어 학습수행에 유의한 증진효과가 있음이 관찰되었으며, 파지 시행으로 살펴본 약물 투여군의 공간기억력에서도 유의한 증진효과가 관찰되었다. 또한 치매음 투여군은 해마의 CA3 부위에서의 AChE 발현이 손상군에 비하여 유의하게 증가한 점은 인정되었으나 ChAT 발현에 있어서는 증가경향성만 인정되었고 유의성은 확인되지 않았다. 따라서 치매음은 아세틸콜린 代謝를 윤택하게 증가시킨다고 할 수는 없지만 학습과 기억력 회복에 어느 정도 개선효과 있을 것임을 시사하며 이는 상대적으로 AChE에 대한 영향이 보다 크게 나타났다. AChE의 경우 아세틸콜린을 분해하는 작용을 하는 것으로 AChE 효소의 활성은 기질의 양에 좌우하므로, 본 실험에서

도 AChE의 발현이 많은 것은 아세틸콜린이 많이 존재하였을 것으로 추정된다.

결 론

Ibotenic acid를 주입한 해마기억세포 손상모델에서 치매을 4주 동안 지속적으로 투여한 후 수종미로검사를 이용한 행동 실험 결과는 다음과 같다. 치매은 획득시험과 파지시험에 의한 공간학습능력 및 기억능력측정 결과 손상을 유의하게 회복시켰으며, 신경화학적 변화에 있어서 학습 및 기억에 관련된 아세틸콜린성 신경세포의 손상을 억제하였는데, 이는 특히 해마에서 AChE의 활성을 증가시키고 아세틸콜린의 양을 늘리는 것으로 사료된다. 이를 근거로 하여 치매에 대한 예방약 및 치료제의 개발을 위한 세부조건 설정과 임상적 검증이 요구된다.

감사의 글

본 논문은 동의대학교 2001 학술연구비 지원사업에 의해 이루어진 것임. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ramzi Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins: Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 1329, 1999.
- 최용덕, 이광규, 강형원, 유영수: 치매의 병리에 대한 동서의학적 고찰, 대한동의병리학회지, 13(1):37, 1999.
- 황의완외: 노인성 치매에 대한 임상적 연구, 동의신경정신과학회지, 7(1):1-13, 1996.
- Jean Wilson, Eugene Braunwald, Kurt Isselbacher, Robert Petersdorf, Joseph Martin, Anthony Fauci, Richard Root. Harrison's Principle of Internal Medicine, 12th ed. MacGraw Hill Com., p. 189, 1991.
- Ramzi S. Cotran, Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th ed., W.B. Saunders, p. 1330.
- Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists, J Alzheimers Dis. 4(3):193-201, 2002.
- Tran MH, Yamada K, Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview, Peptides. 23(7):1271-83, 2002.
- Suh YH, Kim HS, Lee JP, Park CH, Jeong SJ, Kim SS, Rah JC, Seo JH, Kim SS. Roles of A beta and carboxyl terminal peptide fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer disease, J Neural Transm Suppl (58):65-82, 2000.
- Chong YH, Sung JH, Shin SA, Chung JH, Suh YH. Effects of the beta-amyloid and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on the production of the tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 by human monocytic THP-1, J Biol Chem 276(26):23511-7, 2001.
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT Jr. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations, Nature 418(6895):291, 2002.
- Vickers JC, A vaccine against Alzheimer's disease: developments to date, Drugs Aging, 19(7):487-94, 2002.
- Smith MA, Atwood CS, Joseph JA, Perry G. Ill-fated amyloid-beta vaccine, J Neurosci Res. 69(3):285, 2002.
- Imbimbo BP, Toxicity of beta-amyloid vaccination in patients with Alzheimer's disease, Ann Neurol. 51(6):794, 2002.
- Smith MA, Joseph JA, Atwood CS, Perry G. Dangers of the amyloid-beta vaccination, Acta Neuropathol(Berl). 104(1): 110, 2002.
- 서유현, 치매의 치료현황과 전망, Life Science and Biotechnology 14호 특별논단
- Jellinger KA, Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update, J Neural Transm. 109(5-6):813-36, 2002.
- Kalaria RN, Ballard C., Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia, Alzheimer Dis Assoc Disord. 13 Suppl 3: S115-23, 1999.
- Kalaria RN., The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 21(2):321-30, 2000.
- Pasquier F, Leys D., Why are stroke patients prone to develop dementia? J Neurol. 244(3):135-42, 1997.
- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain, In stereotaxic coordinates, 4th Ed., San Diego, Academic Press, 1998.
- Geldmacher DS, Cost-effective recognition and diagnosis of dementia, Semin Neurol. Mar;22(1):63-70, 2002.
- 이근후 외 : 최신임상정신의학, 하나의학사, p.138, pp.216~228, 1988.
- Albert SM, Glied S, Andrews H, Stern Y, Mayeux R.: Primary care expenditures before the onset of Alzheimer's disease, Neurology, 59(4):573-8, 2002.
- Riley KP, Snowden DA, Markesbery WR.: Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study, Ann Neurol 51(5):567-77, 2002.
- Vesey R, Birrell JM, Bolton C, Chipperfield RS, Blackwell AD, Denning TR, Sahakian BJ.: Cholinergic nicotinic systems in Alzheimer's disease: prospects for pharmacological intervention, CNS Drugs. 16(7):485-500, 2002.
- Nordberg A, Hellstrom-Lindahl E, Lee M, Johnson M,

- Mousavi M, Hall R, Perry E, Bednar I, Court J.: Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease(APPsw), *J Neurochem.* 81(3):655-8, 2002.
27. Kuhl DE · Koeppe RA · Minoshima S · Snyder SE · Ficaró EP · Foster NL · Frey KA · Kilbourn MR : In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(4):691~699, 1999.
 28. 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.
 29. Sramek JJ · Frackiewicz EJ · Cutler NR : Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(10):2393~2402, 2000.
 30. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease. In *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. Dipiro JT et al. Ed., New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
 31. National Institute of Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1996.
 32. Zezang Gu, Juan Yu, J. Regino Perez-Polo. Long term changes in brain cholinergic markers and nerve growth factor levels after partial immunolesion. *Brain*, 1998.
 33. Levisohn CF, Isacson O. Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effect of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res.* 564(2). 230-244, 1991.
 34. Kaplan PW, Allen RP, Buchholz DW, Walters JK. A double-blind, placebo-controlled study of the treatment of periodic limb movements in sleep using carbidopa/levodopa and propoxyphene. *Sleep.* 16(8), 717-723, 1993.
 35. Lukaszewaka L. Scopolamine impairs object exploration but not habituation in rats. *Acta Neurobiol Exp(Warsz).* 53(1):243-250, 1993.
 36. Dawson GR, Iversen SD. The effects of novel cholinesterase inhibitor and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. *Behav Brain Res.* 57(2):143-153, 1993.
 37. Dennes RP, Barnes JC. Attenuation of scopolamine-induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non-cholinomimetic drugs using a novel task in the 12-arm radial maze. *Psychopharmacology(Berl).* 111(4), 435-441, 1993.
 38. 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*, 7(5):260-266, 1996.
 39. Lin L, Georgievska B, Mattsson A, Isacson O: Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation, *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(21):12108-13, 1999.
 40. Raskind MA · Sadowsky CH · Sigmund WR · Beitler PJ · Auster SB : Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 54(7):836-840, 1997.
 41. Rupniak NM · Tye SJ · Field MJ : 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.
 42. 정인철, 이상룡: 導痰益氣活血湯이 알츠하이머질환 病態 모델의 生化學的 變化 및 行動에 미치는 影響, 동서의생리병리학 회지 15(2): 269, 2001.
 43. Dunnett, S.B., Everitt, B.J, and Bobbins, T.W. The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci.* 14, 494-501, 1991.
 44. Baskys A : Metabotropic receptors and slow excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 15: 92-96, 1992.
 45. Yamasaki, R., Yamashita, M., Taguchi, K., Okada, M., and Ikeda, H. The role of two major cholinergic systems in memory acquisition and retention in the eight-arm radial maze. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 7, 173-181, 1992.
 46. 張介賓 : 張氏景岳全書, 翰成社, 서울, pp.610~611, 1978.
 47. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 甘地出版社, 台北, pp.222~225, 233~235, 1990.
 48. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 書苑堂, 서울, p.102, 1984.
 49. 陳士澤, 辨證錄, 의성당, 서울, pp. 223-42, 1989.
 50. 趙金鐸, 中醫症狀鑑別診斷學, 人民衛生出版社, 北京, pp. 73-4, 1987.
 51. 김세길: 건망의 원인, 치법, 치방에 대한 문헌적 고찰, 대한한 의학회지 1992 13(1): 218-20, 1992.