

釣鈎藤이 β APP 과발현 인간 신경아세포암에서의 항치매 효과에 관한 연구

김상호 · 강형원* · 유영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

Study of Repair Effect of Anti-Alzheimer on β APP Overexpression in Neuroblastoma cell line by Ramulus et Uncus Uncariae

Sang Ho Kim, Won Hyung Kang*, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Ramulus et Uncus Uncariae (JGD, 釣鈎藤) has sweet in flavour and slightly cold in property, acting on the liver and pericardium channels. This drug was described in a medical classic as having the ability to remove "heat", check hyperfunction of the liver and relieve dizziness, tremors, and convulsions, and subdue "endogenous wind". So this study was estimated to check the anti-neuropathological effect of JGD on the Alzheimer in β APP overexpression in neuroblastoma cell line and JGD extract was showed significantly anti-alzheimer effects (50 and 100 μ g/ml of JGD extracts) compared with control group. Ramulus et Uncus Uncariae has anti-alzheimer effects on the β APP overexpression in neuroblastoma cell line. So we expect that Ramulus et Uncus Uncariae may be used as a drug for neurodegenerative disease, such as stroke, Alzheimer's disease (AD). These results indicate that Ramulus et Uncus Uncariae possess strong inhibitory effect in the nervous system of apoptosis and repair effect against the degeneration of Neuroblastoma cells by β APP expression.

Key words : Ramulus et Uncus Uncariae(釣鈎藤), Alzheimer, β APP

서 론

明代 張¹⁾의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 처음으로記載된 癡呆는 보통 뇌의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 증후군(syndrome)이며, 이로 인해 기억·사고·지남력·이해·계산·학습능력·언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애가 있는 것을 말한다²⁾. 이 중 Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로²⁾, 그 원인에 대해서는 다양한 가설들이 있다^{3,4)}. AD의 대표적인 원인설로는 amyloid β protein ($A\beta$)이 중요한 원인적 인자로 알려져 있어, 이에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있다^{5,6)}. $A\beta$ 는 큰 분자량의 amyloid precursor protein (APP) 일부가 잘라져서 생성된 것인데^{7,8)}, APP가 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사과정에

의해서 잘라져서 $A\beta$ 를 만들어 내는지는 아직 전혀 모르고 있는 실정이지만, APP의 대뇌침착은 AD시 가장 처음 나타나는 특징적인 병리학적 소견으로 알려져 있다. 따라서 $A\beta$ 의 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 있다⁹⁻¹¹⁾. APP는 여러 isoforms로 이루어져 있는데, 이들에게는 APP751, APP770, APP695와 APP714가 있으며, 이 중 뇌에 분포하고 있는 형태는 주로 APP695로 알려져 있다¹²⁾. 釣鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 釣鈎 혹은 華鈎藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 썬서 乾燥한 藥材로서^{13,14)}, 甘·苦·微寒·無毒한 性味와 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하는 效能이 있어 小兒驚風, 頭昏目眩, 中風癱瘓 등의 諸症狀에 사용되어져 왔다¹³⁻¹⁵⁾. 최근 韓醫學에서도 癡呆에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 문헌적¹⁶⁻¹⁸⁾, 임상적 연구¹⁹⁻²²⁾ 외에 실험적 연구로 蝟²³⁾과 각종 한약재가 치매 실험동물에

* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포한방병원

E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2762

· 접수: 2002/07/22 · 수정: 2002/08/29 · 채택: 2002/09/24

있어 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 研究²⁴⁾, 행동 및 생화학적 변화에 대한 研究²⁵⁾, 그리고 염증성 뇌세포 활성물질에 대한 연구^{9, 26)}를 보고한 적이 있으나 β APP 과발현 인간 신경아세포암에서의 약물 연구는 아직 보고된 적이 없다. 이에 저자는 신경계 질환에 多用하는 釣鈎藤의 항치매 효과를 규명하기 위하여 하룻밤 배양한 β APP과발현 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포에서 치매와 동일한 신경세포의 細胞死 誘導에 대한 抑制 효과를 비교 관찰하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin /streptomycin, trypsin(Gibco BRL), Ethanol(Merck, Germany), anti-rabbit IgG, anti-rabbit IgG, 2차 항체인 FITC, Texas Red는 Santa cruse사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다. 본 實驗에 사용된 기기는 CO₂ incubator(VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), immunofluorescence microscope(Bio-Rad, USA), FACScan(Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2. 시료의 조제

釣鈎藤 수침액의 조제 : 본 實驗에 使用한 Ramulus et Uncus Uncariae (이상 JGD으로 명명, 釣鈎藤)은 원광대학교 한의과 대학 전주한방병원에서 75g 구입한 후 정선하여 약탕기에 적당량의 증류수(200cc)를 넣고 약 3시간 다려서 조제했다. 조제한 수침액은 濾過하여(약10g) 냉동건조한 다음 4℃에 보관하여 3차 증류수로 10 mg/ml 농도로 미리 조제하여 실험시 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 神經芽細胞癌 細胞株의 배양

본 실험에 사용된 신경아세포암은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받은 세포주인 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma에 β APP과발현 pCMV APP695를 반영구적으로 stable하게 계대배양시켜 10% RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask에 배양하면서 본 실험에 사용하였다.

4. 세포 형태학적 관찰

β APP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma의 細胞死를 抑制 하는지 조사하기 위해 5% RPMI medium, penicillin/streptomycin이 함유한 배지에 105 세포를 60 mm culture dish에 분주하고 37℃에서 24시간 배양하는데 JGD 50와 100 μ g/ml 농도로 각각 첨가하여 반응을 관찰하였다. 細胞死 관찰은 위상차 현미경의 200배율에서 細胞死가 誘導된 세포를 촬영하여 조사하였다. 그 결과로는 JGD 처리군에 細胞死가 抑制되는 농도를 선정하여 조사하였다.

5. DNA fragmentation 抑制效果 측정

β APP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma를 10⁵세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 JGD를 농도별로 DNA fragmentation를 誘導하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30 min간 얼음에 유지한 다음 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 상등액을 취해 100% 에탄올을 가해 침전시켜 이를 proteinase K(100 μ g/ml), RNase(50 μ g/ml)가 함유한 dH₂O 35 μ l를 첨가하여 부유시켜 50℃에서 30분간 열을 가한다. 이 용액을 2% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사한다.

6. 세포주기의 측정

β APP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma를 10⁵세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 약물군인 JGD(50, 100 μ g/ml)을 5시간 처리한 후 피비에스(phosphate-buffered saline:PBS)로 세척하고 trypsin을 처리하고 세포를 모아서 1.5ml eppendorf tube에 넣은 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 100% EtOH를 1ml 첨가하여 고정한다. 이때 propidium iodide 5 μ g/ml와 RNase를 혼합해서 준비하고 상기 고정된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 PBS로 한번 세척한다. 동시에 상기 고정된 DNA에 염색시약을 첨가하여 37℃에서 30분간 항온조에서 가온시킨 다음 propidium iodide로 염색한 세포는 호일에 밀봉하여 4℃에 보관하고 유세포 검색분석기(Flow cytometry analysis)를 실시하였는데 분석기기는 FACScan (Becton Dickson, CA)이다.

7. RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 분석

β APP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma의 細胞死 효과를 전사수준에서 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 6 well plate에 10⁵ 세포수가 되게 분주하고 적정 JGD 농도가 되도록 가한 다음 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNAzol 용액을 200 μ l를 첨가한 다음 chloroform 50 μ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4℃하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4℃에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 μ l를 넣고 60℃에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 μ l에 10 mM dNTP 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10x RNA PCR buffer 5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, AMV-Optimized Taq 1 μ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 μ l, 50 pM specific primer (sense/ antisense) 1 μ l, RNase free dH₂O 26 μ l를 첨가하여 50℃에서 20분간 역전사 반응을 실시하고, 94℃에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR(polymerase chain reaction)를 실시하였는데 반응조건은 94℃ 1min, 55℃ 45sec, 70℃ 60sec에서 35 cycles를 진행시켜 70℃에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 elute시켜 사이즈 마커를 기준으로 band유무를 확인하였다. 그

결과는 mRNA발현을 확인하여 전사 수준에서 저해효과를 분석하였다.

8. 면역세포화학 분석

βAPP과발현 세포주인 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma에서 단백질 발현의 抑制效果를 誘導하는지 조사하기 위해 상기 방법과 동일하게 한 후 세포를 methanol로 세포 위에 떨어뜨리고 고정시킨 다음 PBS로 세척을 실시하고 1차 항체를 표지하여 4℃에서 1시간정도 방치하고 2차 항체인 FITC와 Texas-Red를 표지하여 호일로 빛을 차광하여 이를 1시간정도 방치한 다음 이를 형광현미경에서 관찰하여 대조군과 鈎鈎藤 물추출물군과의 단백질이 발현되는 정도를 확인 관찰하여 보았다.

9. Western Blot

βAPP과발현 세포주인 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma에 대조군과 달리 JGD를 처리한 후 lysis buffer로 처리하여 그 추출액 20 μg을 polyacrylamide SDS gels에 용출한 후 Immobilon-P membrane (Amersham)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색시켜 확인하는데 antibody를 일차적으로 (Santa Cruz, 1:1,000 희석) 일차항체를 표지하고 PBS로 세척한 다음 blocking 용액을 첨가하여 부반응을 제거하고 이차항체인 Horseradish Peroxidase conjugates (HRP) 항체를 표지하고 발색정도를 확인하였다.

실험성적

1. 鈎鈎藤이 βAPP과발현 신경아세포암에서 細胞死 誘導 抑制의 형태학적 영향

神經細胞의 일차적인 현상으로 βAPP과발현에 의한 細胞死 誘導에 JGD의 細胞死 抑制를 조사하기 위해 먼저 형태학적인 변화를 관찰하였다. JGD를 각각 50, 100 μg/ml 농도로 해서 6 well에 10⁵ cell수로 분주하여 37℃에서 24시간 배양한 βAPP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포주에 첨가하여 위상차 현미경의 200배율에서 매시간 관찰한 바, 6시간 배양한 경우에 細胞死 誘導를 抑制하는 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다. 특히, JGD 농도가 증가함에 따라 細胞死 誘導를 뚜렷하게 抑制하는 것을 볼 수 있었다(Fig 1).

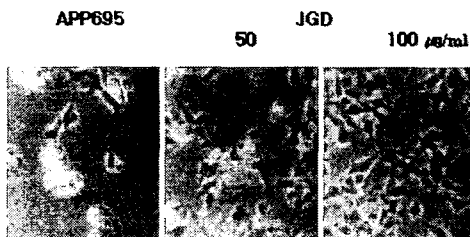
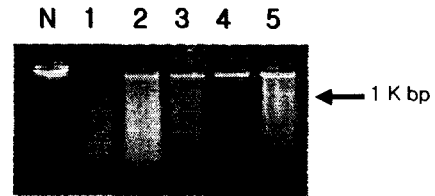


Fig. 1. Morphological pattern of apoptotic body from βAPP overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by Ramulus et Uncus Uncariae(JGD).

2. 鈎鈎藤이 βAPP과발현 신경아세포암의 DNA fragmentation 誘導 억제 효과

βAPP발현에 의한 신경세포의 細胞死는 형태학적 변화를 나타내기 전에 細胞死가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 일정한 크기별로 잘라져 일반적으로 200-400 염기쌍 (bp:base pair)만큼 존재하게 되는데, 결국 細胞死의 일차적인 과정은 세포핵에서 여러 과정의 細胞死 경로를 통과하게 된다. 따라서 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있기 때문에 JGD를 각각 50, 100 μg/ml 농도로 해서 6 well에 10⁵ cell수로 분주하여 하룻밤 배양한 βAPP과발현 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포에 첨가하여 細胞死를 誘導한다면 세포의 염색체에 자가효소에 의해 200-400bp가 출현되는지를 분석 할 필요가 있다. 그래서 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation을 조사하여 본 결과 대조군과 3일후, 5일후, 그리고 JGD의 50μg/ml 처리시 2% agarose gel의 lane에 보이지만 JGD의 100 μg/ml 처리시 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보이고 있다(Fig 2).



N: SK-N-SH cell line
 1: app695 overexpressed SK-N-SH cell
 2: app695 SK-N-SH cell after 3 days
 3: app695 SK-N-SH cell +JGD 50 μg/ml
 4: app695 SK-N-SH cell +JGD 100 μg/ml
 5: app695 SK-N-SH cell after 5 days

Fig. 2. DNA fragmentation pattern from βAPP overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by Ramulus et Uncus Uncariae(JGD).

3. 鈎鈎藤이 세포주기에 G0/G1단계에서 미치는 영향

細胞死가 誘導될 경우 세포주기에서 일차적으로 변화를 보이는데 보통 細胞死는 G0/G1 내지 G2/M의 arrest가 誘導되는 경우가 일반적인 현상이다. 따라서 βAPP에 의한 細胞死가 발생 시 세포주기의 특정단계에서 JGD가 미치는 영향을 알아보기 위해 βAPP과발현 신경아세포암의 細胞死를 誘導하여 細胞死를 抑制한다면 세포 증식에 영향을 주어서 세포 주기 단계에 미치는 영향을 분석 할 필요가 있다. 6 well에 미리 배양한 신경아세포암 세포에 JGD 최종농도가 50, 100μg/ml가 되도록 가한 다음 상기 실험방법에 언급한 것처럼 전처리를 하여 세포주기를 flow cytometry로 조사하여 본 결과 대조군 경우 G0/G1 단계에서는 75.7%, S단계는 3%이었으며 G2/M단계는 20.3%정도로 나타내었는데 반해 50 μg/ml 농도로 JGD처리시 G0/G1 단계에서는 63.7%, S단계는 13%이었으며 G2/M단계는 24.3%로 나타내었으며 100 μg/ml 농도로 JGD처리시 G0/G1 단계에서는 59.5%, S단계는 14.5%이었으며 G2/M단계는 26%로 나타내, JGD 처리 농도 의존적으로 G0/G1 단계는 감소한 반면, S단계는 점점 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

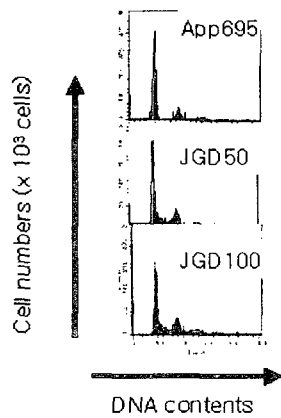


Fig. 3. Cell cycle pattern of flow cytometry from β APP overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by Ramulus et Uncus Uncariae(JGD).

4. 釣鈎藤이 mRNA발현에 미치는 영향

釣鈎藤이 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제이거나 전사 수준에서 조절하는지를 β APP과발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines 세포사에서 알아보기 위해 JGD를 처리하여 분석한 결과를 통해 APP와 세포사의 誘導物質인 caspase-3의 발현을 분석하였는데 세포의 전사수준에서 저해되는 것은 문제되지 않음을 나타내는 기준인 β -actin mRNA 발현 경우 모든 군에서 일정하게 발현되었다. APP695의 발현은 대조군에서는 발현되고 JGD처리군 경우에는 10 μ g/ml에서 발현이 되었으나 50, 100 μ g/ml에서는 발현이 억제됨을 알 수 있었고 caspase-3에서는 대조군은 β APP에 의해 신경세포의 세포사가 誘導되기 때문에 발현이 되지만 JGD처리군에서는 10, 50, 100 μ g/ml 농도 모두에서 억제되었다(Fig. 4).

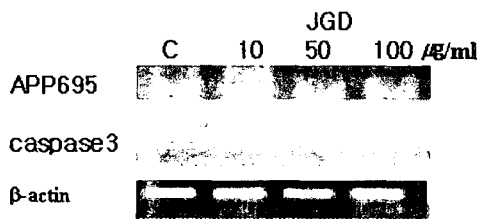


Fig. 4. RT-PCR analysis of total RNA from in the β APP overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by Ramulus et Uncus Uncariae(JGD). Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovin serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific for APP, caspase-3. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without JGD treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

5. 釣鈎藤이 단백질발현에 미치는 영향

β APP과발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines의 세포사를 釣鈎藤이 세포사를 억제하는지 면역세포화학분석법으로 관찰해보면 APP와 caspase-3 단백질의 발현을 억제하는 것을 관찰할 수 있는데 FITC를 표지하여 형광현미경에서 관찰한 바 APP 단백질의 발현이 대조군에서 노란색이 강하게 나타나는데 반해 JGD처리군 경우는 약하게 또는 거의 나타나지 않

아 발현을 억제되는 것을 관찰 할 수 있다(Fig. 5a). 그리고 세포사의 誘導物質인 caspase-3 단백질 경우는 대조군은 Texas Red의 빨강색상의 signal이 강하게 나타내는데 반해 JGD처리군은 약한 발현 signal를 나타내고 있음을 알 수 있다(Fig. 5b).

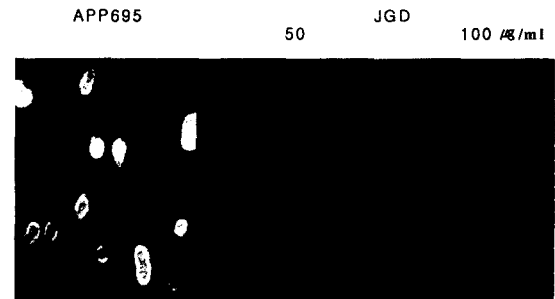


Fig. 5a. Immunocytochemistry staining for APP in Control(left), JGD(50:middle) and JGD(100:right)(a). Yellow color indicates staining in the APP overexpressed SK-N-SH neuroblastoma cell lines.

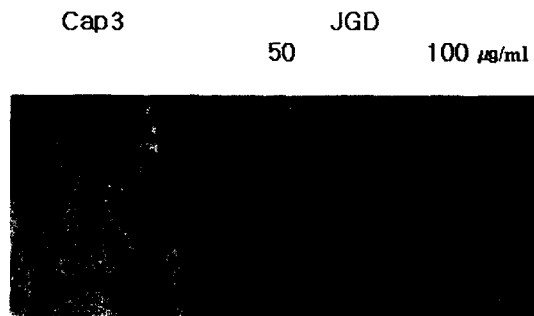


Fig. 5b. Immunocytochemistry staining for caspase-3 in Control (left), JGD 50(middle), JGD100(right)(b). RED color indicates staining in the β APP overexpressed SK-N-SH neuroblastoma cell line.

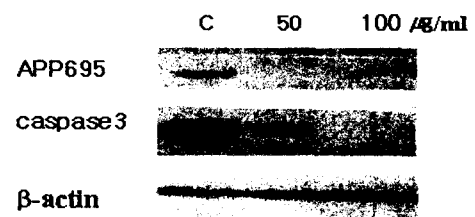


Fig 6. Influence of JGD extract on APP and caspase-3 expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for APP, caspase-3 and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

6. Western Blot을 통한 단백질 발현 억제

지금까지의 JGD처리군이 세포내 단백질의 발현과 작용을 분석하기 위해 50, 100 μ g/ml을 처리한 세포 추출액 20 μ g을 12% polyacrylamide SDS gels에 용출한 후 Immobilon-P membrane (Amersham)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인한 바 APP는 50 μ g/ml부터 발현을 강하게 억제하는 것을 알 수 있었다. caspase-3는 100 μ g/ml에서 발현이 억제되는 것을 확인되었다. 한편 세포내 표준 단백질인 β -actin(Santa Cruz, 1:1,000 희석)

단백질은 이차항체인 Horseradish Peroxidase conjugates (HRP) 항체를 표지하고 발색정도를 확인한 경우는 모든 실험군에서 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 뇌 질환과 같은 병적인 노화로 인한 뇌 증후군으로²⁾ 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 뇌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^{2, 3)}. AD를 유발하는 원인으로는 A β , estrogen, apolipoprotein E(Apo E), presenilin, Oxidants (hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며²⁷⁾, 이 중 A β 의 침적으로 생기는 축색반(neuritic plaques)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이므로^{3, 8)} NFTs와 neuritic plaques는 AD의 지표로 인식되고 있다⁹⁾. NFTs와 neuritic plaques는 정상 뇌에도 존재하며 나이가 많아짐에 따라 그 수가 증가하나 AD의 경우 뇌의 기억과 인지를 담당하는 부위에 상당히 많이 증가하여 신경전달을 방해하게되고 부교감신경과 뇌의 다른 신경전달경로를 파괴하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이에 따라 acetylcholine, serotonin, noradrenaline, dopamine, glutamate, substance P 등의 많은 신경전달물질이 크게 감소하게 되고, 이 중 acetylcholine의 결핍은 가장 중요한 현상이며 이것을 회복시키는 것이 현재까지의 주 치료목표의 하나가 되어 왔다. 痴呆의 원인은 여러 가설이 있으나 AD시 나타나는 특징적인 병리학적 소견으로는, APP가 대뇌에 침착되는 것이 가장 먼저 나타난다고 알려져 있다¹²⁾. 결국은 A β 원인설에서 시작하여 현재까지 대두되고 있는 어떤 인자와 결부되어 진행되는나 중요시되고 있으며 무엇보다도 α , β , γ -secretase에 의해 최종적인 산물이 결국은 신경세포의 細胞死를 誘導하기 때문에 간이나 뇌조직에서 ApoE4의 돌연변이로 인한 산물이 β APP의 원시물질에서 β APP의 과발현시키는 단계로 진행되고 동시에 α , β , γ -secretase에 의해 최종산물이 생성되어 신경독성을 야기하여 細胞死를 誘導하는 것으로 알려져 있다^{10, 11)}. 따라서 촉발인자를 무시하더라도 치매의 진행단계에 β APP의 과발현을 誘導하게 되면 신경세포의 파괴를 유도할 수 있어 본 실험에서 β APP 과발현 신경아세포암 세포주를 이용하여 약물의 항치매효과를 알아보게 되었다. 최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있는데 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구²⁷⁾, 뇌의 노화와 연계하여 노화를 유발하는 항산화작용에 대한 연구²⁸⁾, 白鼠의 記憶와 行動에 미치는 영향에 대한 연구²⁴⁾, 白鼠의 행동과 생화학적 변화에 대한 연구²⁵⁾, 그리고 姜 등^{9, 10, 26)}이 중추신경계의 항염증작용에 관한 연구^{9, 26)}를 보고한 적이 있으나 치매의 대

표적이 원인설이 A β 침착을 유발한 β APP 과발현 인간 신경아세포암에서의 약물의 항치매효과에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없다. 釣鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 釣鈎 혹은 華鈎藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 썰서 乾燥한 藥材로서 性味甘·苦·微寒·無毒하고 效能이 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩, 中風癱瘓 등의 諸症狀에 사용되어 왔다¹³⁻¹⁵⁾. 釣鈎藤의 주요 성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxyindole계 alkaloid 類, 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3- α -dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인되었고, 생리활성의 研究로는 alkaloid 성분의 혈압강하 혹은 혈압확장 작용에 관한 것이 多數 보고^{29, 30)}되었다. 그 외 김 등^{31, 32)}은 釣鈎藤이 신경계통의 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣 作用이, 李³³⁾는 釣鈎藤의 phospholipase Cy1 저해 성분과 그 항암 효과에 대해 보고한 바가 있으나, 항치매효과에 관한 研究는 아직 수행된 바가 없다. 이에 저자는 임상에서 신경계질환에 多用하는 釣鈎藤의 항치매효과를 규명하기 위하여 하룻밤 배양한 β APP과발현 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포에서 신경세포의 細胞死 誘導의 抑制效果에 대한 형태학적인 변화, DNA fragmentation, 세포주기의 분석, RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 분석, 면역세포화학 분석 및 Western Blot를 통한 단백질 발현 抑制를 측정하였다. 먼저 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 β APP과발현 세포주 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포주에 JGD를 첨가하여 6시간 배양한 후 신경세포의 細胞死를 매시간 관찰하였다. JGD의 농도가 증가함에 따라 細胞死 誘導를 뚜렷하게 抑制시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이는 釣鈎藤에 세포 증식과 세포 모양을 抑制시키는 성분들이 함유되어 있을 것으로 예측되어진다. 痴呆는 신경세포가 어떤 원인으로 細胞死가 발생하기 때문에 일어나는 신경계의 퇴행화의 일부분으로 보통 신경세포의 細胞死는 운동신경 및 감각신경의 장애를 초래하는데 치매에 의한 신경세포의 細胞死는 곧 언어장애와 운동장애로 심각한 생활에 장애를 초래한다. 세포핵에서의 변화를 관찰하기 위해 하룻밤 배양한 β APP과발현 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포에 JGD를 각각 50, 100 μ g/ml 농도로 첨가하여 DNA fragmentation을 조사하여 본 결과 대조군 경우 2% agarose gel의 lane에 보이지만 JGD의 100 μ g/ml 처리시 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보여 JGD가 β APP과발현 신경아세포암의 細胞死를 抑制한다고 사료된다(Fig. 2). β APP발현에 의한 신경세포의 細胞死는 형태학적 변화를 나타내기 전에 細胞死가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 일정한 크기별로 잘라지게 되는 일반적으로 200-400 bp만큼 존재하게 되는데 결국 細胞死의 일차적인 과정은 세포핵에서 여러 과정의 細胞死 경로를 통과하게 된다. β APP에 의한 細胞死가 발생시 세포주기의 특정단계에서 釣鈎藤이 미치는 영향을 알아보기 위해 β APP과발현 신경아세포암의 細胞死를 誘導하여 세포주기를 flow cytometry로 조사하여 본 결과 대조군 경우 G0/G1 단계에서는 75.7%, S단계는 3%이었으며 G2/M단계는 20.3%정도로 나타내었는데 반해 JGD 50 μ g/ml

농도처리시 G0/G1 단계에서는 63.7%, S단계는 13%이었으며 G2/M단계는 24.3%로 나타났으며 JGD 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도처리시 G0/G1 단계에서는 59.5%, S단계는 14.5%이었으며 G2/M단계는 26%로 나타나 JGD 처리 농도에 따라 G0/G1 단계는 감소하고 S 단계는 점점 증가한 것으로 나타났다. 이는 JGD처리군에서 β APP 과발현 신경아세포암 細胞死의 抑制 원인이 G0/G1 단계에서 세포주기의 진행을 誘導하여 세포 증식을 촉진하기 때문인 것으로 사료된다(Fig. 3). 다음은 釣鈎藤이 細胞死에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제이거나 전사 수준에서 조절하는지를 알아보기 위해 APP와 細胞死의 誘導物質인 caspase-3의 발현을 통해 분석하였는데, 세포의 전사수준에서 저해되는 것은 문제되지 않음을 나타내는 기준인 β -actin mRNA 발현 경우 모든 군에서 일정하게 발현되었다. APP695의 발현은 대조군과 JGD 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서 발현이 되었으나 JGD 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 발현이 抑制됨을 알 수 있었고 caspase-3에서는 대조군은 β APP에 의해 신경세포의 細胞死가 誘導되기 때문에 발현이 되지만 JGD 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 모두에서 抑制되었다(Fig. 4). 이는 본 약물이 신경세포의 細胞死가 발생하는 양상을 抑制하여 신경세포의 파괴를 조절하는 유효성분을 함유하고 있는 것으로 사료된다. caspase들은 평상시 apoptosis를 억제하고 있는 단백질들을 분해하여 apoptosis를 진행시키는 역할을 하는 것으로 특히, caspase-3가 활성화되면 세포내의 여러 종류의 단백질을 절단한다. β APP과발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines의 細胞死를 釣鈎藤이 細胞死를 抑制하는지 면역세포화학분석법으로 관찰해보면 APP와 caspase-3 단백질의 발현을 抑制하는 것을 관찰할 수 있는데 FITC를 표지하여 형광현미경에서 관찰한 바 APP 단백질의 발현이 대조군에서 강하게 나타내는데 반해 JGD 처리군 경우는 약하게 또는 거의 발현이 抑制됨이 관찰되어진다(Fig. 5a). 그리고 caspase-3 단백질의 경우는 대조군은 Texas Red의 빨강색상의 signal이 강하게 나타내는데 반해 JGD 처리군은 약한 발현 signal을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5b). 이는 본 JGD 처리군이 APP와 caspase-3 단백질의 발현을 抑制하므로 신경세포의 증식을 誘導한다고 사료된다. 지금까지의 JGD 처리군이 세포내 단백질의 발현과 작용을 분석하기 위해 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 세포 추출액 20 μg 을 12% polyacrylamide SDS gels에 용출한 후 Immobilon-P membrane(Amersham)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인한 바 APP는 JGD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 발현을 강하게 抑制하는 것을 알 수 있었고, caspase-3는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 발현이 抑制되는 것이 확인되었다. 한편 세포내 표준 단백질인 β -actin 단백질은 이 차항체인 HRP 항체를 표지하고 발색정도를 확인한 경우는 모든 실험군에서 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 따라서 결국 JGD 처리군은 細胞死를 誘導하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성 과정을 抑制함으로써 신경세포의 파괴를 보호하는 방어작용을 誘導하는 성분이 있음이 시사되어지며 β APP에 의한 신경 세포의 細胞死를 유의성 있게 抑制하므로 치매치료에 적용할 수 있으리라 사료되어진다. 이상의 결과를 종합해 보면 釣鈎藤이 β APP 과발현 신경아세포암 세포주에서 細胞死 誘導에 대한 抑制 효과가

형태학적으로 뿐만 아니라 유전적 및 면역 세포화학적으로 그리고 세포주기에서 뚜렷하게 확인되어 향후 지속적인 연구를 통하여 釣鈎藤의 효능 약리 기전과 AD에 대한 분자생물학적인 접근으로 원 인규명과 치료제 개발에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

β APP 과발현 신경아세포암 세포주를 이용한 釣鈎藤의 추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 細胞死 誘導에 대한 抑制 효과를 규명하기 위하여 實驗한 결과, 釣鈎藤(JGD)이 β APP과발현에 의한 신경세포 細胞死 誘導를 형태학적으로 抑制시켰고, β APP에 의한 신경아세포암 세포주로 부터 DNA fragmentation의 誘導 抑制 효과는 釣鈎藤의 농도 의존적으로 감소했다. 또 癱呆의 원인인자인 신경세포의 β APP발현을 통한 신경세포의 細胞死 시기는 G0/G1 단계를 통해 일어났으며, 釣鈎藤(JGD)은 caspase-3의 발현을 抑制하여 신경세포의 생존을 誘導하므로 細胞死의 진행을 보호하는 역할을 수행하리라 사료된다.

이상과 같이 釣鈎藤(JGD)이 β APP 과발현 신경아세포암 세포주에서 細胞死 誘導에 대한 뚜렷한 抑制 효과를 보여 $A\beta$ 침착에 따른 뇌의 퇴행성 변화를 지연시킬 수 있을 것으로 추정되며, 향후 釣鈎藤을 이용하여 癱呆 원인 인자를 연결한 지속적인 분자생물학적인 研究를 시행하여 AD 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 접목 可能할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, pp.573-578, 1985.
2. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
3. 김지혁·황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327-330, 663-664, 1992.
4. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky : Alzheimer's Disease In Pharmacotherapy; a pathophysiologic approach, Dipiro J. T. et al. Ed., New York; Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
5. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P : Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities, Brain Res, 593(2):299-303, 1992.
6. Dickson D. W., Ksiazek-Reding H, Liu WK Davies P, Crowe A, Yen S. H. : 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 (Berl), 84(6):596-605, 1992.
7. Baddeley A. D., Bressi S., Della Sala S., Logie R., Spinnler

- H.: The decline of working memory in Alzheimer's disease, A longitudinal study. *Brain*, 114(Pt 6):2521-2542, 1991.
8. Reznik-Wolf H., Machado J., Haroutuian V., DeMacro L., Walter G. F., Goldman B., Davidson M., Johnston J. A., Lannfelt L., Dani S. U., Friedman E. : Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain, *J Neurogenet*, 12(1):55-65, 1998.
 9. 황시영 · 강형원 · 유영수 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 관한 研究, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 10(1):95-108, 1999.
 10. Soriano S, Lu DC, Chandra S, Pietrzik CU, Koo EH. : The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases, *Biol Chem*, Aug 3;276(31):29045-50, 2001.
 11. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH. : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity, *FASEB J*, Aug;14(11):1508-17, 2000.
 12. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron*, 10:243-254, 1993.
 13. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.658-659, 1986.
 14. 李盛雨 · 盧昇鉉 : 鈞鉤藤에 관한 文獻的 研究, 大韓韓醫學會誌 第8卷第1號 附錄 本草分科學會誌 2(1): 53-58, 1987.
 15. 明 · 李時珍 : 本草綱目 第二冊, 北京, 人民衛生出版社, pp. 1319-1320, 1977.
 16. 金賢兒 : 老人性 痴呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 大韓韓方內科學會誌, 13(2): 57-68, 1992.
 17. 鄭仁哲 · 李相龍 : 痴呆에 對한 文獻的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):77-94, 1996.
 18. 李東垣外 : 痴呆에 關한 東西醫學的 比較 考察, 서울, 大韓韓方內科學會誌, 16(1):2-5, 11, 14, 1995.
 19. 裴旼星 : 老人性 痴呆에 關한 體質醫學的 研究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 13(2): 101-106, 1992.
 20. 나창수 외 : 痴呆에 關한 최근의 연구 동향, 서울, 大韓韓方內科學會誌, 19(1):291-317, 1998.
 21. 현경철 · 김종우 · 황의완 : Vascular Dementia에 關한 한의학 적 임상연구, 서울, 동의신경정신과학회지, 10(1):147-158, 1999.
 22. 황의완 외 : 痴呆에 對한 韓醫學的 臨床研究, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996.
 23. 서정렬 : 침구자극이 痴呆와 關連된 melatonin 분비와 SOD 합성에 미치는 영향, 익산, 원광대 대학원, 1997.
 24. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 10(1):1-16, 1999.
 25. 최병만 · 이상룡 : 익정지황탕이 痴呆병태모델에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 11(2):23-42, 2000.
 26. 강형원 · 유영수 : 天門冬에 의한 腦神經細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 9(1):73-82, 1998.
 27. Olson JM, Goddard KA, Dudek DM. : The Amyloid Precursor Protein Locus and Very-Late-Onset Alzheimer Disease. *Am J Hum Genet*. Aug 7, 2001.
 28. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구, 釜山, 釜山大學校 藥學研究誌, 29(2):49-56, 1995.
 29. K. Endo, Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Kodhihara, H. Hikino, *J. Med. Plant Research*, 49, 188, 1983.
 30. J. D. Phillipson, S. R. Hemingway, *Lloydia*, 41(6), 503, 1978.
 31. 김동영 : 조구등(鈞鉤藤) 성분의 항경련 효과 I :에틸아세테이트 분획의 항경련 효과, 생약학회지, 104:53-57, 1996.
 32. 김동영 : 조구등 추출물의 항경련 효과 기전 및 활성성분의 분리, 경성대 대학원 학위논문(박사), 1998.
 33. 이지숙 : 조구등의 phospholipase C γ 1 저해 성분과 그 항암 효과, 서울대 대학원 학위논문(박사), 1998.