

가미신선불로단이 알츠하이머병 진단지표인 아밀로이드 단백질독성과 APP_r에 미치는 영향

엄현섭*

동의대학교 한의과대학

Effects of KSM on the Cytotoxicity of Amyloid β Protein and the APP's Molecular Weight

Hyun Sup Eom*

Department of Oriental Medicine, Donggeui University

In order to evaluate the neuroprotective effects of Kamisinsunbulo-dan(KSM), the cytotoxicity of amyloid β and the recovering effect of KSM were checked at first. Then the viability of C6 cells was tested in comparison with each concentration of KSM. The cytotoxicity of amyloid β (31-35) showed from 5 μ M higher to 100 μ M. And the recovering effect by KSM showed significantly at 100 μ g/ml concentration. And the cell viability was shown significantly over 200 μ g/ml of KSM. This is thought that the viability has some relation to length of culturing duration, 6 to 12 hrs. Lastly in the western blotting of APP, the amount of low molecule's APP was decreased. So the APP form ratio(APP_r) changed to increase, and it meant that KSM can be used to lower the toxic APP, and can be a candidate for Alzheimer's disease.

Key words : Kamisinsunbulo-dan, APP form ratio(APP_r), Alzheimer's disease, Amyloid β

서론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 기본적으로 신경계의 퇴행성 변화로 인한 장애로서 세계적으로 발병자가 계속 증가하고 있다. 다시 말하면 AD는 선택적인 신경세포의 사멸과 함께 대뇌가 퇴화되는 것인데 신경세포는 두 가지의 특징적인 병변을 보여준다. 하나는 세포 안에 생기는 신경섬유의 농축(intracellular neurofibrillary tangles, NFTs)이고 또 하나는 세포 주변에서의 아밀로이드 축적(senile plaques)이다¹⁾.

이러한 특징에도 불구하고 AD의 발병에 이르기까지는 많은 변수가 존재하고 기전도 아직 분명하게 밝혀지지 않았지만 연령과 유전적 경향성 및 여기에 영향을 끼치는 내부 환경적 요인들이 AD로의 진전에 많은 역할을 할 것으로 보인다²⁾. 그런데 신경독성을 나타내는 아밀로이드 단백질의 축적은 아밀로이드 전구

단백질(amyloid precursor protein)의 용해과정(proteolysis)에서 유래된 amyloid beta(A β)가 중추신경계, 특히 뇌의 해마(hippocampus)와 대뇌피질에 과잉하게 응집되어 나타나는 것이며³⁾ 바로 이것이 염증반응을 촉진하고 신경세포의 사멸과 인지 기능의 감소를 가져오는⁴⁾ 주범으로서 AD의 본태가 된다.

치매를 포함한 노인성질환에 유용하게 활용되는 가미신선불로단(KSM)을 가지고 지난 연구에서는 특히 해마 신경세포에서의 acetylcholine과 관련된 실험지표(AChE, ChAT)에 미치는 영향을 관찰한 바 있다. 이 실험에서 신경전달을 촉진하는 유의한 효과가 나왔으므로 가미신선불로단이 인지 기능 개선에 긍정적인 작용을 한다는 것을 검증하였다. 그렇지만 알츠하이머병의 신경해부학적인 병리본질인 amyloid beta의 과잉축적에 대해서도 유의성이 있어야만 처방의 효능이 더욱 공고해질 수 있다.

더구나 초기에 시작되는 가족성 AD(early-onset familial Alzheimer's disease)는 APP와 PS(presenilin)-1, PS-2의 착인성 변이(missense mutation)에 의해 유발되는 것으로 알려져 있는데¹⁾ 따라서 amyloid β 도 APP의 유도체이므로 매우 중요한 marker

* 교신저자 : 엄현섭, 부산광역시 진구 양정2동 신45-1, 동의대학교 한의과대학
 · E-mail : hseom@deu.ac.kr · Tel : 051-850-8644
 · 접수 : 2003/10/04 · 수정 : 2003/11/14 · 채택 : 2004/01/06

라 할 수 있다. 또한 현재의 치매에 관한 의학임상에서 biomarker로서 APPr이 주목되고 있는데⁵⁾ 이러한 점들에 착안하여 우선 KSM이 APP의 분자구조변화에 미치는 영향 및 amyloid β에 대해 미치는 효과를 관찰하고자 한다. 이 실험은 초보적인 세포독성과 생존률 등에 대한 관찰이며 임상적 의미를 지니는 APPr을 평가하기 위한 기본적인 실험이다. 따라서 이 결과들은 앞으로 Tau protein 및 PS gene 등에 대한 분자생물학적인 연구를 통하여 효능검증을 지속하기 위한 자료로써 사용될 것이다.

재료 및 방법

1. 약재

실험에 사용된 약재는 광명제약(주)에서 구입한 규격 한약품을 정선하여 사용하였으며 가미신선불로단 처방내용과 용량은 다음과 같다⁶⁾.

Table 1. Prescription of Kamisinsunbulo-dan(KSM)

한약명	생약명	용량(g)
인삼	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
당귀	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	4.0
속지황	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4.0
토사자	<i>Cuscutae Semen</i>	4.0
두충	<i>Cortex Eucommiae</i>	3.0
우슬	<i>Radix Achyranthis</i>	2.0
파극	<i>Radix Morindae</i>	2.0
석창포	<i>Rhizoma Acori graminei</i>	2.0
구기자	<i>Lycii Fructus</i>	2.0
원지	<i>Radix Polygalae</i>	2.0
지골피	<i>Cortex Lycii Radicis</i>	2.0
백복신	<i>Poria</i>	2.0
Total Amount		33.0

2. 검액의 조제

가미신선불로단은 10첩 분량 330g을 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 첨가하여 물로 풀었다. 이 여과액을 rotary vaccum evaporator를 이용하여 감압 농축하고 이 농축액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하였다가 24시간 동안 freeze dryer로 동결건조하여 분말을 얻었으며 이를 적당히 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 재료 및 세포배양

본 실험에 사용한 amyloid β-protein fragment 31-35는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이를 1 mM의 농도로 5% acetic acid에 용해하여 -20 °C에 보관하였고, 처리 전 녹여 사용하였다. 실험에 사용한 C6 (rat glial) 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위하여 90%의 DMEM배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRA, Grand Island, NY, USA)과 1%의 Antibiotic-Antimycotic(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 등이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. 세포주는 37℃, 5% CO₂ 조건하에

서 배양하였으며, 배지는 매 48시간 마다 교환해 주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid(Trypsine-EDTA, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 T-75 flask(Nunc, Denmark)로 옮겨 배양하였다.

4. 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 세포를 0.75 × 10⁵ 개/ml 로 분주하여 24 시간동안 안정화시킨 다음 배지를 99.5% DMEM과 0.5% 우태아혈청과 1% antibiotic-antimycotic을 포함한 배지로 바꾸어 다시 24 시간 배양한다. 이후 KSM을 농도별로 전처리한 3시간 후에 다시 amyloid β-protein fragment 31-35를 처리하여 6시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동카메라용 필름을 이용하여 사진 촬영하였다.

5. Hemocytometer를 이용한 세포 생존률의 측정

세포배양용 6 well plate에 C6세포를 0.75 × 10⁵ 개/ml로 분주하고 24시간동안 안정화시킨 다음 KSM을 처리한 3시간 후에 다시 amyloid β-protein fragment 31-35를 처리하여 12시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 PBS를 가하여 세포를 모은 다음 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 1 ml 가하여 충분히 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue(Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 동량으로 섞어 2분간 처리하였다. Pasteur pippette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hemocytometer로 옮긴 후 위상차 현미경을 이용, 200배의 배율로 관찰하였다.

6. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

Amyloid β protein fragment 31-35와 KSM이 처리된 배지에서 각각 자란 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액은 단백질 정량하여 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane(Scheicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 단백질을 이동시킨 후 10% skim milk를 함유한 TBST(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 넣어 상온에서 1시간 정도 반응시킨 후 TBST로 5분간 3번 세척하였다. 다음은 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 TBST로 다시 세척한 다음 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨다. 그 후 TBST로 5분간 3번 세척한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질을 분석하였다.

실험 결과

1. Amyloid β에 의한 세포독성

Amyloid β 31-35에 의한 C6 세포의 독성손상 정도는 다음 Fig. 1과 같다.

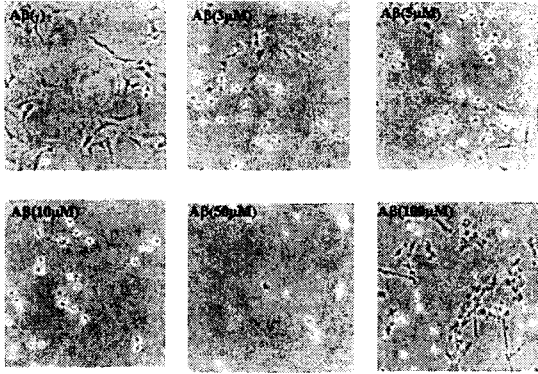


Fig. 1. Morphological changes in C6 cells following incubation with amyloid β-protein fragment 31-35. Cells were treated with amyloid β-protein fragment 31-35 for indicated concentrations for 6 h and were photographed by microscope (× 200).

2. KSM에 의한 세포독성의 회복효과

Amyloid β에 의해 손상된 세포의 KSM에 의한 회복능력을 평가하기 위하여 손상 후 6시간을 배양한 다음 관찰하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.

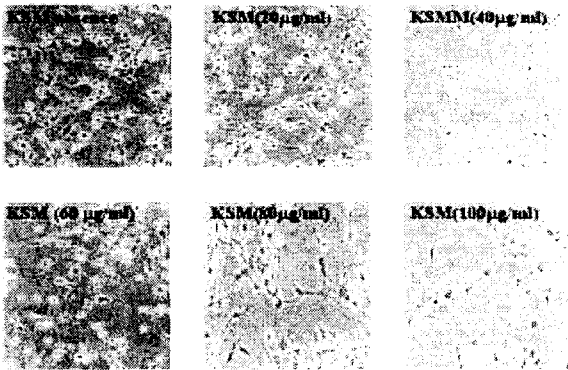


Fig. 2. Influence of the KSM on the amyloid β-protein fragment 31-35. After cells were treated with each indicated KSM concentration for 3 hrs and were treated with amyloid β-protein fragment 31-35. Pictures were then taken under a phase-contrast microscope at 200 × magnification.

3. KSM에 의한 세포생존을 측정

KSM에 의한 C6 cell의 생존개체를 계수하기 위해 손상 후 12시간을 배양한 다음 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

4. KSM이 APP분자량 변화에 미치는 효과

APP의 분자량 차이에 의한 임상적 치매진단기준의 부합성 여부를 평가하기 위한 22C11 항체를 이용한 western blotting 결과는 Fig. 4와 같다.

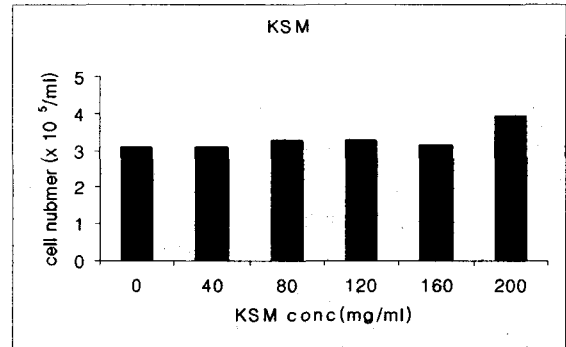


Fig. 3. Cell viability by KSM in C6 cells. Cell were seeded as described in Material and Methods, and hemocytometer count was performed after amyloid β-protein fragment 31-35 treatment for 12 h.

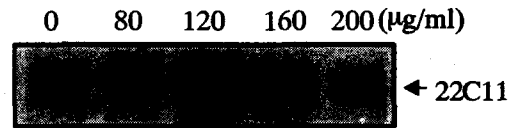


Fig. 4. Effect of KSM on the change of molecular weight of APP in C6 cell. After 3 hours since KSM is pretreated, the C6 cells were treated with 5 μM β amyloid. And then they are cultured for 12 hours and observed using immunoblotting method.

고 찰

APP는 흔히 존재하는 세포막의 당단백질(expressed type 1 membrane glycoprotein)의 일종이며 염색체 21번의 q21에서 코딩된다⁷⁾. APP는 exon에 따라 여러 가지의 isoform 들이 있는데⁸⁾ amyloid β는 16번과 17번 exon부분에 의해 코딩되는 단백질 영역에서 유래된다¹⁾.

거대분자인 APP단백질이 분해되는 과정은 세포막 밖에서 α-secretase와 β-secretase에 의해 각각 soluble N-terminal fragment인 sAPPα와 sAPPβ가 나누어지고 세포내에서는 각각으로부터 다시 분자량 10kDa과 12kDa의 membrane-bound C-terminal fragment인 C83과 C99이 나누어지며 이는 γ-secretase에 의해 C83으로부터는 p3 peptide가 유리되고 C99로부터는 amyloid β가 유리된다. 그렇지만 이 amyloid β는 치매 환자뿐만 아니라 건강인의 전 생애에 걸쳐 뇌척수액과 혈장에 골고루 나타나⁹⁾는 것으로 보아 이들은 정상적인 용해성 세포대사 산물⁹⁾¹⁰⁾이며 공히 병원성을 갖지 않는다.

그런데 amyloid β에는 섬유상 구조인 fibril과 액상의 oligomer가 존재하는데 전에는 주로 amyloid fibril이 응집되어 AD를 만드는 주원인으로 여겨졌지만 최근에는 soluble oligomer가 fibril을 만드는 전구체이며 신경퇴화와 치매에 이르게 하는 독성도 fibril보다 10배 이상 크고 응집되지 않은 fibril 보다는 40배 이상 크다는 사실이 밝혀졌다¹¹⁾. 또한 Aβ(1-40)는 대개 응집(aggregation)을 형성하지 않는 monomer에 우세하게 존재하며 응집을 형성하는 단백질은 Aβ(1-42)이며 신경세포 사멸을 일으키는 주범임도 또한 밝혀졌다¹⁰⁾¹²⁾. 따라서 현재 일반적으로 Aβ가 여러 분자량을 가진 제품이 실험용으로 개발되어 있지만 향후

반드시 Aβ(1-42) 제품을 사용하는 것이 실험의 실패를 줄이는 지름길임을 알 수 있다.

APP은 치매진단기준으로서 MMSE가 있긴 하지만 확실한 치매진단기준이 개발되지 않는 가운데 APP와 치매의 관련성은 있으나 amyloid β의 독성논란은 지속되는 중에 제시된 임상적인 진단방안의 하나로 생각된다. 즉 Borroni 등¹³⁾은 Alzheimer 환자의 APP이 정상인의 그것보다 감소하는 경향이 있다는 점에 착안하여 혈소판에서 검출한 APP 분자량의 비율(form ratio, APPr)을 구하고 그 차이로써 구분하였다. 그 결과 혈소판 APPr(p<0.0001)을 통하여 MMSE(p<0.001)보다 임상적 유의성이 더 크다고 발표하였다.

APP이란 인체의 혈소판(platelet)에는 분자량이 130, 110, 106kDa으로 각기 다른 3가지 종류의 APP가 있는데 이 중 분자량이 큰 것(130)을 분자로 하고 작은 것(106, 110)을 분모로 했을 때의 비율(APP form ratio)을 말한다. 그런데 Alzheimer 환자는 130kDa과 110-106kDa의 비율이 정상인보다 더 현저하게 내려가는 것을 알 수 있다. 이는 다시 말하면 저분자 구조의 APP가 AD 환자에게는 정상인보다 늘어나고 고분자 APP가 적게 존재한다는 것을 의미한다¹⁴⁾¹⁵⁾.

22C11은 이러한 3가지의 APP에 모두 반응하는 항체로서 고저 분자량의 비율을 평가하는데 사용되었다. 즉 Borroni B의 방법에 따라 western blot에 나타난 해당 분자량 대역의 피농도를 시각적으로 평가(optical density)하였다.

본 논문에서는 이상의 사실들에 근거하여 amyloid β의 신경세포독성을 KSM이 어느 만큼이나 회복시키는 지를 평가하고 세포생존률과 APPr의 양상을 관찰하였다.

우선 본 실험에서 amyloid β는 31-35까지를 사용하였는데 이것이 세포독성을 나타내는 가를 관찰하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 amyloid β의 농도가 높아짐에 따라 점차 세포밀도가 감소하면서 사멸하는 비율이 눈에 띄게 증가하였다. 그리고 5 μM을 넘어서부터는 세포와 핵이 거의 죽어있는 상태인데 이는 본 실험에 사용된 amyloid β가 명백한 세포독성을 가짐을 보여 준다. Fig. 2에서는 KSM의 예방효과를 보여주기 위하여 amyloid β를 처리하기 3시간 전에 KSM을 전처리하고 6시간이 경과한 즈음의 독성 회복효과 정도를 관찰한 것인데 60 μg/ml까지는 거의 변화가 없지만 80 μg/ml에서 약간 개선되고 100 μg/ml에서 대조군(0 μg/ml)에 비해 좀 더 독성손상을 회복시킨 것을 볼 수 있다. 따라서 예방을 위해 적어도 80~100 μg/ml이상의 약물 농도가 유지되어야 함을 알 수 있다. Fig. 3에서는 세포 생존률을 살펴보기 위하여 KSM을 전처리한 3시간 후 12시간의 장시간 배양을 하고 나서 세포수를 센 것인데 적어도 200 μg/ml농도를 넘어서야 비로소 생존개체수가 늘어난다는 것을 알 수 있다. 이는 지속시간이 경과함에 따라 KSM의 농도가 줄어들면서 생존효과도 따라서 감소하며 그만큼 약물농도가 늘어나든지 아니면 고농도가 되어야 한다는 사실을 알 수 있다. Fig. 4는 분자량이 다른 세 종류의 APP에 모두 반응하는 monoclonal antibody인 22C11을 이용하여 APP의 분자량을 비교한 것이다. 그림으로부터 KSM이 0~160 μg/ml 사이에서는 대조군과 별 차이가 없으나

200 μg/ml에서는 저분자량 APP가 떨어지면서 상대적으로 적게 발현되었음을 알 수 있다. 반면에 130 μg/ml에서의 변화는 모든 농도에서 특별한 변화가 나타나지 않았다.

따라서 APPr의 분모가 적어지므로 계수가 높아졌다는 것은 치매의 확률을 낮춰준 결과로 해석된다. 결론적으로 이상의 실험을 통하여 KSM은 뇌신경 퇴화와 치매를 일으키는 독성 amyloid β에 대한 예방효과를 비롯하여 독성 단백질의 전구체인 APP의 분자구조형성에 유리한 작용을 미친다는 것을 알 수 있었다.

결론

가미신선불로단이 amyloid β의 신경세포독성에 대한 회복을 평가하고 세포생존률과 APPr의 양상을 관찰하여, 가미신선불로단이 뇌신경 퇴화와 치매를 일으키는 독성 amyloid β에 대한 예방효과를 가지고 있으며 독성 단백질의 전구체인 APP의 분자구조형성에 유리한 작용을 하는 것을 통하여 치매의 예방과 치료에 활용될 수 있다는 가능성을 보여 주었다.

감사의 글

이 논문은 2003학년도 동의대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yan Ling, Kevin Morgan, Noor Kalsheker: Amyloid precursor protein(APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35(11): 1505-1535, 2003.
2. Tanzi, R.E. Bertram, L., New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32: 181 - 184, 2001.
3. Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V. and Eanes, E.D., The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis. *Applied Pathology* 2, 357 - 369, 1984.
4. Selkoe, D.J., Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741 - 766, 2001.
5. B. Borroni et al, Early stages of probable Alzheimer disease are associated with changes in platelet amyloid precursor protein forms, *Neurol Sci*, 23: 207-210, 2002
6. 엄현섭, 가미신선불로단이 ibotenic acid손상에 의해 유도된 치매 백서의 학습 및 기억장애에 미치는 영향, *동의생리병리학회지* 16(6): 1152, 2002.
7. Kang J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733 - 736, 1987.

8. Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H. and Sakaki, Y., Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87: 257 - 263, 1990.
9. Seubert P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M.G., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D.J., Lieberburg, I. and Schenk, D., Isolation and quantitation of soluble Alzheimer's-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325 - 327, 1992.
10. Haass, C., Schlossmacher, M., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D. and Selkoe, D.J., Amyloid- β peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322 - 325, 1992.
11. Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine Jr., W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A. and LaDu, M.J., Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 32046 - 32053, 2002.
12. Kienlen-Campard P. and Octave, J.N., Correlation between beta-amyloid peptide production and human APP-induced neuronal death. *Peptides* 23: 1199 - 1204, 2002.
13. Borroni B, Colciaghi F, Corsini P, Akkawi N, Rozzini L, Del Zotto E, Talarico G, Cattabeni F, Lenzi GL, Di Luca M, Padovani A., Early stages of probable Alzheimer disease are associated with changes in platelet amyloid precursor protein forms, *Neurol Sci.* 23(5): 207-10, 2002.
14. Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Corsini P, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A. ApoE genotype influences the biological effect of donepezil on APP metabolism in Alzheimer disease: evidence from a peripheral model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 12(3): 195-200, 2002.
15. Folin M, Baiguera S, Conconi MT, Pati T, Grandi C, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. The impact of risk factors of Alzheimer's disease in the Down syndrome. *Int J Mol Med.* 11(2): 267-70, 2003.