

# 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

정인철 · 이상룡\*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## Effects of ChongMyung-Tang and MokguenpiChongMyung-Tang Extract on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105

In Chul Jung, Sang Ryong Lee\*

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

This research investigated the effect of the CMT and MCMT on Alzheimer's disease. The effects of the CMT and MCMT extract on expression of proinflammatory cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α) in the THP-1 cell; amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE) mRNA of PC-12 cells treated with CT105; the AChE activity and the APP production of PC-12 cell lysate treated with CT105 were investigated. The CMT and MCMT extract suppressed overexpression of IL-1β, IL-6, TNF-α in the THP-1 cell treated by LPS; the expression of APP, AChE mRNA in PC-12 cells treated with CT105; the AChE activity and the production of APP in PC-12 cell lysate treated with CT105 significantly. This study suggest that CMT and MCMT may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : ChongMyung-Tang(CMT), MokguenpiChongMyung-Tang(MCMT), Dementia, Alzheimer's disease, CT105, cytokine

### 서론

Alzheimer's disease(AD)는 높은 비율을 차지하는 痴呆의 원인질환으로, 뇌의 전반적 위축, 특유의 조직학적 소견과 함께, 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며, 발병과 경과가 점진적인 것이 특징이다<sup>1,2)</sup>.

AD는 β amyloid peptide(βA), estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데<sup>3)</sup>, AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다 생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며<sup>4)</sup>, 또한 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반

응에 의해 활성화된 microglial cells와 astrocytes가 염증반응을 싸이토카인을 과다하게 생성하여 뇌의 싸이토카인 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 설도 주목받고 있다<sup>5)</sup>.

한편 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고<sup>6)</sup>, acetylcholine을 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 연구되고 있다<sup>7,8)</sup>.

韓醫學에서는 痴呆의 유사한 개념으로 《景岳全書》<sup>9)</sup>에 최초로 “癡獸”로 기재되어 있으며, 역대 의서에서 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등<sup>9-13)</sup>을 주요한 病因으로 보고 있다.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》<sup>14)</sup>에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘에 사용한다는 기술 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며<sup>15)</sup>, 또한 木槿皮는 崔의 연구<sup>16)</sup>에서 清熱利濕, 活血의 효능<sup>17)</sup>이 있는 약물로 AD 치료와 예방에 효과적이었다는 연구로 미루어 聰明湯과 木槿皮를 가해 만든 木槿皮聰明湯은 치매의 치료 및 예방 효과가 좋을 것으로 기대된다.

\* 교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : 7575np@dju.ac.kr, · Tel : 042-560-8780

· 접수 : 2005/09/05 · 수정 : 2006/03/04 · 채택 : 2006/04/06

최근 들어 韓醫學界에는 痴癡와 관련된 다수의 실험적 연구<sup>18-22)</sup>가 보고되었고, 특히 聰明湯과 木槿皮가 각각 健忘 및 AD에 대한 효과를 입증하는 선행 연구들<sup>16,23)</sup>이 있었다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명, 비교검토해 보고자, 聰明湯, 木槿皮聰明湯과 CT105의 세포독성을 mLFCs와 PC-12 세포주에서 관찰하고, THP-1 cell에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰하였으며, CT105와 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE (acetylcholinesterase) 유전자 발현과 세포성 단백질에서의 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether), leupetin, N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI 1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사 (Japan)제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.)제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.)제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.)제품을 그리고, Agarose는 FMC사(U.S.A.)제품을 사용하였고,  $\beta$ -amyloid peptide (Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1 $\beta$ 와 anti-TNF- $\alpha$ (Pharmingen, U.S.A.), 그리고 anti-CD44-PE(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(Sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidine affinity column(Invitrogen, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), stereotaxic frame(Adamec, U.S.A.), CELlection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), brain matrix(ASI instruments, Warren, MI, U.S.A.), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, U.S.A.), CO<sub>2</sub>

incubator(Lepco, U.S.A.), Cytometry(BD, U.S.A.), Microscope (Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., U.S.A.) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.) 등의 것을 사용하였다.

#### 2) 동물

본 실험에 사용된 Sprague Dawley(SD)계 雌性白鼠는 대한 실험동물센터에서, BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 사용하였으며 실험당일까지 고형 사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 약제

본 실험에 사용한 聰明湯(ChongMyungTang, CMT)의 처방 구성은 《東醫實鑑》<sup>14)</sup>을 기준으로 하였고 木槿皮聰明湯(MokguenpiChongMyung-Tang, MCMT)은 聰明湯에 木槿皮 20g을 가미한 것으로, 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of ChongMyung-Tang(CMT) & MokguenpiChongMyung-Tang(MCMT)

韓藥名	生藥名	CMT 用量(g)	MCMT 用量(g)
白茯苓	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
木槿皮	Hibiscus syriacus	0	20
Total amount		36g	56g

#### 4) 검액의 조제

聰明湯(36g)과 木槿皮聰明湯(56g)에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer(-84 $^{\circ}$ C)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 세포독성 측정

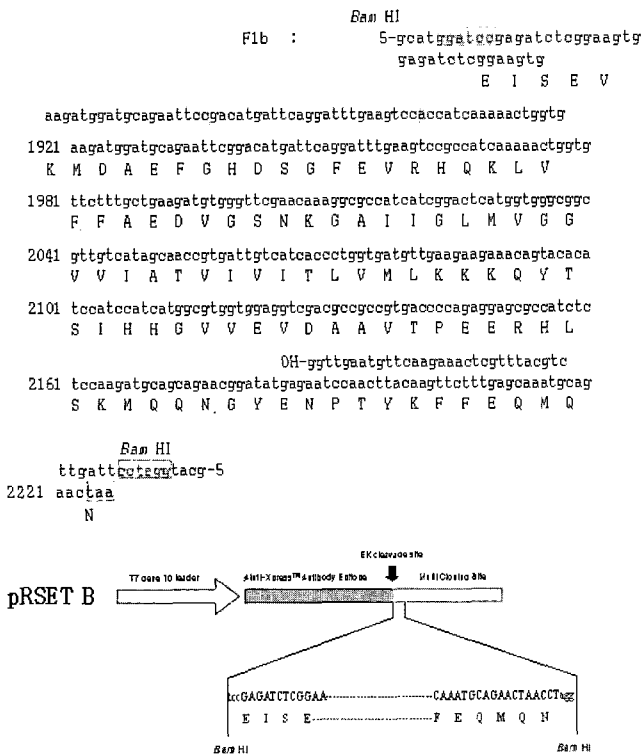
##### (1) 세포배양

mLFCs는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640(containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 $\mu$ g/ml)를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

PC-12 세포주(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721)는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였고, THP-1 세포주(acute monocytes, ATCC, TIB-202)는 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin(100U/ml), streptomycin(100µg/ml) 그리고 10µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO<sub>2</sub>인 37°C 배양기에서 배양하였다.

(2) CT105 복제

CT105를 E. coli에서 발현 정제하기 위해 APP 105 아미노산을 coding하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 Bam HI site를 넣어주었다. PC-12 세포를 LPS로 자극하고 유전자를 추출하여 reverse transcription- polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다. 증폭된 절편을 Bam HI로 절단하여 insert를 위해 6×his · tag를 갖는 pRSET B vector의 Bam HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 E. coli BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 E. coli를 획득하였다. 이 E. coli는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트리고 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidine affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT105를 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Construction of pRSET-CT105.

(3) 세포독성(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법<sup>24)</sup>을 약간 변형하여 실험

에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 자란 것을 Trypsin-EDTA 용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×10<sup>4</sup>개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물(400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)과 CT105(최종농도 80µM, 40µM, 20µM, 10µM, 5µM, 1µM)를 72시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한, 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) THP-1 세포주와 PC-12 세포주에서의 유전자 발현 분석

(1) THP-1 세포주에서의 약물처리

THP-1 세포주에 LPS(2µg/ml)을 처리하고 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양하여 염증반응 사이토카인을 유발시키고 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물을 처리 1시간 전에 HBSS로 세척한 후, 100µg/ml, 10µg/ml의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(2) PC-12 세포주에서의 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10<sup>6</sup>세포를 각각 분주하고 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물을 100µg/ml, 10µg/ml의 농도로 첨가하고, 1시간 후 CT105(20µM)와 rIL-1β(100ng/ml)를 처리하여 5시간 동안 동시 배양하였다.

(3) 유전자 발현 측정

① RNA 추출

배양종료된 PC-12 세포주와 THP-1 세포주를 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 RNeasy 500µl를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50µl를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200µl와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3µg을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5µl 10mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides(25pmole/25µl), RNA inhibitor로서 1µl RNase inhibitor(20U/µl), 1µl 100mM DTT, 4.5µl 5×RT buffer(150mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT(200U/µl)를 다시

가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3 $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer(20pmole/ $\mu$ l)를 혼합하여 1 $\mu$ l를 가하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu$ l Taq. polymerase(5U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu$ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95 $^{\circ}$ C, 5분), denaturation(95 $^{\circ}$ C), annealing(55 $^{\circ}$ C, 1분), elongation(72 $^{\circ}$ C, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 열기배열은 다음과 같다.

Ⓐ human IL-1 $\beta$

sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3'

Ⓑ human IL-6

sense oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

Ⓒ human TNF- $\alpha$

sense oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

Ⓓ human  $\beta$ -actin

sense oligonucleotide	5'-TGGAACTCTGTGGTCCATGAAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAAACGCGAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

Ⓔ rat APP

sense oligonucleotide	5'-TCITTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

Ⓕ rat AChE

sense oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

Ⓖ rat G3PDH

sense oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height; Ht)으로 측정하였다.

3) AChE 활성도 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)을 처리하고 1시간 후 CT105(20 $\mu$ M)와 rIL-1 $\beta$ (100ng/ml)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50 $\mu$ l의 lysis 완충용액 [Tris-HCl(200mM; pH 8.0), 150mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet

P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 $\mu$ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법(25)으로 단백질을 정량하여 50 $\mu$ g으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포성 lysate를 label한 후 sodium chloride solution 0.2ml와 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) APP의 western blot 분석

Cell lysate(50 $\mu$ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후 anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean $\pm$ standard deviation으로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법(26)을 이용하여 통계처리하였고, p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

성 적

1. 聰明湯, 木槿皮聰明湯과 CT105의 세포독성

1) mLFC와 PC-12 세포주에서 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 聰明湯 400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 60.4 $\pm$ 6.1(%), 75.3 $\pm$ 5.4(%), 木槿皮聰明湯 400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 42.0 $\pm$ 7.3(%), 68.4 $\pm$ 5.2(%)로 대조군에 비해 감소되었으며, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 실험군에서는 모두 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

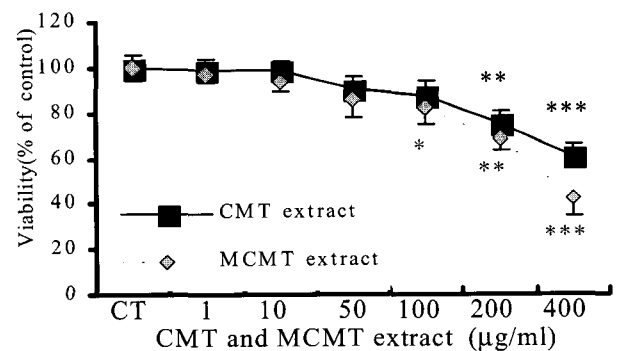


Fig. 1. Cytotoxicity effects of CMT & MCMT extract on mLFCs.

PC-12 세포주의 생존율 역시 聰明湯 400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 66.0 $\pm$ 5.2(%), 75.3 $\pm$ 7.3(%), 木槿皮聰明湯 400 $\mu$ g/ml

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 62.8 $\pm$ 5.5(%), 72.6 $\pm$ 6.1(%)로 대조군에 비해 감소되었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군에서는 모두 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 2).

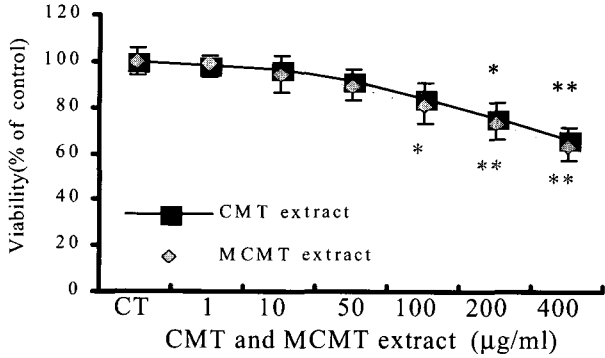


Fig. 2. Cytotoxicity effects of CMT & MCMT extract on PC-12 cell line. mLFCs and PC-12 Cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract. The results are expressed the mean $\pm$ S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

2) PC-12 세포주에 대한 CT105의 세포독성

CT105를 PC-12 세포주에 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 80 $\mu\text{M}$ , 40 $\mu\text{M}$  투여군은 각각 40.0 $\pm$ 1.4(%), 79.5 $\pm$ 3.7(%)로 감소되었으나, 20 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ 의 CT105 투여군은 모두 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 3).

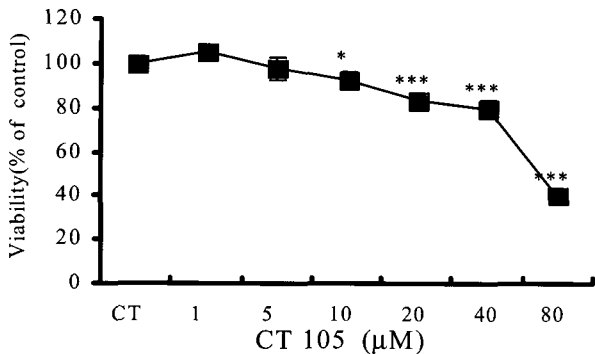


Fig. 3. Cytotoxicity of CT105 in PC-12 cell line. PC-12 cell line were pretreated with 1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$ , 40 $\mu\text{M}$ , and 80 $\mu\text{M}$  of CT105 for 72h. The results are expressed the mean $\pm$ S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

2. THP-1 세포주의 염증반응 사이토카인 발현 억제 효과

THP-1 세포주에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰한 결과, IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 있어서 대조군이 104(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 30(Ht), 72(Ht), 木槿皮聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 33(Ht), 65(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 4).

IL-6 mRNA 발현에 있어서는 대조군이 126(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 27(Ht), 30(Ht), 木槿皮聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 38(Ht)로 발현이 억제되었다(Fig. 5).

TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 있어서는 대조군이 117(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 32(Ht), 86(Ht), 木槿皮聰明湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 30(Ht)으로 발현이 억제되었다(Fig. 6).

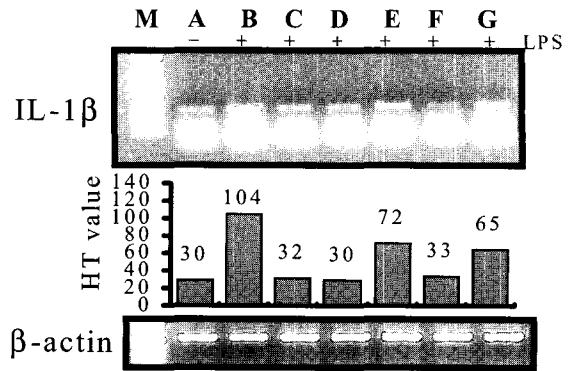


Fig. 4. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on IL-1 $\beta$  gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration MCMT extract(100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6hrs. IL-1 $\beta$  mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control( $\beta$ -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Control(B), Cyclosporin A(CsA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C), CMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (D), CMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E), MCMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (F), MCMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed IL-1 $\beta$  mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin) in THP-1 cell line.

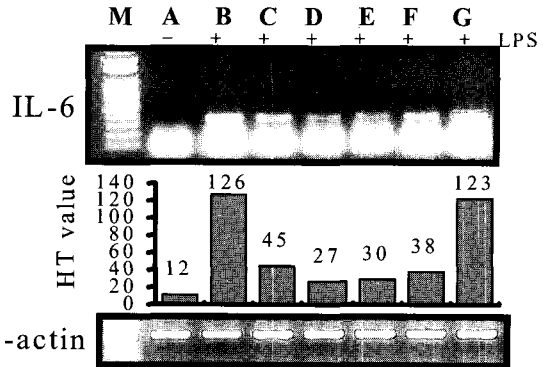


Fig. 5. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on IL-6 gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration MCMT extract(100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6hrs. IL-6 mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control( $\beta$ -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Control(B), CsA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C), CMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (D), CMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E), MCMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (F), MCMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed IL-6 mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin) in THP-1 cell line.

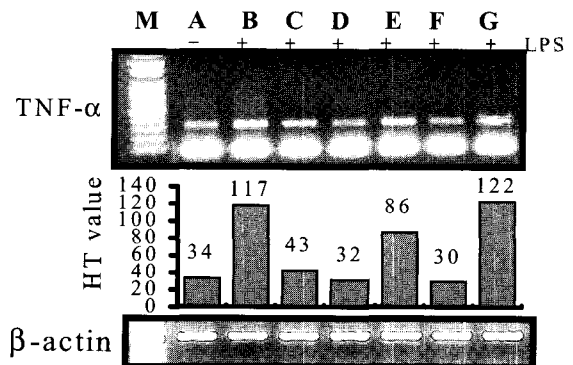


Fig. 6. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on TNF- $\alpha$  gene mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS. THP-1 cell line were pretreated with various concentration MCMT extract(100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6hrs. TNF- $\alpha$  mRNA expression were measured RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control( $\beta$ -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. THP-1 cell line media(A), LPS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Control(B), CsA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C), CMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (D), CMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E), MCMT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (F), MCMT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (G) and 100bp DNA marker(M). The gene expression were observed TNF- $\alpha$  mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin) in THP-1 cell line.

3. PC-12 세포주의 APP, AChE의 유전자 발현 억제 효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 136(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 56(Ht), 117(Ht), 木槿皮聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 40(Ht), 94(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 7).

AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 45(Ht)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 20(Ht), 25(Ht), 木槿皮聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 18(Ht), 28(Ht)로 모두에서 억제되었다(Fig. 8).

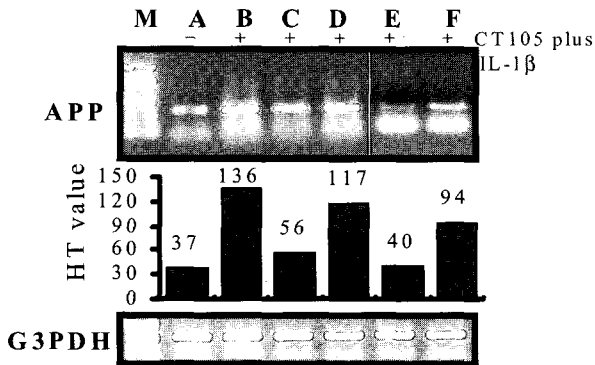


Fig. 7. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1 $\beta$ . Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract(100, 10 $\mu$ g/ml) in the presence CT105(20  $\mu$  M) plus recombinant IL-1 $\beta$ (100ng/ml) for 6h. APP mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control( $\beta$ -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT105 20 $\mu$ M plus recombinant IL-1 $\beta$  100ng/ml Control(B), CMT 100 $\mu$ g/ml(C), CMT 10 $\mu$ g/ml(D), MCMT 100 $\mu$ g/ml(E), MCMT 10 $\mu$ g/ml(F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

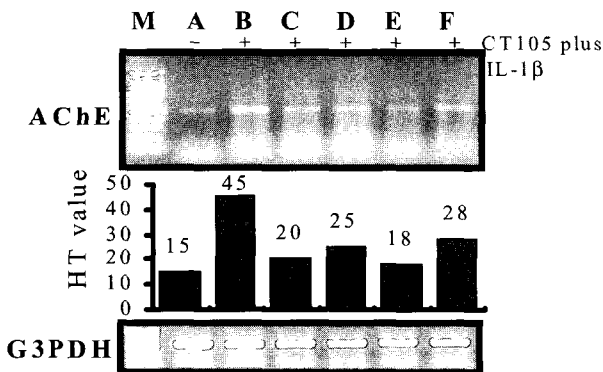


Fig. 8. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1 $\beta$ . Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract(100, 10 $\mu$ g/ml) in the presence CT105(20  $\mu$  M) plus recombinant IL-1 $\beta$ (100ng/ml) for 6h. AChE mRNA express were measured RT-PCR. Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control( $\beta$ -actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. PC-12 cell line media(A), CT105 20 $\mu$ M plus recombinant IL-1 $\beta$  100ng/ml Control(B), CMT 100 $\mu$ g/ml(C), CMT 10 $\mu$ g/ml(D), MCMT 100 $\mu$ g/ml(E), MCMT 10 $\mu$ g/ml(F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

4. PC-12 세포주 세포성 단백질의 AChE activity와 APP의 발현 억제효과

1) AChE activity 억제 효과

AChE activity를 측정된 결과, CT105와 rIL-1 $\beta$ 만을 처리한 대

조군이 100.0 $\pm$ 8.6(%)인데 비해, 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 68.4 $\pm$ 9.5(%), 87.5 $\pm$ 5.9(%), 木槿皮聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 43.4 $\pm$ 6.6(%), 75.4 $\pm$ 7.2(%)로 聰明湯 10 $\mu$ g/ml의 실험군을 제외한 모두에서 발현이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 9).

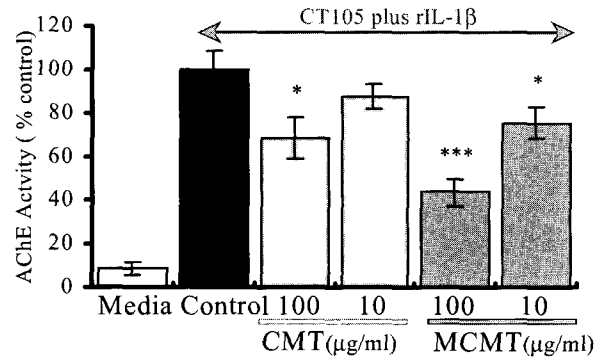


Fig. 9. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on the AChE activity in PC-12 cell lysate. PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract(100, 10 $\mu$ g/ml) in the presence CT105(20 $\mu$ M) plus rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) for 24h. The cell lysate(100 $\mu$ l, mg/ml) were measured using AChE diagnostic kits. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Media was not treated, CT105 plus rIL-1 $\beta$  was control, CT105 plus rIL-1 $\beta$  + CMT and MCMT(100 $\mu$ g/ml), and CT105 plus rIL-1 $\beta$  + CMT and MCMT(10 $\mu$ g/ml). Statistically significant value compared with CT105 plus rIL-1 $\beta$  control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2) APP의 발현 억제효과

APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, CT105와 rIL-1 $\beta$ 만을 처리한 대조군에 비해 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 실험군 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 10).

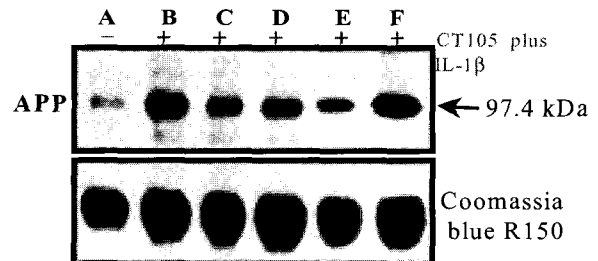


Fig. 10. Suppression effects of CMT and MCMT on APP in PC-12 cell lysate by Western blot analysis. PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract in the presence CT105(20  $\mu$  M) plus rIL-1 $\beta$  (100ng/ml) for 24h. APP expression was measured by immune Western blot assay. The cell lysate(50mg/lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. RPMI-1640 media control was not treated(A), CT105 20 $\mu$ M plus rIL-1 $\beta$  100ng/ml Control(B), CMT 100 $\mu$ g/ml(C), CMT 10 $\mu$ g/ml(D), MCMT 100 $\mu$ g/ml(E), MCMT 10 $\mu$ g/ml(F).

고찰

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발생되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로<sup>1)</sup>, 유발 질환에는 AD, 뇌경색, 기타 급성 일산화탄소 중독의 후유증, 두부외상, 알콜중독 등이 있는데, 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로<sup>2)</sup>, 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며, 발병은 서서히, 경과는 점진적인 것이 특징이다<sup>1,2)</sup>. 증상으로는 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안,

소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등을 보인다<sup>1,2)</sup>. 한국에서의 생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고되고 있고, 보편적으로 동양보다 서양에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 빈발하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 질환에 이환되는 것으로 역학 조사에 의해 보고되어 있다<sup>28)</sup>. 그리고 혈관성치매는 20~30% 정도이고 약물이나 알코올중독에 의한 중독성 치매는 10~20% 정도이며, 사고에 의한 뇌의 손상도 癡呆의 원인이 될 수 있다<sup>1)</sup>.

AD는  $\beta$ A, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발 인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데<sup>3)</sup>, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해  $\beta$ A가 과량으로 만들어지게 되고, 이  $\beta$ A의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다<sup>4)</sup>. 큰 분자량의 APP가 잘라져서  $\beta$ A가 유래되는데, APP는 다양한 molecular weight form이 있어,  $\beta$ A sequence를 포함한 amino acid의 수에 따라 APP695, APP751, APP770 등으로 불린다. 결국  $\beta$ A는  $\beta$ -secretase나  $\gamma$ -secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로<sup>5)</sup>, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다<sup>29)</sup>. Amyloid cascade hypothesis에 따르면  $\beta$ A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로 amyloid의 축적이 점차 커지면서  $\beta$ A가 신경세포를 손상시켜 결국 癡呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. 그러나  $\beta$ A는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉽게 만들어 癡呆의 증상을 유발시키는 것이다<sup>30)</sup>. 또한 최근에는 APP의 일부분인 CT105가  $\beta$ A보다 더 독성이 있다는 보고 등<sup>31,32)</sup>,  $\beta$ A와 CT105의 독성기전에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데,  $\beta$ A의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다<sup>33,34)</sup>. APP는 21번 염색체에 encode되어 있는 단백질로<sup>35)</sup>, 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자의 경우 30, 40대에 조기 癡呆 현상을 빈번히 나타내고, 그 환자의 뇌에서 노인반과 신경섬유다발이 발견됨이 보고되고 있는데, 이는 유전자수가 증가한 효과에 의해 APP가 과다생성되었기 때문이라고 추측되고 있으며<sup>29)</sup>, AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되고 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가된다는 보고로 볼 때, APP가 노화와 癡呆 형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다<sup>36)</sup>.

한편 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonin, GABA 등의 수준이 병적으로 낮아지며<sup>7,8)</sup>, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고<sup>6)</sup>, 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제

시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다<sup>7,8)</sup>. 비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등<sup>37)</sup>과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등<sup>38)</sup>이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다<sup>38)</sup>.

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial 세포 등의 신경교세포에서 생성되는 염증반응 사이토카인에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia 세포가 IL-1, IL-6, TNF 등의 염증반응 사이토카인들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 사이토카인 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다<sup>5,6,39)</sup>. 정상상태의 뇌에서 신경교세포인 astrocyte 및 microglial 세포는 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, 사이토카인들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 microglial 세포로 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF- $\alpha$ 를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고<sup>40)</sup>, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 사이토카인을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다<sup>39,41)</sup>. 또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인 발현을 보이는 astrocyte와 microglial 세포의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 염증반응 사이토카인이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다<sup>41)</sup>. 특히  $\beta$ A가 침적된 노인반 주변의 microglial 세포는  $\beta$ A에 의해 활성화되어 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 염증반응 사이토카인을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>.

韓醫學의으로 癡呆는 '呆病'<sup>10,11)</sup>, '健忘'<sup>43-47)</sup> 등의 범주에 속하며, 《景岳全書·癡狂癡歌》<sup>9)</sup>에서 癡呆와 유사한 개념의 언급이 있었는데, “癡歌症, ..... 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....”, “凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致癡歌이라 되어 있다.

癡呆의 관련 症狀으로는 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이 기술되고 있으며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되어 왔다<sup>9,13)</sup>. 원인에 대해서는 역대 문헌에서 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 제시되고 있는데<sup>9,13)</sup>, 현재 中醫學<sup>12,13,48)</sup>에서는 비록 일관된 치료는 아니지만, AD와 VD로 구분하고, AD를 다시 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 주로 肝腎陰虛 心脾兩傷 腎精虧虛 脾腎陽虛로 辨證하여 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 益氣補血 補益腎精 溫補脾腎 등의 治法을 응용하며, 實證

으로는 痰火와 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內阻 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 등의 治法을 응용하고 있다.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》<sup>14)</sup>에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 癡呆 등의 병증에 활용되고 있으며<sup>15)</sup>, 木槿皮는 錦葵科에 속한 落葉灌木인 무궁화의 莖皮 혹은 根皮로 性味는 甘·苦, 涼 無毒하며, 清熱利濕, 活血의 효능<sup>17)</sup>이 있어 痰火와 瘀血로 인한 癡呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 木槿皮가 崔의 연구<sup>16)</sup>에서 AD 치료와 예방에 효과적이라는 결과로 볼 때, 聰明湯에 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯은 치매의 치료 및 예방 효과가 더욱 좋을 것으로 기대된다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명, 비교검토해 보고자, 聰明湯, 木槿皮聰明湯과 CT105의 세포독성을 mLFCs와 PC-12 세포주에서 관찰하고, THP-1 cell에서의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰하였으며, CT105와 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현과 세포성 단백질에서의 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(聰明湯 및 木槿皮聰明湯)과 처리물질(CT105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC, PC-12 세포주의 생존율 모두에서 대조군에 비해 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml의 모든 실험군에서는 80% 이상의 생존율을 나타내었으나, 400  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml에서는 mLFC에서 聰明湯 투여군은 각각 60.4 $\pm$ 6.1(%), 75.3 $\pm$ 5.4(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 42.0 $\pm$ 7.3(%), 68.4 $\pm$ 5.2(%)로 감소되었으며, PC-12에서는 聰明湯 투여군은 각각 66.6 $\pm$ 5.2(%), 75.3 $\pm$ 7.3(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 62.8 $\pm$ 5.5(%), 72.6 $\pm$ 6.1(%)로 감소되었다(Fig. 1, 2). 이러한 결과는 100  $\mu$ g/ml이하의 농도로 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 생존율이 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 100  $\mu$ g/ml이하의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 사용하였다. 실험에 사용된 PC-12 세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 PS-1의 발현이 쉽게 관찰되어 AD의 연구에 상용되는 세포<sup>49)</sup>이며, CT105는  $\beta$ A를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로, 실험적으로 PC-12 세포주와 cortical neuron에 독성을 나타내고, 생쥐에 대해 기억력을 감퇴시키고 신경변성을 초래하며 칼슘의 항상성을 파괴하는 작용을 하며, microglial 세포에서 IL-1, IL-6 유전자를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있다<sup>32,50)</sup>. CT105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M의 CT105 투여군은 큰 변화가 없었고, 80  $\mu$ M, 40  $\mu$ M 투여군은 각각 40.0 $\pm$ 1.4(%), 79.5 $\pm$ 3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타내어(Fig. 3), 이후 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 80% 이상의 생존율을 나타낸 20  $\mu$ M 농도의 CT105를 주로 사용하였다. THP-1 cell은 사람의 monocyte 세포로, LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태

를 나타내므로 사람의 microglial cell의 모델로 사용할 수 있고<sup>51)</sup>, 또한 LPS와 A $\beta$ 를 처리한 THP-1 cell에서 염증반응 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 생성이 증가된다고 알려져 있다<sup>52)</sup>. 이런 배경에서 THP-1 cell의 염증반응 사이토카인의 발현을 관찰한 결과, IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 있어서 대조군이 104(Ht)인데 비해, 聰明湯 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 30(Ht), 72(Ht), 木槿皮聰明湯 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 33(Ht), 65(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었고, IL-6 mRNA 발현에 있어서는 대조군이 126(Ht)인데 비해, 聰明湯 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 27(Ht), 30(Ht), 木槿皮聰明湯 100  $\mu$ g/ml의 실험군은 38(Ht)로 발현이 억제되었으며 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 있어서는 대조군이 117(Ht)인데 비해, 聰明湯 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 실험군은 각각 32(Ht), 86(Ht), 木槿皮聰明湯 100  $\mu$ g/ml의 실험군은 30(Ht)으로 발현이 억제되었다(Fig. 4-6). 여기서 聰明湯과 木槿皮聰明湯은 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA의 과잉발현을 일정정도 감소시켜 AD의 原因 중 하나로 알려진 astrocyte, microglial cell의 활성화로 인한 염증반응 사이토카인의 과잉을 억제하는 효과를 가지고 있을 것으로 생각된다.

PC-12 세포주에 20  $\mu$ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 후 각각 다른 농도의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml)를 24시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, APP, AChE 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하였다. PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 투여한 실험군에서 모두 발현이 억제되었으며, 10  $\mu$ g/ml 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 투여군간의 큰 차이는 없었는데(Fig. 7, 8), 이는 聰明湯 및 木槿皮聰明湯이 CT105와 rIL-1 $\beta$ 로 인해 PC-12 세포주에 과도하게 발현되는 APP, AChE를 효과적으로 억제시킨 결과로 노인반 형성에 관여하는 APP, 기억력 장애에 중요한 역할을 하는 AChE를 억제함으로써 AD의 예방과 기억력 감퇴 등의 증상 치료에 기여할 수 있음을 보여준 것으로 사료된다. PC-12 세포주의 세포성 단백질에서의 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20  $\mu$ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 $\beta$ 를 처리한 뒤 서로 다른 농도의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도에서 聰明湯, 木槿皮聰明湯 실험군은 모두에서 AChE 활성도 억제효과를 보였으며, 木槿皮聰明湯이 聰明湯에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 우수한 억제효과를 보였는데(Fig. 9), 이를 AChE 유전자 발현 결과와 함께 보면 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 AChE가 억제된 것으로 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 투여가 acetylcholine의 양이 증가시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

APP는 western blot을 통해 측정하였는데, 대조군에 비해 실험군에서 농도에 따른 유의성 있는 APP 억제효과를 보였다(Fig. 10). 이를 APP 유전자 발현 결과와 함께 보면 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 APP가 억제된 것으로 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 투여가  $\beta$ A의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써 임상적으로 AD의 예방과 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.



이상의 결과를 종합해 보면 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 또한 THP-1 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 염증반응 사이토카인의 發顯을 抑制하였고 PC-12 세포주에서 APP, AChE 유전자의 발현과 PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE의 활성도, APP의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은  $\beta$ A의 과다생성, astrocyte, microglial 세포 등의 염증반응 사이토카인의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결론

聰明湯 및 木槿皮聰明湯이 CT105로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 THP-1 cell에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 發顯을 모두 抑制하였고 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하였으며 PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE의 활성도와 APP 발현을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 金知赫, 黃義完. 東醫精神醫學. 서울, 現代醫學書籍社, pp 256-271, 327-330, 1992.
2. 李定均. 精神醫學. 서울, 一潮閣, pp 87-88, 465-467, 514-518, 600, 1995.
3. McGeer, E.G., McGeer, P.L. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol*, 33(5):371-378, 1998.
4. 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, 2000.
5. Downen, M., Amaral, T.D., Hua, L.L., Zhao, M.L., Lee, S.C. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28(2):114-127, 1999.
6. Trabace, L., Cassano, T., Steardo, L., Pietra, C., Villetti, G., Kendrick, K.M., Cuomo, V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1):187-194, 2000.

7. 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.
8. Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(10):2393-2402, 2000.
9. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
10. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울, 書苑堂, p 102, 1984.
11. 錢鏡湖. 辨證奇問全書.台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
12. 陳輝 외. 實用中醫腦病學. 北京, 學苑出版社, pp.242-251, 784-791, 1993.
13. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 378-381, 1989.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 大星文化社, pp 55-56, 1996.
15. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울, 成輔社, pp 151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
16. 최병만. 木槿皮가 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 大田大學校大學院, 2003.
17. 康秉秀 외. 本草學. 서울, 永林社, p 649, 650, 1991.
18. 채종걸, 이상룡. 拱淸丸이 老化 白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 9(2):71-86, 1998.
19. 홍대성, 김중우, 황의완. 麝香蘇合元이 情緒反應性과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 10(1):17-38, 1999.
20. 김명진, 이상룡. 醒心地黃湯이 老化白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 10(2):71-84, 1999.
21. 정인철, 이상룡. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的變化 및 記憶에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 15(2):260-276, 2001.
22. 채종걸, 정인철, 이상룡. 山查肉이 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 13(1):79-115, 2002.
23. 김영욱 외. 聰明湯이 健忘誘導白鼠의 學習과 記憶에 미치는 영향. 韓方再活醫學科學會誌 8(2):464-479, 1998.
24. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, D., Warren, J.T., Kennedy, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112, 1990.
25. Zor, T., Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236(2):302-308, 1996.
26. 金宇暉 외. 統計學概論. 서울, 英志文化社, pp 177-179, 1990.
27. 서무규. 성인병 · 노인병학. 서울, 高麗醫學, pp 225-267, 1986.

28. 우종인 외. 한국의 한 농촌 지역에 거주하는 老人에서의 치매의 유병율. *신경정신의학* 36(1):92-101, 1997.
29. Reznik-Wolf, H., Machado, J., Haroutunian, V., DeMarco, 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 brains. *J Neurogenet*, 12(1):55-65, 1998.
30. Mattson, M.P., Guo, Z.H., Geiger, J.D. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem*, 73(2):532-537, 1999.
31. Bryan-Sisneros, A.A., Fraser, S.P., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and  $Na^+/Ca^{2+}$  gradients. *Neuroreport*, 11(15):3357-3360, 2000.
32. Kim, H.S., Park, C.H., Cha, S.H., Lee, J.H., Lee, S., Kim, Y., Rah, J.C., Jeong, S.J., Suh, Y.H. Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J*, 14(11):1508-1517, 2000.
33. Kontush, A. Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1120-1131, 2001.
34. Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., Shea, T.B. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity ; role of oxidative stress. *J Neurochem*, 78(2):249-253, 2001.
35. Racchi, M., Johnston, J.A., Flood, F.M., Cowburn, R.F., Govoni, S. Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein(APP) gene. *Biochem J*, 338, 777-782, 1999.
36. Breakefield, X.O., Geller, A.I. Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol*, 1(4):339-371, 1987.
37. Linert, W., Bridge, M.H., Huber, M., Bjugstad, K.B., Grossman, S., Arendash, G.W. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine ; relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1454(2):143-152, 1999.
38. Wu, D.C., Xiao, X.Q., Ng, A.K., Chen, P.M., Chung, W., Lee, N.T., Carlier, P.R., Pang, Y.P., Yu, A.C., Han, Y.F. Protection against ischemic injury in primary cultured mouse astrocytes by bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Neurosci Lett*, 288(2):95-98, 2000.
39. Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., Hirsch, E.C. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*, 19(9):3440-3447, 1999.
40. Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 150(7):2659-2667, 1993.
41. Selmaj, K., Shafit-Zagardo, B., Aquino, D.A., Farooq, M., Raine, C.S., Norton, W.T., Brosnan, C.F. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem*, 57(3):823-830, 1991.
42. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. Amyloid  $\beta$  and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 74(3):1017-1025, 2000.
43. Fukuyama, R., Izumoto, T., Fushiki, S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur Neurol*, 46(1):35-38, 2001.
44. Zhao, W., Bing-sheng, L., Alkon, D.L., Barker, J.L., Chang, Y.H., Wu, M., Rubinow, D.R. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. *Neuroreport*, 11(2):409-412, 2000.
45. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, pp 217, 218, 229, 1985.
46. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울, 東洋醫學研究院, p 68, 342, 1985.
47. 孫思邈. 備急千金要方. 서울, 杏林出版社, pp 129-135, 534, 545, 550, 1982.
48. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京, 人民衛生出版社, pp 822-825, 1987.
49. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울, 鼎談出版社, pp 306-307, 1992.
50. 楊思澎 외. 中醫臨床大全, 北京, 北京科學技術出版社, pp 224-230, 1991.
51. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. Amyloid  $\beta$  and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 74(3):1017-1025, 2000.
52. Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382(6593):685-691, 1996.