

參苓白朮散이 Alzheimer's Disease 동물모델의 Astrocyte 활성화 및 Apoptosis에 미치는 영향

이상룡*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effect of Samryungbaikchul-san on Astrocyte Activation and Apoptosis in Mouse Model of Alzheimer Disease

Sang Ryong Lee*

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Samryungbaikchul-san(SRBCS) has been used in oriental medicine for the treatments of gastrointestinal and neurological disorders. Here, potential protective function of SRBCS was investigated in neural tissues in Alzheimer's disease(AD) mouse model. In primary cultured cells from the spinal cord of newborn rats, treatment of β -amyloid peptide elevated cell counts positive to glial fibrillary acidic protein(GFAP) or caspase 3 immunoreactivity, but the co-treatment of SRBCS reduced positive cell counts. In vivo administration of scopolamine, an inhibitor of muscarinic receptor, resulted in increases in the number of glial fibrillary acidic protein(GFAP) and caspase 3-positive cells in hippocampal subfields, which was then decreased by the treatment of SRBCS or acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. The present data suggest that SRBCS may play a protective role in damaged neural tissues caused by scopolamine treatments in mice.

Key words : alzheimer's disease, samryungbaikchul-san(SRBCS), GFAP, caspase 3

서론

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)에 의한 치매는 고연령 층에서 발생빈도가 증가하는 대표적 퇴행성 질환으로, 이에 대한 병리학적 기전규명 및 치료제 개발을 위하여 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다¹⁾. 알츠하이머병에 의해 사망한 인간의 대뇌는 노인반 (senile plaques)과 신경섬유다발 (neurofibrillary tangle)의 형성이라는 조직학적 특성을 나타내고 있는데, 이와 관련된 신경조직의 퇴행성을 이해하고 더 나아가 병리적 기전을 규명하려는 많은 연구들이 진행되어 왔다²⁾. 특히 인간이나 영장류의 뇌 조직을 이용한 치매의 연구의 장애요인을 극복하기 위하여 여러 가지 설치류의 치매 모델이 개발되었고, acetylcholine receptor의 한 type인 muscarinic receptor의 길항제로서 작용하는 scopolamine은 cholinergic neuron의 활성도를

차단하고 AD형 치매의 특성인 인지기능의 감소를 유발하는 것으로 알려져 있다³⁾.

參苓白朮散은 《太平惠民和劑局方》에 기록¹⁰⁾된 이래脾胃虛弱으로 인한 飲食不消, 食慾不振, 嘔吐泄瀉, 四肢無力, 多困少力, 胸膈滿悶, 脈緩弱 등을 치료하며 大病後 虛弱에 활용되는데¹¹⁾, '痴瘖'⁴⁾, '呆病'^{5,6)}, '健忘'^{7,8)}등의 범주에 속하는 痴呆의 다양한 원인 중 주된 원인인 年老體虛, 飲食失調를 치료하는 補益精氣의 처방⁹⁾으로 가능할 것으로 판단하였다.

치매에 대하여 한의학에서는 최근에 金 등^{12,13)}의 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향에 관한 연구와 李 등¹⁴⁻¹⁶⁾의 AD 병태 모델에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어 졌으며, 삼령백출산은 항암효과와 소화기계 질환에 대한 실험적 효과가 있다고 보고¹⁷⁻¹⁹⁾된 바 있으나 年老體虛, 飲食失調 등으로 야기되는 치매의 치료와 예방에 활용가능 하다고 판단되는 삼령백출산에 대한 치매 관련 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 삼령백출산 열수추출물을 시료로 신생 흰쥐의 척수조직으로부터 분리한 아교세포를 β -amyloid peptide를 처리

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

· E-mail : 7575np@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2600

· 접수 : 2009/01/14 · 수정 : 2009/02/24 · 채택 : 2009/03/02

하여 염증반응의 지표로서의 glial fibrillary acidic protein(GFAP) 양성 세포와 apoptosis 활성의 지표로서의 caspase 3 양성세포 변화를 관찰하였다. 그리고 scopolamine으로 유도된 AD 생쥐 모델 해마조직의 dentate gyrus, CA3 pyramidal, CA1 pyramidal 세포층에서 GFAP 양성세포, caspase 3 양성세포를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 蔘苓白朮散(Samryungbaichul-san, SRBCS)의 처방구성은 《東醫寶鑑》²⁰⁾에 준하였으며, 사용한 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Samryungbaichul-San(SRBCS)

Herbal Name	Galenical Term	Dose(g)
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	12.0
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	12.0
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12.0
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	12.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	12.0
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	6.0
蓮子	<i>Nelumbo Semen</i>	6.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	6.0
砂仁	<i>Amomi Semen</i>	6.0
白扁豆	<i>Dolichi Semen</i>	6.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	3.0
Total amount		97.0

2) 검액의 조제

대전대 대전한방병원에서 얻은 건조 상태의 삼령백출산 (97 g)을 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물 5.85 g을 얻었다(수율; 6.03%). 이를 냉동 (-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

3) 동물

척수신경세포 배양 실험을 위하여 생후 1-2일의 신생 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐 (Samtago Co, Korea)를 실험대상으로 하였다. 치매모델에 사용한 생쥐는 albino ICR 계열로서 교형 사료와 물을 어떠한 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24℃, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

4) 주요 시약

본 실험에 사용한 β amyloid peptide는 Sigma-Aldrich

(USA)에서 구입하였으며, 10 mM의 농도로 증류수에 녹여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다. 또한 scopolamine methyl nitrate와 galanthamine triethiodide는 Sigma-aldrich (USA)에서 구입하였으며, 각각 0.1 mg/ml와 0.3 mg/ml이 되도록 증류수에 녹여, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2. 실험방법

1) 척수 아교세포 배양

본 신경조직세포 배양에 대한 일반적 방법 및 원리는 Banker 와 Goslin²¹⁾의 실험서를 참조하였다. 유리 coverslip을 poly-L-ornithine (0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin (0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA)을 혼합하여 실온에서 precoating 하였다. 출생 1일자 신생흰쥐에서 척수를 분리하여 ice-cold DMEM medium (Gibco, USA)에 넣었다. 분리한 척수는 type XI collagenase (2500 U/ml, Sigma, USA) 를 포함한 DMEM을 처리하여 37℃에서 90분 동안 처리하였다. 조직을 DMEM으로 세척한 후 상층액을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 다시 한 번 세척 후 세포를 DMEM에 녹여서 화염 멸균한 Pasteur pipette 을 16-20번 통과하여 분리시키고 상층액을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. Cell은 type SII trypsin (0.5 mg/ml)을 포함한 DMEM 을 15분간 처리 후 trypsin inhibitor (100 mg/ml), EDTA (1 mM) and DNase I (80 mg/ml) 을 포함한 DMEM으로 5분간 처리하였다. 배양배지 (5 % heat-inactivated FBS (GIBCO), 5 % horse serum, 2 mM glutamine and 1 % penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM) 으로 세척한 1×10^5 개의 astrocyte를 12 mm round coverslip 위에 plating 하고 37℃, 5 % CO₂ incubator에서 12시간동안 배양한 뒤 새로운 배지로 갈아주었다. astrocyte는 蔘苓白朮散 (50 mg/ml or 100 mg/ml) 또는 식염수 용액으로 처리하고 48시간동안 배양하였다. Coverslip 위에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose solution 으로 상온에서 45분 동안 고정시킨 후 면역형광염색에 사용하였다. 면역 염색된 세포들은 형광현미경에 연결된 디지털 카메라로 찍고, 그 image를 Photoshop 프로그램에서 분석하였다.

2) Alzheimer's Disease 동물모델의 설립

10주령 ICR계 생쥐에 대해 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군, (ii) scopolamine (1 mg/kg)만 투여한 대조군, (iii) scopolamine (1 mg/kg) + galanthamine (3 mg/kg)을 투여한 양성 대조군, (iv) scopolamine (1 mg/kg) + 삼령백출산 열수추출물 (400 mg/kg, p.o)을 투여한 실험군으로 나누었다. 실험군에만 7일간 삼령백출산 열수추출물을 구강 투여하였고, 8일째부터 대조군과 실험군은 scopolamine (1 mg/kg)을 3일간 1일 1회 복강 주사하였으며 양성대조군은 투여 8일째부터 scopolamine (1 mg/kg)과 galanthamine (3 mg/kg)을 3일간 1일 1회 복강 주사하였다. 처리가 끝난 후 각 군 생쥐의 뇌를 분리하였다.

3) Hemotoxylin & Eosin 염색

뇌조직은 -20℃에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μ m 의 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후, H & E 염색을 실시하기 위

하여 슬라이드를 Hematoxylin에 1분 동안 담가 둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척하였다. 그 다음 Eosin에 30초간 담그고 흐르는 증류수에 여러 번 세척하고 에탄올 50%, 70%, 95% 에 여러 번 씻으며 염색을 적당히 제거하였다. 이러한 과정을 마친 후 xylene에 1분간 담가 놓고, 마지막으로 gelatin mount medium을 이용하여 cover-slide를 부착하였다. 이러한 샘플들은 광학현미경 (Light microscope, Nokon, Japan)을 통해 관찰하였다.

4) 면역형광염색

생쥐 뇌조직은 -20℃에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액 (phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담긴 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:500에 비율로 혼합하여 처리한 후 실온에서 4시간 동안 반응하였다. 일차항체 반응이 끝난 후 PBST (PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse (green; Molecular probes)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody (red; Molecular probes)를 1:100으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하고 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 2차항체는 빛에 민감하기 때문에 반응 시간동안 반드시 암실에서 수행하였다. 모든 조직시료는 형광현미경 (Nikon fluorescent microscope)을 통해 일차 관찰한 후, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop(version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 증폭시켜 컴퓨터에 저장하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 일차항체는 caspase-3 (1:500로 희석, Cell signaling)와 GFAP (1:1000로 희석, Dako) 이었다.

5) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직 및 H & E 염색조직은 Nikon 형광현미경을 이용하여 분석한 후 현미경에 부착된 디지털 카메라로 이미지를 포착하여 ACT-1 software를 이용하여 분석하였다. 중첩이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. β-amyloid 처리 배양 아교세포에서 astrocyte와 apoptosis에 미치는 영향

β-amyloid peptide를 처리하지 않은 경우 정상군과 삼령백출산 투여군에서 관찰되는 astrocyte는 다소 형태의 차이는 있었

지만 세포질 표면이 돌기구조 모양인 전형적 astrocyte를 보였다. 반면 β-amyloid peptide를 처리한 경우, 대조군에서 세포의 구형의 응집형태를 나타내었으나 삼령백출산 투여군에서는 정상군과 유사한 형태를 보였다(Fig. 1A).

β-amyloid를 처리하지 않은 경우 삼령백출산 투여군이나 정상군에서 모두 극소수의 세포만이 caspase 3 양성 형광염색 반응을 나타내었으며 두 집단 간의 생체세포의 수나 형태적 면에 있어 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았다. 반면 β amyloid를 처리한 대조군은 정상군에 비하여 caspase 3 양성세포가 빈번하게 관찰되었고 삼령백출산 투여군은 대조군에 비하여 caspase 3 양성 세포가 감소되었다(Fig. 1B).

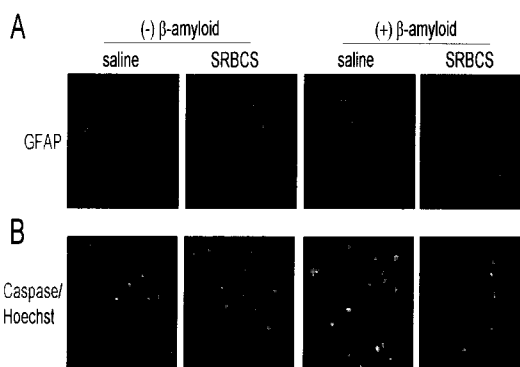


Fig. 1. Effects of SRBCs on morphological characteristics and caspase 3 protein levels in cultured glial cells. Glial cells were prepared from the dissociated spinal cord tissue (see for details in the Materials and Methods). Cells were treated with 50 μg/ml of SRBCs or an equivalent volume of saline (5 μl) for 48 hrs. (A) Harvested cells were fixed and used for immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody (red) to identify astrocytes. (B) Cultured cells were used for immunofluorescence staining with anti-caspase 3 antibody (red) and Hoechst nuclear staining to identify individual cells (blue). The merged images identify correct localization of caspase 3 signals within the cell.

2. Scopolamine 처리 AD 생쥐의 해마조직에 대한 영향

1) GFAP

해마의 세포층은 Hoechst33258 형광염료에 의한 염색(파란색)에 의하여 잘 확인되었고 GFAP 양성 astrocyte는 신경세포층 주변부위에 적색 염색신호를 주로 나타내었다. Dentate gyrus에서는 scopolamine 처리 후 hilus 부위에서 강한 GFAP 양성 astrocyte 염색신호를 나타내었으나 삼령백출산 투여군의 경우 GFAP 양성 astrocyte가 감소하였으며 양성대조군과 유사한 결과가 관찰되었다. CA3 및 CA1 pyramidal 세포층에서는 정상군에 비하여 대조군은 증가된 GFAP 양성 astrocyte가 확인되었으나 삼령백출산 투여군이나 양성대조군에서는 대조군에 비해 상대적으로 감소하였다(Fig. 2).

2) Caspase 3

Dentate gyrus 부위의 granule cell 층과 CA3 및 CA1 pyramidal cell 층 모두 정상군에서는 caspase 3 양성세포가 관찰되지 않았으나 대조군의 caspase 3 양성신호는 granule 세포층과 hilus 부위, 그리고 CA3 와 CA1 세포층에서 강하게 관찰되었다.

양성대조군의 경우 dentate gyrus, CA3 및 CA1 세포층에서 caspase 3 양성신호의 감소를 나타내었고 藜蘆白朮散 투여군도

유사한 변화를 보였다(Fig. 3).

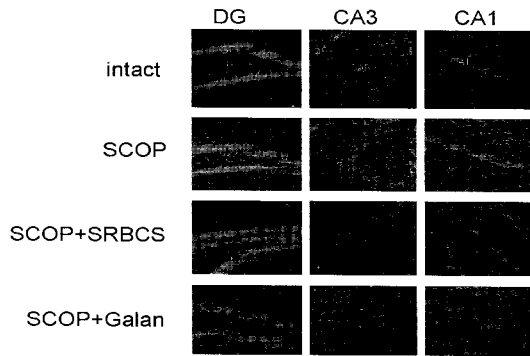


Fig. 2. Micrographic images of GFAP-positive astrocytes in the hippocampus. Cells in the dentate gyrus (DG), CA3 and CA1 pyramidal cell layers. Layers of granule cells (GCL), CA3 and CA1 pyramidal cells were identified by Hoechst nuclear staining (in blue), and the astrocytes were detected by immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody (in red). GFAP-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal intact, scopolamine (Scop), scopolamine plus SRBCS (Scop + SRBCS), and scopolamine plus galanthamine (SCOP + Galan). H, hilus.

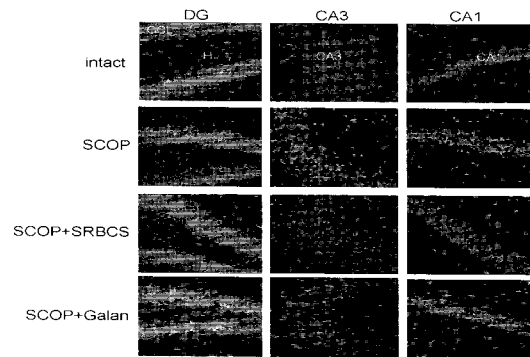


Fig. 3. Micrographic images of caspase 3-labeled cells in hippocampal dentate gyrus (DG), CA3 and CA1 pyramidal cell layers. Caspase 3-positive cells in dentate gyrus region were identified by red-color staining, and Hoechst nuclear staining (in blue) visualizes individual neuronal cell layers. Caspase 3-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus SRBCS (Scop + SRBCS), and scopolamine plus galanthamine (Scop + Galan).

고찰

치매를 일으키는 원인은 70여 가지 이상으로 알려져 있고, 대표적인 것은 알츠하이머병(AD)과 혈관성 치매(Vascular dementia, VD)로, 전체 치매의 약 70~80%를 차지하고 있으며²²⁾, AD가 50% 정도로 가장 많다²³⁾.

AD는 뇌의 전반적인 위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며²⁴⁾, 증상으로 기억, 언어, 시·공간 파악 능력, 실행능력 및 판단력 등 인지능력의 퇴화와 망상, 의식증, 환각, 우울증 및 인격의 변화 등 행동장애가 나타난다²⁵⁾.

AD의 기전에는 β A, estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), proinflammatory cytokine의 과잉 및, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양

인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데²⁶⁻²⁹⁾, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 아밀로이드전구단백질(APP)의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 만들어지게 되고, 이 β A의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다²⁹⁾.

한편 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데^{27,30)}, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 제시되고 있다³¹⁾.

韓醫學으로 痴呆는 '呆病'^{5,6)}, '健忘'^{7,8)}등의 범주에 속하며, 《景岳全書·癡狂痴狀》⁴⁾에는 痴呆와 유사한 개념으로 '痴狀'가 언급되어 있는데, "痴狀症, 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..... 或以驚恐而漸致痴狀이라 하여 痴呆와 유사한 痴狀에 대해 최초로 기술하고 있다.

痴呆의 病因에는 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이 있으며, 精氣不足, 脾胃虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱으로 辨證하여 補益精氣, 補腎健脾, 割痰化濁, 開竅醒神, 行氣活血, 通竅醒腦, 清熱解毒, 益氣養血, 健腦益腎 등의 治法을 응용하고 있다⁹⁾.

參苓白朮散은 宋代의 《太平惠民和劑局方》¹⁰⁾에 "能 補氣健脾 滲濕和胃 治脾胃氣虛而挾濕之證 飲食不消 或吐瀉 形體虛弱 四肢無力"라 최초로 기록된 이래 脾胃虛弱으로 인한 飲食不消, 食慾不振, 嘔吐泄瀉, 四肢無力, 多困少力, 胸膈滿悶, 脈緩弱 등을 치료하며 大病 後 허약 때 조리방으로 활용되고 있다¹¹⁾. 처방을 구성하고 있는 각각 약물의 효능을 살펴보면 人蔘은 甘, 微苦하고 性溫하여 大補元氣하고 健脾養胃의 效能이 있어 主證을 치료하는 君藥이 된다. 白朮은 甘溫하여 健脾燥濕하며, 山藥은 甘淡, 性平하여 健脾澁精하고, 炙甘草는 甘溫하여 益氣補中하고 人蔘의 補氣健脾의 效能을 도와 運化를 보조하게 하므로 臣藥이 되고, 白茯苓, 白扁豆, 薏苡仁 등은 甘淡하여 滲濕하고, 蓮子肉은 澀腸止瀉하며, 砂仁은 辛溫芳香하여 行氣醒脾하고 脾胃의 運化를 촉진하며 또한 中焦의 氣滯를 理氣시키므로 佐藥이 되며, 手太陰肺經으로 引經시키는 枳梗을 配伍하여 脾氣가 散精하여 肺로 歸原시켜 全身의 氣를 養하게 하므로 使藥이 된다³²⁾. 《醫方集解》³³⁾와 《湯頭歌訣白話解》³⁴⁾에서는 脾胃虛弱하고 肺氣가 부족하여 발생하는 飲食減少, 體倦少力, 嘔吐泄瀉, 胸膈滿悶 등증을 다스린다고 기록되어 있다^{35,36)}. 參苓白朮散을 이용한 실험적 연구는 항암효과와 소화기계 질환¹⁷⁻¹⁹⁾을 중심으로 이루어지고 있다.

최근 痴呆에 대한 연구동향을 살펴보면 임상에서 활용되는 여러 複合處方들이 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향^{12,13)}, AD 病態 모델에 미치는 影響에 대한 연구들¹⁴⁻¹⁶⁾이 이루어 졌으나 參苓白朮散이 활용된 바는 아직까지 없었다.

이에 저자는 參苓白朮散이 年老體虛, 飲食失調로 인한 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단하여 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 AD 치매 환자에서 관찰되는 퇴행성 뇌 조직

의 반응성에 대한 삼령백출산의 세포 생물학적 역할을 조사하기 위하여 두 가지 실험적 실험을 진행하였다.

첫째, 신생 흰쥐의 척수로부터 분리 배양한 비신경세포 즉 아교세포에 대하여 β -amyloid peptide의 처리에 의한 astrocyte의 활성화 및 caspase 3의 활성도를 조사하였다.

β -amyloid peptide는 AD 환자의 뇌 조직에서 비정상적으로 amyloid precursor protein (APP) 단백질의 절단과정을 통하여 축적되며, 노인반의 주된 구성 성분으로 in vivo 및 in vitro 배양 세포에 대해 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁷⁻³⁹.

Astrocyte는 중추신경계의 전체세포수의 90%를 차지하는 아교세포 집단에서 70% 이상을 차지하는 대표적 중추신경계 비신경세포이다. 성상교세포는 신경계 조직상의 염증반응 등 손상 자극에 의하여 그 숫자는 더욱 증가함과 동시에 활성화 되는데, 이렇게 활성화 성상교세포(reactive astrocyte)는 외부손상 자극에 대한 보호반응으로서 아교상흔(glial scar)을 형성하여 염증반응을 최소화하는데 관여한다⁴⁰.

척수아교세포에 β -amyloid를 처리하지 않은 경우 삼령백출산은 세포생존이나 형태에 전혀 변화를 나타내지 않았다. 즉, 삼령백출산은 정상세포에 대해 자체적 독성 혹은 생존성에 영향을 나타내지 않음을 보여주고 있다. 반면 β -amyloid를 처리한 대조군의 세포는 다소 구형상의 구조적 변화를 나타내었으며 이러한 변화는 삼령백출산의 처리에 의하여 정상 형태로 유도되는 효과를 보여주었다(Fig. 1A).

β -amyloid의 처리에 의한 형태적 변화와 분자적 수준의 반응성의 변화와의 연관성을 조사하기 위해 동일 특성의 배양세포 상에서 caspase 3 단백질의 생성수준을 조사하였다. caspase 3은 apoptosis 과정에서 전구체 단백질 procaspase 3의 절단에 의하여 활성화되며 기질 단백질의 절단을 통하여 자멸경로의 집행을 유도하는 역할을 수행한다⁴¹. 세포외부의 stress 등의 유해성 자극에 의하여 유도된 proapoptotic 단백질인 Bad나 Bax 등으로부터 유도된 신호가, 미토콘드리아의 cytochrome c 배출을 유도하여 apoptosis activating factor(APAF)를 활성화시키고 이는 procaspase 3를 caspase 3로 전화시킴으로서 세포사멸을 수행하게 된다. Caspase 3는 DNA 분해효소의 활성화나 세포골격단백질의 분해를 유도하여 DNA 응축 및 세포구조의 위축을 초래하여 주변의 탐식세포에 의한 제거를 유도한다⁴².

β -amyloid peptide를 처리한 후 배양세포상의 caspase 3 수준은 현저히 증가하였으며 삼령백출산의 처리에 의하여 상당히 감소하였다(Fig. 1B). 이러한 변화는 astrocyte의 형태적 변화와 양성적 상관관계를 나타내며 삼령백출산이 apoptosis 억제 기능을 나타낸다는 점을 시사하고 있다.

두 번째 실험으로서, scopolamine의 처리에 의한 생쥐의 대뇌 해마조직의 변화에 대해 삼령백출산의 투여가 어떤 효과를 나타내는지를 조사하였다. Scopolamine은 muscarinic receptor의 길항제로서 신경계 독성효과가 알려져 있으며 이것의 cholinergic neuron 활성도 억제효과가 뇌조직의 퇴행을 유도하기에 AD의 병리적 동물모델 제작에 활용할 수 있는 물질로 제시된 바 있다⁴³⁻⁴⁵. 본 연구에서는 scopolamine의 처리에 의한 신경

조직의 퇴행과정을 방지하기 위하여 galanthamine을 양성대조군의 약물로 사용하였다. Galanthamine은 acetylcholine 신경전달 물질의 분해효소인 acetylcholinesterase의 경쟁적 억제제로 작용하여 cholinergic neuron의 신경전달 기능을 개선시키는 역할을 한다³. 또한 치매환자의 기억력 회복에 양성적인 효과가 있다고 것이 제시된 바 있다^{46,47}. 생쥐에 scopolamine 처리 후 해마조직 부위에서 비신경세포의 활성도의 변화와 자멸반응성 유도 수준을 조사한 결과 scopolamine 처리 후 dentate gyrus의 hilus 부위에 GFAP 양성 astrocyte의 반응성이 증가하였으나 삼령백출산이나 galanthamine의 처리에 의하여 상당 수준 감소하였다. CA1 그리고 CA3 부위에서도 삼령백출산 투여군은 양성대조군과 유사한 수준으로 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 또한, Scopolamine 처리 생쥐에 삼령백출산을 투여한 결과, hilus와 CA3 부위에서는 galanthamine 처리에 의하여 유도된 것과 유사하게 caspase 3 양성세포 증가를 억제하였다. CA1 pyramidal cell 층의 경우 scopolamine에 의한 apoptosis 유도 및 삼령백출산이나 galanthamine의 처리효과가 다소 낮은 수준으로 관찰되었다(Fig. 3). CA3 세포는 흥분성 전위 생성에 있어 낮은 역치 값에 근거하여 탈분극에 의한 세포손상 반응에 민감한 것으로 알려져 있어 간질이나 뇌졸중 손상에 민감한 것으로 알려져 있다⁴⁸⁻⁵¹.

Hilus 부위의 interneuron 역시 다중적 시냅스에 과다자극에 의하여 민감한 세포반응성이 제시된 바 있다⁵². Scopolamine의 처리는 astrocyte의 활성화에 따른 astrocyte 자체 혹은 인접한 뉴론 즉 hilus 부위의 interneuron이나 CA3 pyramidal cell의 apoptosis를 유도할 것으로 사료되며, 이러한 apoptosis 과정이 삼령백출산의 투여에 의하여 상당 수준 억제되었을 것으로 해석된다.

이상의 결과는 삼령백출산이 scopolamine 혹은 β -amyloid의 의하여 유도된 뇌와 척수의 신경세포의 퇴행성 변화 및 astrocyte의 활성화를 조절하는데 관여할 수 있음을 보여주고 있다. 양성대조군으로 사용된 galanthamine의 처리효과와 유사한 양상의 변화를 나타내는 것으로 볼 때 acetylcholine 신경경로에 작용하여 AD에 의한 치매의 병리학적 기전에 관여할 수 있음을 암시한다.

이러한 가능성을 규명하기 위하여 향후 參朮白朮散의 특정 후보성분에 대한 분자적, 전자생리학적 수준에서의 심층적 연구가 요구된다.

결론

參朮白朮散 처리에 의한 Alzheimer's disease 병태모델의 신경세포 손상에 미치는 영향을 조사하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

參朮白朮散은 β -amyloid를 처리한 흰쥐 배양 아교세포에서 GFAP 양성반응 astrocyte와 caspase 3 양성 세포의 활성 수준을 감소시켰다. 參朮白朮散은 scopolamine을 처리한 생쥐의 해마조직 상에서 GFAP 양성반응 astrocyte와 caspase 3 양성 세포의 수를 감소시켰다. 이상의 결과로 參朮白朮散은 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 작용기전과 임상적 활용에

대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 368(9533):387-403, 2006.
2. Selkoe, D.J., Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43: 545-584, 2003.
3. Downey, D. Pharmacologic management of Alzheimer disease. *J Neurosci Nurs*. 40(1):55-59, 2008.
4. 錢鏡湖, 辨證奇問全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
5. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京, 中國中醫藥出版社, p 125, 1991.
6. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, pp 37, 124, 196, 229, 217-218, 229, 1985.
7. 朱震亨. 金匱鉤玄. 서울, 鼎談出版社, pp 306-307, 1992.
8. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
9. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울, 집문당, pp 311-320, 324-333, 2007.
10. 陳師文. 中醫學大系, 太平惠民和劑局方. 서울, 도서출판 鼎談, 9(147):537, 1990.
11. 신재용 편저. 方藥合編解說. 서울, 정보사, p 37, 1988.
12. 김현주, 이상룡. 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯의 microglia 보호, 항산화 및 acetylcholinesterase 억제 효과. 동의신경정신과학회지 19(2):65-75, 2008.
13. 유종호, 이상택, 한윤승, 김근우, 구병수, 김현일. 황련청심음(黃連淸心飲)의 항산화 및 AChE 억제 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지 17(1):1-16, 2006.
14. 이병훈, 박선영, 최철홍, 이은경, 정대규. 紫河車 藥鐵이 β A로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(2):41-64, 2008.
15. 최강욱, 정인철. 天王補心丹 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(2):77-93, 2008.
16. 서규태. 鹿茸大補湯이 β -amyloid로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 대구한의대학교 대학원, 2007.
17. 송호철, 김성훈. 加味蔘苓白朮散 hexane분획의 抗轉移 및 혈관형성억제작용에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 15(6):967-974, 2001.
18. 김영진. 蔘苓白朮散의 Indomethacin 유도 위점막손상에 미치는 抗酸化效果, 동국대학교 대학원, 1998.
19. 송대섭. 蔘苓白朮散의 효능에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1993.
20. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 법민문화사, p 1158, 1999.
21. Banker G., Goslin, K. Culturing nerve cells, second edition. MIT Press, Cambridge, USA, 2002.
22. 대한치매학회. 치매 임상적 접근. 서울, 아카데미아, pp 23-24, 30-34, 201, 233-236, 2006.
23. Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D., Dchmeridler, J., Kanof, P. and Davis, K.L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *Journal of Neurochemistry*. 64: 749-760, 1995.
24. 이광우. 임상신경학. 서울, 고려의학, pp 203-208, 2002.
25. National Institute on Aging. National Institute on Health, Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999.
26. acquevel, M., Lebourrier, N., Cheenne, S., Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease, *Current Drug Targets*. 5(6):529-534, 2004.
27. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficaró, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 52(4):691-699, 1999.
28. Mhatre, M., Floyd, R.A., Hensley, K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets, *Journal of Alzheimers disease*. 6(2):147-157, 2004.
29. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지, 21(1):11-16, 2001.
30. de Vente, J., Markerink-van Ittersum, M., van Abeelen, J., Emson, P.C., Axer, H., Steinbusch, H.W. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain, effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis, *Eur J Neurosci*. 12(2):507-519, 2000.
31. 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.
32. 李尙仁 외. 방제학. 서울, 영림사, p 278, 1999.
33. 徐夏霖 외 2인. 脾胃理論與臨床, 湖南, 湖南科學技術出版社, pp 28-36, 69-85, 121, 127-147, 1990.
34. 北京中醫學院中藥方劑教研組, 湯頭歌訣白話解, 北京, 人民衛生出版社, pp 56-57, 1995.
35. 江克明, 包明蕙. 簡明方劑辭典. 上海, 上海科學技術出版社, p 699, 1989.
36. 이향중 외 4인. 중의방제적약리급임상응용, 북경, 人民衛生出版社, pp 232-235, 1992.
37. Selkoe, D.J. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 110(10):1375-1381, 2002.

38. Kobayashi, K., Hayashi, M., Nakano, H., Shimazaki, M., Sugimori, K., Koshino, Y. Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 6(6):623-632, 673-681, 2004.
39. Paradis, S., Sacchetti, B., Balduzzi, M., Gaudi, S., Malchiodi-Albedi, F. Astrocyte modulation of in vitro β -amyloid neurotoxicity. *Glia.* 46(3):252-260, 2004.
40. Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., Okano, H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury, *Nat Med*, 12(7):829-834, 2006.
41. Rich, T., Watson, C.J., Wyllie, A. Apoptosis: the germs of death. *Nat Cell Biol.* 1(3):69-71, 1999.
42. Vassar, R. Caspase-3 cleavage of GGA3 stabilizes BACE: implications for Alzheimer's disease, *Neuron*, 54(5):671-673, 2007.
43. Leung, L.S., Shen, B., Nagalingam, N. and Ma, J. Cholinergic Activity Enhances Hippocampal Long-Term Potentiation in CA1 during Walking in Rats *J. Neurosci.* 23: 9297-9304, 2003.
44. Weiss, C., Preston, A.R., Matthew, M. Oh, Roy D., Schwarz, Devin Welty and John F. Disterhoft. The M1 Muscarinic Agonist CI-1017 Facilitates Trace Eyeblink Conditioning in Aging Rabbits and Increases the Excitability of CA1 Pyramidal Neurons. *J. Neurosci.* 20: 783-790, 2000.
45. Oh, M.M., Power, J.M., Lucien, T., Thompson, Pamela, L., Moriearty, John F. Disterhoft. Metrifonate Increases Neuronal Excitability in CA1 Pyramidal Neurons from Both Young and Aging Rabbit Hippocampus. *J. Neurosci.* 19: 1814-1823, 1999.
46. Raschetti, R., Albanese, E., Vanacore, N., Maggini, M. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. *PLoS Med.* 4(11):338, 2007.
47. Villarroya, M., García, A.G., Marco-Contelles, J., López, M.G. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs.* 16(12):1987-1998, 2007.
48. During, M.J., Symes, C.W., Lawlor, P.A., Lin, J., Dunning, J., Fitzsimons, H.L., Poulsen, D., Leone, P., Xu, R., Dicker, B.L., Lipski, J., Young, D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science.* 287(5457):1453-1460, 2000.
49. Yee, A.S., Longacher, J.M., Staley, K.J. Convulsant and anticonvulsant effects on spontaneous CA3 population bursts. *J Neurophysiol.* 89(1):427-441, 2003.
50. Wallenstein, G.V., Hasselmo, M.E. Functional transitions between epileptiform-like activity and associative memory in hippocampal region CA3. *Brain Res Bull.* 43(5):485-493, 1997.
51. Leung, L.W., Yim, C.Y. Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* 553(2):261-274, 1991.
52. House, C.R. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog Brain Res.* 163: 217-232, 2007.