

蓮根의 신경 보호 효과 및 기전연구

홍승철, 이가평, 김상현, 이진희, 구병수

동국대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

The Mechanism of Lotus Root Extract (LRE) as Neuro-Protective Effect in Alzheimer Disease (AD)

Seung-Chul Hong, Chia-Hung Lee, Sang-Heon Kim, Jin-Hee Lee, Byung-Soo Koo

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Objectives :

There is a possibility LRE as remedy in Alzheimer disease (AD), but it's nerve protection effect and mechanism have to be elucidate. In this research, we applied LRE on $A\beta_{25-35}$ pre-treated SH-SY5Y cells, to find out the nerve protection effect and mechanism in AD cell model.

Methods :

We tried to confirm that effect by experimenting with 20, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentration of LRE as a medicine. Next experiment, we assessed damage effect which induced $A\beta_{25-35}$, known to cause AD, on SH-SY5Y cell. In addition, cellular viability test is executed under H_2O_2 treatment condition in a SH-SY5Y cell.

Results :

1. In $A\beta_{25-35}$ treated SH-SY5Y cell, LRE exhibited an anti-phosphorylation effect about tau protein, JNK, and IKK.
2. LRE prevent nerve cell apoptosis, which induced $A\beta_{25-35}$ and oxidative stress, modify JNK engaged synaptic structure and NF- κ B induced p75-neurotrophin receptor polymorphism.

Conclusions :

We found that LRE prevented oxidative stress-induced cellular destruction, for example, increased SOD activity of $A\beta_{25-35}$ treated SH-SY5Y cell and reduced toxicity of oxygen free radical. Consequently, the ingredients of LRE have a role as a catalyzer for $A\beta_{25-35}$ clearance and as scavenger for active oxygen free radical.

Key Words:

Lotus root, Alzheimer disease, SH-SY5Y cell.

I. 서론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 초로기 또는 노년기에 발생하는 원인 불명의 진행성 치매를 초래하는 질환으로, 노령사회 진입의 특성인 65세 이상 고령인구 증가에 따라 환자의 비율이 높아질 것으로 예측되는 질환이다¹⁾.

환자의 뇌는 특히 대뇌피질의 뇌신경세포의 소실로 인해 광범위한 뇌회의 위축이 나타나며 결과적으로 뇌실이 상대적으로 커지게 된다. 조직학적 소견으로 신경반(neuritic plaque)과 신경원섬유농축(neurofibrillary tangle, NFT)이 나타난다²⁾.

한의학적으로 치매는 呆病, 健忘, 癡狂의 범주에 포함된다³⁾. 呆病에 관해 明代 張⁴⁾은 病因을 情緒상의 문제로 보았고 病理는 逆氣가 心에 있는 것과 肝膽二經의 氣不清으로 보았으며 胃氣와 元氣의 強弱으로 可治와 不治로 나누었다. 清代 陳⁵⁾은 呆病의 원인을 情緒의 불균형으로 보았고 治痰을 중요하게 보았다. 錢⁶⁾은 肝氣鬱滯와 胃氣衰退가 원인이 된 胸中之痰의 積滯를 언급하고 治法으로 開氣鬱結 逐其痰 健其胃를 제시하였다. 清代 王⁷⁾은 老年虛衰로 인해 腦髓가 空虛하게 되면 呆病에 걸릴 수 있음을 설명하였다. 통괄적으로 치매의 병기는 虛實이 挾雜된 것이 많은데 本虛表實로 나눌 수 있고 虛한 것은 肝腎不足, 氣血虧虛로 實한 것은 痰濁阻礙, 氣滯血瘀로 나눌 수 있다³⁾.

蓮根은 本草名으로 藕節로, 연꽃(蓮) *Nelumbo nucifera*의 비대한 根莖이다^{8,9)}. 止血 및 瘀血을 제거하는 효능이 있어서 각종의 出血 증후에 사용한다⁸⁻¹¹⁾. 최근의 연구로는 뇌 조직 내 호르몬과 혈류에 미치는 효과가 보고되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 이에 본 연구팀은 蓮根의 止血 및 瘀血을 제거하는 효능과 뇌에 미치는 영향에 주목하여 蓮根추출물로 AD를 일으킨다고 알려진 A β 펩타이드를 처리한 세포로 실험한 결과, 신경보호효과가 있음이 확인되었기에 보고하는 바이다.

II. 연구방법

1. 실험재료

동결건조한 연근 추출물(LRE)의 무게를 재고 100 mg을 1 ml의 증류수에 넣고 녹인 후 0.2 μ m filter로 불순물을 제거한 후 세포 실험에 사용하였다. A β ²⁵⁻³⁵ (Sigma aldrich, Inc, USA)는 20 μ M 용량을 처리하였다.

2. 세포주와 세포배양

실험에 사용한 neuroblastoma cell line, SH-SY5Y 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입을 하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen, USA)이 함유된 DMEM (Invitrogen, USA) 배지를 사용하여 배양하였다. 오염 방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. Trypsin-EDTA (Gibco/BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2~3일 마다 교환하여 주었다. 약물을 처리하기 위해 배양하고 있는 SH-SY5Y 세포주를 1 \times 10⁵/well의 개수로 24-well plate (Corning, USA)에 옮겨주고 다음 날 저녁에 FBS가 들어있지 않은 배지로 16시간 이상 교체해 준 후 약물을 처리하였다.

3. 세포활성도 측정(MTT assay)

MTT (tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay는 Sladowski의 방법¹⁵⁾을 따라 행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 580 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아

있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다.

MTT assay는 우선 12 well plate에 SH-SY5Y 세포 (1×10^5 /well)를 12시간 배양한 후 FBS가 없는 배지로 교환하여 16시간동안 안정화시키고, 여러 농도로 약 물을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다.

그리고 MTT 2 mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 570 nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 계산하였다.

세포생존율(Cell Viability, %)은 다음과 같이 정의를 하였다. 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100%라고 정의하고, 나머지 군의 측정된 O.D. 값을 상대치로 환산을 하면 다음과 같다.

$$\text{Cell Viability} = (\text{실험치} / \text{control 군})$$

4. Western blot 분석법

모든 세포 용해질들은 표본 완충제(62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 내에 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 μ g을 4~12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법(SDS-PAGE)으로 분리하였고, nitrocellulose paper (Amersham)로 옮겼다. 단백질을 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)로 씻은 후 5% Skim milk로 30분 이상 blocking하였다. 인산화 IKBa (p-IKBa), IKBa, 인산화 JNK (p-JNK), JNK (Cell signaling tech, USA), 인산화 tau (p-tau, Ser262) 및 actin 항체(Cell signaling tech, USA)를 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 다음 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 뒤 막을 씻고 enhanced chemilumini-

science system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비(LAS-3000, Fuji film, Japan)를 이용하였다.

5. SOD 활성 측정

세포내에서 Superoxide dismutase (SOD)의 활성도 측정은 SOD assay kit (Cell Biolabs, Inc. USA)를 사용하였으며 작용원리는 xanthine/xanthine oxidase를 사용하여 superoxide anion을 생성하고 생성된 superoxide anion은 chromogen에 의해 수용성의 formazan dye를 생성하게 되는데 이 때 세포내에 존재하는 SOD의 양에 따라 생성되는 formazan dye가 줄어들게 된다. 최종적으로 생성된 formazan dye는 spectrophotometer (Molecular Device, USA)를 사용하여 490 nm 파장에서 측정하였다.

6. Catalase activity 측정

세포내에서 Catalase의 활성도 측정은 Catalase activity assay kit (Cell Biolabs, Inc. USA)를 사용하였다. 본 실험법의 작용기전은, 일차적으로 세포내 존재하는 catalase에 의해 외부에서 넣어준 H_2O_2 가 물과 산소로 해리되고 남은 H_2O_2 가 Horse radish peroxidase (HRP)에 의해 3,5-dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonic acid (DHBS), 4-aminoantipyrene (AAP)과 반응하여 Quinoneimine dye를 생성하게 된다. 최종적으로 생성된 Quinoneimine dye는 spectrophotometer (Molecular Device, USA)를 사용하여 520 nm 파장에서 측정하였다.

7. Data 분석 및 통계처리

모든 측정값은 평균값 표준편차(mean \pm S.D.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 student t-test로 검정하여 p 값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결과

1. 신경세포 보호효과

SH-SY5Y cell에 A β 를 처리하기 30분 전에 蓮根 추출물을 전 처리 후, 24시간이 지난 후에 세포 활성도를 측정하였다. 蓮根추출물의 농도가 20 μ g/ml와 50 μ g/ml일 때 SH-SY5Y cell의 활성은 미미하게 감소하였으나, 100 μ g/ml에서는 세포활성은 0.9배 감소가 관찰되었다. 하지만 통계적으로 유의미하지는 않았다(Fig. 1).

SH-SY5Y cell에 각각 20, 50 μ g/ml의 蓮根 추출물을 30분 전에 전 처리한 후 A β_{25-35} 를 처리하고 24시간 지난 후 MTT 방법으로 세포 생존율을 관찰하였다. A β_{25-35} 만을 처리한 세포보다 蓮根추출물을 처리한 세포에서 생존율이 높았고 농도는 20 μ g/ml보다 50 μ g/ml에서 높은 생존율이 관찰되었다. 실험그룹들의 부적 통제집단과의 차이는 통계적으로 유의미하였다(Fig. 2).

SH-SY5Y cell에 蓮根 추출물을 각각 20, 50 μ g/ml의 농도로 30분 전에 전 처리 후 200 μ M의 H₂O₂를

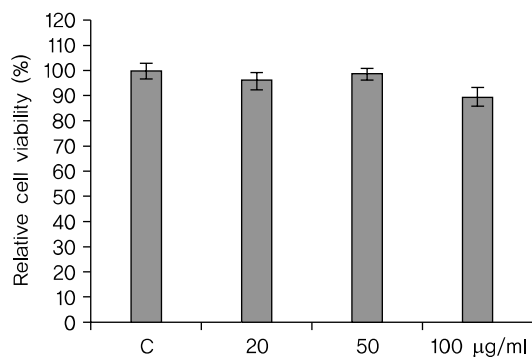


Fig. 1. The cytotoxic effect of LRE in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of LRE for 24 hours. Cell viability was determined by the MTT assay. Values are mean \pm S.D. (n=6).

LRE: Lotus Root Extract, MTT: tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, S.D: standard deviation, C: control group.

처리하고 24시간이 지난 후에 MTT 방법으로 세포 생존율을 관찰한 결과 H₂O₂만을 처리한 SH-SY5Y cell의 세포 생존율보다 蓮根추출물을 처리한 세포의 생존율이 높았고 농도는 20 μ g/ml보다 50 μ g/ml에서

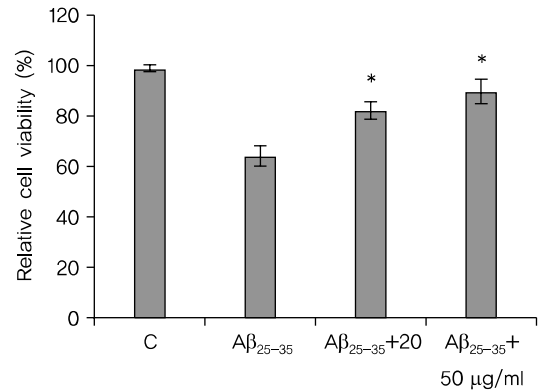


Fig. 2. Protective effect of lotus root on the A β_{25-35} induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were pretreated with B extract (20 or 50 μ g/ml) for 0.5 hour before exposure to A β_{25-35} (20 μ M) for 24 hours. Cell viability was determined by the MTT assay. Values are mean \pm S.D. (n=6). *p<0.05 vs A β .

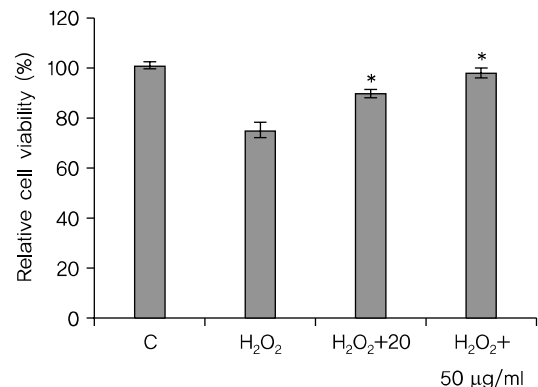


Fig. 3. Protective effect of LRE on the H₂O₂ induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were pretreated with B extract (20 or 50 μ g/ml) for 0.5 hour before exposure to H₂O₂ (200 μ M) for 24 hours. Cell viability was determined by the MTT assay. Values are mean \pm S.D. (n=6). *p<0.05 vs A β .

LRE: Lotus Root Extract, MTT: tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, S.D: standard deviation, C: control group.

세포생존율이 높았다. 실험그룹들의 부적 통제집단과의 차이는 통계적으로 유의미 하였다(Fig. 3).

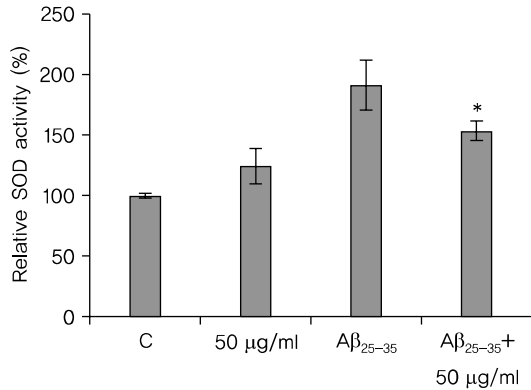


Fig. 4. Inhibitory effects of LRE on the Aβ₂₅₋₃₅-induced SOD activation in SH-SY5Y cells. The cells were treated with B for 30 min before 20 µM Aβ₂₅₋₃₅ stimulation. SOD activity was measured by the chromagen concentration after 20 µM Aβ₂₅₋₃₅ stimulation for 24 h. Values are indicated as the mean ± S.D. *p<0.05 vs Aβ.

LRE: Lotus Root Extract, SOD: superoxide dismutase, S.D: standard deviation.

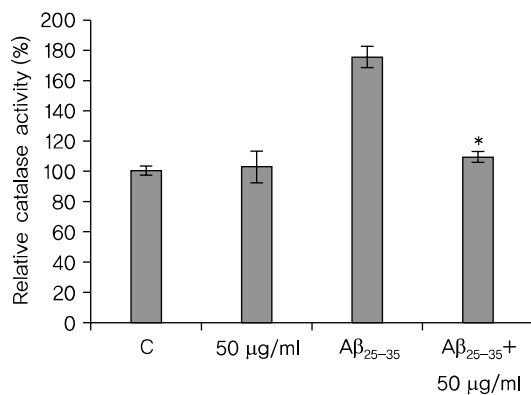


Fig. 5. Inhibitory effects of LRE on the Aβ₂₅₋₃₅-induced Catalase activation in SH-SY5Y cells. The cells were treated with B for 30 min before 20 µM Aβ₂₅₋₃₅ stimulation. Catalase activity was measured by the quinoneimine dye concentration after 20 µM Aβ₂₅₋₃₅ stimulation for 24 h. Values are indicated as the mean ± S.D. *p<0.05 vs Aβ.

LRE: Lotus Root Extract, S.D: standard deviation.

2. 항산화 효소 활성 측정

SH-SY5Y cell에 50 µg/ml 蓮根추출물을 30분전에 전 처리 후 20 µM Aβ₂₅₋₃₅로 24시간 동안 자극을 준 후 Superoxide dismutase (SOD)의 활성을 chromagen concentration으로 측정하였다. Aβ₂₅₋₃₅만 처리한 세포의 SOD활성보다 50 µg/ml의 蓮根추출물로 처리된 세포의 SOD활성이 더 낮았다. 실험그룹의 부적 통제집단과의 차이는 통계적으로 유의미 하였다 (Fig. 4).

카탈라제 활성은 Aβ₂₅₋₃₅만 처리한 세포의 경우보다 50 µg/ml의 蓮根추출물에 전처리 후 Aβ₂₅₋₃₅의 자극을 받은 경우 통계적으로 유의하게 저해되었다 (Fig. 5).

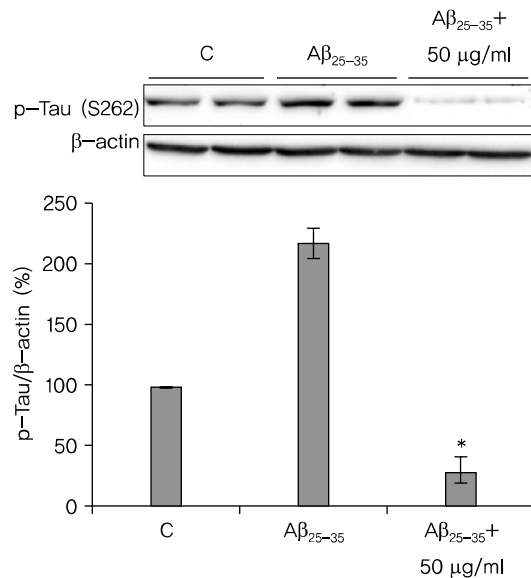


Fig. 6. Effect of LRE on Tau in Aβ₂₅₋₃₅ induced SH-SY5Y cells. The cells were treated with 50 µg/ml of B and 20 µM of Aβ₂₅₋₃₅ for 6 h and then measured Tau phosphorylation by immunoblotting. The intensity of the phosphorylated Tau bands was quantitated by densitometry and normalized versus β-actin. The data are expressed as the mean ± S.D of three experiments. *p<0.05 vs Aβ alone.

LRE: Lotus Root Extract, S.D: standard deviation.

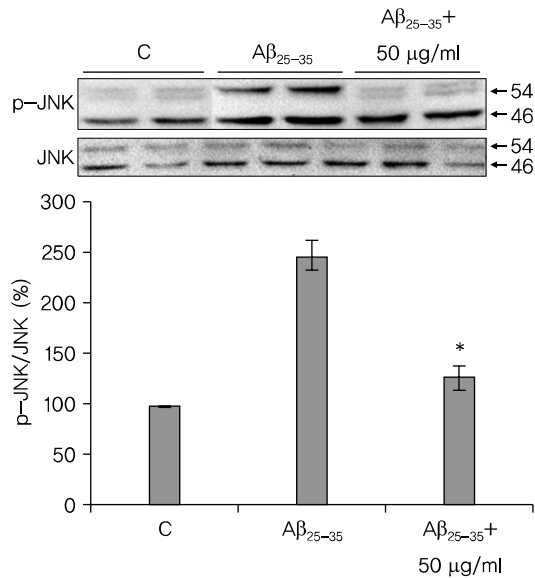


Fig. 7. LRE treatment inhibits Aβ₂₅₋₃₅-induced JNK phosphorylation in SH-SY5Y cells. The cells were treated with 50 μg/ml of B and 20 μM of Aβ₂₅₋₃₅ for 6 hour and then measured JNK phosphorylation by immunoblotting. The intensity of the protein bands was quantitated by densitometry and the amounts of phosphorylated JNK was normalized versus total JNK band. Values are mean±S.D. (n=3). *p<0.05 vs Aβ alone. LRE: Lotus Root Extract, S.D: standard deviation, JNK: c-Jun N-terminal kinases.

3. 신경세포 사멸 억제 기전 연구

SH-SY5Y cell에 50 μg/ml의 蓮根추출물로 처리 후 20 μM의 Aβ₂₅₋₃₅로 6시간 자극을 준 후 면역학적 블로팅법으로 검사하였더니 Tau의 인산화가 통계적으로 유의하게 저해되었다(Fig. 6).

SH-SY5Y cell에 50 μg/ml의 蓮根추출물을 처리 후 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하고 6시간 후에 세포를 회수하여 JNK의 인산화를 면역학적 블로팅법으로 관찰하였다. 아무런 약제를 처리하지 않고 Aβ₂₅₋₃₅만을 처리한 세포에서 JNK의 인산화는 대조군에 비해 2.5배 이상 증가하였으나 蓮根 추출물을 처리한 세포는 JNK의 인산화가 약 1.3배로 저해되었다(Fig. 7).

SH-SY5Y cell에 50 μg/ml의 蓮根추출물을 처리

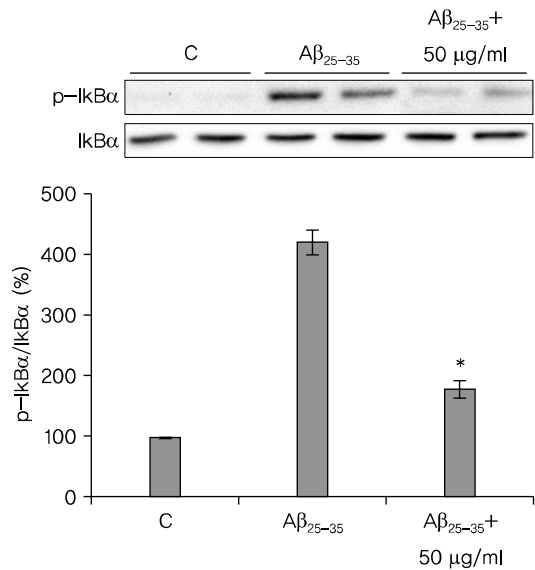


Fig. 8. LRE treatment inhibits Aβ₂₅₋₃₅-induced IκB phosphorylation in SH-SY5Y cells. The cells were treated with 50 μg/ml of LRE and 20 μM of Aβ₂₅₋₃₅ for 6 hour and then measured IκB phosphorylation by immunoblotting. The intensity of the protein bands was quantitated by densitometry and the amounts of phosphorylated IκB was normalized versus total IκB band. Values are mean±S.D. (n=3). *p<0.05 vs Aβ alone.

LRE: Lotus Root Extract, S.D: standard deviation.

후 20 μM Aβ₂₅₋₃₅로 자극을 준 후 6시간 후에 세포를 회수하여 IκB alpha (IκBα)의 인산화를 면역학적 블로팅법으로 관찰하였다. SH-SY5Y cell에 Aβ₂₅₋₃₅를 처리한 세포는 세포내 IκBα의 인산화가 4.2배 이상 증가하게 되었고 蓮根 추출물을 처리한 SH-SY5Y cell에 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하면 이러한 증가가 약 1.9배 정도로 감소하였다(Fig. 8).

IV. 고찰

AD는 초로기 또는 노년기에 발생하는 원인 불명의 진행성 치매를 초래하는 질환으로서 65세 이상의 인구 중 약 8%가 발병하는 것으로 알려져 있다. 평균 수명 연장 및 출산율감소의 특성으로 대변되는 고령 사회의 도래로, 65세 이상의 인구 비율은 현재 점점

증가하는 추세이며 가까운 미래에는 환자의 수가 폭증할 것으로 예측된다. 2000년에는 7.2%였던 비율이 2019년 14.4%로 2026년에는 20%로 증가하여 초고령 사회로 진입하게 될 것으로 관측하는데, 이와 같은 노인 인구의 증가로 AD환자 또한 증가할 것으로 예측할 수 있다^{1,3)}.

임상 증상으로는 진행성 치매를 들 수 있으며, 초기부터 뚜렷한 기명장애, 기억장애, 방향상실을 보이고, 실독, 실인, 실행, 공간 지남력 상실 등이 나타나게 된다. 환자는 서서히 기억력이 감퇴하고 언어구사 및 다른 사람들과의 대화가 힘들어지며 점차 간단한 일상 업무 수행이 어려워진다. 그리고 시간, 장소에 대한 개념이 흐려지는데 특히 공간의 분별력이 나빠지고 자신이 잘 알고 있던 장소조차 기억하지 못하게 된다. 학습을 통한 새로운 지식을 습득이 어렵고 어떤 일을 미루어 생각하거나 판단하는 능력이 떨어지는 것은 물론 간단한 계산조차 못하게 된다. 병이 더 진행되면 성격변화를 동반한 행동심리 증상이 나타나며 결국에는 아주 단순한 일상생활능력마저 유지하기 힘들고 자기 자신을 돌보지 못하게 되어 대소변도 가리지 못하게 될 수 있다^{2,3)}.

환자의 뇌를 살펴보면, 신경반과 신경원섬유농축이 특징적으로 나타나게 되는데, 신경반은 독성단백질인 A β 가 신경세포 밖에 응결되고 그 바깥쪽에 신경교세포, 미세아교세포, 성상세포 등 염증세포들이 둘러싸서 모여 있는 것이다. A β 는 신경세포 퇴행을 유도하는 독성 단백질로 응집된 A β 에 의해 염증반응, 산화성손상, 신경전달물질 분비 이상 등 일련의 반응들이 연쇄적으로 증폭되어 신경세포퇴행이 일어나 AD의 주요원인으로 여겨지고 있다. 신경원섬유농축은 과인산화된 타우단백이 타우단백 응집체로 생성된 것으로, 신경원섬유농축이 생성되면 정상 미세소관의 구조가 파괴되고 축삭 수송(axonal transport)이 이루어지지 못하게 되어 신경세포의 기능 장애가 일어나고 나아가 사멸을 유발된다고 여겨지고 있다²⁾.

AD의 발병원인으로는 아밀로이드 증폭가설(amyloid cascade hypothesis), 타우농축체가설(tau-tangle

hypothesis)이 두 축을 이루고 있고 그 외 콜린성 가설, 신경염증가설(neuroinflammation hypothesis), 그리고 혈관성 치매가 동반하는 복합성 치매를 의미하는 혈관가설 등이 발병원인을 설명하고 있다²⁾.

AD의 원인은 독성단백질인 A β 가 뇌에 축적되어지고 이것에 의한 신경세포사멸이 일어난다고 보는데¹⁾ A β 는 AD환자의 뇌에서 발견되는 신경반점의 주성분으로 β , γ -secretase가 아밀로이드 전구단백(amyloid precursor proteins, APP)을 분해하여 생성되는 39~43개의 아미노산으로 구성된 펩티드이다. β -secretase에 의해 A β 의 N-단 부분이 절단되고, γ -secretase에 의해 C-단 부분이 절단되면 A β_{40} , A β_{42} 가 생성된다. 42개의 아미노산으로 구성된 A β_{42} 가 AD환자의 신경반에 많이 있고 원섬유를 잘 형성하고 신경독성도 가장 강하다^{2,6)}.

A β 가 신경반에 축적되면서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 산화적 스트레스를 주고 이로 인해 산화적 손상을 일으켜 세포사멸을 일으키게 된다^{2,16-19)}. 이런 일련의 반응들이 연쇄적으로 증폭되어 신경세포퇴행이 일어나며 이로 인해 치매증상이 나타나게 된다는 설이 아밀로이드 증폭가설이다²⁾. ROS는 superoxide radical ($-O_2$), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl radical ($-OH$) 등이 있는데, 산화적 스트레스를 주고, 산화적 손상을 일으켜 세포사멸을 일으킨다^{20,21)}.

뇌의 95% 이상은 지방으로 구성되어 있어 이런 ROS의 공격을 받으면 산화되는데, 이러한 손상으로 유발된 순차적 신호전달에 의해 세포사멸이 일어난다¹⁸⁾. 이와 같은 ROS에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 효소계 항산화제로는 superoxide dismutases (SOD), Catalase, peroxidase, glutathione 등이 있다²²⁾.

SOD는 생명체가 산소를 소비하는 호흡과정에서 발생하는 초과산화음이온(Superoxide anion)을 산소(O_2)와 과산화수소(H_2O_2)로 불균등화하는 반응을 촉매함으로써 세포를 보호하며²³⁾ 이렇게 하여 생성된 과산화수소는 Catalase나 glutathion peroxidase에

의해 제거될 수 있다²⁴⁾.

타우농축체가설(tautangle hypothesis)은 신경세포에 존재하여 미세소관과 결합하는 단백질인 Tau이 과인산화되어 신경세포의 기능을 잃어버리고 세포 내에 신경원섬유농축(neurofibrillary tangle; NFT)이라는 타우단백의 응집체를 만들어 세포사(cell death)를 유도한다는 설이다²⁾. Tau의 주요 기능은 단백질 내 여러 serine 또는 threonine 위치의 인산화와 탈인산화의 균형 조절을 통하여 미세소관의 안정성을 조절하는 것인데 과인산화되면 정상 미세소관의 구조가 파괴되고 축삭 수송(axonal transport)이 이루어지지 못하게 된다는 것으로 점차적으로 신경세포 기능 장애가 일어나고 나아가 사멸을 유발한다^{2,25)}. 현재 비정상 타우단백의 생성을 억제하는 GSK-3 β 억제제, cdk-5억제제도 개발되고 있다²⁾.

신경염증가설은 미세아교세포, 정상세포들의 활성화에 따른 염증반응에 의해 신경세포사멸이 이루어진다는 설이고 혈관가설은 혈관성 위험요소들에 의해 신경세포 퇴행이 유발된다는 설이다²⁾.

NF κ B는 신호전달체계의 자극을 받아 세포 생존과 증식에 필수적인 것으로 알려져 있다²⁶⁾. NF κ B의 활성화에 필수적인 I κ B α 의 분해는 I κ B의 인산화에 의존하고 NF κ B의 활성은 I κ B α 의 인산화를 막음으로써 조절되는데²⁷⁾, NF κ B는 염증과 세포사멸에 관여하는 전사인자(transcription factor)로 자극을 받지 않은 경우에는 불활성형으로 NF κ B가 I κ B라는 억제단백질과 복합체를 형성하여 세포질 내에 머물지만 세포의 자극을 받으면 I κ B는 인산화되어 I κ B가 파괴되고 NF κ B는 핵 내로 들어가 활성형이 되고 전사에 관여하게 된다. 이후 염증관련인자들이 활성화되어 세포사멸을 촉진시키게 된다²⁸⁾.

JNK는 MAPKs (Mitogen-activated protein kinase)의 하나로, MAPKs는 세포증식, 분화, apoptosis와 같은 다양한 세포반응들의 조절에 관여하는 serine/threonine kinase이다²⁹⁾. JNK는 화학적, 또는 환경적 스트레스에 대한 반응에 의해 활성화되고, 종종 apoptosis의 유도에 관련되어 있다.

한의학에서는 치매를 呆病 健忘 癡狂을 근거로 변증시치를 한다. 明代 張⁴⁾은 〈景岳全書·雜證謨〉의 癡狂痴獸에서 痴獸를 최초로 언급하였다. 病因으로 “痴獸證 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮或以疑貳 或以驚恐而漸致痴獸”라 하여 情緒상의 문제로 보았고 病理로 “脈必或弦或數 或大或小 變易不常 此其逆氣在心 或肝膽二經 氣有不清而然”이라 하여 逆氣가 心에 있거나 肝膽二經의 氣不清을 원인으로 보았다. 증상은 “言辭顛倒 舉動不經 惑多汗惑善愁 其證則天奇萬怪 無所不至”로 인격의 변화와 행동 이상에 대하여 언급을 하였으나 기억장애에 대한 구체적인 언급은 없다. 치료는 胃氣와 元氣의 強弱으로 可治와 不治로 나눌 수 있으며 大驚으로 인한 경우 신속히 元氣를 회복하여야 한다고 하였다.

清代 陳⁵⁾은 〈石室秘錄〉에서 “胸腹之中 無非痰氣 故癡呆無奇法 治痰則癡呆也”라 하여 胸中の 痰과 “內鬱抑不舒 憤怒而成者有之”라 하여 情緒의 불균형을 呆病의 원인으로 보았고 증상은 “呆病如癡 而默默不言也 如饑而悠悠如失也 意慾癡而不能心慾狂而不敢 有時睡數日不醒 有時坐數日不眠 有時將己身衣服密密縫補 有時將他人物件深深藏藏掩 與人言則煎語而神遊 背人言則低聲而泣訴 與之食則厭薄而不吞 不與食則吞炭而若快”라 하여 치매와 유사한 증상을 언급하였다. 치료로서 “無非痰氣 故治呆奇法 治痰即治呆也”라 하여 治痰의 중요성을 강조하였다.

〈辨證奇聞〉⁶⁾에서 “人有終日不言不語 不飲不食 忽笑忽歌 忽愁忽哭 與之所饑則不受 與之糞穢則大喜 與之依不服 與之草木之葉則又大喜 人以爲此呆病不必治也”라 하여 병진과 다른 성격과 인격의 변화에 대해서 서술하였고 “終日 閉戶獨居 口中喃喃 多不可解 將自己衣服 鍼線蜜蜂 與之飲食 時而用 時而不用 嘗有數日 高腹 而不呼飢餓者 見炭最善 食之如爽口之物 人皆棄之” 외부환경과의 소외, 언어곤란, 식사상태변화 등에 관해 언급하였다. 병리로는 肝氣鬱滯와 胃氣衰退가 원인이 된 胸中の 痰이 積滯되는 것을 언급하고 치법으로 開氣鬱結 逐其痰 健其胃을 제시하였다. 清代 王⁷⁾은 〈醫林改錯〉에서 “靈機記性不在心在腦”라

하여 精神思惟活動이 腦에 의해 이루어짐을 인식하였고, “小兒無記性者 腦髓未滿 高年無記性者 腦髓漸空”이라 하여 老年虛衰로 인해 腦髓가 空虛하게 되면 呆病에 걸릴 수 있음을 설명하였다.

蓮根은 藕 또는 藕根 光藕節 藕節疤라고도 한다. 性味는 甘澀 平하고 歸經은 心胃肝經이며 止血, 瘀血을 제거하는 효능이 있어서 衄血, 吐血, 咯血, 尿血, 便血, 血痢, 血崩 등 각종의 出血 증후에 사용할 수 있으나 藥力이 완화하므로 佐藥으로서 사용하는 경우가 많은 약제이다⁸⁻¹¹⁾.

최근까지의 蓮根에 관한 연구를 살펴보면 蓮根은 藥食同原이라는 말처럼 약재뿐만 아니라 만두피, 청포묵, 떡 같은 식품으로도 연구가 많이 되어 왔다³⁰⁻³²⁾. 歸經이 腎으로 언급되어 있지는 않지만 급성신부전³⁴⁾과 만성신부전³⁴⁾, 신독성³⁵⁾에서 효과가 보고되었고 콜레스테롤혈증³⁶⁾의 효과 및 항당뇨활성성분³⁷⁾에 대해서도 보고되었다. 蓮根은 뇌와 뇌혈류에 관한 연구도 꾸준히 있어 왔는데 스트레스 실험¹²⁾에서는 혈청 내 ALT감량으로 간보호에 대한 효과뿐만 아니라 뇌조직내 noradrenalin 증가와 혈청 corticosterone 감소도 보고되었고, 뇌혈류역학에 미치는 효과²⁴⁾, 국소 뇌혈류량에 조절효과²⁵⁾가 있다는 보고도 있었다.

AD의 한의학적 병리기전이 本虛表實로서, 노쇠로 인한 肝腎기능 저하를 바탕으로 痰飲이나 瘀血이 저체되어 뇌의 퇴행적인 변화가 온 것이다. 따라서 기존에 연구된 蓮根의 신경보호효과와 타우와 A β , 활성산소를 瘀血로 착안하여 지혈시키거나 瘀血을 제거하는 등 혈행의 흐름을 원활하게 해 줄 수 있는 蓮根이 AD에 유의한 효과가 나타날 것이라 사료되었다. 최근 AD치료제로 아밀로이드 생성을 저지하거나 파괴하고 혹은 독성저지 효과를 가지는 A β 합성효소 억제제와 아밀로이드 백신의 개발이 이루어지고 있다^{1,2)}. 본 연구에서는 A β 로 유도되는 세포 독성실험에서 蓮根추출물로 실험한 SH-SY5Y cell의 세포생존율이 대조군에 비해 높게 관찰되었다. 이것은 蓮根추출물이 A β 로 유도되는 세포사멸을 억제함을 시사한다(Fig. 2).

산화적 스트레스에 대한 蓮根 추출물의 세포보호 효과를 관찰한 결과 H₂O₂로 독성을 유발시킨 대조군의 세포 생존율이 75.4%에 비해 50 μ g/ml의 蓮根추출물로 전처리한 SH-SY5Y cell은 세포생존율이 98.24%로 증가하였다(Fig. 3). A β 의 독성기전 중 하나는 ROS의 영향으로, 항산화 효소(Superoxide dismutase; SOD)의 활성실험결과 A β ₂₅₋₃₅에 의해 SH-SY5Y cell SOD의 활성이 대조군에 비해 2배 정도 증가되었으나 蓮根 추출물에 의해 SOD의 활성이 47% 저해되었다(Fig. 4). 또한 Catalase의 활성을 측정한 결과 A β 에 의해 약 177% 정도 증가하였으나 蓮根 추출물에 의해 통계적으로 유의하게 Catalase의 활성이 저하되었다(Fig. 5). 이는 蓮根추출물이 항산화효과를 가지는 것으로 산화적 스트레스로 유발되는 세포 사멸을 억제시킬 수 있음을 시사한다.

蓮根추출물이 Tau의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 결과 蓮根추출물은 Tau의 인산화를 저해시킴을 확인하였다. A β ₂₅₋₃₅ 처리한 SH-SY5Y cell에서 Tau의 인산화는 대조군에 비해 약 2.2배 증가하였는데, 蓮根추출물로 처리 후 A β ₂₅₋₃₅ 처리한 군에서는 약 0.3배로 감소하여 대조군보다 저해되었다(Fig. 6). 이는 Tau의 인산화 증가로 유도되는 AD의 치료 및 예방에 있음을 시사한다.

蓮根추출물이 JNK의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 결과 蓮根추출물은 JNK의 인산화를 저해시킴을 확인하였다. 이것은 세포사멸시 발생하는 산화적 스트레스를 억제시키고, 그 이후의 신호전달 체계인 JNK의 활성을 저해함으로써 세포사멸을 억제시킴을 시사하는 것이다.

蓮根 추출물이 I κ B α 의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 세포내 I κ B α 의 인산화증가가 저해되었는데(Fig. 8), 이러한 결과는 蓮根 추출물이 NF κ B가 활성화를 막아 세포사멸을 억제함을 의미하고, 蓮根추출물이 A β ₂₅₋₃₅에 의한 세포 독성을 감소시킬 때 p75-neurotrophin receptor (p75NTR)를 통한 NF κ B의 신호전달 체계에도 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 차후 어떠한 기전으로 I κ B α 의 인산화를 저

해시켰는지에 관한 추후 연구가 더 필요하다고 사료된다.

이상의 결과는 蓮根추출물이 신경세포보호효과, 항산화효과, 항인산화효과를 나타낸다. 이는 A β 및 Tau로 야기되는 AD환자의 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있는 신약개발에 대한 in-vitro 실험으로 향후 형질변환 백서에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

IV. 결론

AD를 유발하는 A β ₂₅₋₃₅로 처리된 SH-SY5Y cell에서 蓮根추출물의 신경세포 보호효과를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H₂O₂로 세포독성을 일으킨 SH-SY5Y cell에서 산화적 스트레스로 유발되는 세포사멸을 억제함을 나타냈고, 50 μ g/ml 蓮根추출물로 전 처리된 cell이 20 μ g/ml 蓮根추출물로 전 처리된 cell보다 더 유의한 세포보호효과를 나타내었다.

2. A β ₂₅₋₃₅로 세포독성을 일으킨 SH-SY5Y cell의 SOD활성에 대한 억제효과를 보는 실험에서 활성산소를 떨어뜨리는 효과를 나타내었다.

3. A β ₂₅₋₃₅로 유도된 Catalase 활성의 억제효과를 보는 SH-SY5Y cell의 실험에서 활성산소를 감소시키는 효과를 나타내었다.

4. A β ₂₅₋₃₅에 의해 발생하는 타우의 인산화에 대한 SH-SY5Y cell의 실험에서 유의한 항인산화효과를 나타내었다.

5. A β ₂₅₋₃₅에 의해 발생하는 JNK의 인산화에 대한 SH-SY5Y cell의 실험에서 유의한 항인산화효과를 나타내었다.

6. A β ₂₅₋₃₅로 의해 야기된 IKK의 인산화에 대한 SH-SY5Y cell의 실험에서 유의한 항인산화효과를 나타내었다.

7. 신경세포 사멸 억제 기전은 A β 에 의해 발생하는 세포사멸에 대해 산화적 스트레스 억제와 그 이후의 신호전달 체계인 JNK의 활성을 저해함으로써 억제하는 것으로 사료된다.

References

1. Ministry of Education, Development of Plant-derived Vaccine for Alzheimer's Disease; 2010:2-3, 11.
2. Korean Neurological Association, Neurology. Seoul: Koon Ja Publishing, Inc.; 2007:406-17.
3. The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry, Oriental Neuropsychiatry, 1st ed, Seoul: Jipmundang; 2007:324-33.
4. Jang GK, Gyong AK Jeon Seo, Seoul: Il Jung Sa; 1992:846.
5. Jin ST, Seoksilbirok (下), Seoul: SewanDang; 1984:316-7.
6. Jeon GH, Byunjeunggimoonjeonse, Taipei: Gandichubanshe; 1980:233-5.
7. Wang QR, Yi Lin Gai Cuo, Taipei: Taiwandongfangshudian; 1960:22-5.
8. The University of Korean Medicine Professor, Herbal Medicine, Seoul: Yonglimsa, 2000:405-6.
9. Bae GH, The Medicine Plant of Korea, Seoul: Kyohaksa; 2010:158.
10. Hwang DY, Bangyakhappyeon, Seoul: Yonglimsa; 567.
11. Kim CM, Shin MK, Lee KS, et al, Encyclopedia of Chinese Herbal Medicine, Seoul: JeongDam; 1997:3528.
12. Won HY, Kim SY, Kim EJ, et al, Effects of Nodus Nelumbinis Rhizomatis Extracts on Sociopsychological Stress in Mice, Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongshin University; 2004.
13. Lee KS, Jeong HY, Effects of Nelumbinis Rhizomatis Nodus Extract on Cerebral Hemodynamics in Rats, Korean Journal Oriental Physiology & Pathology, 2005;19(6):1546-51.
14. Kim YG, Kwon MJ, Cho SI, Effect of Nodus Nelumbinis Rhizomatis Extract on the Regulation of Regional Cerebral Blood Flow in Rats, Korean Journal Herbology, 2005;20(3):75-81.
15. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, et al, An Improved MTT Assay, J Immunol Methods, 1993; 157(1-2):203-7.
16. Araujo DM, Cotman CW, Beta-amyloid Stimulates

- Glial Cells Vitro to Produce Growth Factors That Accumulate in Senile Plaques in Alzheimer's Disease. *Brain Res.* 1992;569(1):141-5.
17. Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, et al. Amyloid Beta Peptide Potentiates Cytokine Secretion by Interleukin-1 Beta-activated Human Astrocytoma Cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(23):10738-41.
 18. Behl C, Davis JB, Lesley R, et al. Hydrogen Peroxide Mediates Amyloid Beta Protein Toxicity. *Cell.* 1994;77(6):817-27.
 19. Jang SG. *Dementia.* Shinwon, Seoul; 2004:21-2, 120-3.
 20. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: What Role Do They Play in Physical Activity and Health? *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):637-46.
 21. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):323-33.
 22. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. *Journal of Andrology.* 1995;16(6):464-81.
 23. Na JM. Characterization of Superoxide Dismutase from Cold-adapted Arctic Bacteria. Department of Chemistry, Sejong University; 2010:3.
 24. Youm JA. Effects of DNA Damage in *Escherichia coli* Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase Mutants under Oxidative Stress. Department of Biology, Graduate School, Chosun University; 2003:24.
 25. Yoon YC. Malformation of Entorhino-Hippocampal Projections Is Associated with Abnormal Phosphorylation of Tau in a Reelin-Deficient Mice. Reeler. Ajou University; 2011.
 26. Jeong CH, Jo SC, Han SH, et al. Effect of PD98059 on NF- κ B and AP-1 Expressions in HepG2 and SNU182. 8th Spring Conference Abstracts of the Clinical and Molecular Hepatology. 2002;8(3):49.
 27. Kim DK, Lee SH, Lee JH, et al. Effect of FK506 on Regulation of I κ B α and NF- κ B. 1999 Fall Conference Abstracts of the Tuberculosis & Respiratory Diseases. 1999;89(0):54.
 28. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N Engl J Med.* 1997;336:1066-71.
 29. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated Protein Kinases in Apoptosis Regulation. *Oncogene.* 2004;23(16):2838-49.
 30. Kim MA. Quality Characteristics of Mandupri Added Lotus Root Powder. Graduated School of Education, Mokpo National University; 2009.
 31. Park JH, Kim EM. Changes in the Quality Characteristics of Mung Bean Starch Jelly with White Lotus (*Nelumbo nucifera*) Root Powder Added. *The Korean Journal of Culinary Research.* 2010;16(1):180-90.
 32. Cho TO. Functional of Lotus (*Nelumbo Nucifera*) and Quality Characteristics of Korean Rice Cake Added with Lotus Powder. Dept. of Culinary & Food Service Management, The Graduate School of Sejong University; 2009.
 33. Jeong H. Beneficial Effect of Nodus *Nelumbinis Rhizomatis* Aqua-Acupuncture Treatment on Glycerol-Induced Acute Renal Failure in Rats. Dept. of Oriental Medicine, Graduate School of Dongshin University; 2006.
 34. Hong GH. Effects of *Nelumbinis Rhizomatis* Nodus (NRN) on Chronic Renal Failure in Rats. Dept. of Oriental Medicine, Graduate School of Dongshin University; 2009.
 35. Cho SI, Kim HW. Beneficial Effect of Nodus *Nelumbinis Rhizomatis* Extract on Cisplatin-Induced Kidney Toxicity in Rats. *The Korean Journal of Herbology.* 2003;18(4):127-34.
 36. Lee JJ, Park SY, Lee MY. Effect of Lotus Root (*Nelumbo Nucifera* G) on Lipid Metabolism in Rats with Diet-Induced Hypercholesterolemia. *Korean Journal of Food Preserv.* 2006;13(5):634-42.
 37. Kim JS. Anti-diabetic Constituent from the Node of Lotus Rhizome (*Nelumbo Nucifera Gaertn.*). Graduate School of Chung-Ang University; 2000.

