

玫瑰花 추출물의 아세틸콜린에스테라제, 베타 시크리타제 및 베타 아밀로이드 응집에 대한 저해효과

김효신 · 김주은 · 임재윤*

우석대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Extract of Rosae Rugosae Flos on the Acetylcholinesterase, β -secretase, and β -amyloid Aggregation

Hyo Shin Kim, Ju Eun Kim, Jae-Yoon Leem*

College of Pharmacy, Woosuk University

Alzheimer's disease(AD), one of the most common forms of dementia, is characterized pathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and deposition of β -amyloid(A β) peptides of 40-42 residues. A β has been believed to be neurotoxic and now is also considered to have a role on the mechanism of memory dysfunction. Only a few acetylcholinesterase(AChE) inhibitors have been developed for treatment of AD, although the numbers of patients are rapidly increasing within aging society. Here, we show that ethanol extract of Rosae Rugosae Flos(RR) or its butanol fraction reduce the enzyme activity of AChE and BACE1(β -site APP cleaving enzyme 1). Furthermore, We found that RR inhibits A β aggregation and removes A β aggregates by Transmission electron microscopy(TEM). In addition, RR reduces the free radical of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH). We suggest that Rosae Rugosae Flos may be useful as a herbal medicine to treat AD.

keywords : Alzheimer's disease, Rosae Rugosae Flos, Acetylcholinesterase, BACE, β -Amyloid aggregation, Antioxidant

서 론

고령화 사회로 진입한 한국의 65세 이상 노인인구 비율은 2015년 현재 약 13%이나, 2030년에는 약 24%로 국민 4명 중 1명이 노인일 것으로 예상된다. 고령화와 더불어 치매환자 수도 급속히 증가하고 있다. 이러한 현실은 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 과도한 의료비 지출로 인한 국가 경쟁력 저하에 따라 커다란 사회·국가적 문제로까지 대두되고 있다¹⁾.

癡呆(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력 저하와 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지능 장애 증상을 수반하는 증후군을 일컫는다²⁾. 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease)은 치매의 가장 주요한 발병요인으로서 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 나타나는 sporadic type이다³⁾. Familial type은 amyloid precursor protein(APP), presenilin 1(PS1), presenilin 2(PS2) 유전자의 돌연변이가 병인으로 알려져

있으며⁴⁾, sporadic type의 경우는 그 원인이 노화 및 ApoE4 대립형질의 다양성이 병인으로 보고되었다^{5,6)}. A β (β -amyloid)의 응집은 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상으로 응집된 A β 는 활성산소를 발생하고 염증반응을 일으켜 신경세포사를 유도한다. A β 는 베타 아밀로이드 전구단백질인 APP(Amyloid precursor protein)가 β -secretase(BACE, β -site APP cleaving enzyme) 및 γ -secretase에 의해 분해되어 생기는 펩티드이다. 알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin (PS), nicastrin (NCT), APH-1, PEN-2 등으로 이루어진 complex로 알려졌다⁷⁾. BACE knock-out 생쥐는 정상적으로 발육되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다⁸⁾. 최근 이와 같은 발병기전의 연구와 더불어 효소 저해제 및 A β 백신요법 등과 같은 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 임상에서는 acetylcholinesterase (AChE) 저해제가 치료개선제로서 사용되고 있을 뿐 효과적인 치료제는 없는 실정이다⁹⁻¹¹⁾. 최근에는 ibuprofen 등 항염증약물이 치매 형질전환 모델인 Tg2576 생쥐의 신경세포사를 보호하는 것으로

* Corresponding author

Jae-Yoon Leem, College of Pharmacy, Woosuk University, 443, Samnye-ro, Samnye-eup, Wanju-gun, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : jyleem@woosuk.ac.kr Tel : +82-63-290-1575

Received : 2015/12/22 Revised : 2016/02/02 Accepted : 2016/02/03

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.02.30.1.33

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

보고되었다^{12,13}).

한편, 본 연구에 사용한 玫瑰花(Rosae Rugosae Flos, 이하 RR로 약함)는 海棠花(Rosa rugosa Thunbug., 장미과)의 꽃으로서 전국의 바닷가의 모래땅이나 산기슭에 자생하며 5-8월에 홍자색의 꽃이 핀다. 玫瑰花는 理氣, 解鬱, 和血散瘀의 효능이 있으며, 肝胃氣痛, 慢性關節炎, 吐血, 咯血, 乳癰의 치료에 사용한다. 玫瑰花根은 민간에서 당뇨병의 치료에 사용해 왔으며 스트렙토조토신 유발 당뇨쥐에서 血糖降下와 지질감소에 효과가 있다고 보고되었다¹⁴). 또한 玫瑰花의 물 추출물은 안티몬 중독에 대한 해독효과가 있으며 玫瑰油는 쥐의 膽汁分泌促進작용이 있다고 알려졌다¹⁵).

본 연구는 전통약물로부터 AChE의 활성을 저해하는 약물을 선별하기 위해 국내 자생식물의 추출물을 스크리닝한 결과, 玫瑰花의 에탄올 추출물과 부탄올 분획물이 AChE를 저해하였다. 또한 다른 표적분자인 BACE에 대한 저해 활성을 나타내었으며, TEM(Transmission Electron Microscopy)을 이용한 A β 응집실험을 통해 玫瑰花의 에탄올 추출물 또는 부탄올 분획물이 A β 의 응집을 감소시키며 응집된 A β 를 분해하고 제거하는 것을 확인하였다. 더불어 DPPH에 의한 라디칼을 소거하는 활성을 나타내었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

Galantamine hydrobromide(USP, Rockville, MD, USA), Tacrine hydrochloride(Cayman, Ann arbor, MI, USA), L-ascorbic acid sodium salt(amresco, Solon, USA), β -secretase inhibitor III(Calbiochem, Darmstadt, Germany), β -amyloid(BACHEM, Bubendorf, Switzerland), DPPH(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

2. 玫瑰花 에탄올 추출물 및 용매분획물의 제조

玫瑰花 500 g을 선운산야생꽃차(주)로부터 공급받아 실온에서 하루 말리고 55°C에서 6시간동안 건조하여 습득한 47 g의 약재에 470 mL의 70% 에탄올을 첨가하여 70°C에서 5시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 농축하여 약 7.83 g의 에탄올 추출물(EtOH, 16.66%)을 얻었다. 추출물을 50 mL의 물에 잘 녹인 다음 순차적으로 헥산(Hex, 0.17%), 디클로로메탄(DCM, 0.08%), 에틸아세테이트(EtOAc, 0.85%), 부탄올(BuOH, 0.39%), 물(DW, 12.17%)을 50 mL 씩 넣고 각각의 용매분획물을 얻었다(Fig. 1).

3. Acetylcholinesterase 분석

Acetylcholinesterase(AChE)에 대한 저해활성은 Acetylcholinesterase Activity Colorimetric Assay 키트(BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 玫瑰花 추출물 또는 분획물을 최종농도가 1, 10, 50, 100 μ g/mL이 되도록 적당히 희석하여 96 well plate에 30 μ L 넣은 후 AChE 10 μ L와 reaction mixture 50 μ L를 넣고 37°C에서 20분 반응시켰다. 대조약물로는 1 μ M tacrine 혹은 10 μ M galantamine을 사용하고,

AChE 효소활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 AChE 저해활성을 3회 반복하여 분석한 후 통계 처리하였다.

4. BACE 분석

BACE에 대한 저해활성은 BACE-1 FRET(fluorescence resonance energy transfer) ASSAY 키트(PanVera Co, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였다. 玫瑰花 추출물 또는 분획물을 96 well plate에 최종농도가 1, 10, 50, 100 μ g/mL이 되도록 적당히 희석하여 BACE-1 기질(Rh-EVNLDAEFK quencher, in 50 nmol/L ammonium bicarbonate)과 BACE-1 효소[in 50 mM Tris(pH7.5), 10% glycerol] (1.0 U/mL)를 각각 10 μ L씩 넣은 후 실온에서 반응시켰다. 반응 1시간 후 정지액인 2.5 mol/L sodium acetate 10 μ L를 넣고 multiwell spectrofluorometer (infinite F200, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 emission 585 nm, excitation 545 nm에서 형광을 측정하였다. 이때 양성대조군은 β -secretase inhibitor III(β -SI) 10 μ M을 사용하였으며, 각 시료에 대한 BACE 저해활성을 3회 반복하여 분석한 후 통계 처리하였다.

5. A β 응집실험과 Transmission electron microscopy 분석

A β 의 응집에 미치는 영향을 분석하고자 다음과 같이 A β 응집반응을 유도한 후 Transmission electron microscopy(TEM) 분석을 수행하였다. PBS로 희석한 A β 42(20 μ M)를 상온에서 20분 동안 반응시킨 후, 玫瑰花 추출물, 분획물 또는 양성대조군인 curcumin을 각각 5 μ L(10 μ g)씩 넣고 37°C에서 0, 3, 15시간 반응시켰다. 반응이 종료된 시료 10 μ L를 400mesh Copper grids (Formvar/Carbon, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA)에 올려놓고 건조시킨 후, Milli-Q water 5 μ L로 두 번 세척하였다. Milli-Q water를 제거한 grid를 1% uranyl acetate 10 μ L로 1분 동안 염색한 후, 상온에서 15분 건조하여 FEI G2 Spirit Twin microscope(Hitachi H-7650, Japan)로 이미지를 얻었다. 이 때 각 시료 마다 3개 이상의 A β 응집체를 확보하였고 이 중 무작위로 3곳의 이미지를 선택하여 Image J2(NIH, USA)로 A β 응집정도를 정량하였다.

6. DPPH 라디칼 분석

항산화활성을 검정하기 위해 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)의 활성산소 라디칼을 측정하여 그 소거능을 분석하였다. 玫瑰花 추출물 또는 분획물을 최종농도가 1, 10, 50, 100 μ g/mL이 되도록 적당히 희석하여 96 well에 2.5 μ L씩 넣은 후 100 μ g/mL DPPH 기질용액을 247.5 μ L씩 넣고 차광하여 20분 실온에서 반응시켰다. 대조약물로는 50 μ M L-ascorbic acid(Vit.C)를 사용하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군을 100%로 하여 Microplate reader(Sunrise, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대해 DPPH radical을 3회 반복하여 분석한 값을 통계 처리하였다.

7. 통계처리

각 실험군(n=3) 간의 유의성 검정은 Student's T-test로 하였으며, P값이 0.05, 0.01 및 0.001 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

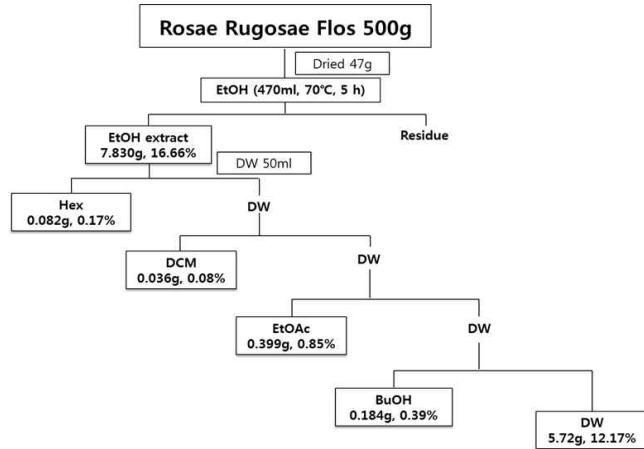


Fig. 1. Sample extraction and fractionation of RR. RR(500 g) were washed and air-dried. The dried 47 g RR were milled in blender and then extracted twice with 470 ml of 70% ethanol at 70°C for 5 h. After filtration and it was concentrated using a rotary evaporator and a vacuum drier. The EtOH extract was solved in 50 ml of DW and subjected to a series of partitioning with Hex, DCM, EtOAc, BuOH, or DW. *EtOH=Ethanol, Hex=Hexane, DCM=Dichloromethane, EtOAc=Ethyl acetate, BuOH=Buthanol, DW=Distilled water.

결 과

각 용매분획물의 AChE에 대한 저해활성을 분석한 결과, 에탄올 추출물(이하 ET로 약함)과 부탄올 분획물(이하 BU로 약함)에서 만 유의성 있는 저해효과를 보였다. 따라서 이하 결과에는 이 2가지 시료에 대해서만 기술하겠다.

1. AChE 저해 효과

각 용매분획물의 AChE에 대한 저해활성을 분석한 결과, ET 50, 100 µg/ml를 처리하였을 경우 DMSO 처리군(CON)에 비해 농도 의존적으로 각각 48.9±6.6, 72.7±2.9% 저해하였다. BU 50, 100 µg/ml에서 농도 의존적으로 각각 75±3.0, 86.1±0.6% 의 저해활성을 나타내었다. 두 시료 모두 1, 10 µg/ml의 농도로 처리 하였을 경우에는 저해활성을 관찰할 수 없었으며, 양성대조군으로 사용한 tacrine 1 µM, galantamine 10 µM 농도에서 각각 74.3±1.0%, 74.2±1.2%를 저해하였다. ET와 BU 모두 100 µg/ml 농도로 처리하였을 경우 tacrine 1 µM, galantamine 10 µM 처리 시의 AChE 저해 활성과 동일하거나 더 강한 저해 활성을 확인하였다(Fig. 2).

2. BACE 저해 효과

BACE에 대한 저해 활성을 분석한 결과, ET 1, 10, 50, 100 µg/ml를 처리하였을 경우 DMSO 처리군(CON)에 비해 각각 42.8±0.5%, 60.2±2.6%, 49.0±1.0%, 45.9±7.5% 저해하였다. BU

1, 10, 50, 100 µg/ml 농도에서 농도 의존적으로 각각 13.6±16.5%, 51.2±0.4%, 69.2±7.1%, 74.6±7.0%의 효소저해활성을 나타냈다. 양성 대조군으로 사용한 10 µM β-secretase inhibitor III(β-SI)은 30.2±8.3%의 저해활성을 나타내었다. BU 1 µg/ml을 제외한 모든 농도에서 10 µM β-SI 보다 더 강한 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3).

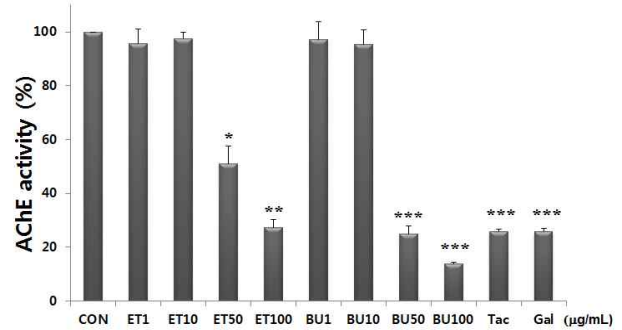


Fig. 2. Effect of ET or BU on AChE. The activity of AChE was accessed by Acetylcholinesterase Activity Colorimetric Assay. ET or BU was added to a reaction mixture containing AChE enzyme and after 20 min incubation. Galantamine(10 µM) and tacrine(1 µM) was used as a positive control. The absorbance was measured at 570 nm by using an Model 680 Microplate reader(Bio-Rad). The means±SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 CON; control, ET; Rosae Rugosae Flos EtOH extract, BU; Rosae Rugosae Flos BuOH fraction, Tac; Tacrine, Gal: Galantamin.

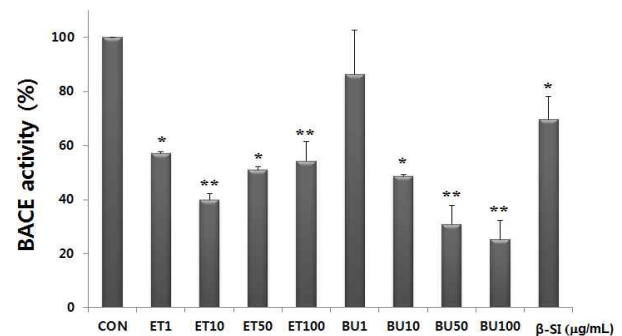


Fig. 3. Effect of ET or BU on BACE. The activity of BACE was determined by a BACE1 FRET assay. ET or BU was added to a standard reaction mixture containing 250 µM BACE substrate and 10µU of BACE1 enzyme in BACE1 assay buffer. β-secretase inhibitor III(β-SI, 10 µM) was used as a positive control. The reaction was stopped with BACE1 stop solution after 60 min incubation at room temperature. Rhodamine fluorescence was monitored on a TECAN Infinite F200 fluorometer(ex.λ =545 nm/ex.λ=585 nm). The means±SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 CON; control, ET; Rosae Rugosae Flos EtOH extract, BU; Rosae Rugosae Flos BuOH fraction, B-SI; β-secretase inhibitor III.

3. Aβ 응집 저해 효과

Aβ42의 응집에 대한 저해활성을 측정하기 위해 TEM 분석을 실시하여 각각 3개 이상의 이미지를 얻었다(Fig. 4). 이미지로부터 응집된 Aβ를 Image J2로 정량한 결과, 대조군(Aβ)의 응집정도는 시간이 0, 3, 15h 순으로 각각 2.3배, 3배로 증가하지만 ET와 BU 는 감소하는 결과를 나타냈다. 한편, 양성대조군인 curcumin의 응

집저해 효과와 비교해보면, ET 시료에서 유사한 양상으로 응집저해활성을 나타내었다(Fig. 5).

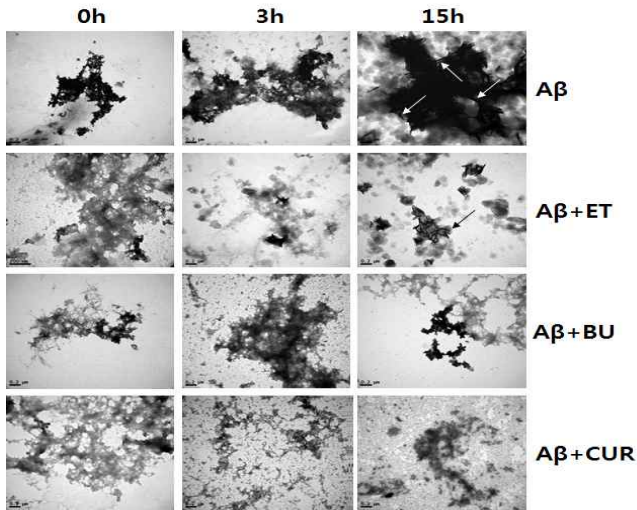


Fig. 4. Effect of ET or BU on A β aggregation and its aggregates. Diluted A β 42(20 μ M) were pre-incubated for 20 min at room temperature, and incubated for 0, 3, and 15 h with/without each 10 μ g of ET, BU, or curcumin. Aliquots(10 μ l) of 20 μ M A β 42 sample were adsorbed to carbon-coated FormVar film on 400-mesh copper grids(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 1 min at room temperature. The excess solution was removed using 3M filter paper. The grids were rinsed with 10 μ l of Milli-Q water and stained with 5 μ l of 1%(w/v) uranyl acetate for 1 min, blotted with 3M filter paper and dried for 15 min at room temperature. Each 3 images were visualized using a H-FEI G2 Spirit Twin microscope(80 kV). As shown in 15 h A β alone image(arrow), the fibrils are short and intertwined. Scale bars are 0.2 μ m, ET; Rosae Rugosae Flos EtOH extract, BU; Rosae Rugosae Flos BuOH fraction, CUR: curcumin.

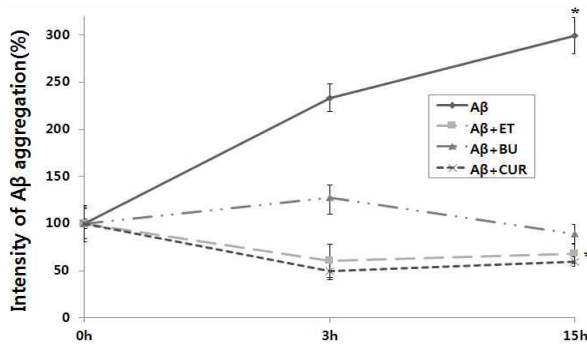


Fig. 5 Quantification of A β aggregates. Each 3 images obtained from TEM were normalized and quantified by Image J2 program(NIH). Each 0 h image is standardized as 100 % and compared to 3 h or 15 h image. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, ET; Rosae Rugosae Flos EtOH extract, BU; Rosae Rugosae Flos BuOH fraction, CUR: curcumin.

4. DPPH 라디칼 소거능

ET 처리군은 대조군(CON)에 비해 ET는 농도 의존적으로 1, 10, 50, 100 μ g/ml 처리할 경우 각각 64.5 \pm 7.5%, 88.4 \pm 0.1%, 94.7 \pm 0.9%, 97.7 \pm 4.9%를 저해하였다. BU도 농도 의존적으로 1, 10, 50, 100 μ g/ml 처리할 경우 각각 83.5 \pm 1.4%, 90.5 \pm 0.1%, 94.0 \pm 0.5%, 94.0 \pm 0.4%의 저해활성을 나타냈다. 양성 대조군으로

사용한 50 μ M Vit.C는 59.3 \pm 0.1%의 저해활성을 나타냈다. 모든 시료에서 50 μ M Vit.C 보다 더 강한 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 6).

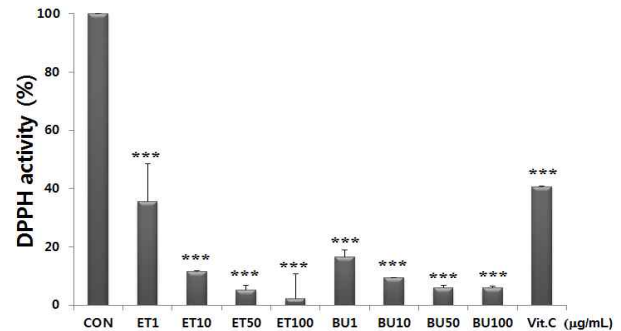


Fig. 6. Effect of ET or BU on DPPH activity. ET or BU was added to a solution of DPPH in ethanol(1.5 \times 10 $^{-4}$ M) in 96 well plates. After storing these mixtures for 30 min at room temperature, the remaining amounts of DPPH were determined by colorimetry at 520 nm on a microplate reader(Sunrise, TECAN, Mannedorf, Switzerland). And the radical scavenging activity of each sample was expressed by he ratio of the lowering of the DPPH solution in the absence of sample. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 CON; control, ET; Rosae Rugosae Flos EtOH extract, BU; Rosae Rugosae Flos BuOH fraction, Vit.C; Vitamin C.

고 찰

치매는 한의학적으로 氣虛, 血虛, 心火亢盛, 血瘀氣滯, 肝腎의 陰虛, 心肥의 兩虛, 肝鬱陽亢, 精髓의 缺乏, 濕痰의 心竅 등이 원인이 되어 나타난다고 알려져 있다. 치매의 임상적 특징은 그 병세가 완만히 진행되면서 지적 능력 상실과 함께 감정 성격 그리고 행위의 개변 상태가 동반됨으로써 健忘症이나 癡狂症 또한 虛勞 등의 증세도 포함한다. 치매치료제 개발을 위한 한약 처방 연구도 활발히 이루어지고 있는데, 健腦飲, 扶正祛邪를 위해 治呆飲, 加味神仙不老丹, 壯元丸加減方, 孔子大聖智枕中方, 半夏白朮天麻湯, 六味地黃湯, 台封飲이 있으며, 사상체질방을 활용한 연구는 調胃升清湯과 荊防地黃湯이 있다¹⁶⁾. 이중 壯元丸加減方은 APP 형질전환 초파리 모델에서의 활성연구가 보고되었다¹⁷⁾. 聰明湯加味方은 A β 의 생산과 BACE 효소활성을 억제하고 疏風順氣元 및 黃蓮解毒湯는 뇌 세포 손상에 대한 보호 효과를 나타내고 A β 로 유도된 알츠하이머 동물모델의 기억력 개선에서 荊防瀉白散壯, 獨活地黃湯, 人蔘養榮湯이 효과를 나타내는 연구도 이루어지고 있다¹⁸⁾.

현재 임상에서 사용하고 있는 치매 개선제의 표적인 AChE은 아세틸콜린을 acetate와 choline으로 분해한다. 신경세포가 손상된 치매 환자의 경우, ACh은 감소하고 AChE의 작용은 항진되어 신경전달에 이상이 생기게 된다.^{19,20)} 이러한 작용 기전에 따라 치매 환자의 인지기능을 개선하는 용도로 AChE 저해제가 개발되어 시판되고 있다.^{21,22)} 그러나 이러한 AChE 저해제들은 많은 부작용이 동반된다고 알려져 있어 천연물 유래 AChE 저해제를 찾고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다.²³⁾ Fig. 2에 보는 바와 같이, 玫瑰花 에탄올 추출물 또는 부탄올 분획물은 100 μ g/ml 농도에서 tacrine 1 μ M, galantamine 10 μ M과 동등하거나 오히려 강한

AChE 저해효과를 보였다. 향후, 유효성분이 규명되면 천연물 유래 AChE 저해약물을 개발하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 한편, ET와 BU를 제외한 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 물 분획물은 유의적인 활성이 없었다.

알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 많은 분자를 기질로 삼아 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점 때문에²⁴⁻²⁷ 치료제 개발이 어렵다. 반면, BACE를 저해하는 치료제 개발은 상대적으로 용이함에도 불구하고 아직 임상에 사용하는 치료제는 없는 실정이다. β -secretase의 일종인 BACE 1(β -site APP cleaving enzyme 1)은 신경세포에 높은 농도로 분포한다. 이 BACE 1이 뇌신경세포에서 과다발현 됨으로써 A β 가 과다생성 되고 노인반이 형성 된다²⁸. 이 효소에 대한 저해제로 AZD3293, CTS-21166, E2609, HPP854, LY2886721, MK-8931, PF-05297909, RG7129, TAK-070 등이 최근 phase I 이상의 임상시험 중에 있다²⁹. Fig. 3에서 보는 바와 같이, BU는 BACE 활성을 농도 의존적으로 감소시켰다. ET는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 강한 저해활성을 보였으나, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 농도 의존적이지 않은 저해활성을 보였다. 이는 ET 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 이미 저해활성이 포화된 상태를 시사한다. 양성 대조군인 β -SI 10 μM 과 비교해서 모든 시료에서 더 강한 활성을 보였으며 향후, 유효성분의 규명을 통하여 단일 성분으로서의 비활성을 검증함으로써 천연물 유래 BACE 저해제 약물개발이 가능할 것이다.

지금까지 A β 의 응집에 의해 유도되는 신경세포사멸 과정에 관한 연구들이 많이 이루어져 왔지만, 이를 효과적으로 저해 하거나 신경세포를 보호할 수 있는 치료방법이 미미한 상태이다.³⁰ 따라서 A β 의 응집을 저해하거나 응집된 A β 를 분해하는 치료제를 개발하는 것 또한 중요한 전략 중에 하나이다.³¹ Fig. 4에서 보는 바와 같이, 시료를 처리하였을 때 대조군(CON)에 비해 A β 의 응집을 저해하거나 이미 응집된 것을 분해하는 것으로 해석할 수 있다. 즉, ET 처리 후 0시간과 3시간에서의 응집양상을 비교할 경우, 0시간에서 응집이 일어난 것이 3시간에서 경시적으로 분해되어 간다. 이러한 양상은 curcumin 처리한 경우와 유사하여 시료 중에 들어 있는 A β 친화성 성분이 A β 와 결합함으로써 A β 의 응집을 저해하기도 하며 이미 응집된 A β 에도 높은 친화력으로 결합하여 분해하는 것으로 추론할 수 있다. curcumin의 작용 또한 A β 에 직접 결합하는 특성을 갖고 있다.³² A β 만을 15시간 배양한 이미지에서 백색 화살표로 나타난 바와 같이, A β fibril이 급격히 증가하여 서로 응집하는 반면, ET의 경우 fibril이 생기긴 하지만, 검정색 화살표로 지시한 부분에서 알 수 있듯이, 그 길이와 수는 현저히 감소한 것을 알 수 있다. BU의 경우엔 더욱 감소하였다.

서론에서 언급했다시피 최근 연구에 따르면 항염증약물을 경구 투여한 Tg2576 생쥐에서 신경세포사가 감소하는 것으로 보고되는 등 항염증약물이 치매의 치료제 후보약물로 주목받고 있다. A β 에 의한 활성산소 라디칼이 뇌의 neuronal lipids, proteins, nucleic acids에 손상을 입히므로 vitamin E, quercetin, caffeic acid 등의 항산화물질에 의해 이러한 손상을 보호하고 예방 가능할 것이다. Fig. 5에서 알 수 있듯이, ET 또는 BU가 모든 농도에서 DPPH에 의한 활성산소 라디칼을 대조군인 Vit. C보다 현저하게 감소시

켰으며, 특히 부탄올 추출물의 분석 최저농도인 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 80% 이상 라디칼 소거능을 나타냈다. 향후 항염증작용에 의한 신경세포 보호효과도 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구를 통해 玫瑰花 에탄올 추출물 및 부탄올 분획물이 치매 치료제 개발을 위한 표적분자인 AChE, BACE, A β 응집에 모두 유효한 저해활성을 나타낸다는 것을 알았다. 이상의 결과를 종합해 보면, 玫瑰花는 알츠하이머 질환의 복수의 표적에 효능을 나타내므로 치매 치료제 개발을 위한 후보약물로 응용할 수 있다고 사료된다. 향후 玫瑰花에 의한 약리활성기전을 명확히 규명하기 위해서는 cytokine 등 염증 관련분자에 대한 항염증활성, 유효성분의 규명과 동물모델에서의 기억력 개선효과의 검증도 필요하다.

결론

玫瑰花의 에탄올 추출물 및 부탄올 분획물이 AChE와 BACE의 효소활성을 저해하였다. 각각의 대조약물인 β -SI, tacrine과 galantamine과 비교하였을 때 유의적인 활성을 보였다. 또한, A β 의 응집생성을 저해하며 동시에 응집된 A β 를 분해 제거하였으며, DPPH 라디칼 활성을 감소시켰다. 이러한 결과를 종합해보면, 玫瑰花는 향후 항염증활성을 비롯하여 복수의 표적을 갖는 다기능 치매 치료제 개발을 위한 후보자원으로서 개발 가치가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 산업통상자원부 지역주력산업기술개발 사업(R0004383), 광역경제권연계협력사업(R0002019), 우석대학교 및 순창군 농·특산물 활용 식문화 융합기반 구축 사업의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1B35001
2. Iqbal, K., Sisodia, S.S. and Winblad, B. Alzheimer's disease. Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics. John Wiley & Sons, Ltd. 2001.
3. Morris, J.C. Classification of dementia and Alzheimer's disease. Acta Neurol. Scand. 165: 41-50, 1996.
4. Selkoe, D.J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol. 8: 447-453, 1998.
5. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D. and Roses, A.D. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:

- 8098-8102, 1993.
6. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923, 1993.
 7. Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: 23-31, 1999.
 8. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741, 1999.
 9. Sugimoto, H. Donepezil hydrochloride. a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* 1: 63-73, 2001.
 10. Zarotsky, V., Sramek, J.J. and Cutler, N.R. Galantamine hydrobromide. an agent for Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 60: 446-452, 2003.
 11. Jann, M.W. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.* 20: 1-12, 2000.
 12. Colin K., Combs, Derrick E. Johnson, J. Colleen Karlo, Steven B. Canndy and Gary E. Landreth. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's Disease: Inhibition of β -Amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ Agonists. *The journal of Neuroscience.* 20(2):558-567, 2000.
 13. Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A.L., Citron, M., Landreth, G. Anti-inflammatory drug therapy alters β -amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's Disease. *The journal of Neuroscience.* 23(20):7504-7509, 2003.
 14. Kim, E.J., Kim, G.Y. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of *Rosa rugosa* Radix in Streptozotocine-induced Diabetic Rats. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology.* 24(5):866-871, 2010.
 15. Park, J.H. *Medical Plants of Korea.* Shinilbooks. 1: 668, 2012.
 16. Koo, J.S., Seo, B.I., Park, J.H., Roh, S.S. Analysis of papers on Oriental herbal medicines (prescriptions and herbs) for dementia. *Kor. J. Herbology.* 25(3):131-137, 2010.
 17. Kim, S.T., Kang, H.W., Han, P.L., Cho, H.K., Kim, T.H., Lyu, Y.S., Son, H.J. Effects of Antidementia on LMK02 in APP-transgenic Fly. *J. of Oriental Neuropsychiatry.* 19(2):151-163. 2008.
 18. Kim, T.Y., Kim, C.J., Oh, J.W. The current status about Alzheimer's dementia in the journal of oriental neuropsychiatry for evidence based medicine. *J of Oriental neuropsychiatry.* 25(3):287-296, 2014.
 19. Perry, E.K., Peryy, P.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet.* 1: 8004-8189, 1997.
 20. Browen, D.M., Benton, J.S., Spillane, J.A., Smith, C.C., Allen, S.J. Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J. Neurol. Sci.* 57: 191-202, 1982.
 21. Schroder, H., Giacobini, E., Struble, R.G., Luiten, P.G., Zilles, K., Strosberg, A.D. Muscarinic cholinceptive neurons in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 27: 631-636, 1991.
 22. Polinsky, R.J. Clinical pharmacology of rivastigmine: A new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 20: 634-647, 1998.
 23. Kwak, J.H., Jeong, C.H., Kim, J.H., Choi, G.N., Shin, Y.H., Lee, S.C., Cho, S.H., Choi, S.G., Heo, H.J. Acetylcholinesterase inhibitory effect of green tea extracts according to storage condition. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41(4):435-440, 2009.
 24. Fu, H., Dou, J., Li, W., Cui, W., Mak, S., Hu, Q., Luo, J., Lam, C.S., Pang, Y., Youdim, M.B. and Han, Y. Promising multifunctional anti-Alzheimer's dimer bis(7)-Cognitin acting as an activator of protein kinase C regulates activities of alpha-secretase and BACE-1 concurrently. *Eur. J. Pharmacol.* 623(1-3):14-21, 2009.
 25. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St. George-Hyslop, P. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407: 48-54, 2000.
 26. Lee, S.F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., Yu, G. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J. Biol.*

- Chem. 277: 45013-45019, 2002.
27. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol.Chem.* 277: 39062-39061, 2002.
 28. Robert, V., Brian, D. Bennett and Safura babu-Khan. β -secretase cleavage of Alzheimer's precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 22: 735-741, 1999.
 29. Yan, R., Vassar, R. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.* 13(3):319-329, 2014.
 30. Lee, H.J., Lee, D.Y., Noh, Y.H., Yun, J.Y., Chung, Y.H., Kim, S.S., Lee, W.B. Protective Effect of Green Tea Extract on Neuronal Cell Death in Alzheimer Model using β -amyloid Peptide. *The Korean J. Anat.* 38(6):543-552, 2005.
 31. Zhao, L.N., Long, H., Mu, Y., Chew, L.Y. The toxicity of amyloid β oligomers. *Int J Mol Sci.* 13(6):7303-7327, 2012.
 32. Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., Cole, G.M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem.* Feb 18:280(7):5892-5901, 2005.