

SH-SY5Y 세포에서 도네페질과 병용투여시 신경보호 효과를 나타내는 한약재의 *in vitro* 선별 연구

송수진, 류천봉, 홍민호, 김근우, 구병수

동국대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

In Vitro Screening of Traditional Medicinal Herbs Combined with Donepezil for Neuroprotective Effects in SH-SY5Y Cells

Sue-jin Song, Quan Feng Liu, Min-ho Hong, Geun-woo Kim, Byung-soo Koo

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Received: August 30, 2019

Revised: September 9, 2019

Accepted: September 16, 2019

Correspondence to

Byung-soo Koo
Department of Oriental
Neuropsychiatry, Dongguk University
Ilsan Medical Center, 27 Dongguk-ro,
Ilsandong-gu, Goyang, Korea
Tel: +82-31-961-9140
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: koobs@dongguk.ac.kr

Acknowledgement

This work was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education [2016R1D1A1B03932530 (B.S.K.)].

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effects of donepezil and 33 kinds of herbal extract combinations in SH-SY5Y cells with A β ₂₅₋₃₅ treatment.

Methods: MTT assay was performed to measure the cell viability of each herbal extract combined with donepezil against A β -induced neurotoxicity. The most active extracts were then subjected to assess the effects on CREB phosphorylation and COX-2 expressions through the western blot analysis.

Results: There were eight herbal extracts representing significant increase on the cell viability: 1) *Erycibe obtusifolia*, 2) *Polygonum multiflorum*, 3) *Polygala tenuifolia*, 4) *Illicium verum*, 5) *Santalum album*, 6) *Loranthus parasticus*, 7) *Platycladus orientalis*, and 8) *Zanthoxylum piperitum*. Especially, when *Santalum album* and donepezil were treated together, the phosphorylation of CREB significantly increased and COX-2 protein expression was significantly inhibited.

Conclusions: Among the screened herbal extracts, combination treatment of each of the eight herbs and donepezil showed neuroprotective effects in SH-SY5Y cells. Additionally, the combination of *Santalum album* and donepezil suggested cognitive improvement by up-regulation of p-CREB and down-regulation of COX-2.

Key Words: Herbal medicine, Donepezil, Drug combinations, Alzheimer's disease.

I. 서론

치매는 후천적 뇌질환에 의한 다발성 인지장애가 일상생활의 장애를 일으키는 상태로 뇌신경의 퇴화에 의해 발생하는 임상증후군이다¹⁾. DSM-5에서는 주요 신경인지 장애(Major Neurocognitive Disorder)로 기술된 상태에 해당하며, 학습, 기억, 언어, 집행 기능, 복합적 주의, 지각-운동, 사회 인지 능력에서 현저한 장애를 초래하여 일상에서의 독립적인 활동 능력을 점진적으로 저하시키는 증상을 특징으로 한다²⁾.

가장 대표적인 치매의 원인 질환은 알츠하이머병이며 치매의 60% 이상을 차지하는데³⁾, 알츠하이머병은 베타아밀로이드(β -amyloid; A β) 단백질의 과다생성으로 인해 침착되는 아밀로이드반(amyloid plaques)이 주원인 중 하나로 알려져 있다^{4,5)}. A β 는 신경세포사멸(neuronal apoptosis)을 유도하여 신경전달물질인 아세틸콜린의 활성 상태를 저하시키는데, 그 과정에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되어 산화적 스트레스를 유발하고, 염증 반응을 통해 점차적인 시냅스 손상이 발생하여 치매 발병 기전에 영향을 미친다⁶⁾.

이에 따라 알츠하이머병에 대한 약물요법은 A β 신경독성, 신경전달물질 결핍, 산화적 스트레스, 세포손상, 염증 등과 관련된 여러 가지 경로를 표적으로 하지만, 이러한 약물은 근본적 치료제가 아닌 증상완화제로 작용한다⁷⁾. 그 중에서도 도네페질(donepezil)은 아세틸콜린분해효소(acetylcholinesterase; AChE)를 비경쟁적, 선택적으로 억제함으로써 아세틸콜린의 양을 증가시켜 알츠하이머병 증상을 완화 또는 지연시킨다⁸⁾. 그렇지만 알츠하이머병은 다양한 발병기전을 가지고 있으며, 그 중 하나의 기전만 억제해서는 의미 있는 치료 효과를 보이지 않는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

이와 같은 기존 약물의 한계를 극복하기 위해, 치매에 대한 한약의 치료 효과를 밝히려는 시도는 지속적으로 이어지고 있다. 인지기능 개선 효과를 보인 단일 한약재로는 인삼, 원지, 석창포, 천마, 은행, 황련, 황기, 작약 등이 보고되었다¹⁰⁻¹²⁾. 또한 도네페질과 한약 복합 처방의 병용 투여를 통하여 그 효능을 관찰한 연구로는 가미온담탕(加味溫膽湯)¹³⁾, 지황음자(地黃飲子)¹⁴⁾, 인삼양영탕(人參養榮湯)¹⁵⁾, 역간산가진피반하(抑肝散加陳皮半夏)¹⁶⁾ 등이 있다. 이처럼 한약재 단독 투여의 효과 또는 도네페질과 한약 복합제제의 병용 투여 효과에

대한 연구는 다양하게 진행되고 있음에도 불구하고, 도네페질과 한약 단일제제의 병용 투여 효과에 대한 연구는 상대적으로 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 기존의 선행 연구 및 문헌 고찰 논문을 바탕으로 하여¹⁰⁻¹⁷⁾ 33종의 단일 한약재를 선택하였고, A β 로 신경독성을 유도한 SH-SY5Y 세포에 단일 한약재의 추출물을 도네페질과 함께 처리하여 세포생존율을 관찰하였다. 이를 통해 개별 한약재와 도네페질의 상호 연관성과 알츠하이머병의 치료 효과에 대하여 알아보고자 하였으며, 나아가 도네페질과 병용하여 약효 상승을 기대하는 한약의 개발 가능성을 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 한약 추출물의 제조

실험에 사용된 한약은 Table 1에서 확인할 수 있으며, 태원당약업사(Daegu, Korea)에서 구입하였다. 예외적으로 백단향(白檀香)은 TFS Corporation Ltd. (Nedlands, Australia) 회사로부터 제공받은 것을 이용하였다. 추출물은 약재 100 g을 세말하여 30% 에탄올 1 L에 넣고 실온에서 30분 방치 후 100°C에서 초탕 100분 후 30% 에탄올 300 ml 추가 후 60분 재탕하여 추출액을 50 μ m에서 여과하고 여액을 -60°C 이하에서 감압 농축한 후 건조하여 건조엑스를 사용하였다.

2. 세포 실험

1) 세포배양

실험에 사용한 SH-SY5Y 세포(neuroblastoma cell line)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. SH-SY5Y 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 첨가하였고, Trypsin-EDTA (Gibco/BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2~3일마다 교환하여 주었다. 약물을 처리하기 위해 배양하고 있는 SH-SY5Y 세포주를 1×10⁵/well 의 개수로 24-well plate (Corning, USA)

Table 1. List of Tested Herbal Medicinal Extracts with Donepezil and Their Neuroprotective Effects against A β ₂₅₋₃₅-induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells

Herbs screening	Scientific name	Part used	Cell viability (%)			Characteristics	
			10 μ g/mL	50 μ g/mL	200 μ g/mL	Four properties	Five flavors
	Control		100.0 \pm 2.0				
	A β 25 μ M		76.6 \pm 4.7				
丁公藤	<i>Erycibe obtusifolia</i>	Caulis	71.5 \pm 5.0	76.9 \pm 1.5	91.0 \pm 0.3*	warm	pungent
何首烏	<i>Polygonum multiflorum</i>	Radix	73.7 \pm 5.0	70.6 \pm 0.8	93.7 \pm 2.3*	slightly warm	bitter
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Radix	69.7 \pm 4.0	77.8 \pm 2.5	69.4 \pm 2.5	slightly warm	sweet
山藥	<i>Dioscorea batatas</i>	Rhizoma	68.2 \pm 2.1	66.6 \pm 3.1	69.9 \pm 2.3	moderate	sweet
	D 5 μ M		92.4 \pm 3.8*				
	Control		100.0 \pm 3.9				
	A β 25 μ M		73.2 \pm 0.5				
胡荽	<i>Coriandrum Sativum</i>	Herba	75.3 \pm 3.7	75.6 \pm 4.3	77.2 \pm 5.2	warm	pungent
甘松香	<i>Nardostachys chinensis</i>	Rhizoma	67.8 \pm 1.2	66.0 \pm 1.6	75.8 \pm 1.3	warm	sweet
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i>	Radix	74.5 \pm 1.9	87.4 \pm 1.5**	62.4 \pm 2.4	warm	bitter
烏梅	<i>Prunus mume</i>	Fructus	73.3 \pm 2.0	70.3 \pm 1.5	71.2 \pm 0.7	moderate	sour
	D 5 μ M		90.8 \pm 3.2**				
	Control		100.0 \pm 9.7				
	A β 25 μ M		78.3 \pm 10.0				
骨碎補	<i>Drynaria fortunei</i>	Rhizoma	75.0 \pm 2.3	81.5 \pm 3.7	85.6 \pm 4.6	warm	bitter
卷柏	<i>Selaginella tamariscina</i>	Herba	73.1 \pm 8.1	74.7 \pm 6.8	90.5 \pm 7.9	moderate	pungent
大茴香	<i>Illicium verum</i>	Fructus	89.5 \pm 3.6	105.7 \pm 2.9*	102.5 \pm 5.4*	hot	pungent
射干	<i>Belamcanda chinensis</i>	Rhizoma	75.6 \pm 3.9	71.7 \pm 5.4	71.0 \pm 2.6	moderate	bitter
	D 5 μ M		95.1 \pm 3.4*				
	Control		100.0 \pm 5.9				
	A β 25 μ M		76.9 \pm 9.3				
萹撥	<i>Piper longum</i>	Fructus	77.9 \pm 3.5	80.4 \pm 1.1	78.4 \pm 6.1	severely warm	pungent
丹參	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Radix	78.9 \pm 1.5	80.4 \pm 5.1	88.5 \pm 0.7	slightly cold	bitter
當歸	<i>Angelica gigas</i>	Radix	78.6 \pm 2.7	77.5 \pm 2.3	83.9 \pm 4.5	warm	sweet
白檀香	<i>Santalum album</i>	Lignum	78.0 \pm 0.4	88.3 \pm 6.1*	108.1 \pm 3.2**	warm	pungent
	D 5 μ M		94.6 \pm 5.1*				
	Control		100.0 \pm 6.1				
	A β 25 μ M		71.2 \pm 3.0				
續斷	<i>Dipsacus asperoides</i>	Radix	77.7 \pm 1.2	79.4 \pm 4.9	76.9 \pm 5.4	slightly warm	bitter
桑寄生	<i>Loranthus parasticus</i>	Ramulus	74.6 \pm 3.3	75.2 \pm 0.6	86.0 \pm 1.2**	moderate	bitter
吳茱萸	<i>Tetradium ruticarpum</i>	Fructus	71.8 \pm 5.5	72.6 \pm 2.1	71.3 \pm 7.7	warm	pungent
龍眼	<i>Dimocarpus longan</i>	Arillus	77.6 \pm 3.4	67.3 \pm 0.4	77.3 \pm 8.4	moderate	sweet
桑白皮	<i>Morus alba</i>	Radices Cortex	72.0 \pm 2.0	73.4 \pm 1.1	73.8 \pm 4.3	cold	sweet
貝母	<i>Fritillaria cirrhosa</i>	Bulbus	69.3 \pm 4.2	67.1 \pm 4.4	70.4 \pm 5.1	moderate	pungent
地膚子	<i>Kochia scoparia</i>	Fructus	67.2 \pm 6.9	73.7 \pm 14.7	64.1 \pm 1.6	cold	bitter
	D 5 μ M		90.4 \pm 3.5**				
	Control		100.0 \pm 4.1				
	A β 25 μ M		73.9 \pm 3.2				
側柏葉	<i>Platyclusus orientalis</i>	Folium	72.4 \pm 2.0	80.4 \pm 9.5	86.4 \pm 0.6*	slightly warm	bitter
桑椹子	<i>Morus alba</i>	Fructus	71.9 \pm 7.4	64.0 \pm 4.5	78.1 \pm 6.4	cold	sweet
茯苓	<i>Poria cocos</i>	Sclerotium	75.5 \pm 13.6	67.6 \pm 3.8	66.9 \pm 3.2	moderate	sweet
兔絲子	<i>Cuscuta japonica</i>	Semen	74.3 \pm 5.3	72.8 \pm 3.0	73.8 \pm 12.3	moderate	sweet
蜀椒	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Pericarpium	73.8 \pm 7.3	77.4 \pm 15.4	95.4 \pm 4.4*	warm	pungent
艾葉	<i>Artemisia argyi</i>	Folium	68.6 \pm 0.6	74.6 \pm 13.7	71.5 \pm 7.1	slightly warm	bitter
山楂	<i>Crataegus pinnatifida</i>	Fructus	71.8 \pm 6.2	75.3 \pm 10.7	79.6 \pm 5.9	cool	sour
	D 5 μ M		94.8 \pm 5.6*				

Table 1. Continued 1

Herbs screening	Scientific name	Part used	Cell viability (%)			Characteristics	
			10 μ g/mL	50 μ g/mL	200 μ g/mL	Four properties	Five flavors
	Control		100.0 \pm 3.8				
	A β 25 μ M		69.5 \pm 2.9				
大薊	<i>Cirsium japonicum</i>	Herba	70.6 \pm 3.9	68.5 \pm 2.4	71.2 \pm 3.6	warm	sweet
小薊	<i>Cephalonoplos segetum</i>	Herba	69.4 \pm 4.7	71.9 \pm 3.6	71.6 \pm 3.5	warm	sweet
夜關門	<i>Lespedeza cuneata</i>	Herba	69.8 \pm 3.7	72.6 \pm 1.9	77.7 \pm 7.0	moderate	sweet
	D 5 μ M		87.4 \pm 5.1**				

Effects of the herbal extract with donepezil on the viability of SH-SY5Y cells with A β_{25-35} treatment. Values are expressed as percentage of control (means \pm standard error; *p<0.05, **p<0.01 vs A β 25 μ M; Student's t-test; n=3). D: donepezil.

에 옮겨주고 다음날 저녁에 FBS가 들어있지 않은 배지로 16 시간 이상 교체해 준 후 약물을 처리하였다.

2) 세포활성도 측정(MTT assay)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) 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 살아있으며 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다.

MTT assay는 우선 12 well plate에 SH-SY5Y 세포 (5×10^3 cells/well)를 12시간 배양한 후 FBS가 없는 배지로 교환하여 16시간 동안 안정화시키고, 25 μ M 농도의 A β 와 여러 농도의 약물을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 MTT 2 mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)로 용해시켜 580 nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

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

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

3. Western blot analysis

SH-SY5Y 세포는 1×10^6 /well 의 개수로 6-well plate

(Corning, USA)에 옮겨주고 약물 처리 24시간 후, 표본 완충제(62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)를 사용하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce) 법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 30 μ g을 4~12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (In-vitrogen) 전기영동법(SDS-PAGE)으로 분리되었고, 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% 탈지분유액으로 30분 이상 blocking하였다. Anti-phospho CREB, COX-2 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA), actin (Cell signaling tech. USA)과 함께 4도시에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminescence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비(LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

4. 통계처리

모든 자료는 평균값 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 표시하였고, 실험 결과에 대한 통계학적 유의성은 Student's t-test로 검증하여 p-value가 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

III. 결과

1. A β 로 유도된 신경독성에 대한 한약의 신경보호 효과

도네페질과 함께 투여된 여러 가지 한약재가 A β 로 유도된 신경세포 독성에 대해 보호 효과를 가지는지 검토하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 도네페질 5 μ M과 각각의 한약재 추출물의 농도를 각각 10, 50, 200 μ g/ml씩 조합한 복합제제를 SH-SY5Y 세포 모델에 처리하여 세포생존율을 측정된 결과, A β 로 인해 감소되었던 세포생존율이 유의성 있게 증가한 한약재는 정공등(丁公藤) 200 μ g/ml ($p < 0.05$), 하수오(何首烏) 200 μ g/ml ($p < 0.01$), 원지(遠志) 50 μ g/ml ($p < 0.01$), 대회향(大茴香) 50 μ g/ml ($p < 0.05$) 및 200 μ g/ml ($p < 0.05$), 백단향(白檀香) 50 μ g/ml ($p < 0.05$) 및 200 μ g/ml ($p < 0.01$), 상기생(桑寄生) 200 μ g/ml ($p < 0.01$), 측백엽(側柏葉) 200 μ g/ml ($p < 0.05$), 촉초(蜀椒) 200 μ g/ml ($p < 0.05$), 총 8종이었다(Table 1).

이들 8종 한약의 약용부위를 살펴보면, 줄기(caulis), 뿌리(radix), 열매(fructus), 심재(lignum), 가지(ramulus), 잎

(folium), 열매껍질(pericarpium)로 다양하다. 또한 <<본초강목(本草綱目)>>을 기준으로 기미(氣味)에 대해 분류해보면, 평(平)한 성질의 약은 상기생, 미온(微溫)한 성질의 약으로는 하수오와 측백엽이 있었으며, 온성(溫性) 약은 정공등, 원지, 백단향, 촉초가 있었고, 열성(熱性) 약은 대회향이 있었다. 한량(寒涼)한 성질의 약은 없었다. 오미(五味) 중에서는 정공등, 대회향, 백단향, 촉초가 신미(辛味)를, 하수오, 원지, 상기생, 측백엽은 고미(苦味)를 가지고 있었다.

다음으로, 도네페질과 병용 투여하였을 때 신경보호 효과에서 유의성이 나타난 한약 및 그 농도에서의 세포생존율을 재확인하여 비교하였다(Fig. 1). 이 중에서도 신경보호 효과가 있음을 가장 유의하게 보여준 것은 백단향이였다($p < 0.001$). 백단향과 도네페질의 복합 투여에 의한 효과는 도네페질 단독 처리에 비해서도 유의한 개선 효과를 보였다($p < 0.01$).

2. 백단향 및 도네페질 병용 투여가 CREB 인산화 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

백단향과 도네페질 병용 투여가 인지기능 향상 효과를 나

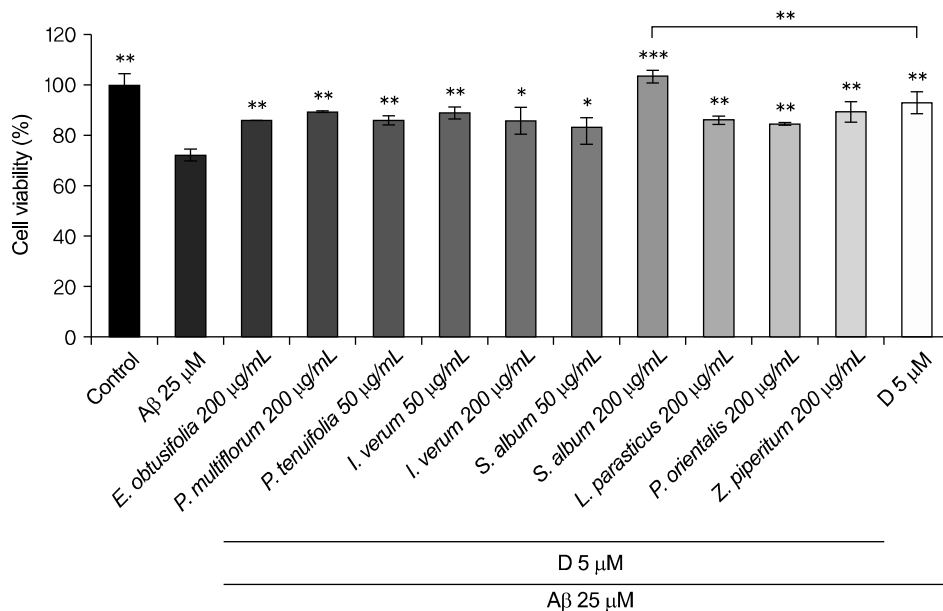


Fig. 1. Effects of the herbal extract with donepezil on the viability of SH-SY5Y cells with A β ₂₅₋₃₅ treatment. Values are expressed as percentage of control (means \pm standard error; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs A β 25 μ M; Student's t-test; n=3). E. obtusifolia: Erycibe obtusifolia, P. multiflorum: Polygonum multiflorum, P. tenuifolia: Polygala tenuifolia, I. verum: Illicium verum, S. album: Santalum album, L. parasticus: Loranthus parasticus, P. orientalis: Platycladus orientalis, Z. piperitum: Zanthoxylum piperitum, D: donepezil.

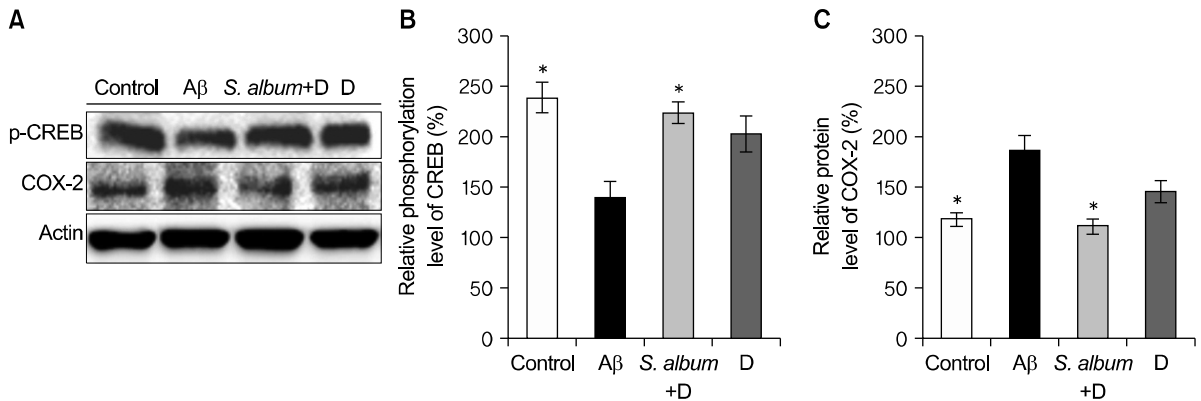


Fig. 2. Expression of p-CREB and COX-2 in SH-SY5Y cells. (A) To evaluate the protein level of p-CREB and COX-2 expression, cells were incubated with 200 μ g/ml *S. album* and 5 μ M donepezil. For the control, non-incubated cells were analyzed. The level of (B) p-CREB and (C) COX-2 in cell lysates was measured by immunoblotting.

Values represent means \pm standard error (* $p < 0.05$ vs A β ; Student's t-test; $n = 3$). A β : A β_{25-35} 25 μ M, *S. album*: *Santalum album*, D: donepezil 5 μ M.

타내는 작용 기전을 밝히기 위하여 SH-SY5Y 세포 모델에서 CREB 인산화 및 COX-2 단백질 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다(Fig. 2).

첫 번째로 신경세포 재생에 관여하는 전사인자인 cAMP 반응요소 결합단백질(cAMP response element binding protein: CREB)의 활성화를 인산화 특이 항체를 사용하여 확인하였으며, 그 결과 A β 를 처리하였을 때 인산화된 CREB의 양이 대조군에 비해 현저히 감소하였고, 이후 백단향 및 도네페질을 병용 투여함으로써 CREB의 인산화가 대조군과 유사한 수준으로 유의하게 증가하였다. 도네페질 단일 투여군에서도 CREB의 인산화가 증가하였으나, 그룹간의 통계적인 차이는 보이지 않았다.

또한 염증 인자인 COX-2 단백질의 발현 억제 효과를 실험한 결과, COX-2 단백질 발현량이 백단향과 도네페질의 병용 투여군에서 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 도네페질 단일 투여군에서는 COX-2 발현량이 소폭 감소함에도 불구하고 유의성은 나타나지 않았다.

IV. 고찰

우리나라의 65세 이상 고령자 인구는 2018년에 전체 인구의 14%를 넘어섰으며 이는 고령화 사회에 진입한 시기인 2000년에 비해서 2배 정도 증가한 수치이다¹⁸. 그 중에서도 노인의 치매 유병률은 10%에 달하여 치매는 점점 더 심각한 사회적 문제로 인식되고 있다¹⁹. 이와 같은 현실에도 불구하고

고 현대 서양의학의 약물요법은 치매의 증상 경감 등의 효과에 불과할 뿐 질병의 진행을 막지는 못하고 있다²⁰.

이러한 서양의학의 약물학적 치료 한계에 대한 대안으로 한약치료가 제시되고 있다. 치매는 한의학에서 매병(呆病), 건망(健忘) 등의 범주에 속하며, 주로 담음(痰飲)과 어혈(瘀血), 심비허(心脾虛), 심담허겁(心膽虛怯), 심신불교(心腎不交)를 원인으로 보고 할담개규(割痰開竅), 활혈화어(活血化瘀), 보익심비(補益心脾), 보익신정(補益腎精)하는 등의 치료법을 적용하고 있다²¹. 현재까지 여러 가지 한약 처방의 치매에 대한 효능을 제시하는 연구 결과들이 보고되어 왔으며, 치매 관련 생리지표에 대한 실험적 연구 결과들도 제시되어 있다²².

본 연구에서는 서른세 가지의 한약재를 사용하여 SH-SY5Y 세포 모델에서 A β 의 신경독성에 대한 한약 및 도네페질 병용 투여의 세포보호 효과를 관찰하였다. 결과적으로 A β 에 의한 세포생존율의 감소는 정공등(丁公藤), 하수오(何首烏), 원지(遠志), 대회향(大茴香), 백단향(白檀香), 상기생(桑寄生), 측백엽(側柏葉), 촉초(蜀椒)와 도네페질의 복합 투여에 의하여 유의하게 완화되었다. 이들 8종 한약의 약용부위는 다양하였으며, 기미(氣味)를 분석한 바에 의하면 평성(平性) 약재 1종, 미온성(微溫性) 약재 2종, 온성(溫性) 약재 4종, 열성(熱性) 약재 1종이 있었다. 오미(五味) 중에서는 신미(辛味) 약재 4종, 고미(苦味) 약재 4종을 확인하였다. 다른 한편으로는 본 연구에서 신경보호 활성을 나타낸 8종의 한약을 대상으로 하여 치매 또는 알츠하이머병과 관련된 연구

들을 분석하여 다음과 같이 고찰하였다.

정공등은 비증(痺證)을 치료하며, 풍사(風邪)를 몰아내는 효능이 있다. 항염증의 관점에서 보고된 연구가 있으나²³⁾, 직접적으로 치매와 관련된 보고는 없었다. 정공등에 대한 알츠하이머병 치료 효능을 보고하는 한의학적인 연구는 부족하므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

하수오는 보간신(補肝腎), 익정혈(益精血)하는 효능이 있으며, 본초 및 그 주요 성분이 치매 동물 모델에서 기억 및 인지기능을 향상시키는 것으로 입증되었다^{24,25)}. 그리고 윈지는 안신녕심(安神寧心), 거담개규(祛痰開竅)의 효능으로 심신불녕(心神不安), 경계(驚悸), 불면(不眠), 건망(健忘), 정신착란(精神錯亂) 등을 치료하는 데 활용되며, 중추신경계 질환과 인지기능 장애에 대응하는 한약 중 하나이다. 이러한 원지의 효능과 기전에 대한 연구들은 주로 알츠하이머병의 신경퇴행 과정을 기반으로 하여 수행되었다²⁶⁾. 이에 대한 결과로 A β 에 의한 신경세포 손상을 억제하며, 학습과 기억 장애를 개선하는 효능이 보고된 바가 있다.

대회향은 팔각회향(八角茴香)이라는 이름으로도 불리며, 온양산한(溫陽散寒), 이기지통(理氣止痛)의 효능이 있어 한산복통(寒疝腹痛), 신허요통(腎虛腰痛) 등을 치료하는 데 응용된다. AChE 억제 활성을 통해 알츠하이머병에 대한 잠재적인 효능을 제시한 연구²⁷⁾ 외에도 NF κ B 경로 억제를 통한 항염증 작용을 밝힌 연구²⁸⁾ 등이 보고되어 있다.

백단향은 거한(祛寒), 행기止痛(行氣止痛)하며, 조중화위(調中和胃)시키는 효능이 있어 한응기체(寒凝氣滯)로 인한 흉복동통(胸復疼痛) 등의 증상을 치료하는 데 응용된다. 백단향에는 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있으며²⁹⁾, 폴리페놀(polyphenol)은 항산화 효과를 비롯하여 항염증, 항혈전 작용 등 다양한 생물학적 효능을 지니므로³⁰⁾, 이는 백단향의 산화적 스트레스에 대한 보호 작용을 시사한다. 백단향의 AChE 억제 작용을 보고함으로써 알츠하이머병에서의 기억력 향상 효능을 확인한 연구도 있다³¹⁾.

상기생 또한 AChE 활성과 ROS 생성을 억제함으로써 알츠하이머병에 대한 기억력 개선 효과와 신경보호 효과가 밝혀져 있다³²⁾. 전통적으로는 거풍습(祛風濕), 보간신(補肝腎), 강근골(強筋骨)의 효능을 통해 풍습비통(風濕痺痛), 근골무력(筋骨無力), 요슬산연(腰膝酸軟) 등의 증상을 치료한다.

측백엽은 량혈지혈(涼血止血), 지해화담(止咳化痰)의 효능이 있어 예로부터 토혈(吐血), 변혈(便血), 폐열해수(肺熱咳

嗽) 등을 치료하는 데 사용되어 왔다. 항산화 및 항염증 효과, 항세포사멸 효과 등 다양한 약리효능이 있는 것으로 보고되었으며³³⁾, 특히 측백엽의 활성 성분 중 하나인 α -pinene은 동물 모델에서 학습 및 기억력에 대한 효과를 나타내어 인지 장애 및 신경퇴행성 질환에 대한 치료에 유용한 물질 중 하나로 제시되었다³⁴⁾.

촉초는 온중산한(溫中散寒), 제습지통(除濕止痛)의 효능이 있고 적응증은 식적(食積), 심복냉통(心腹冷痛), 풍습비통(寒濕痺痛) 등이다. 촉초에 관한 최근 국내연구는 촉초의 페놀(phenol) 성분이 신경세포 보호 및 항산화 작용을 일으킨다는 것을 보고하였다^{35,36)}. 또한 촉초에서 추출한 물질인 gx-50은 A β 로 유도된 신경세포사멸 유전자 발현을 저해하고, 신경 독성을 감소시킬 수 있음을 생체외실험을 통해 입증하였다. 더불어 생체내실험에서도 gx-50이 인지기능을 개선시키고 대뇌 피질의 A β 축적을 감소시킨다는 것을 확인함으로써 알츠하이머병 치료에 대한 가능성을 보였다³⁷⁾.

본 연구에서는 이들 한약재 중에서도 백단향과 도네페질의 병용에 대한 효능이 월등히 유의한 것을 관찰하였는데, 백단향과 도네페질의 병용은 CREB 인산화와 COX2 단백질 수준에서도 유의한 변화를 나타내었다. CREB는 뇌유래 신경성장인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)의 발현을 조절하는 전사인자로 가장 유력하게 제시되고 있으며, BDNF는 신경세포 발생 및 생존, 장기 기억력 강화, 시냅스 가소성 등과 관련되어 퇴행성 뇌질환에서 신경세포의 생존 및 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. CREB의 활성화는 백단향과 도네페질을 병용 처리한 경우 CREB의 인산화를 통하여 활성화되어 p-CREB 형태가 증가되었으며, 이는 BDNF의 발현 증가를 통한 기억력 향상 효과를 매개할 것으로 추정된다. CREB는 기억력뿐만 아니라, 우울과 불안에도 관련이 있으며³⁹⁾, 따라서 치매의 행동심리증상에도 백단향과 도네페질의 병용 투여를 고려해 볼 수 있을 것이다.

염증인자 중 하나인 COX (cyclooxygenase)는 아라키돈산(arachidonic acid)을 프로스타글란딘(prostaglandin)으로 전환하는 과정에 작용하는 효소로 COX-1과 COX-2가 존재한다. 이 중 COX-2는 염증성 자극에 의해서 그 작용이 증가하며⁴⁰⁾, 알츠하이머병의 전두엽 피질에서도 COX-2 단백질의 발현 상승이 보고되었다⁴¹⁾. 신경퇴행 및 기억력 장

애가 COX-2로 유도된 신경염증에 의해 매개된다는 보고에 근거하면⁴²⁾, COX-2의 억제에 의한 항염증 효과는 치매의 개선 효과로 이어질 수 있다. 상기 결과는 백단향과 도네페질 병용 치료의 시너지 효과를 시사하는 중요한 결과라고 할 수 있다.

알츠하이머병은 A β 가 발병에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 A β 를 통한 치매 유발 독성 실험이 다양하게 진행되고 있다. 본 연구에서 스크리닝한 한약들이 도네페질과 함께 투여되었을 때 A β 처리와 같은 치매 유발 독성에 대한 뇌신경세포 사멸을 보호하는 효과가 있다는 것은 향후 그들이 알츠하이머병의 예방 및 치료제로 이용될 가능성을 제시한다. 특히 백단향에서는 CREB 활성화와 COX-2 활성 억제에 대한 효과를 확인하여 작용 기전을 구체적으로 제시하였다. 그러나 본 연구에 포함된 실험은 *in vitro* 수준에서만 이루어졌으므로 이들 한약 효능에 대한 보다 신뢰도 높은 과학적 근거 제시를 위해서는 향후 동물 모델을 적용하여 비임상 유효성 검증이 필요할 것이다.

V. 결론

1. 도네페질과 한약 추출물을 SH-SY5Y 세포 모델에 동시에 처리하여 MTT assay를 수행함으로써 효과적인 한약재를 스크리닝하였다. 그 결과, A β 로 유도된 신경독성에 대해 정공 등, 하수오, 원지, 대회향, 백단향, 상기생, 측백엽, 축초 각각의 한약과 도네페질의 복합 투여는 신경보호 효과를 가진다.

2. 세포생존율이 A β 에 의해 감소했던 상태에서 도네페질과 한약 추출물 복합 투여에 의해 증가한 결과를 토대로, 백단향과 도네페질의 조합이 가장 효과가 우수하였다.

3. 백단향과 도네페질의 병용은 CREB 활성화 및 COX-2 활성 저해를 통해 인지기능 저하를 개선할 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

1. Ku BD, Kim SG, Lee JY, Park KH, Shin JH, Kim KK, Youn YC, Lee YM, Hong CH, Seo SW, Na DL, Kim SY, Cheong HK, Kim DK, Lee JH, Kim S, Yeon BK, Kim SY, Han SH. Clinical practice guideline for dementia by Clinical Research Center for Dementia of South Korea. *Journal of the Korean Medical Association*. 2011;54(8):861-75.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5)*. Seoul:Hakjisa. 2015:656-69.
3. Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2018;14(3):367-429.
4. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*. 2004;62(11):1984-9.
5. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2004;44(1):181-93.
6. Jang SA, Koo HJ, Kang SC, Sohn EH, Namkoong S. Effects Amyloid Beta Peptide on the Inflammatory Response in Neuronal Cells. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 2013;28(4):230-7.
7. Quinn J, Kaye J, Montine T, Stackman R. Phytochemicals in Alzheimer Disease: The Development of Clinical Trials. *Pharmaceutical biology*, 2004;42(S1):64-73.
8. Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011;8(5):581-603.
9. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*. 2012;148(6):1204-22.
10. May BH, Feng M, Zhou IW, Chang SY, Lu SC, Zhang AL, Guo XF, Lu CJ, Xue CC. Memory Impairment, Dementia, and Alzheimer's Disease in Classical and Contemporary Traditional Chinese Medicine. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2016;22(9):695-705.
11. Howes MJR, Fang R, Houghton PJ. Effect of Chinese Herbal Medicine on Alzheimer's Disease. *International Review of Neurobiology*. Academic Press. 2017;135:29-56.
12. Kumar A, Singh A, Aggarwal A. Therapeutic potentials of herbal drugs for Alzheimer's disease—An overview. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2017;55:63-73.
13. Maruyama M, Tomita N, Iwasaki K, Ootsuki M, Matsui T, Nemoto M, Okamura N, Higuchi M, Tsutsui M, Suzuki T, Seki T, Kaneta T, Furukawa K, Arai H. Benefits of combining donepezil plus traditional Japanese herbal medicine on cognition and brain perfusion in Alzheimer's disease: a 12-week observer-blind, donepezil monotherapy controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006;54(5):869-71.
14. Gu C, Shen T, An H, Yuan C, Zhou J, Ye Q, Liu T, Wang X, Zhang T. Combined therapy of Di-Huang-Yi-Zhi with Donepezil in patients with Parkinson's disease dementia. *Neuroscience Letters*. 2015;606:13-7.
15. Kudoh C, Arita R, Honda M, Kishi T, Komatsu Y, Asou H, Mimura M. Effect of ninjin'yoeito, a Kampo (traditional Japanese) medicine, on cognitive impairment and depression in patients with Alzheimer's disease: 2 years of observation. *Psychogeriatrics*. 2016;16(2):85-92.
16. Meguro K, Yamaguchi S. Decreased Behavioral Abnormalities After Treatment with Combined Donepezil and Yokukansankachimpingane in Alzheimer Disease: An

- Observational Study. The Osaki-Tajiri Project. *Neurology and Therapy*. 2018;7(2):333-40.
17. Zhu W, Hu H. A Survey of TCM Treatment for Alzheimer's Disease. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2007; 27(3):226-32.
 18. Statistics Korea. 2018 Elderly Statistics. Daejeon: Statistics Korea. 2018.
 19. National Institute of Dementia. Korean Dementia Observatory 2018. Seongnam: National Institute of Dementia. 2018.
 20. Youn HC, Jeong HG. Pharmacotherapy for dementia. *Journal of the Korean Medical Association*. 2018;61(12): 758-64.
 21. Song IG, Jo HJ. Korean Medicine Clinical Effects on Light Cognitive Impairments and Dementia of 15 Aged Men Living Alone in the Farm Village. *Journal of Korean Medical Classics*. 2013;26(3):111-26.
 22. Lim HS, Kim YJ, Kim YJ, Kim BY, Jeong SJ. Screening of 56 Herbal formulas covered by the National Health Insurance Service on Dementia-related Factors. *Journal of Korean Medicine*. 2018;39(3):1-16.
 23. Chen Z, Liao L, Zhang Z, Wu L, Wang Z. Comparison of active constituents, acute toxicity, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Porana sinensis* Hemsl., *Erycibe obtusifolia* Benth. and *Erycibe schmidtii* Craib. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;150(2):501-6.
 24. Yang X. The Effects of Refined *Polygonum Multiflorum* Thunb. Polysaccharide on Learning Memory and the Activities of Enzymes in the Brain for the Experimental Mice with Dementia. *Progress in Pharmaceutical Sciences*. 2005;29(12):557-9.
 25. Chen J, Chen Q, Wang A, Liu L. Potential Application of Tetrahydroxystilbene Glucoside in the Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Neurology Research*. 2016;2(1):203-9.
 26. Son YH, Kim SJ, Chung MC, Cho DG, Cho WS, Shin JW, Park DI, Sohn NW. Effects of *Polygalae Radix* on β -Amyloid Accumulation and Memory Impairment Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2014;29(6):73-83.
 27. Bhadra S, Mukherjee PK, Kumar NS, Bandyopadhyay A. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. *Fitoterapia*. 2011;82(3):342-6.
 28. Keum SY, Park SM, Jegal KH, Hwangbo M, Cho IJ, Park CA, Kim SC, Jee SY. Anti-inflammatory Effects of *Illicium verum* Hook. f. via Suppression of NF κ B Pathway. *Herbal Formula Science*. 2016;24(4):243-57.
 29. Kim TH. Antioxidative and Biological Activities of *Santalum album* Extracts by Extracting Methods: The Korean Society of Food Preservation. 2008;15(3):456-60.
 30. Urquiaga I, Leighton F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*. 2000;33(2):55-64.
 31. Jackson DD, Shiju L, Jebasingh D, Huxley VAJ. Memory enhancement potential of *Santalum album* extracts on albino mice. *Journal of Theoretical and Experimental Biology*. 2009;5(3/4):151.
 32. Weon JB, Lee J, Eom MR, Jung YS, Ma CJ. The Effects of *Loranthus parasiticus* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014;2014:860180.
 33. Park G., Kim HG, Ju MS, Kim AJ, Oh, MS. *Thuja orientalis* leaves extract protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity via inhibiting inflammatory action. *The Korea Journal of Herbology*. 2014;29(3):27-33.
 34. Lee, GY, Lee, C., Park, G. H., & Jang, J. H. (2017). Amelioration of Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment by α -Pinene in C57BL/6 Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017; 2017:4926815.
 35. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim DO, Heo HJ. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chemistry*. 2011;125(2):417-22.
 36. Chung JW, Oh, JU, Lee S, Kim SJ. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase-2 and Lipid Peroxidation by Methanol Extract of *Pericarpium Zanthoxyli*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(3): 369-75.
 37. Tang M, Wang Z, Zhou Y, Xu W, Li S, Wang L, Wei D, Qiao Z. A Novel Drug Candidate for Alzheimer's Disease Treatment: gx-50 Derived from *Zanthoxylum Bungeanum*. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013;34(1):203-13.
 38. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 2001;63(1):71-124.
 39. Kubota K, Fukue H, Sato H, Hashimoto K, Fujikane A, Moriyama H, Watanabe T, Katsurabayashi S, Kainuma M, Iwasaki K. The Traditional Japanese Herbal Medicine *Hachimijiogan* Elicits Neurite Outgrowth Effects in PC12 Cells and Improves Cognitive in AD Model Rats via Phosphorylation of CREB. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:850.
 40. Pairet M, Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1996;10(1):1-15.
 41. Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*. 1998;87(2):319-24.
 42. Sil S, Ghosh T. Role of COX-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroimmunology*. 2016;291:115-24.