

# 釣鈎藤 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포 상해에 미치는 영향

장현호 · 최 혁 · 양현덕<sup>1</sup> · 김상태<sup>2</sup> · 김태현 · 강형원\* · 유영수

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 1:원광대학교 산본병원 신경과, 2:주암생명공학연구소

## Effects of Ramulus et Uncus Uncariae DM fraction on CT105-injured Neuronal Cells

Hyun Ho Jang, Hyuk Choi, Hyun Duk Yang<sup>1</sup>, Sang Tae Kim<sup>2</sup>, Tae Heon Kim, Hyung Won Kang\*, Young Su Lyu

Department of Neuropsychology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
1: Department of Neurological Medicine, Wonkwang University SanBon Medical Center,  
2: JuAm of Research Institute Bioscience & Biotechnology

The purpose of this study was to estimate the effects of Ramulus et Uncus Uncariae DM fraction on CT105-injured neuronal cells. We were examined by ROS formation, neurite outgrowth assay and DPPH scavage assay. Additionally, we investigated the association between the CT105 and neurite degeneration caused by CT105-induced apoptotic response in neurone cells. We studied on the regenerative and inhibitory effects of anti-Alzheimer disease in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by REUD. Findings from our experiments have shown that REUD inhibits the synthesis or activities of CT105, which has neurotoxicities and apoptotic activities in cell line. In addition, treatment of REUD(>50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 12 hours) partially prevented CT105-induced cytotoxicity in SK-N-SH cell lines, and were inhibited by the treatment with its. REUD(>50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 12 hours) repaired CT105-induced neurite outgrowth when SK-N-SH cell lines was transfected with CT105. As the result of this study, In REUD group, the apoptosis in the nervous system was inhibited, the repair against the degeneration of Neuroblastoma cells by CT105 expression was promoted. Base on these findings, REUD may be beneficial for the treatment of AD.

Key words : Alzheimer's disease, Ramulus et Uncus Uncariae(REUD), CT105

### 서 론

痴呆는 고위 대뇌기능 장애나 진행성 뇌질환에 의해 나타나는 기억력 감퇴, 학습장애, 언어장애, 시공간기능장애, 판단력저하, 행동장애 등의 임상증상을 포괄하는 일종의 만성 진행성 정신 퇴행질환으로<sup>1)</sup>, 韓醫學에서는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에 속하며<sup>2)</sup> 明代 張景岳<sup>3)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 痴呆의 病因과 病機, 治法 그리고 豫後에 대해서 구체적으로 언급하였으며, 清代 陳士鏞<sup>4)</sup>에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 개념으로 기술되었다.

이러한 痴呆에는 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 痴

呆(이하 AD)와 腦梗塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混在된 混合型 痴呆가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다<sup>5)</sup>.

AD의 정확한 병리학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지는 않았으나, 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein (이하 APP)으로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein (이하 A $\beta$ )이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 왔다<sup>6,7)</sup>. 그러나 A $\beta$ 의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관련되어 있을 가능성이 제기되어왔다<sup>8,9)</sup>.

그래서 최근에는 AD의 발병원인으로 A $\beta$ 의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질(이하 CT105)에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 실제로 CT105를 여러 종류의 세포주에 형질전환

\* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포산본병원

· E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2762

· 접수 : 2004/09/20 · 수정 : 2004/10/27 · 채택 : 2004/11/22

시킬 경우 세포독성을 일으키고<sup>10,11)</sup>, 특히 이러한 CT105의 형질 전환시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 관심을 끌고 있다<sup>10)</sup>. 더구나 이렇게 CT105가 transfect된 세포를 실험용 백서의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고됨으로써<sup>11)</sup>, 실제 in vivo에서도 CT105가 신경독성을 일으킬 가능성이 높다는 것이 입증되었다. 또한 최<sup>12)</sup>는 CT105에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하에 기인한 것이라 하였고, 라<sup>13)</sup>는 CT105로 신경교세포가 활성화되어 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 더욱 증명해주고 있다<sup>14-19)</sup>.

최근 한의학에서도 CT105로 유도된 세포사에 대해 한약물이 갖는 억제효과를 규명하는데 초점이 이뤄지고 있는데, 이미 최 등<sup>20)</sup>과 이 등<sup>21)</sup>은 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대해서 각각 石菖蒲 수추출액과 遠志와 石菖蒲 혼합 수추출액이 세포사를 억제함으로써 항치매 효과가 있음을 입증한 바 있다.

본 연구에 사용된 釣鈎藤은 性味甘·苦·微寒·無毒하고 效能이 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩 등의 諸症狀을 치료하고<sup>22,23)</sup>, 실제 臨床에서도 高血壓性 頭昏이나 目眩 및 神經性 頭痛 등의 치료에 頻用될 뿐만 아니라 척수 및 말초신경의 손상에 의한 마비와 뇌졸중 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>22,23)</sup>. 또 釣鈎藤의 수추출물은 BAPP 과발현에서 신경세포사 억제작용을 갖고 있고<sup>24)</sup>, 백서에 경구 투여된 에틸아세테이드 분획은 항경련 작용에 도움이 된다는 사실<sup>25)</sup>이 증명되었으나, 아직 釣鈎藤의 디글로로메탄 분획에서의 항치매 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

임상에서 뇌신경계 질환에 多用되는 釣鈎藤의 메탄올 추출물 중 디글로로메탄분획(이하 REUD)의 항치매 효과를 규명하기 위하여 CT105 과발현 신경아세포종 세포주에서의 REUD의 세포사 유도 억제효과에 대한 형태학적인 변화, 신경세포의 ROS (Reactive Oxygen Species) 발생, NO (nitric oxide) 생성, 항산화반응, neuritic outgrowth 신장, 아세틸콜린에스테라제 활성반응 등을 분석하여 유의성 있는 결과를 보였기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시약

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin, lipofectin, (Gibco BRL), MeOH (Merck, Germany), MeOH, dichlorometane, Acetylcholinesterase(AChE), MTT (3-[4,5-dimethiozol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Scopolamine, Greiss reagent, sodium nitrite는 Sigma CO.사에서 구입하였고, N',N'-dimethyl formamide는 amresco사(USA), D2DCFDA(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein는 Molecular Probes에서(USA) 구입하였고 그 외 시약은 모두 특급 및 일반시

약을 사용하였다. 본 實驗에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), phase-contrast microscope (Olympus), GEMINI avoidance System (San Diego Instruments, San Diego, CA), evaporator(Elyla, Japon), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Bio-Red, USA) reader 등을 사용하였다.

#### 2) 시료의 조제

釣鈎藤 디글로로메탄 분획(이하 REUD)조제 : 본 實驗에 使用한 釣鈎藤 2 kg을 원광대 군포병원에서 엄선하여 잘게 분쇄한 후 메탄올(MeOH) 수용액 5 l를 넣고 2~4회 용매 추출하고 분리된 알콜 추출액을 50 ~ 60 mmHg 및 30 ~ 40℃의 조건하에서 감압농축기 evaporator로 증발 농축하여 추출액 내의 알콜을 제거하며, 회수된 추출액에 대해서는 동결 건조하여 추출액을 분말상태로 얻었다. 농축액 중에 함유된 불필요한 성분을 정제하기 위하여, 디글로로메탄과 물이 5 : 1 부피비로 혼합되어 있는 혼합액을 1 : 1 부피비로 투입하고 진탕하여 디글로로메탄층 용매분획(이하 REUD라 명명)을 얻은 다음, 용매 분획물에 대해서는 동결건조시켜 분말상태로 45g을 회수하였다. 이와 같이 추출·정제 공정을 수행하여 회수된 디글로로메탄 분획을 사용 전에 미리 1000mg/ml 농도로 희석하여 CT105에 의한 신경세포 상해의 개선효과와 아세틸콜린에스테라제(이하 AChE)의 활성을 저해시키는 효과의 유무를 확인하기 위해 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) CT105 플라스미드를 형질전환 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 CT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital의 Center for Neurologic Diseases 소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양받은 치매 유발 유전자 APP695로부터 포유동물세포주인 SK-N-SH cell 내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리한 다음, 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질전환시킨 후, 이 플라스미드를 추출하여 BamHI/HindIII의 제한효소로 처리하고, 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamHI/HindIII에 삽입하여 cloning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 CT105 플라스미드를 분리함으로써 이뤄졌다. 세포주인 SK-N-SH cell은 서울대학교 압연연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하였고, CT105의 플라스미드를 본 실험에서 사용할 세포주를 구축하기 위해 미리 10<sup>3</sup> 세포를 6-well plate에 분주하였다. 이를 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 반응액 A로 CT105 플라스미드 2μg와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100μl을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10μl와 SFM 100μl을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음, 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 이

를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

## 2) 세포 증식도 측정

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 96-well plate에 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$  incubator에서 하룻밤 배양한 다음, CT105가 없는 vector만 형질전환시킨 정상군(NOR), CT105를 삽입시켜 형질전환시킨 대조군(CON), 대조군에 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 REUD를 처리한 약물군으로 구분하여 수행하였다. 배양한 세포는 약물을 처리한 다음 6시간 후에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20 $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음, DMSO 50 $\mu\text{l}$ 을 첨가하고 실온에서 30분 이상 반응을 시켜서 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630 nm에서 흡광도로 측정하였다.

## 3) 세포 형태학적 관찰

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음, IC<sub>50</sub>농도인 REUD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 약물군을 처리하여 세포주의 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 5% FBS가 함유한 RPMI medium, penicilin / streptomycin이 함유한 배지를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개 정도 세포수를 촬영하여 조사하였다.

## 4) 신경세포의 Reactive Oxygen Species 측정

Reactive oxygen species(이하, ROS) 측정은 Zhang 등<sup>26)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>cells/ml로 96-well plate에 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$  incubator에서 하룻밤 배양한 다음, REUD를 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 배지에 처리한 후 12시간 배양하였다. 세포를 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase를 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 $\mu\text{M}$  DCFDA와 6U/ml esterase를 혼합하여 N,N-dimethyl formamide (amresco, USA)에 용해된 H<sub>2</sub>DCFDA (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein) (Molecular Probes, USA)를 최종농도가 50 $\mu\text{M}$ 이 되도록 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에 보관하고 실험시 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2', 7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로, 이 때 발생된 형광은 Fluorescan Ascent FL (Thermo Labssystem, Finland)을 이용하여 excitation 485 nm/emission 530 nm에서 측정하였다.

## 5) CT105 세포주의 Nitric Oxide 생성도 측정

CT105 세포주 내의 nitric oxide(이하, NO)의 생성도를 측정하기 위해 10<sup>3</sup>세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 REUD 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 6시간 처리한 후 상등액 100 $\mu\text{l}$ 을 따서 96-well에 옮기고 Greiss reagent 용액 50  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 실온에서 반응을 시킨 다음 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630

nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$  sodium nitrite로 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

## 6) 신경세포의 항산화력 측정

항산화력을 측정하기 위해 Takao (1994) 등의 방법<sup>27)</sup>을 약간 수정하여 실험을 실시하였다. 프리라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액을 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in EtOH로 조제하고, 이 용액 1ml에 REUD 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 에탄올에 용해시킨 후, DPPH의 색깔변화를 관찰하여 항산화 활성 정도를 U.V spectrophotometer에서 흡광도 517nm에서 O.D를 판정하였으며 항산화제 표준품인 20 $\mu\text{M}$  BHT를 대조군으로 사용하였고 항산화능력의 계산식은 다음과 같다.

$$\% \text{ inhibition} = [ (CA-SA) / CA ] \times 100$$

CA: absorbance of control group

SA: absorbance of test sample

또한 MTS assay로 항산화능력을 측정하고 세포독성을 측정하기 위해 100 $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide로 처리한 각각의 well에 세포액 100 $\mu\text{l}$ 당 20 $\mu\text{l}$ 의 MTS용액을 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 490nm에서 UV 흡광도를 측정하여 이를 임의의 값으로 환산하여 나타내었다.

## 7) neurite outgrowth의 길이 측정

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 laminin coated 6-well plate(BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50ng/ml이 되게 하여 첨가하고 6시간 동안 자극을 가한 다음, 약물군의 무혈청 내지 REUD 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도별로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth length를 현미경하에서 관찰하였다. 정상군과 상호 비교하여 neurite length score는 대조군을 0.5로 임의의 수치를 설정하고 실험군의 결과치를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 통계 처리하였다.

## 8) 아세틸콜린에스테라제(AChE)의 활성 저해도 측정

디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시킨 후 100mM 인산염 (pH 8.0, '완충액 I'이라 함)에 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 희석하였다 (DMSO의 경우 최종농도 5%로 희석). (1, 1.5, 2, 5, 10)  $\times$  100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 REUD 1.5ml, 100mM 인산염 (pH 7.0, '완충액 II'라 함) 1.5 ml, 75mM 아세틸티오콜린요오드 용액 20 $\mu\text{l}$  및 완충엘만시약 [Buffered Ellman's reagent; 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산) 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 17.85mM] 100 $\mu\text{l}$ 를 혼합하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시켰다. 그리고, AChE 효소(20 $\mu\text{l}$ )를 넣고 흔들어 섞어준 다음 30초 간격으로 5분동안 흡광도를 측정함으로써 선형반응 (linear reaction)임을 확인하였다. 블랭크(blank)에는 효소 대신 식염수(saline)를 넣어주었다. 또한, REUD의 무첨가 그리고 첨가에 대한 아세틸티오콜린요오드 용액의 분해정도를 흡광도로 측정하여 본 결과, REUD와 AChE간의 비특이적 반응이 나타나지 않음도 확인하였다.

또한, REUD를 넣지 않았을 때를 대조군(control)으로 하고

이때의 AChE 활성도를 100%로 하였을 때, REUD농도에 대한 AChE의 억제 활성도를 '%저해'로 나타내었다. 효소활성도는 대조군에서 Lineweaver-Burk plot으로부터 Km 값 0.005이고 Vmax 값은 6.51으로 확인하여 실험군인 REUD의 AChE의 활성 저해도를 측정하였다. AChE에 대한 활성실험은 5회 반복하여 결과의 유의성을 P<0.05 범위 내에서 T-test로 검증하였다.

9) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±S.E로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

성 적

1. REUD가 CT105 발현 세포주에 미치는 세포 형태학적 영향

βAPP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 CT105가 발현된 신경세포를 광학현미경하에서 관찰한 결과, 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. CT105가 발현된 신경세포에 REUD를 처리한 군(이하 REUD 처리군)은 50µg/ml 농도에서 세포의 생존율과 세포사의 회복, 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었고, 100µg/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

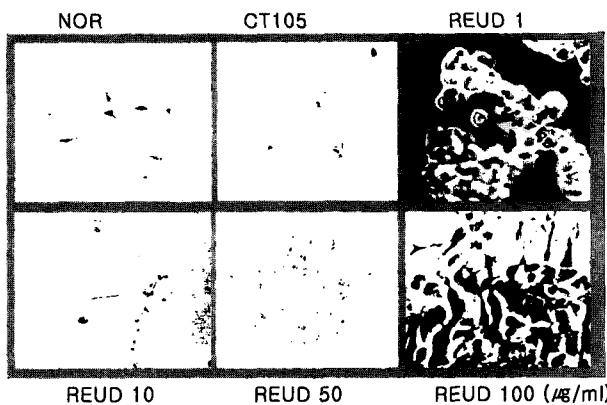


Fig. 1. Effect of REUD on morphological changes. Representative photomicrographs of SK-N-SH cells(NOR), CT105-expressed cells(CT105), and CT105 cells treated with REUD at the concentration of 1, 10, 50 and 100µg/ml, respectively, were shown (×200). Survival cell was determined by phase-contrast microscopy. Similar results were found in at least three separate experiments.

2. REUD가 농도별로 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사에 미치는 억제효과

신경세포의 세포사가 REUD에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과, CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사 비율은 정상군의 5.3±2.5%에 비해 약 92.1±2.0%로 높게 나왔고, 반면 1, 10, 50, 100 µg/ml 농도의 REUD 처리군에서는 각각 약 82.1±3.5%, 56.2±4.5%, 44.3±3.5%, 23.2±4.6%로 나타났으며, 특히 IC50은 약 53µg/ml 정도였다. 따라서 신경세포의 세포사가

REUD의 50µg/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 P<0.05의 범위 내에서 억제되었다(Fig. 2).

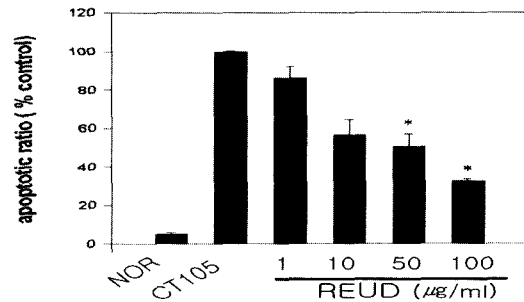


Fig. 2. Inhibitory effect of apoptotic ratio by REUD. Apoptotic ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by ELISA reader and phase-contrast microscopy in medium, induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test(\*p<0.05).

3. REUD의 CT105발현 신경세포에서의 ROS 발생 억제효과

CT105에 의해 손상당한 신경세포에서 REUD의 ROS 발생 억제효과를 관찰한 결과, Fig. 3에서처럼, REUD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데, 고농도일수록 억제되는 경향이 증가되었다. 결과적으로 ROS 측정량을 MTS 측정량으로 나누어 세포당 ROS 발생량을 표시하여 %로 표시하였다. 따라서 REUD 50µg/ml 이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였는데 정상군의 13±1.4%에 비해 CT105가 발현된 대조군은 약 91±2.4%, 1, 10, 50, 100 µg/ml 농도의 REUD 처리군에서는 각각 83±5.5%, 62±2.5%, 37±2.3%, 25±2.1%로 나타났는데, 이는 50µg/ml 이상의 농도에서 ROS 발생 억제효과가 P<0.05의 범위 내에서 유의성있게 나타난 것이다(Fig. 3).

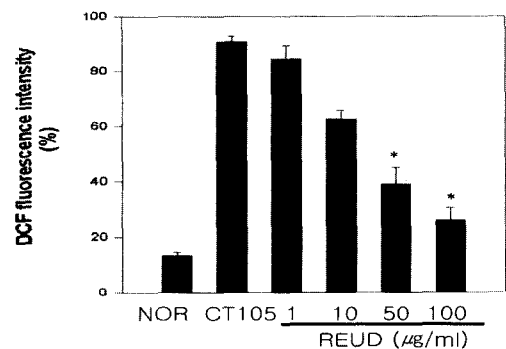


Fig. 3. ROS measurement of SK-N-SH cells in medium containing various concentration of REUD after 12 hours incubation. Control(CT105) was cultured in medium without REUD. Cell viability was quantified by MTS assay and MTT assay. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\*p<0.05).

또한 신경세포의 REUD의 항산화효과를 측정한 결과 Fig. 4에서처럼 REUD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였다. 특히 REUD 50µg/ml 이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였는데, 정상군의 53±2.0 unit에 비해 CT105가 발현된 대조군은 약 245±4 unit, 1, 10, 50, 100 µg/ml 농도의 REUD 처리군에서는 각각 183±8, 152±3, 124±3, 84±2 unit

로 나타났다. 이는 REUD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 ROS 발생 억제효과가  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 나타난 것이다.

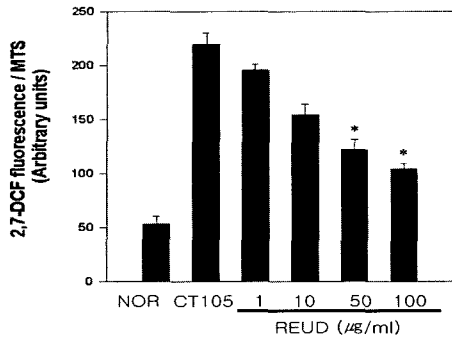


Fig. 4. Anti-oxidative effect of SK-N-SH cells in medium containing various concentration of REUD after 12 hours incubation. Control(CT105) was cultured in medium without REUD. Cell viability was quantified by MTS assay. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

4. REUD가 CT105 발현 신경세포에 미치는 NO 생성 억제효과  
일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 REUD가 CT105 발현 신경세포주에서의 NO생성을 억제하는지 조사한 결과, Fig. 5에서처럼 정상군에서는  $4.0 \pm 1.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약  $91.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$ 인데 반해, REUD 처리시 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 약  $74.3 \pm 5.8$ ,  $56.3 \pm 2.4$ ,  $43.6 \pm 3.4$ ,  $23.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$  정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 REUD가 억제하고 특히 REUD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서는 NO 생성 억제효과가  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 나타났다.

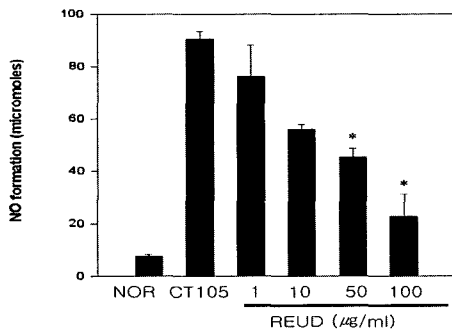


Fig. 5. Inhibitory effect of NO formation on SK-N-SH cells in medium containing various concentration of REUD after 12hours incubation. Control(CT105) was cultured in medium without REUD. NO formation was quantified by ELISA reader. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

5. REUD가 CT105 발현 신경세포에 미치는 항산화 효과

신경세포에서 CT105의 손상에 의한 free radical 발생에서 REUD의 억제효과를 관찰하였더니 Fig. 6에서처럼, REUD 농도의존적으로 free radical 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데 농도가 증가할수록 억제되는 경향이 증가되었다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였으며 CT105 처리군의 경우  $3.0 \pm 1.4\%$ 에 비해 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  REUD 처리군에서는 각각

23 $\pm 2.5\%$ , 36 $\pm 1.5\%$ , 59 $\pm 1.3\%$ , 79 $\pm 3.1\%$ 로 나타났는데, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 free radical 생성을  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6).

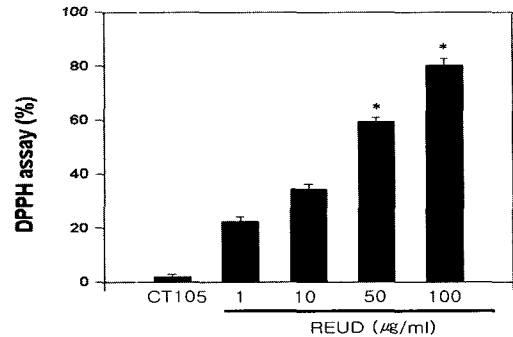


Fig. 6. Inhibitory effect of free radical by various concentration of REUD. Control(CT105) was cultured in medium without REUD. free radical formation was quantified by ELISA READER. Statistically significant value compared with control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

6. REUD가 CT105 발현 신경세포의 neurite outgrowth 신장에 미치는 영향

Fig. 1에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달하여 분지되어 있으나 CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 성장이 안된 상태로 나타나고 있다. REUD 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 증가시켜 처리시 신경돌기가 잘 신장되어 있는데, 이런 결과에서 neurite outgrowth length를 임의의 값으로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 7에서처럼 대조군을 기준으로  $0.75 \pm 0.5$ 으로 환산시 정상군은  $4.75 \pm 0.5$ 이고 REUD의 농도 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가하면 할수록 각각 약  $1.45 \pm 4.5$ ,  $1.65 \pm 2.5$ ,  $2.45 \pm 0.5$ ,  $3.75 \pm 0.5$ 의 수치를 보였는데, 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 신경돌기의 생성을  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 증가시켰다 (Fig. 7).

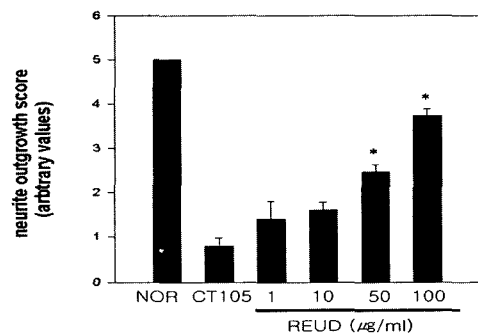


Fig. 7. REUD induces neurite outgrowth. CT105 expressed SK-N-SH cells were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and REUD. Neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means $\pm$ S.D from 200 determination cells. Those values significantly different from control are indicated (\* $p < 0.05$ , students two-tailed t test)

7. REUD가 아세틸콜린에스트라제 활성저해도에 미치는 영향

신경세포의 세포사는 인지능력에 영향을 주기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 세포사는 결국 치매유도가 진행될 가능성을 내포한다. Fig. 8에서처럼 아세틸콜린에스트라

제(이하 AChE)의 활성저해도를 측정하여 REUD의 효과를 확인한 결과, REUD (1, 1.5, 2, 5, 10)  $\times 100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 효소를 반응시켰더니, AChE 효소와 REUD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않았으며 실험군인 REUD의 AChE의 활성저해도를 측정하여 각각  $45 \pm 1.5\%$ ,  $53 \pm 2.5\%$ ,  $65 \pm 0.5\%$ ,  $77 \pm 3.5\%$ ,  $75 \pm 0.5\%$ 의 값을 얻었는데, 이는 AChE 활성실험을 5회 반복하여  $1.5 \times 100 \mu\text{g/ml}$  이상의 농도이상에서 효소활성 저해도에 대한 유의성이  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 나타난 것이다.

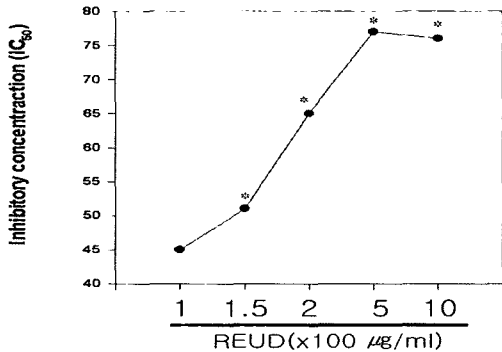


Fig. 8. Inhibition of human Acetylcholinesterase activity by REUD. Concentration of REUD to inhibit human AChE activity by 50%. All results are the Means±S.D from five experimental values. Those values significantly different from control are indicated (\* $p < 0.05$ , students two-tailed t test).

한편 REUD의 작용 양상 중 AChE의 기질인 acetylthiocholine (ATCh)과의 경쟁관계를 알아보기 위하여 농도를 달리하면서 그 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하여 본 결과 Fig. 9와 같이 나타났다. AChE 효소와 REUD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음을 확인하였는데 Km 값은 REUD 무첨가시 0.005에서 REUD 첨가시 0.0057로 거의 변하지 않는 반면에 Vmax 값은 5.23에서 6.51로 변함을 확인하였고, 이로써 REUD는 acetylthiocholine과 비경쟁적으로 AChE의 활성을 억제함을 알 수 있었고 AChE 활성실험을 5회 반복하여 IC50인  $1.5 \times 100 \mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 효소활성 저해도에 대한 유의성이  $p < 0.05$  범위 내에서 있었다.

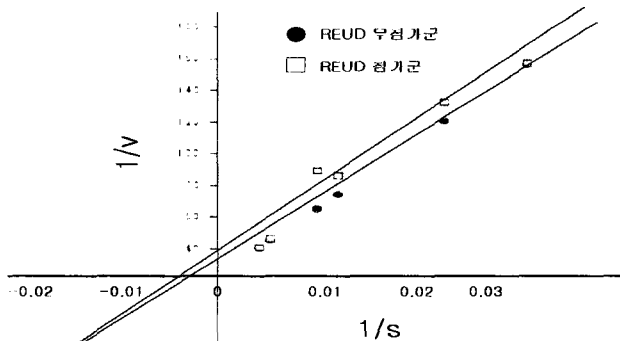


Fig. 9. Characterization of the inhibition of AChE activity by REUD. Lineweaver-Burk plot of the inhibition of AChE activity with REUD. Inhibition was performed with REUD. Results were plotted as REUD concentration against  $1/V$  for acetylthiocholine(ATCh) concentrations of  $20 \mu\text{M}$  to  $200 \mu\text{M}$ . Results were plotted as  $1/V$  against  $1/[ATCh]$  in the presence(□) or absence(●) of REUD. The slopes of the plots reveal that REUD inhibition of AChE is noncompetitive.

8. REUD가 수동회피테스트를 통해 백서의 기억개선에 미치는 영향

신경세포의 세포사는 인지능력에 영향을 주기 때문에 scopolamine을 투여한 쥐에서 신경이 손상을 입었을 시 신경세포의 세포사는 결국 기억감퇴를 유도한다. Fig. 10에서처럼 백서에 REUD의 경구투여로 인한 기억개선효과를 알아보기 위해 백서 무게 100g 당 0.1, 1, 10, 100 mg/ml 농도의 REUD를 투여한 결과, 정상군에서는 기억개선효과가  $267 \pm 25 \text{ sec}$ , 대조군은  $25 \pm 2 \text{ sec}$ 이고 REUD 처리군의 경우는 각각  $27 \pm 1$ ,  $52 \pm 1$ ,  $53 \pm 2$ ,  $64 \pm 1 \text{ sec}$ 의 값을 얻었는데, 이는 경구내로 1회 투여한 군에서 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과들로 보아 REUD는 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 분해를 막아 농도를 유지시켜, 치매질환과 같은 증상에서 나타나는 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 1mg/ml 이상의 농도에서 기억개선효과에 대한 유의성이  $P < 0.05$  범위 내에서 있었다.

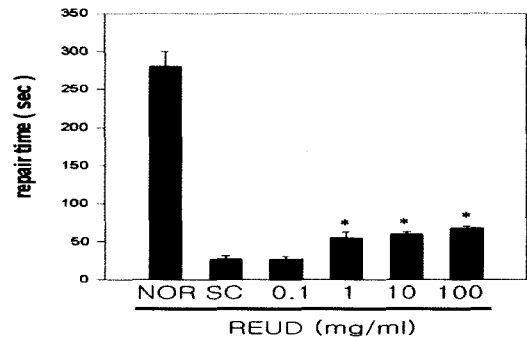


Fig 10. The retention latency of passive avoidance response. The retention test was performed 24 hours after training session. Normal: groups of rats without any treatment(n=6). SC: groups of rat with scopolamine treatment, REUD: groups of rats administrated with 0.1, 1, 10, 100 mg/ml/day of REUD treatment. All results are the Means±S.D from five experimental tests. Those values significantly different from control are indicated (\* $p < 0.05$ , students two-tailed t test)

## 고 찰

痴呆 중 전세계적으로 가장 많은 비유를 차지하고 있는<sup>2)</sup> AD의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되어지는 노인반(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실물처럼 보이는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)을 들 수 있다<sup>6, 7)</sup>. 노인반은 신경반(neuritic plaques) 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축색돌기와 수상돌기들의 얽힌 덩어리가 Aβ를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다<sup>28)</sup>. 노인반의 수는 질병의 심한 정도와 비례하므로 이 plaques에 대한 연구가 AD 연구의 초점이 되고 있다<sup>28)</sup>. 이러한 병리학적 특징은 가족성 AD(Familial Alzheimer's disease, FAD)와 산발성 AD(Spradic Alzheimer's disease, SAD)의 모든 경우에 다 나타나며, 그 결과 신경세포의 사멸에 의해 결국 인지기능의 손상을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다<sup>29,30)</sup>.

AD의 원인에 대해 여러 가설들이 있으나, Aβ가 AD의 발병

원인으로 작용할 것이라는 베타아밀로이드 가설은 1980년대 초에 아세틸콜린의 저하가 AD의 병인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설 이후에 가장 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여지고 있었다<sup>31)</sup>. A $\beta$ 는 APP라는 type I integral membrane protein에서부터 유래된 단백질 분해효소에 의한 대사산물로서 extracellular domain과 membrane domain으로 이루어져 있는 39-43개의 펩타이드이다<sup>32)</sup>.

APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 pathway에 의해 진행된다<sup>33)</sup>. 즉  $\alpha$ -secretase에 의해서 A $\beta$  domain 안쪽이 잘려지며 amino terminal이 세포 밖으로 분비되고 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고되었다<sup>34)</sup>. 한편 alternative processing pathway에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은  $\beta$ -secretase 등에 의해 A $\beta$ 의 N terminal 주위가 잘라지며 A $\beta$  sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 부착되어 남는다<sup>35,36)</sup>. 이 C단 단백질 중 일부는 A $\beta$  전체 sequence를 가지고 있으며  $\gamma$ -secretase에 의해 잘려져 A $\beta$ 를 형성하는 것으로 생각된다.

하지만 이상과 같이 in vitro에서 A $\beta$ 의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, A $\beta$ 가 독성을 나타내기 위해서는 20 $\mu$ M 이상의 고농도가 필요하고 일부 연구에서는 A $\beta$ 의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데<sup>37,38)</sup>, 특히 in vivo 실험에서는 A $\beta$ 의 독성에 대해 상반되는 결과가 팽팽히 맞서고 있어, 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을 할 것인지 불확실한 실정이다. 따라서 실제 pathogenesis에는 다른 인자들, 그 중에서도 APP의 다른 중간대사산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 A $\beta$ 의 직전 대사물질로 생각하고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내<sup>39)</sup>와 배양액<sup>40)</sup>에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD(family Alzheimer disease)나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 뇌 부위에서도 발견되었다<sup>36,41)</sup>. 또한 이 단백질은 in vitro에서 세포에 형질전환시켰을 때 amyloid와 유사한 집합체를 형성할 수 있다<sup>42,43)</sup>. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 형질전환시킬 경우 세포독성을 일으키는데<sup>10,11)</sup>, 특히 이러한 C단 단백질의 형질전환시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다<sup>10)</sup>. 더구나 이렇게 C단 단백질에 형질전환된 세포를 실험용 백서의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고됨으로써<sup>11,44)</sup>, 실제 in vivo에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다. 미국의 Neve 박사 group에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데<sup>44)</sup>, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고 인지기능의 결손이 동반됨이 보고되어<sup>45)</sup> C단 단백질이 과도하게 발현되면 신경세포에 유해한 영향을 끼쳐 인지기능을 손상시킬 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다.

최근 C단 단백질(이하 CT105)에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons<sup>14,15)</sup>에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, xenopus oocytes<sup>16,17)</sup>과 purkinje cells에

서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation (LTP)를 차단한다고 보고하였다<sup>46)</sup>. 또한 CT105는 calcium homeostasis에도 악영향을 미치는데, rat brain microsomes에서는 Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup> ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로 calcium homeostasis을 손상시키지만, A $\beta$ 는 그렇지 않다고 하여<sup>18,19)</sup> 기존의 A $\beta$ 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다.

또한 최<sup>12)</sup>는 CT105 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하에 기인한 것이라 하였고, 라<sup>13)</sup>는 CT105가 신경교세포의 활성으로 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 더욱 증명해주고 있다. 본 실험도 AD와 관련성 있는 CT105의 발현에 의한 신경세포의 세포사를 억제하고자 하는 연구의 일환이다.

韓醫學에서 痴呆는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등과 유사한 概念으로<sup>2)</sup> 明代 張景岳<sup>3)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 “癡狀證, 凡平素無痰而或以鬱結, 或而不遂, 或而思慮, 或而疑貳 或而驚狂而漸致癡, 言辭顛倒, 舉動不經, …… 此其逆氣在心, 或肝膽二經……”이라 하여 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 痴呆의 病因과 病機·治法 그리고 豫後에 대해서 설명하였으며, 清代 陳士鏞<sup>4)</sup>에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술되었다.

본 연구에 사용된 鈎鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 鈎鈎 혹은 華鈎藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 찌서 乾燥한 藥材로서 鈎藤, 鈎藤, 鈎鈎, 芎藤鈎, 嫩鈎藤, 雙鈎藤, 鈎屯 등의 異名을 가지고 있다<sup>22,23)</sup>. 그리고 性味가 甘·苦·微寒·無毒하고 效能이 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩 등의 諸症狀에 사용되어 왔다<sup>22,23)</sup>. 주요 성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxyindole계 alkaloid類, 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3- $\alpha$ -dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인되었고<sup>47)</sup>, 생리활성의 研究로는 alkaloid 성분의 혈압강하 혹은 혈관확장 작용에 관한 것이 多數 보고되었다<sup>48,49)</sup>. 그 외 김 등<sup>25,50)</sup>은 鈎鈎藤의 신경계통의 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣作用, 이<sup>51)</sup>는 鈎鈎藤의 phospholipase C $\gamma$ 1 저해 성분과 그 항암 효과에 대해 보고한 바가 있으며, 강<sup>52)</sup>은 鈎鈎藤 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화적 손상으로부터 신경세포와 총단백질의 양적 증가와 lipid peroxidation과 LDH 활성을 유의하게 감소시킴으로서 척수감각 신경절 세포 손상에 효과적으로 작용한다는 것을 보고한 바 있으며, 실제 臨床에서도 鈎鈎藤은 高血壓性 頭昏이나 目眩 및 神經性 頭痛 등의 치료에 頻用할 뿐만 아니라 척수 및 말초신경의 손상에 의한 마비와 뇌졸중 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>22,23)</sup>.

이에 저자는 鈎鈎藤 수추출물의  $\beta$ APP 과발현에서 신경세포

사 억제작용에 대한 연구<sup>24)</sup>에서 더 나아가 鈎鈎藤의 디클로로메탄분획(이하 REUD)이 CT105 플라스미드에 의해 유도된 신경세포에서도 상해의 개선효과와 AChE의 활성을 저해시키는 효과가 있는지에 대해 연구하여 아래와 같이 보고하는 바이다.  $\beta$ APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 CT105가 발현된 신경세포를 광학현미경하에서 관찰한 결과, 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. CT105가 발현된 신경세포에 REUD를 처리한 군(이하 REUD 처리군)은  $50\mu\text{g/ml}$  농도에서 세포의 생존율과 세포사의 회복, 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었고,  $100\mu\text{g/ml}$  농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

또 REUD의 농도별 신경세포의 세포사 억제효과를 살펴본 결과, CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사 비율은 정상군의  $5.3\pm 2.5\%$ 에 비해 약  $92.1\pm 2.0\%$ 로 높게 나왔고, 반면 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$  농도의 REUD 처리군에서는 각각 약  $82.1\pm 3.5\%$ ,  $56.2\pm 4.5\%$ ,  $44.3\pm 3.5\%$ ,  $23.2\pm 4.6\%$ 로 나타내었고, 특히  $\text{IC}_{50}$ 은 약  $53\mu\text{g/ml}$  정도였다. 따라서 신경세포의 세포사가 REUD의  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 유의성 있게  $P<0.05$ 의 범위 내에서 억제되었다(Fig. 2).

CT105에 의해 손상당한 신경세포에서 REUD의 ROS 발생 억제효과를 관찰한 결과에서는 Fig. 3에서처럼, REUD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데, 고농도일수록 억제되는 경향이 증가되었다. 결과적으로 ROS 측정량을 MTS 측정량으로 나누어 세포당 ROS 발생량을 표시하여 %로 표시하였다. 따라서 REUD  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였는데 정상군의  $13\pm 1.4\%$ 에 비해 CT105가 발현된 대조군은 약  $91\pm 2.4\%$ , 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$  농도의 REUD 처리군에서는 각각  $83\pm 5.5\%$ ,  $62\pm 2.5\%$ ,  $37\pm 2.3\%$ ,  $25\pm 2.1\%$ 로 나타내었는데, 이는  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 ROS 발생 억제효과가  $P<0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 나타난 것이다(Fig. 3). 또한 신경세포의 REUD의 항산화효과를 측정할 결과 Fig. 4에서처럼 REUD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였다. 특히 REUD  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였는데, 정상군의  $53\pm 2.0$  unit에 비해 CT105가 발현된 대조군은 약  $245\pm 4$  unit, 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$  농도의 REUD 처리군에서는 각각  $183\pm 8$ ,  $152\pm 3$ ,  $124\pm 3$ ,  $84\pm 2$  unit로 나타났다. 이는 REUD  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 ROS 발생 억제효과가  $P<0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 나타난 것이다. 일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 REUD가 CT105 발현 신경세포주에서의 NO생성을 억제하는지 조사한 결과, Fig. 5에서처럼 정상군에서는  $4.0\pm 1.82\mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약  $91.2\pm 0.9\mu\text{M}$ 인데 반해, REUD 처리시 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 약  $74.3\pm 5.8$ ,  $56.3\pm 2.4$ ,  $43.6\pm 3.4$ ,  $23.3\pm 1.5\mu\text{M}$  정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 REUD가 억제하고 특히 REUD  $50\mu\text{g}$

$/\text{ml}$  이상의 농도에서는 NO 생성 억제효과가  $P<0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 나타났다.

신경세포에서 CT105의 손상에 의한 free radical 발생에서 REUD의 억제효과를 관찰하였더니 Fig. 6에서처럼, REUD 농도 의존적으로 free radical 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데 농도가 증가할수록 억제되는 경향이 증가되었다.  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 강한 억제효과를 보였으며 CT105 처리군의 경우  $3.0\pm 1.4\%$ 에 비해 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$  REUD 처리군에서는 각각  $23\pm 2.5\%$ ,  $36\pm 1.5\%$ ,  $59\pm 1.3\%$ ,  $79\pm 3.1\%$ 로 나타났는데,  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 free radical 생성을  $P<0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6). 세포사때 소멸되는 신경돌기와 REUD와의 관계를 살펴보면, Fig. 1에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달하여 분지되어 있으나 CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 성장이 안된 상태로 나타나고 있다. REUD 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 증가시켜 처리시 신경돌기가 잘 신장되어 있는데, 이런 결과에서 neurite outgrowth length를 임의의 값으로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 7에서처럼 대조군을 기준으로  $0.75\pm 0.5$ 으로 환산시 정상군은  $4.75\pm 0.5$ 이고 REUD의 농도 1, 10, 50,  $100\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면 할수록 각각 약  $1.45\pm 4.5$ ,  $1.65\pm 2.5$ ,  $2.45\pm 0.5$ ,  $3.75\pm 0.5$ 의 수치를 보였는데, 특히  $50\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 신경돌기의 생성을  $P<0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 7). 신경세포의 세포사는 인지능력에 영향을 주기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 세포사는 결국 치매유도가 진행될 가능성을 내포한다. Fig. 8에서처럼 아세틸콜린에스테라제(이하 AChE)의 활성저해도를 측정하여 REUD의 효과를 확인한 결과, REUD (1, 1.5, 2, 5, 10)  $\times 100\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 효소를 반응시켰더니, AChE 효소와 REUD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않았으며 실험군인 REUD의 AChE의 활성저해도를 측정하여 각각  $45\pm 1.5\%$ ,  $53\pm 2.5\%$ ,  $65\pm 0.5\%$ ,  $77\pm 3.5\%$ ,  $75\pm 0.5\%$ 의 값을 얻었는데, 이는 AChE 활성실험을 5회 반복하여  $1.5\times 100\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 효소활성 저해도에 대한 유의성이  $P<0.05$ 의 범위 내에서 나타난 것이다.

한편 REUD의 작용 양상 중 AChE의 기질인 acetylthiocholine (ATCh)과의 경쟁관계를 알아보기 위하여 농도를 달리하면서 그 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하여 본 결과 Fig. 9와 같이 나타났다. AChE 효소와 REUD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음을 확인하였는데  $K_m$  값은 REUD 무첨가시 0.005에서 REUD 첨가시 0.0057로 거의 변하지 않는 반면에  $V_{max}$  값은 5.23에서 6.51로 변함을 확인하였고 이로써 REUD는 acetylthiocholine과 비경쟁적으로 AChE의 활성을 억제함을 알 수 있었고 AChE 활성실험을 5회 반복하여  $\text{IC}_{50}$ 인  $1.5\times 100\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 효소활성 저해도에 대한 유의성이  $p<0.05$  범위 내에서 있었다. 이상과 같이 REUD는 CT105로 발현된 신경아세포종 세포주에서 세포사때 일어나는 ROS (Reactive Oxygen Species) 발생, NO (nitric oxide) 생성, 항산화 반응을 억제하고 신경세포의 neuritic outgrowth 신장, 아세틸콜린에스테라제(AChE) 활성저해를 유도하였음을 알 수 있었다.



## 결 론

鈎鈎藤 디클로로메탄 분획(REUD)이 CT105 발현 신경아세포종 세포주에 미치는 영향은 다음과 같다. 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 신경세포에서 CT105 발현에 의한 세포사 유도를 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제하였다.(P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 신경세포에서 CT105 발현에 의한 ROS발생 유도를 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제하였다.(P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 CT105로 인한 신경세포의 NO 생성도를 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제하였다.(P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 신경세포에서 CT105 발현에 의한 자유기 발생을 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 현저히 억제되었다.(P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 neurite outgrowth 신장을 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 유도하였다.(P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획에 의해 AChE의 효소활성도가 1.5 $\times$ 100 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제되었고 (P<0.05) 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획과 AChE 효소의 반응은 비특이적이지 않았다. 以上과 같은 결론으로 鈎鈎藤 디클로로메탄 분획은 BAPP의 CT105 발현 신경아세포종의 세포사를 효과적으로 억제하는 것으로 보아 치매 원인에 대한 病因, 病理學的 분석으로 지속적인 연구가 이뤄지고 치매 등의 다양한 뇌질환에 대한 임상응용에 접목 가능할 것으로 사료되어진다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

## 참고문헌

1. 민성길. 최신정신의학. 서울. 일조각. 1, 104-105, 1993.
2. 강형원 외. 癡呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 동의병리학회지. 13(1):36-45, 1999.
3. 張介賓. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社. 573-578, 1985.
4. 陳士鐸. 辨證錄. 서울:醫聖堂. 241-246, 1989.
5. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학사적사. 256-271, 327-330, 663-664, 1992.
6. Dickson DW, Ksiazak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH. Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site, Acta Neuropathol (Berl). 84(6):596-605, 1992.
7. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein, Neuroscience. 95(1):1-4, 2000.
8. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal

- by tachykinin neuropeptides. Science 250:279-282, 1990.
9. Fukuchi K, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Kamino K, Ogburn CE, Furlong CE, and Martin GM. Overexpression of a C-terminal portion of the beta-amyloid precursor protein in mouse brains by transplantation of transformed neuronal cells. Exp Neurol 127:253-264, 1994.
10. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease, Science. 28;245(4916):417-420, 1989.
11. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM. Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein, Brain Res Mol Brain Res. 26(1-2):207-217, 1994.
12. 최세훈. 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구. 서울대 대학원. 학위논문(석사). 2001.
13. 라종철. 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화와 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대 대학원. 학위논문(석사). 2002.
14. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, J. Neurochem. 67:1172-1182, 1996.
15. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH. Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein(BAPP) in PC12 cells by nicotine, Molecular Pharmacology. 52:430-436, 1997.
16. Fraser S, Suh YH, Chong YH, and Djamgoz MA. Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the carboxyl terminal fragment of the amyloid precursor protein, J. Neurochem 66:2034-2040, 1996.
17. Suh YH, Chong YH, Kim SH, Choi w, Kim KS, Jeong SJ et al. Molecular physiology, biochemistry and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein(APP), Annals of N Y Acad Sci 786:169-183, 1996.
18. Kim HS, CH Park, and YH Suh. C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup> ATPase. Neuroreport 9(17):3875-3879, 1998.
19. Kim HS, Lee JH, and Suh YH. C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SK cell. Neuroreport 10:113-116, 1999.
20. 최혁, 김상호, 이대용, 안대중, 강형원, 류영수. pCT105로 유도된 치매모델에서 석창포 수추출액이 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 13(2):173~194, 2002.
21. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수. 원지와 석창포 혼합추출액

- 의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 동의생리병리학회지. 17(4):1037-1049, 2003.
22. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울:南山堂. 658-659, 1986.
  23. 李盛雨, 盧昇鉉. 釣鉤藤에 관한 文獻的 研究. 大韓韓醫學會誌 第8卷第1號 附錄 本草分科學會誌 2(1):53-58, 1987.
  24. 김상호, 강형원, 류영수. 釣鉤藤이  $\beta$ APP 과발현 인간세경아 세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 16(5):960-966, 2002.
  25. 김동영, 최종원, 박종철, 이정규. 조구등 성분의 항경련효과 II. 메탄올추출물 및 에틸 아세테이트 분획의 뇌 신경전달 관련물질에 미치는 효과. 생약학회지. 29(3):179-186, 1998.
  26. Zhang HY, Tang XC, Huperzine B. A novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. Neuroscience Letters. 292:41-44, 2000.
  27. Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi and K. Sakata, A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, Biosci. Biotech. Biochem., 58, 10:1780-1783, 1994.
  28. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease In Pharmacotherapy. a pathophysiologic approach, Dipiro J. T. et al. Ed.. New York. Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
  29. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. Neuron. 10:243-254, 1993.
  30. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis, Apple Pathol. 2(6):357-369, 1984.
  31. 정창환, 정민환, 복인희. 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향. 한국 뇌학회지. 1(1):45-52, 2001.
  32. George-hyslop, PH. et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. Science. 235:885-890, 1987.
  33. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. J. Neurochem 65(4):1431-1444, 1995.
  34. Barger SW, Fiscus RR, Ruth P, Hofmann F, Mattson MP. Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of beta-amyloid precursor. J. Neurochem. 64(5):2087-2096, 1995.
  35. Shoji M, Glode TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al.. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. Science. 2;258(5079):126-129, 1992.
  36. Tamaoka A, Kalaria RN, Lieberburg I, Selkoe DJ. Identification of a stable fragment of the Alzheimer amyloid precursor containing the beta-protein in brain microvessels. Proc Natl Acad Sci USA. 15;89(4):1345-1349, 1992.
  37. Games D, Khan KM, Soriano FG, Keim PS, Davis DL, Bryant K, Lieberburg I. Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injection in rat brain, Neurobiol Aging. 13(5):569-576. 1992.
  38. Podlisny MB, Stephenson DT, Frosch MP, Tolan DR, Lieberburg I, Clemens JA, Selkoe DJ. Microinjection of synthetic amyloid beta-protein in monkey cerebral cortex fails to produce acute neurotoxicity. Am J Pathol. 142(1):17-24, 1993.
  39. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al Amyloid beta-peptides is produced by cultured cells during normal metabolism. Nature. 24;359(6393):322-325, 1992.
  40. Matsumoto A and Matsumoto R. Familial Alzheimer's disease cells abnormal abnormally accumulate beta-amyloid harbouring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid, Eur J Biochem. 225:1055-1062, 1997.
  41. Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee g, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 85(19):7341-7345, 1988.
  42. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. EMBO J. 7(4):949-957, 1988.
  43. Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K. Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid precursor. Nature. 11;347(6293):566-569, 1990.
  44. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C, Vaught JL, Neve RL. Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain, Proc Natl Acad Sci USA. 5;89(22):10857-10861, 1992.
  45. Lacey-Casem ML, Oster-Granite ML. The neuropathology of the trisomy 16 mouse. Crit Rev Neurobiol. 8(4):293-322, 1994.
  46. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, and Rowan MJ. Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments,

- Neuroreport. 8:3213-3217, 1997.
47. 김종문. 조구등과 홍삼의 성분에 관한 연구. 서울대 대학원 학위논문(박사). 1995.
  48. Chag P, Koh YK, GEH SL, Soepadmo E, Goh SH, and Wong AK, *Journal of Ethnopharmacology*. 25:213-215 1989.
  49. Y Joji, M Shuji, M Hisashi, K Hogo. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 90(3):133, 1987.
  50. 김동영. 조구등(釣鉤藤) 성분의 항경련 효과 I;에틸아세테이트 분획의 항경련 효과, *생약학회지*. 104:53-57, 1996.
  51. 이지숙. 조구등의 phospholipase C $\gamma$ 1 저해 성분과 그 항암 효과. 서울대 대학원 학위논문(박사). 1998.
  52. 강형원. 조구등이 산소자유기에 의하여 손상된 배양척수감각신경절세포에 미치는 영향에 관한 연구. 원광대학교 제3 의학과 대학원. 1999.