

朱子讀書丸의 아밀로이드베타로 유발된 생쥐 알츠하이머모델에 대한 효과

경희수, 임강현*, 고흥

세명대학교 한의과대학 내과학 교실, 본초학 교실*

Effects of Jujadokseo-hwan on Mice with Alzheimer's Disease Induced by Amyloid- β

Hyuk-su Kyung, Kang-hyun Leem*, Heung Ko

Dept. of Internal medicine, College of Oriental medicine, Semyung University
Dept. of Herbal medicine, College of Oriental medicine, Semyung University*

Object : This research investigated effects of Jujadokseo-hwan on mice with Alzheimer's Disease induced by amyloid- β . According to Dongyibogam, Jujadokseo-hwan can cure amnesia. Amyloid- β is believed to induce oxidative stress and inflammation in the brain, postulated to play important roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In this way amyloid- β induces Alzheimer's Disease.

Methods : In order to make an efficient prescription and cope with dementia, learning and memory functions of mice were tested on passive avoidance test and Y-maze task. NF- κ B were measured from protein derived from the brain. RT-PCR was done for gene analysis. Primers were protein kinase B and NGF- α .

Results :

1. Jujadokseo-hwan was effective for memory capacity on passive avoidance test, but noneffective for spatial memory capacity and locomotor activity on Y-maze task.
2. The measurement of NF- κ B showed upward tendencies and the result of RT-PCR showed up-regulation when given Jujadokseo-hwan by mouth.

Conclusion : Results suggest that Jujadokseo-hwan is effective on mice with Alzheimer's Disease induced by amyloid- β .

Key Words: amyloid- β , Jujadokseo-hwan, Alzheimer's Disease, memory, learning.

1. 緒 論

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 1907년 Alois Alzheimer가 처음으로 기술하였다. 당시에는 초로성 치매의 비교적 드문 형태로 여겨졌지만, 현재는 어느 연령대에서도 발생할 수 있으며, 노년기

에서 가장 흔한 치매의 원인으로 알려져 있다¹.

주증상은 건망증의 점진적인 발생이며, 기억력 장애가 심해지면서 다른 대뇌 기능의 이상도 점차적으로 나타나게 된다. 언어장애는 처음에는 약하나 나중에는 명백한 실어증의 형태로 나타나게 되며, 時空的 指南力도 장애를 보이게 되어, 차를 주차하지 못하거나, 팔을 옷소매에 제대로 집어넣지 못하는 등의 운동장애도 나타나게 된다. 말기에는 흔히 사용하던 물건과 도구의 사용법까지 잊어버리게 된다².

· 접수 : 2006. 2. 17. · 채택 : 2006. 2. 28.
· 교신저자 : 경희수, 충북 충주시 봉방동 837
세명대학교 부속 충주 한방병원 7층 2의국
(Tel. 043-841-1772, Fax. 043-856-1731
E-mail : lightyw@freechal.com)

알츠하이머병을 일으키는 발병원인은 뚜렷치 않으나, 최근의 연구에 의하면, amyloid- β (A β)가 가장 유력한 원인 물질로 대두되고 있다³. Amyloid- β 는 뇌에서 산화적 스트레스(oxidative stress)와 감염을 야기할 가능성이 있으며, 이것은 알츠하이머병의 병인에 주요한 역할을 한다⁴. 최근 아밀로이드 전구 단백질 변이 알츠하이머 쥐 모델에서, amyloid- β 펩티드면역화가 발병을 예방하고 뇌에서의 아밀로이드 플라크의 축적을 역전시키는 것으로 알려졌으며, 사람에서도 이 치료법이 가능한지에 대해 연구가 이루어지고 있다¹. Yan 등⁵은 amyloid- β 를 주입하여 알츠하이머를 유발시킨 생쥐에게 식물에서 추출한 ferulic acid를 투여하여 amyloid- β 가 감소되는 것을 확인하였다.

朱子讀書丸⁶은 『東醫寶鑑』에 기록된 처방으로 健忘을 主訴症으로 하는 경우에 사용하고 있다. 이에 저자는 amyloid- β 를 주입하여 알츠하이머가 유발된 생쥐에게 朱子讀書丸을 투여하여 수동회피실험⁷과 Y-maze task⁸를 통한 사건기억력, 공간지각능력과 운동량에 미치는 영향 및 NF- κ B와 protein kinase B(PKB), nerve growth factor- α (NGF- α)에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 藥材의 調製

실험에 사용된 약재는 世明大學校 附屬 忠州韓方

病院에서 買入 精選한 후 사용하였으며, 처방은 東醫寶鑑에 기재되어 있는 朱子讀書丸⁶에서 朱沙를 제한 처방으로, 3첩 분량(200g)을 증류수 2,000ml로 2회 가열하여 추출여과한 후 여액을 농축하고, 동결 건조하여 분말84.5g(수득율42.3%)을 얻었으며, 실험 시에는 증류수에 용해시켜 사용하였다(Table 1).

2. 實驗動物

실험동물은 썬타코(주)(경기도 안산시. 한국)에서 구입한 체중 23~25g되는 5주령의 수컷 ICR계 생쥐로 사용하였으며, 각 군당 15~20마리씩 4군으로 나누었으며, 한 cage에 5마리씩 넣어 사육하였다. 물과 사료(썬타코. 한국)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 22°C \pm 1로 유지하였고, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간(7:00~19:00)으로 하였다.

3. 實驗 道具 및 方法

1) 왕복상자(passive avoidance box: shuttle box)

수동회피실험(passive avoidance test)을 위해 제작된 왕복상자는 크기를 50 \times 50 \times 40cm의 크기로 제작하였다. 이 상자는 아크릴 판을 벽으로 하여 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며 두 방을 나누는 벽에는 가로, 세로 각 10cm인 단두대 형식의 문이 있어 외부에서 상하로 열고 닫을 수 있게 하였다. 좌측 방의 뚜껑에는 매우 밝은(250W) 할로겐전구를 달아 실험동물이 싫어하는 매우 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였다. 우측 방의 바닥에는 전기충격을

Table 1. The Composition of Jujadokseo-hwan

Korean Name	Drug Name	Scientific Name	Dose(g)
茯神	Hoelen	<i>Poria cocos</i>	15
遠志	Polygalae Radix	<i>Polygala tenuifolia</i>	15
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i>	10
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	<i>Citrus reticulata</i>	10
石菖蒲	Acori Rhizoma	<i>Acorus calamus</i>	7
當歸	Angelicae sinensis Radix	<i>Angelica sinensis</i>	7
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	3
Total amount			67

실험동물의 발바닥에 가할 수 있도록 밑면에 스테인레스봉을 이용한 통전장치를 설치하였고 AC 가변 전원 전기 충격발생기를 이용하여 2.0mA의 전기충격을 가할 수 있게 하였다. 밝은 방에는 흰색의 아크릴로 하였고, 어두운 방은 검은색 아크릴로 하였다.

2) Y자형 미로 (Y-maze)

Y자형 미로 측정 장치는 3개의 통로(arm)를 뺀 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25cm, 높이 14cm, 폭 5cm이고 동일한 각도로 위치시킨다.

4. 藥物 投與 方法

대조군은 증류수를 경구투여하였으며, 실험군은 증류수(distilled water;DW)를 경구투여한 군(이하 DW군)과 朱子讀書丸을 20mg/kg, 100mg/kg을 경구투여한 군으로 나누었다. 약물은 기억 검사를 시행하기 일주일 전부터 매일 저녁 8시경 일주일간 0.015ml를 경구로 투여하였다.

5. 實驗 方法

1) 기억력 결손을 일으키는 amyloid-β의 농도 결정

(1) Intracerebroventricular injection(ICV)

생쥐는 물과 음식을 자유롭게 먹도록 하였고, 3일간 shuttle box를 숙지하도록 하였으며, 4일째에는 Laursen & Belknap⁹이 설정한 절차에 따라서 amyloid-β를 생쥐의 정수리(Bregma)에 주입(intracerebroventricular injection;ICV)하였다. 실험에 사용한 시약은 amyloid-β 1-42(Sigma, Seoul, Korea)이다. 각각의 생쥐는 50μl Hamilton microsyringe에 26-gauge 바늘을 뒷척위 2.4mm의 깊이가 주입되도록 설치한 후 쥐의 정수리(Bregma)에 amyloid-β를 5μl씩 주입하였다.

생쥐는 1군당 15~20마리로 하였으며, 대조군은 ICV 시행시 phosphate-buffered saline(PBS)를 사용하였으며, 실험군은 각각 amyloid-β를 20pmol, 100pmol, 500pmol 주입한 군으로 나누었다. 이 과정으로 가장 효과있는 농도를 확인하였으며, 이후 朱子讀書丸의 효과를 검증하는 과정에서는 대조군에는 PBS

를 ICV하고, 실험군은 위에서 확인된 amyloid-β의 농도로 동일하게 ICV하였다.

(2) 기억력 측정

기억력 측정은 수동회피 실험(passive avoidance test)을 실시하여 측정하였다.

① 학습 (learning)

학습은 3일간 진행되었다. 학습 1일째와 2일째에는 생쥐에게 어두운 방을 각인시키기 위하여 중앙의 통로 가까운 곳에 어두운 통로를 향하여 내려놓고 test를 시행하였으며, 3일째가 되었을 때는 통로에서 먼 쪽 벽 근처에 내려놓아 2일간 학습한 어두운 방에 대한 기억을 확인하였으며, 각 과정에서 생쥐가 1분 이상 어두운 방으로 넘어가지 않고 흰 방에 머무는 생쥐는 실험에서 제외하였다. 생쥐가 어두운 방으로 넘어가면 중앙의 통로를 막은 후 약 1분간 어두운 방에서 쉴 수 있게 하였으며, 1분이 지나면 중앙의 칸막이를 이용하여 밝은 곳으로 이동시키게 한 후에 밝은 방에 진입한 후에는 바로 꼬리를 잡아서 cage로 다시 옮김으로써 밝은 방에서는 잡힐 수 있다는 것을 인식시키고 동시에 어두운 곳이 편안한 곳임을 충분히 인식시키도록 하였다.

학습 4일째에는 amyloid-β를 ICV한 후 3일째와 같은 방식으로 실험을 진행하였으며, 생쥐가 어두운 방으로 넘어가면, 중앙의 통로를 막은 후 생쥐가 심하게 발작할 정도의 강도로 5초간 전기 충격을 가한 후 중앙의 통로를 다시 개방하여 어두운 방에는 전기가 흐른다는 것을 인식시켰으며, 밝은 방으로 넘어간 후에 약 30초간 안정하도록 하여 밝은 방은 전기가 흐르지 않는다는 것을 인식시켰다.

② 기억 검사(retention test)

학습 한 다음날, 생쥐를 중앙통로에서 먼 쪽 벽에 내려놓은 후 어두운 방으로 들어가는 시간(latency)을 확인하였다. 생쥐는 뒷발까지 넘어갔을 때를 넘어간 것으로 간주하였으며, 각 test는 최대한 300초까지 측정하였으며, 300초가 넘어가는 것은 300초로 간주하였다.

2) 수동 회피 실험을 통한 사건기억능력 측정
상기 투여방법에 따라 朱子讀書丸을 일주일간 투여

하였으며, 약물 투여 3일째부터 상기에 사용된 수동 회피실험의 과정을 적용하여, 사건기억능력을 측정하였다.

3) Y-maze task를 통한 공간 지각 능력 측정

공간 지각 능력은 Y-maze task를 실시하여 측정하였다. 실험은 amyloid-β가 주입된 2일 후에 측정되었다. 생쥐의 움직임은 교차회수(alternation)로 나타내는데, 교차회수란 생쥐가 연속적으로 3개의 통로를 순차적으로 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 각 생쥐는 한 쪽 미로의 끝에서 벽을 보고 있는 상태에서 출발하여 다른 미로로 가도록 하였으며, 교차를 올바르게 성공하면, 1점을 부여하는 방식으로 채점하게 된다. 채점은 각 점수를 가능한 최고 점수(각 arm을 통과한 합에서 2를 뺀 회수)로 나누어서 100을 곱한 수(%)로 한다. 미로를 통과하는 기준은 생쥐가 각 통로의 반을 통과한 경우로 하였다.

4) Y-maze task를 통한 운동량 측정

운동량은 Y-maze task를 사용하여 측정하였다. 측정은 공간 지각 능력 측정과 동시에 이루어졌으며, 각 arm에 들어간 횟수를 모두 더하여 운동량으로 계산하였다.

5) NF-κB 측정

Amyloid-β를 ICV 한지 5일 후에 생쥐를 에테르가 함유되어있는 유리통 안에 주입하여 마취시키고, 좌측 대뇌 피질을 절개한 후 단백질을 추출하였다. 추출된 조직의 단백질을 정량하기 위해 Bradford assay의 방법을 이용하였다. 96 well plate에 BSA 용액을 증류수에 희석하여 6가지 농도로 표준용액으로 만들고, 각 sample 1μl에 DW 79μl를 섞었다. 모든

well에 protein assay 시약(원액)을 섞은 후 5분간 상온에서 방치시킨 후에 A595로 흡광도를 측정하였다.

NF-κB는 Oxford Biomedical Research, Inc.(U.S.A.)에서 나온 kit를 사용하였다. NF-κB를 정량하기 위해 시약과 표준용액은 kit의 설명에 따라 제작하였으며, 96 well-plate에 분주한 후, 표준용액과 sample을 정해진 순서에 따라 정해진 시약과 섞은 후 비우는 과정을 반복하였다. 이 과정이 마무리 된 후 시약을 화학발광분석기에서 넣어 결과를 분석하였다.

6) RT-PCR

뇌의 sample을 떼어 buffer RLT(350μl)에 넣고 homogenization을 넣은 후 원심분리기를 3분간 작동시켜 상층액만을 새 튜브에 옮기고, 70%EtOH를 섞어 RNeasy mini column에 담아 10,000rpm으로 15초간 원심 분리하였다. 이 후 각 과정에 따라 정해진 완충용액을 넣고 각각 10,000rpm으로 15초간 원심분리를 시행하였다.

위의 과정에 따라 추출된 total mRNA 20μl를 65℃로 10분간 가열한 뒤 급속 냉각시킨 후 bulk first-standard reaction 11μl, DTT 1μl, of primer 1μl와 함께 잘 섞은 후 37℃ water bath에서 1시간 이상 배양하였다. 이 과정으로 제조된 first-stand cDNA를 주형으로 2μl를 사용하였다. 주형에 대한 primer는 cyclophilin, protein kinase B(PKB), nerve growth factor-α(NGF-α)(Table 2.)를 사용하였으며, 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/μl)와 antisense primer (20pmole/μl)를 1μl씩 혼합한 후 2.5mM dNTP 4μl, 10X buffer 3μl, Taq(5U/μl) 1μl, 멸균증류수 18μl를

Table 2. Sequences of Primer Used for RT-PCR

Gene Name		Sequence
Protein kinase B	Sense	5'-CCTGTCTCGAGAGCGTGTGTT-3'
	Antisense	5'-CATAGTGGCACCGTCCTTGA-3'
Nerve growth factor-α	Sense	5'-ACTGGGTTCACAGCTGCC-3'
	Antisense	5'-CGCAGCAGCATCAGTCAT-3'
Cyclophilin	Sense	5'-ACCCACCGTGTCTTCGAC-3'
	Antisense	5'-CATTTGCCATGCACAAGATG-3'

첨가하여 30 μ l가 되도록 하였다. 이 후 denaturation (95 $^{\circ}$ C, 60sec) annealing(55 $^{\circ}$ C, 60sec, 35cycle), extension(72 $^{\circ}$ C, 60sec)을 25회 시행한 뒤 PCR을 시행하였다. 각 PCR product는 전기영동하여 분석하였다.

6. 統計 處理

실험 결과 모든 데이터는 mean \pm S.E.M로 표시하였고, 결과는 SPSS 8.0 for windows를 이용하여 One-

way ANOVA(Tukey post-hoc test)를 사용하였으며, P<0.05인 것을 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 結 果

1. 기억 결손을 유발하는 amyloid- β 의 농도 결정
 PBS 투여군은 206.2 \pm 30.53(sec), amyloid- β 20pmol ICV한 군은 193 \pm 23.94(sec), 100pmol ICV한 군은

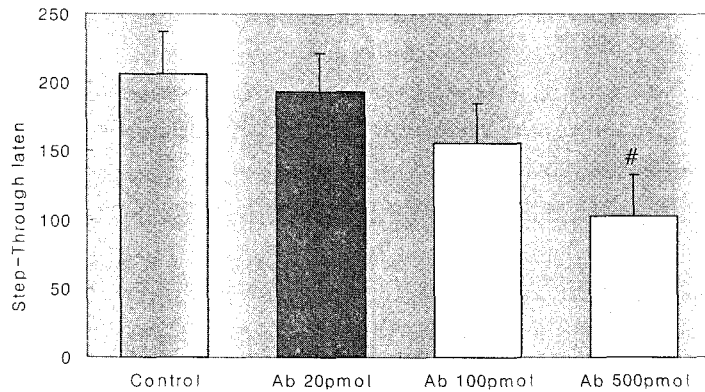


Fig. 1. Effect of Intracerebroventricular Amyloid- β on Passive Avoidance Test.

Control group was injected with phosphate-buffered saline(PBS) and treated group was injected various doses of amyloid- β (Ab)(20pmol, 100pmol, 500pmol). The next day retention test was done. The data are expressed as mean \pm S.E.M, with n=15~20 mice per group. #: compared to control group. P<0.05

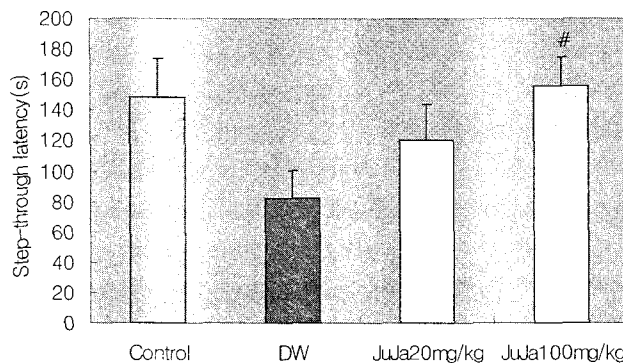


Fig. 2. Effect of Jujadokseo-hwan Given by Mouth in Part of Memory Capacity on Passive Avoidance Test.

Control group and DW group were given with distilled water and the others were given Jujadokseo-hwan(JuJa) at different concentration(20mg/kg, 100mg/kg) by mouth. Control group was injected phosphate-buffered saline(PBS) and treated groups were injected amyloid- β at the concentration of 500pmol by method of intracerebroventricular injection. The data are expressed as mean \pm S.E.M, with n=15~20 mice per group. #: compared to DW group. P<0.05

155.44±29.44(sec), 500pmol ICV한 군은 103±29.42(sec)을 나타내었다. 이 중 500pmol의 농도에서 유의성이 확인되었다(Fig. 1).

2. 朱子讀書丸이 사건 기억 능력에 미치는 영향

수동 회피 실험에서 대조군은 148.21±25.29(sec), 실험군 중에서 DW군은 82.11±25.29(sec), 朱子讀書丸 20mg/kg투여군은 128.31±23.47(sec), 100mg/kg투

여군은 155.38±19.44(sec)이었다.

실험군 중에서 DW군과 朱子讀書丸을 100mg/kg을 경구투여한 군 사이에서 유의성이 확인되었다(Fig. 2).

3. 朱子讀書丸이 공간 지각 능력에 미치는 영향

대조군은 66.12±2.79(%)이고, DW군은 71.30±2.61(%), 朱子讀書丸을 20mg/kg 투여한 군은 70.64±3.13

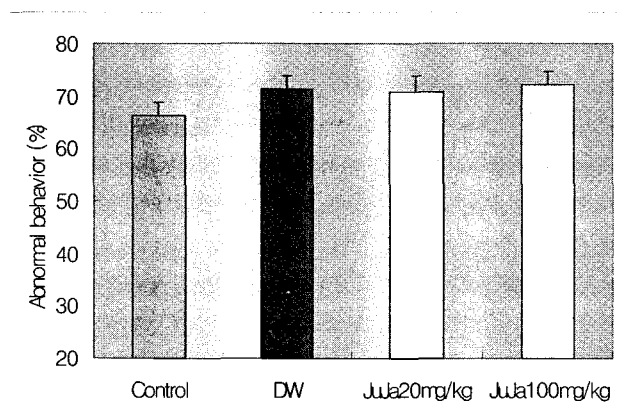


Fig. 3. Effect of Jujadokseo-hwan In Part of Spatial Memory on Y-maze Task.

Control group and DW group were given distilled water and the others were given Jujadokseo-hwan(JuJa) at different concentration(20mg/kg, 100mg/kg) by mouth. Control group was injected phosphate-buffered saline(PBS) and treated groups were injected amyloid-β at the concentration of 500pmol by method of intracerebroventricular injection. There was no significant difference between control and treated groups.

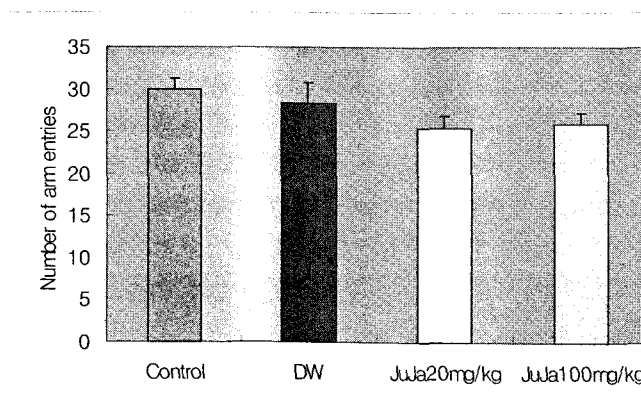


Fig. 4. Effect of Jujadokseo-hwan in the Part of Locomotor Activity on Y-maze Task.

Control group and DW group were given distilled water and the others were given Jujadokseo-hwan(JuJa) at different concentration(20mg/kg, 100mg/kg) by mouth. Control group was injected phosphate-buffered saline(PBS) and treated groups were injected amyloid-β at the concentration of 500pmol by method of intracerebroventricular injection. There was no significant difference between control and treated groups.

(%), 100mg/kg 투여한 군은 72.02±2.77(%)의 결과를 나타내었다. 각 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3.).

4. 朱子讀書丸이 운동량에 미치는 영향

대조군의 운동량은 30±1.16(회), 실험군 중에서 DW군은 28.33±2.49(회), 朱子讀書丸 20mg/kg을 투여한 군은 25.41±1.47(회), 100mg/kg을 투여한 군은 25.83±1.37(회)의 결과를 나타내었다. 각 군에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4.).

5. 朱子讀書丸이 NF-κB에 미치는 영향

NF-κB 측정 결과 대조군은 24.62±4.95(ng/mg of protein), DW군은 12.82±2.03(ng/mg of protein), 朱子讀書丸 20mg/kg 투여한 군은 16.02±2.03(ng/mg of protein), 100mg/kg 투여한 군은 13.08±2.07(ng/mg of protein)이었다.

대조군과 DW군 사이에서 유의한 변화가 관찰되었으며, 朱子讀書丸을 투여한 군에서는 증가되는 경향을 보였다(Fig. 5.).

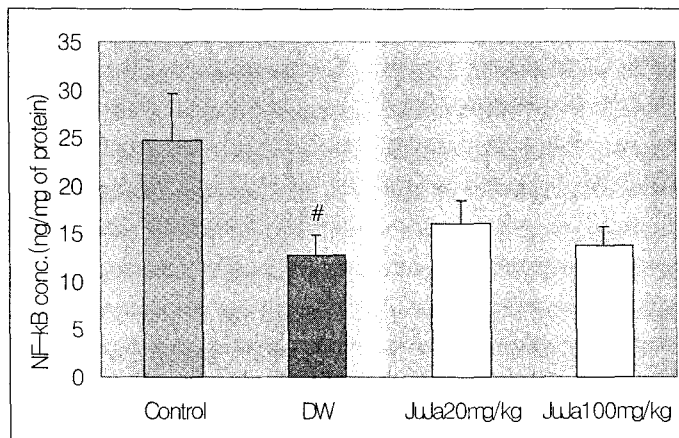


Fig. 5. Measurement of NF-κB.

Control group and DW group were given distilled water and the others were given Jujadokseo-hwan(JuJa) at different concentration(20mg/kg, 100mg/kg) by mouth. Control group was injected phosphate-buffered saline(PBS) and treated groups were injected amyloid-β at the concentration of 500pmol by method of intracerebroventricular injection. There was no significant difference between control and treated groups. The data are expressed as mean±S.E.M. with n=15-20 mice per group. #: compared to control group. P<0.05

6. 朱子讀書丸이 protein kinase B(PKB), nerve growth factor-α(NGF-α)에 미치는 영향

Protein kinase B(PKB), nerve growth factor-α(NGF-α)는 대조군에 비해 DW군에서는 감소되었고, 朱子讀書丸을 투여한 군은 DW군에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 6.).

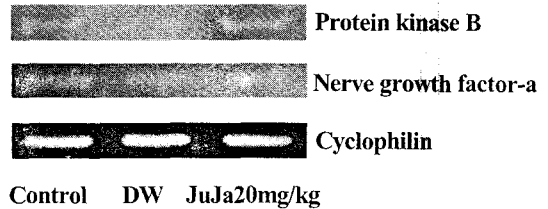


Fig. 6. Effect of Jujadokseo-hwan analyzed by RT-PCR of PKB & NGF-α expressions in the cerebral cortex of control or treated mice.

Control group and DW group were given distilled water and the others were given Jujadokseo-hwan(JuJa) at concentration of 20mg/kg by mouth. Control group was injected phosphate-buffered saline(PBS) and treated groups were injected amyloid-β at the concentration of 500pmol by method of intracerebroventricular injection. DW group showed down-regulation and group given Jujadokseo-hwan 20mg/kg by mouth showed up-regulation.

IV. 考 察

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 치매의 가장 흔한 원인으로, 경제적으로 많은 비용이 소모될 뿐 아니라, 가족과 간병인에게 큰 정서적 부담을 준다. 뇌의 위축증은 나이가 들어감에 따라 어쩔 수 없는 현상이지만, 수년에 걸쳐 심한 정도의 광범성 대뇌 위축증은 반드시 치매와 연관이 있으며, 이러한 대부분의 경우가 흔히 알츠하이머병으로 입증되었다. 알츠하이머병이 어느 연령에나 일어날 수 있지만, 환자의 대부분은 60대 이상이며, 젊은 사람은 상대적으로 소수이다^{1,2}.

알츠하이머병의 주증상은 건망증의 점진적인 발생으로, 초기에는 기억력 장애가 발견되지 않은 상태로 지낼 수도 있고, 양성건망증으로 여겨지기도 한다. 그러다가, 서서히 인지기능에 문제가 생겨 경제생활, 직업적 업무수행, 쇼핑 혹은 집안일 등 일상생활에 장애를 주게 된다. 병의 중기에는 일을 수행할 수 없게 되고, 쉽게 길을 잃고 혼동을 일으키며 일상생활에 있어서 타인의 도움이 필요하게 된다. 일부 환자들은 초기에 실어증이 주증상으로 나타나기도 한다. 기억력 장애가 심해지면서 다른 대뇌 기능의 이상도 점차적으로 나타나게 되는데, 언어장애는 처음에는 약하나 나중에는 명백한 실어증의 형태로 나타나게 되며, 時空의 指南力도 장애를 보이게 되어 차를 주차하지 못하거나, 팔을 옷소매에 제대로 집어넣지 못하는 등의 운동장애를 나타나게 된다. 말기에는 흔히 사용하던 물건과 도구의 사용법을 잊어버리게 된다^{1,2}.

치매를 일으키는 원인은 아직 뚜렷하지 않다¹⁰. 가장 중요한 위험 인자는 연령의 증가와 가족력이다. 발병률은 나이가 들어가면서 증가하여 85세 이후에는 20~40%에 이른다. 여성의 경우 폐경 후 에스트로겐호르몬의 사용이 알츠하이머병의 발병감소와 연관이 있다는 보고도 있다. 가장 중요한 현미경적인 소견은 신경돌기노인반과 신경세포질 내 신경원 섬유용축체이다. 신경돌기반은 중심핵에 amyloid- β , proteoglycan, Apo E, α 1-antichymotrypsin과 기타 단

백질을 함유한다. 신경원 섬유용축체(Neurofibrillary Tangles, NFT)는 신경세포질의 호은성의 꼬인 신경세사로 비정상적으로 인산화된 tau 단백질이다. Tau 단백질의 미세소관 분절에 결합하는 능력은 부분적으로는 인산염 그룹의 수에 의해 결정된다. Tau 단백질의 인산화의 증가는 이런 정상적인 기능의 장애를 유발한다. 생화학적으로 알츠하이머병은 대뇌피질의 단백질 및 신경전달물질, 특히 아세틸콜린과 그의 합성 효소인 choline acetyltransferase(CAT) 및 nicotinic cholinergic receptor 감소와 관련이 있다. 그 외에도 다운 증후군과 관련하여 유전에 대한 연관성도 발견되고 있다¹.

Amyloid- β 는 39-42개의 아미노산으로 구성된 4.2-kDa의 단백질로, 더 큰 세포막사이 단백질인 아밀로이드전구단백질(amyloid precursor protein; APP)의 β / γ secretase 효소에 의한 단백질분해에 의해 만들어진다. Amyloid- β 의 정상기능은 아직 명확하지 않다¹. 다만 amyloid- β 는 뇌에서 산화적 스트레스(oxidative stress)와 감염을 야기할 가능성이 있으며, 이것은 알츠하이머병의 발생에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴. 이러한 결과로 amyloid- β 는 mice에 주입하는 경우 효과적으로 학습과 기억행동을 손상시킬 수 있음이 보고되었다^{11,12}.

최근 人蔘, 遠志, 菖蒲, 茯芩으로 구성된 DX-9386의 연구 결과에 따르면 DX-9386은 운동능력을 향상시키며, 지질 과산화를 감소함으로써 기억 손상을 개선하였고¹³, 노년기를 연장함으로써 항노화 효과가 있다고 하였다¹⁴. Zhang 등¹⁵은 이것이 학습이 손상된 모델 동물에 대해 해마에 일부 직접적인 영향을 미쳐 개선의 효과를 나타내는 것으로 추정하였다. 이에 Smriga 등¹⁶은 네 가지 약물을 각각 나누어 실험하였는데, 茯芩과 人蔘은 효과가 있었고, 遠志와 菖蒲는 효과가 적었다고 발표하였다. 朱子讀書丸은 DX-9386과 人蔘, 菖蒲, 遠志가 일치하며, 白茯神은 茯芩으로 대체된 처방이다. 본 실험에서는 水銀을 함유하여 장기간 복용시 주의를 요하는 주사는 제거한 후 실험에 사용하였다.

병태모델은 amyloid- β 로 생쥐에게 학습과 기억행동

장애를 유발시켜 기억과 학습장애에 미치는 영향을 확인하였다. 본 실험에서 사용된 amyloid- β 1-42는 Yan 등⁵이 실험에서 사용해 이미 치매 유발의 효능을 입증하였다. 본 실험에서는 사용될 amyloid- β 의 농도를 결정하기 위하여, 대조군과 20pmol, 100pmol, 500pmol의 세가지 농도의 실험군을 정한 후 각각 Bregma에 ICV한 후 수동회피실험을 실시하였다.

수동회피실험은 사건기억능력을 평가하기 위해 고안되었다. 이 실험은 비협조적인 동물도 쉽게 실험할 수 있고, 어떤 동물도 빨리 쉽게 학습 시킬 수 있는 이점이 있으며, 다양한 분야의 행동실험에 활용되었다. 그 효과를 검증한 결과 20pmol과 100pmol에서 생쥐가 어두운 방으로 들어가는 데 까지 걸리는 시간은 다소 짧아지는 양상을 보였으나, 통계학적으로 유의성은 없었고, 500pmol의 농도에서는 유의성 있는 결과가 나왔다. 따라서 이번 실험에 사용될 amyloid- β 의 농도는 500pmol로 정하였다.

朱子讀書丸이 기억능력에 미치는 영향을 알아보기 위해 수동회피 실험을 시행한 결과 약물의 농도에 따라 기억력이 증가하는 경향을 나타내었다.

Y-maze task는 단기작업 기억(working memory)을 측정하기 위해 고안되었다. Y-maze task는 공간 기억 능력(spatial memory)을 측정할 수 있다⁸. 朱子讀書丸은 Y-maze task를 시행한 결과 공간지각능력 과 운동량에는 효과가 없는 것으로 확인되었다.

NF- κ B는 가장 특징적인 전사인자로서, 인체에 골고루 분포되어 있고, 많은 유전자의 발현을 조절하고 있으며, 상당수의 NF- κ B는 면역계와 감염에서 중요한 역할을 하는 단백질을 코드화한다¹⁷. 최근의 연구에서는 학습과 기억의 행동 틀에서 중재자로서의 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. NF- κ B는 학습과 기억에 있어서 긍정적인 역할을 하며, 따라서, NF- κ B의 작용을 저해하면 다양한 학습의 틀을 부족하게 만들 수 있다¹⁸.

NF- κ B는 기억의 통합의 과정에서 활성화되는 것이 Chasmagnathus 종의 게(crab)의 기억의 패러다임에서 발견되었다. 이 모델에서 NF- κ B 활성화와 기억 형성은 뚜렷한 상관성이 발견되었으며^{19,20}, 반면

sulfasalazine은 Inhibitor κ B kinase를 저해하여 건망을 유발하였다²¹. NF- κ B는 시냅스에서 그것의 신호를 보내는 분자로서의 활동과 핵에 근접하는 전사개시자로서의 두 가지 역할을 하는 것으로 여겨져 왔다²². 활성화된 NF- κ B는 장기기억형성 후의 종말 시냅스에서 발견되었으며²⁰, NF- κ B p65와 tumor necrosis factor receptor의 결손이 공간 기억 능력의 결손을 나타내었다²³. Freudenthal 등²⁴은 κ B decoy로 장기기억이 손상된 생쥐모델의 NF- κ B를 측정한 결과 45분까지는 NF- κ B가 증가하는 경향을 보였으나, 이후에는 κ B decoy가 NF- κ B의 활성을 저해하여 감소하는 경향을 확인하였다. 본 실험에서 NF- κ B는 DW군과 대조군 사이에서는 뚜렷한 감소를 보였고, 朱子讀書丸을 투여한 군에서는 DW군에 비해 증가되는 경향을 보였다.

PKB는 AKR mouse의 흉선종 세포에서 추출한 AKT⁸의 RNA 종양 세포에서 직접 변형시켜 분리한 것으로²⁵, inositol lipid를 발생시키는 phosphoinositide 3-kinase(PI3Ks)의 특징적인 목표가 되는 물질이다²⁶. PKB는 PI3Ks가 포함된 과정에 의해 성장인자에 반응하여 활성화되며²⁷, PKB는 신경계의 생존에 있어서 성장인자의 암호화를 PI3Ks를 통해 중재하는 것과 혈장이 부족하거나 신경계 세포가 분화하는 과정에서 anti-apoptosis의 신호를 전해주는 중대한 역할에 관여한다²⁸. PKB는 소뇌 뉴런의 생존에 중요하며, 세포의 생존과 성장 그리고 당의 대사의 다양한 작용을 하는 조절인자로서, amyloid- β 의 독성으로 인해 세포가 죽어가는 과정을 막는 역할을 할 수 있다²⁸⁻³⁰. NGF는 쥐의 악하선에서 정제된 것으로, 교감신경계와 일부 감각신경의 성장과 분화의 조절에 관여하는 폴리펩타이드이다³¹. NGF는 alpha, beta, gamma의 폴리펩타이드로 나누어지는데, beta-subunit은 NGF의 성장과 활동의 촉진을 담당하며, gamma-NGF는 kallikreins의 특징적인 활동을 보여주며, pro-beta-NGF를 2개 이상의 장소로 분할하여 성장인자를 활성화시키는 것으로 여겨진다. Alpha-subunit은 의미있는 효소 활동은 보이지는 않지만, 복합체의 안정적인 형성을 위해서 분명히 필요하다³². 또한,

NGF- α 는 생체와 실험관 모두에서 신경계 세포의 생존에 유익한 영향을 미치는 것으로 확인되었다³³.

Kong 등³³은 amyloid- β 로 알츠하이머가 유발된 생쥐 병태 모델의 유전자의 발현을 확인해 본 결과 PKB와 NGF- α 는 amyloid- β 를 주입하였을 때 감소되는 경향을 확인하였다. 본 실험에서 amyloid- β 를 투여하지 않은 대조군과 DW군은 PKB와 NGF- α 가 기존 연구결과와 같이 감소되는 경향을 보였으며, 朱子讀書丸을 투여한 군은 DW군에 비해 증가되는 경향을 나타내어 신경계 세포가 독성에 저항하며 생존할 수 있는 능력이 증가되는 것을 알 수 있었다.

이상에서 朱子讀書丸은 수동회피실험에서 기억력을 향상시켰으며, NF- κ B와 PKB, NGF- α 를 증가시켜 amyloid- β 로 인해 신경 세포가 죽어가는 것을 막음으로써 알츠하이머병으로 인한 치매 현상에 효과가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

Amyloid- β 를 주입하여 알츠하이머를 유발시킨 생쥐 모델에게 朱子讀書丸을 투여하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Amyloid- β 를 500pmol의 농도로 주입한 군에서 치매가 유발되었다.
2. 朱子讀書丸은 사건 기억 능력을 향상시켰다.
3. 朱子讀書丸은 공간지각능력을 향상시키지 못하였다.
4. 朱子讀書丸은 운동량을 향상시키지 못하였다.
5. 朱子讀書丸은 amyloid- β 로 저하된 NF- κ B의 수치를 증가시키는 경향을 나타내었다.
6. 朱子讀書丸은 PKB와 NGF- α 의 발현을 증가시켰다.

Amyloid- β 를 주입한 알츠하이머 모델에게 朱子讀書丸을 투여한 결과 기억력을 향상시켰으며, NF- κ B의 수치 역시 증가시키는 경향성을 보였고, PKB와 NGF- α 의 양도 증가시키는 것으로 보아 朱子讀書丸은 알츠하이머 병태 모델의 생쥐에게 효과가 있는

것으로 보인다.

參考文獻

1. 해리슨내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울: 도서출판 MIP; 2003, p.2466.
2. 아담스 신경과학 편찬위원회. 아담스 신경과학. 서울: 도서출판 정담; 1998, p961.
3. 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. *Neurosci.* 2000;95(1):1-4.
4. Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobio.* 1999;57:301-23.
5. Ji-Jing Yan, Jac-Young Cho, Hee-Sung Kim, Kyoung-Li Kim, Jun-Sub Jung, Sung-Oh Huh, Hong-Won Suh, Yung-Hi Kim & Dong-Keun Song. Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *British J of Pharmacol.* 2001;133: 89-96.
6. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 1999, p.191.
7. Miller NE. Studies of fear as an acquerable drive I: Fear as motivation and fear-reduction as reinforcement in the learning of new response. *J of Experimental Psychology.* 1948;38:89-101.
8. Sarter M, Bodewitz G & Stephens DN. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta carbolines. *Psychopharmacol.* 1988; 94:241-53.
9. Laursen SE & Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice: Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods;* 1986;16: 355-7.
10. 이광우 편저. 임상신경학. 서울: 범문사; 2002,

- p.208.
11. Flood JF, Morley JE & Roberts E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88,3363-6.
 12. Maurice T, Lockhart BP & Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 1996;706:181-93.
 13. Nishiyama N, Zhou Y, Saito H. Ameliorative effects of chronic treatment using DX-9386, a traditional Chinese prescription, on learning performance and lipid peroxide content in senescence accelerated mouse. *Biol Pharm Bull.* 1994 Nov;17(11):1481-4.
 14. Zhang Y, Saito H, Nishiyama N, Abe K. Anti-aging effect of DX-9386 in senescence accelerate mouse. *Biol Pharm Bull.* 1994 Jun;17(6):866-8.
 15. Zhang Y, Saito H, Nishiyama N, Abe K. Effects of DX-9386, a traditional Chinese prescription, on long-term potentiation in the dentate gyrus in rats. *Biol Pharm Bull.* 1994 Oct;17(10):1337-40.
 16. Smriga M, Saito H, Nishiyama N. Hoelen(Poria Cocos Wolf) and ginseng(Panax Ginseng C.A. Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation in vivo. *Biol Pharm Bull.* 1995 Apr; 18(4):518-22.
 17. Luke AJ, O'Neill and Christian Kaltschmidt. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997; 20:252-8.
 18. Mollie K, Meffert & David Baltimore, Physiological functions for brain NF- κ B. *TRENDS in Neurosci.* 2005;28:37-43.
 19. Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Delorenze A & Romano A. Kappa-B like DNA binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Neurosci. Lett.* 1998; 242:143-6.
 20. Freudenthal R & Romano A. Participation of NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Brain Res.* 2000;855: 274-81.
 21. Merlo E, Freudenthal R & Romano A. The I κ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Neuroscience.* 2002;112:161-72.
 22. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B & Bauerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech. Dev.* 1993; 43:135-47.
 23. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS & Baltimore D. NF- κ B function in synaptic signaling and behavior. *Nature Neurosci.* 2003;6: 1072-8.
 24. Freudenthal R, Mariano M, Boccia, Gabriela B Acosta, Mariano G Blake, Merlo E, Carlos M Baratti & Romano A. NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *European J of Neurosci.* 2005; 21:2845-52.
 25. Staal SP. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT2 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1987;84: 5034-7.
 26. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 2000;346;561-76.
 27. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. Akt/PKB and Other D3 Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-

- Dependent Phosphorylation. Annual Review of Biochem. 1999;68:965-1014.
28. Dudek K, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Sci. 1997;275:661-5.
29. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. Genes Dev. 1999; 13:2905-27.
30. Martin D, Salinas M, Lopez-Valdaliso R, Ser-rano E, Recuero M, Cuadrado A. Effect of the Alzheimer amyloid fragment A β (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12cells. J Neurochem. 2001;78:1000-8.
31. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. Sci. 1987;1154-62.
32. Evans BA, Richards, RI. Genes for the alpha and gamma subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. EMBO J. 1985;4:133-8.
33. Ling-na KONG, Ping-ping ZUO, Liang MU, Yan-Yong LIU, Nan YANG. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer's disease. Acta Pharmacologica Sinica. 2005;26(6):666-72.