

## 총명탕, 원지, 석창포가 베타아밀로이드로 유발된 학습과 기억장애에 미치는 영향

박은경, 심은섭\*, 정혁상\*, 손낙원, 손영주\*\*

경희대학교 동서의대대학원, \*경희대학교 한의과대학 한의학연구소, \*\*상지대학교 한의과대학

### Effects of *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix* and *Acori Graminei Rhizoma* on A $\beta$ Toxicity and Memory Dysfunction in Mice

Eun-kyung Park, Eun-shep Shim\*, Hyuk-sang Jung\*, Nak-won Sohn, Young-joo Sohn\*\*

Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University

\*Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

\*\*College of Oriental Medicine, Sangji University

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study investigated the protective effects of the water extracts of *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix*, and *Acori Graminei Rhizoma* in an in vivo Alzheimer's disease (AD) mouse model.

**Methods** : Memory impairment was induced by an intraventricular injection of A $\beta$ 25-35 peptides and subsequently *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix*, or *Acori Graminei Rhizoma* extract were administered orally for 14 days.

**Results** : In the water maze task, *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix*, and *Acori Graminei Rhizoma* extracts improved learning ability during the acquisition period and significantly increased memory scores during the retention period versus A $\beta$ -injected controls. Furthermore, the toxicity of A $\beta$ 25-35 on hippocampus was assessed immunohistochemically (Tau, MAP2, TUNEL, Bax) and by in vitro study. *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix*, and *Acori Graminei Rhizoma* demonstrated significant neuroprotective effects against oxidative damage and apoptotic cell death of hippocampal neurons damaged by A $\beta$  25-35.

**Conclusions** : These results suggested that *Chongmyung-tang*, *Polygalae Radix* and *Acori Graminei Rhizoma* extract improve memory impairment and reduce Alzheimer's dementia via anti-apoptotic effects and by modulating the expressions of Tau and MAP2 protein in the hippocampus.

**Key words** : *Chongmyung-tang*, A $\beta$ 25-35, water maze, Tau, MAP2

## 1. 서론

치매란 가벼운 기억장애로부터 전반적인 인지기능의 저하, 정서장애, 성격장애 및 행동장애 등으로 직업, 사회생활 및 대인관계에서 정상적인 일상생활을 할 수 없게 하는 질병을 말한다. 알츠하이머병(Alzheimer's Disease : AD)은 전체 치매의

· 교신저자: 손영주 강원도 원주시 우산동 283번지  
상지대학교 한의과대학  
TEL: 033-741-9303 FAX: 033-732-2124  
E-mail: q701@chollian.net

· This study was supported by BK21 Project, Republic of Korea

50% 정도를 차지하며 여성에서 남성보다 2-3배 정도 더 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병은 서서히 뇌병변이 일어나는 퇴행성 뇌질환이며 대뇌의 위축과 노인반(senile plaque) 그리고 신경원섬유의 변화가 특징적으로 나타난다. 병리조직학적 소견은 세포 외 노인반(extracellular senile plaque)과 세포 내 신경섬유 다발(intracellular neurofibrillary tangles), 특정 신경부위 손상, 시냅스퇴화(synaptic degeneration) 등을 특징으로 한다. 노인반의 주요 구성성분은  $\beta$ -amyloid로서 fibrillar 및  $\beta$ -sheet 구조로 응집되는 경향이 있다. 알츠하이머병의 원인에 대해서 여러 가지 설들이 제기되고 있으며 그 중 가장 유력한 가설로는  $\beta$ -amyloid protein(A $\beta$ )의 축적을 들 수 있는데, 알츠하이머병 초기에 A $\beta$ 는 apoptosis pathway를 활성화시켜 신경퇴행을 유도하는 것으로 알려져 있다. 즉, A $\beta$ 는 membrane blebbing 및 DNA 손상에 의한 cell shrinkage, nuclear apoptotic bodies의 생산, DNA ladder 등 apoptosis의 전형적인 모습을 나타낸다. 또한 과인산화된 tau protein의 침착에 의한 신경퇴행이 발생한다<sup>12</sup>.

학습과 기억을 증진시키는 대표적인 처방으로 다용되는 총명탕(聰明湯)은 허준의 <東醫寶鑑 · 內景編>에서 “多忘”을 치료하는 것으로 기재되어 있으며, 기억력 감퇴, 건망 등의 병증을 치료하는데에 활용되어 왔다<sup>3</sup>. 총명탕은 원지(遠志), 석창포(石菖蒲), 백복신(白茯神) 등 세가지 약물로 구성되는데 건망유도 백서를 이용한 실험적 연구<sup>1</sup>를 통하여 총명탕의 학습 및 기억증진에 대한 유의성이 보고된 바 있다.

총명탕의 구성약물인 원지와 석창포는 각각 寧心安神, 祛痰利竅, 消散癰腫의 효능과 開竅豁痰, 醒神益智, 化濕開胃의 효능이 있다<sup>4</sup>. 원지에 대한 실험적 연구로는 apomorphine으로 유발된 생쥐의 과행동 및 상동적 행동에 억제효과<sup>5</sup>, 뇌성상세포에 작용하여 염증을 일으키는 주요한 세포활성물질의 생성을 억제<sup>6</sup>, 지질과산화 억제<sup>7</sup> 및 이노, 진통, 해

열, 수면시간 연장<sup>8</sup> 등의 효과가 보고된 바 있고, 석창포에 대한 실험적 연구로는 장관운동의 이완<sup>9</sup>, 혈중 콜레스테롤의 수치 감소<sup>10</sup>, 국소뇌혈류량 증가<sup>11</sup>, 뇌연막동맥의 직경 확장<sup>12</sup>, 경련억제<sup>13</sup>, MAO 억제활성, xanthine oxidase 억제활성 및 지질과산화 억제효과<sup>7</sup>가 보고된 바 있으며, 원지와 석창포의 혼합투여에 대한 실험적 연구로는 뇌보호기능<sup>14</sup>이 있다.

본 연구에서는 알츠하이머병 치매 동물 모델에서 총명탕과 그 구성약물인 원지, 석창포의 방어효과를 측정하였는데, 생쥐에 알츠하이머형 치매 질환을 유발시키기 위하여 뇌의 뇌실 내에 베타아밀로이드(A $\beta$ 25-35)를 주입하고, 총명탕, 원지, 석창포를 각각 14일간 경구투여 한 후, 수중미로검사(water maze test)를 통해 학습과 기억력 장애의 회복정도를 측정하였으며, 생쥐 뇌의 해마조직에서 Tau, MAP2, Bax 등의 단백질 변화를 면역조직화학적 방법을 통하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 샘타코(주)에서 구입한 11주령, 약 25-30g사이의 BALB/c계 수컷 생쥐를 사용하였다. 생쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 제조

경희의료원에서 구입한 총명탕 120g, 원지 1.092g과 석창포 787.6g을 2,000 ml의 3차 증류수로 전탕하고, 전탕액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조(-70℃, 10mmHg)하여 총명탕 17.0g, 원지 38.9g, 석창포 19.8g의 분말 건조된 농축액기스를 얻었다. 수율은 각각 총명탕 14.2%, 원지

3.56%, 석창포 2.51%였다.

Table 1. Contents of *Chongmyung-tang*.

Herb medicine	Scientific name	Medical Use	Dosage (g) /Chup*
<i>Polygalae Radix</i>	<i>Polygala tenuifolia</i> L.	a lump root	4g
<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	<i>Acorus gramineus</i> Ogon	rootstock	4g
<i>Poria cocos</i>	<i>Poria cocos</i> Wolff	ripen fruit	4g
Total			12g

\* : Chup : A standard unit of prescription filled (a dose).

### 3. 실험군의 분리와 Aβ25-35주입을 통한 치매유발

실험군 분리는 모의시술군(Sham, n=8), 대뇌외측뇌실(lateral ventricle) 내에 Aβ25-35를 주입한 Aβ25-35주입군(Aβ inj. : n=8), Aβ25-35주입 후 14일간 총명탕을 경구투여한 총명탕투여군(*Chongmyung-tang* : n=8), Aβ25-35주입 후 14일간 원지추출물을 경구투여한 원지투여군(*Polygalae Radix* : n=8), Aβ25-35주입 후 14일간 석창포추출물을 경구투여한 석창포투여군(*Acori Graminei Rhizoma* : n=8)으로 나누었다.

실험에 사용된 Aβ25-35(A4559, Sigma-Aldrich, U.S.A)는 독성을 높이기 위해 실험 전에 37°C에서 72시간 보관하여 서로 응집될 수 있도록 하였다. 실험군 생쥐를 sodium pentobarbital(50mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 입체정위 수술장치(stereotaxic apparatus)를 이용하여 고정하고 생쥐 뇌의 피부를 박리한 다음 알츠하이머병 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 Aβ25-35를 우외측뇌실 내로 주입하는데, Aβ25-35가 주입되는 우외측뇌실의 위치는 본 실험 전에 미리 트립판 블루염색시약(trypan blue stain)을 주입해 봄으로써 육안으로 확인하였다. 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리 쪽)방향으로 0.5mm, midline(정중선)에서 오른쪽

으로 1.0mm, 구개골 표면에서 2.0mm 깊이의 지점이며, 26-gage 미세주사기를 통해 5μl(mg/ml)의 양을 약 15초 동안 천천히 주입하였다. 모의시술군의 경우는 같은 시술과정으로 Aβ25-35를 주입하는 대신 같은 양의 생리식염수를 뇌실 내로 주입하였다.

### 4. 총명탕과 원지, 석창포의 투여

시술 후 약물은 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 약물을 생리식염수에 녹여 2주간 투여한 후 행동검사를 시행하였다. 실험동물에의 약물 투여량은 건조 총명탕 12g, 원지 4g, 석창포 4g에 대한 체중비례로 계산하여 체중 100g 당 총명탕 24.0 mg, 원지 0.6 mg, 석창포 0.5 mg을 매일 1회 경구투여 하였다.

### 5. Morris 수중 미로 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

수중 미로로 이용되는 수조는 직경이 90cm, 높이가 35cm인 원형통으로 온도가 23±1°C되는 물이 20.5cm 높이로 채워지게 하였다. 수중 미로의 주변은 비디오키메라, 실험대, 그리고 수조 주위에 각종 도형 모형의 공간단서(visual cue)들을 설치하고 동일하게 유지하였다. 도피대는 직경이 10cm, 높이가 20cm인 원통형 투명 아크릴받침대로 수면보다 약 0.5cm 낮게 위치시켰다. 또한 물에 분유를 일정량 혼합함으로써 불투명하게 하여 실험용 쥐의 육안으로는 도피대를 찾아갈 수 없게 만들었다. 수중 미로는 사분면으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되어 이중 북동(NE) 사분면의 중심부에 도피대가 놓여지고, 반대 측인 남서(SW) 사분면의 중심부가 출발지점으로 사용되었다.

실험쥐들은 수조 속에서 자유롭게 수영할 수 있도록 하였는데, 숨겨진 도피대를 찾아서 도달하는 시간을 측정하였다. 스스로 도피대를 찾아낸 실험쥐들은 약 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 허용하였으며, 60초 이내에

도피대를 스스로 찾아내지 못한 쥐들은 실험자가 조심스럽게 도피대 쪽으로 유도하여 도달할 수 있도록 하였다. 수중 미로 실험은 이러한 방식으로 시술 후 14일째 되는 날로부터 3일간 시행되었는데 첫째날 5회, 둘째날 3회 시행한 후 마지막 날에는 자유수영 검사(retention test)가 시행되는데, 이 때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오카메라로 녹화 기록된 후, SMART 프로그램을 이용하여 분석되었다.

### 6. 공간 기억력 유지 검사

수중 미로 검사 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유수영 검사를 시행하였는데, 수조를 5개의 구역으로 나누고 도피대로부터의 거리에 따라 각각의 구역에 서로 다른 점수를 할당하였다. (Zone 1 : -1, Zone 2 : +1, Zone 3 : +8, Zone 4 : +5, Target (Platform) : +10, Fig. 1.). 그 후, 각 실험 동물들이 60초간 자유롭게 수영하며 도피대를 찾으려 하였는데, 그 궤적을 기록하여 각각의 구역별로 머문 시간과 부여된 점수의 곱을 합산하여 공간 기억력 유지능력에 대한 총 점수를 산출하였다.

### 7. 뇌조직의 처리

모든 행동실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (25mg/kg, i.m.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 4% formalin 고정액(fixative)으로 심장을 통해 관류하였다. 이 후 뇌를 꺼내어 같은 고정액으로 24시간 동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 완충액(phosphate buffer saline : PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 적출된 뇌는 파라핀 포매를 거쳐 8 $\mu$ m의 두께로 절편되었다.

### 8. 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다

시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-Bax (B-9, 1:200, Santa Cruz, CA, USA), anti-Tau (MN1000, 1:200, Pierce Endogen, USA) 그리고 anti-MAP2(M4403, 1:100, Sigma, USA)로, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다.

이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidinetetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

### 9. 통계처리

실험결과는 통계 프로그램 SPSS® for windows (version 10.0, SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.)를 사용하여 약물의 농도에 따른 지표의 발현수치를 비교할 경우 oneway ANOVA를 실시하였으며, 유의수준 P value<0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 post hoc test로서 Scheffe's test를 시행하였다.

## III. 실험성적

### 1. Morris 수중 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

수중 미로 장치 실험에서 각 군의 실험동물들이 도피대를 찾아서 오르기까지의 회피시간(Escape Latency)은 아래와 같다(Table 2). 모의시술군(Sham)의 경우 학습검사 시행기간동안 전반적으로 측정 횟수가 증가함에 따라 회피시간이 점차 감소하는 것이 관찰되었다. 특히 첫째 날과 둘째

날의 첫 번째 시행 즉, 1회(51.0±5.5sec)와 2회(26.5±7.2sec) 사이 그리고 6회(29.4±4.3sec)와 7회(17.4±5sec) 사이에서 가장 큰 감소폭을 보였으며, 첫째 날 5회 시행을 마친 후 24시간이 지난 뒤의 6회째 시행에서는 회피시간이 약간 상승함이 관찰되었다.

반면에 Aβ25-35 주입 군에서는 모의시술군에 비해 상대적으로 회피시간의 감소가 적었으며, 검사 둘째 날의 첫 번째 시행인 6회(54.6±4.0sec)에서는 회피시간이 첫째 날의 1회(53.1±7.4sec)의 그것

과 비슷한 수준으로 다시 증가되는 것이 관찰되었다. 총명탕 투여군, 원지 투여군과 석창포 투여군에서는 시행 횟수에 따른 회피시간이 Aβ25-35 주입군에 비해 유의하게(P<0.01) 감소되는 것이 관찰되었다.

특히 마지막 시행인 8회 시행에서는 총명탕(24.5±7.2sec), 원지(19±8.3sec)와 석창포(23.4±5.8sec) 모두 Aβ25-35 주입 군(46.0±3.8sec)에 비해 뚜렷한 감소를 보였다.

Table 2. The Mean Escape Latency of each Group.

	day 1				day 2			
	trial 1	trial 2	trial 3	trial 4	trial 5	trial 6	trial 7	trial 8
Sham	51.0±5.5	36.5±7.2	18.1±5.6	15.5±4.0	12.0±7.8	29.4±4.3	17.4±5.0	16.0±3.2
Aβ inj.	53.1±7.4	48.4±2.7	45.5±7.1	38.5±4.7	36.1±4.7	54.6±4.0	46.5±5.1	46.0±3.8
<i>Chongmyung-tang</i>	50.0±12.0	35.5±8.0	29.0±9.7	25.6±7.8	19.1±7.5	35.1±9.2	27.0±3.5	24.5±7.2
<i>Polygalae Radix</i>	45.0±8.9	39.0±13.6*	29.4±7.2*	23.2±9.1*	21.0±8.8*	37.2±13.0*	34.4±5.3*	19.0±8.3*
<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	47.0±9.9	30.6±13.2*	28.0±9*	19.8±8.1*	19.0±6.75*	40.2±14.5*	30.0±8.7*	23.4±5.8*

On each trial, the mice were placed in the pool at one starting position. They were allowed to swim freely or until they found the platform. The time required to escape onto the hidden platform was recorded.

\* P < 0.01 vs. the Aβ inj.

## 2. 공간 기억력 유지 검사

수중 미로 검사 셋째날인 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유 수영 검사를 시행하여 공간 기억력 유지 정도를 측정하였다. 각 군의 실험동물들이 수조 안에서 60초간의 자유롭게 수영을 하면서 그린 궤적은 아래 그림과 같다(Fig. 1).

우선, 모의시술군(Sham)의 경우 실험 동물들이 이전 도피대가 있던 자리를 쉽게 찾아내고 그 주변에서 계속 맴도는 형태를 보이고 있음이 관찰되었다. 반면에 Aβ25-35주입군의 동물들은 이전 도피대의 자리를 잘 찾아내지 못하며 또한 활동성도 모의시술군에 비해 현저히 떨어짐이 관찰되었다.

그러나 총명탕 투여군, 원지 투여군과 석창포 투여군의 경우 모두 이전의 도피대 위치를 찾아가는 능력이 활동성에 있어 상당한 호전이 있음이 관찰되어 졌다.

또한 공간 기억력 유지능력을 측정하기 위하여 수조를 도피대로부터의 거리에 따라 5구역으로 나누고 각 구역에 각기 다른 점수를 부여하고 실험동물이 그 구역에 머문 시간과 점수를 곱하여 합산한 총 점수에서도 Aβ25-35주입군(76.6±4.1)은 모의시술군(138.7±12.2)에 비해 현저히 낮았으며 총명탕투여군(121.9±10.5), 원지투여군(126.7±6.4)과 석창포투여군(116.7±7.8)은 Aβ25-35주입군에 비해 유의성 있는(모두 P<0.05) 증가를 나타냈다(Table 3).

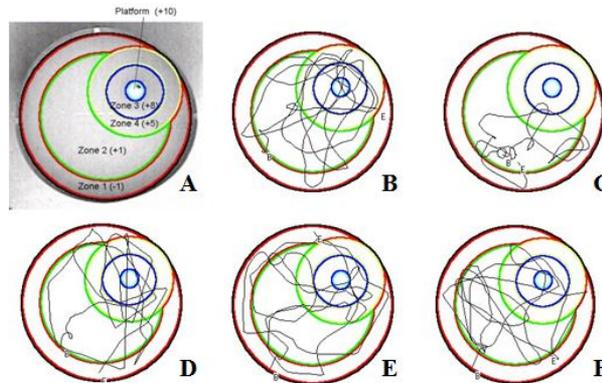


Fig. 1. The zones divided by the distance from the platform (A) and representative swimming pathway of mice taken from their starting position to the hidden platform in water maze (B-F).

The different points was allocated to each zone. (Zone 1 : -1, Zone 2 : +1, Zone 3 : +8, Zone 4 : +5, Target (Platform) : +10) Sham group (B) indicated swimming pathway from the typical mouse pathway after 2 day-training, Aβ injected group (C) lost its directional bearings and thus employed more random search strategy than straight search strategy. Chongmyung-tang (D), Polygalae Radix (E) and Acori Graminei Rhizoma (F) treated group showed recovery in the pathway to find the hidden platform.

Table 3. The Mean Memory Retention Points over Groups.

	Sham	Aβ inj.	Chongmyung-tang	Polygalae Radix	Acori Graminei Rhizoma
zone 1	9.8	11.3	16.9	16.9	12.9
zone 2	31.2	38.1	22.0	24.0	30.0
zone 3	7.8	2.8	6.48	7.0	7.5
zone 4	9.7	5.5	11.6	11.0	6.3
Platform	0.6	0.1	0.7	0.9	0.8
Total	138.7±12.2**	76.6±4.1	121.9±10.5*	126.7±6.4*	116.7±7.8*
n	8	8	8	8	8

At day 3, each mouse was allowed to swim freely for 60s and the total points of each mouse were calculated in summation of multiplying swimming times by different points of each zone.

\*\* p < 0.01, \* p < 0.05 v.s Aβ inj. group. (mean±SEM)

### 3. Bax 단백질의 면역조직화학염색

모의시술군의 실험동물 뇌해마 CA1 영역에서의 Bax 단백질 발현은 매우 약한 편이었으나, Aβ 25-35 주입군에서는 Bax 단백질의 발현이 비교적 강한 편이었다. 반면에, Aβ25-35 주입+원지 투여 군과 Aβ25-35 주입+석창포 투여군에서는 Bax 단백질의 발현이 Aβ25-35 주입군에 비해 상대적으로 약해짐이 관찰되었다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Changes of Bax, TUNEL, MAP2 and Tau Expressions in Hippocampus

Groups	Immuno-reactivity			
	Bax	TUNEL	MAP2	Tau
Sham	-	-	++	-
Aβ inj.	++	+	±	++
Chongmyung-tang	+	±	+	+
Polygalae Radix	+	±	+	±
Acori Graminei Rhizoma	+	±	+	±

Immuno-densities are demonstrated with ±, weak; +, mild; and ++, moderate

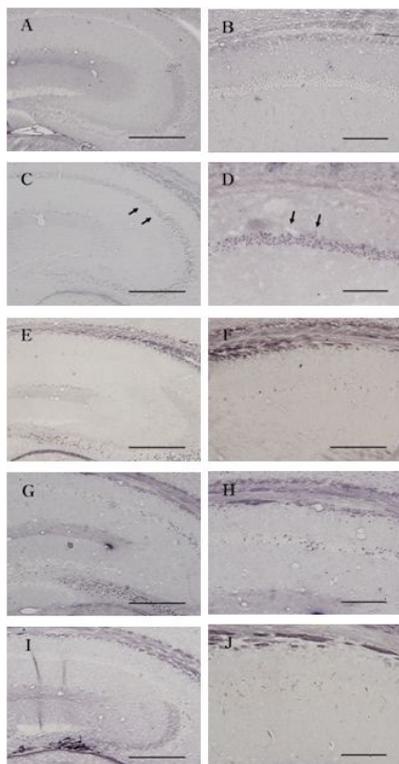


Fig. 2. Immunohistochemical analysis of Bax protein in sections from the Sham (A, B), A $\beta$ 25-35 injected (C, D), *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group 14 days after surgery.

A, C, E, G, I show the whole feature of hippocampus and B, D, F, H, J show magnified CA1 area in A, C, E, G, I. Bax expression was scarcely observed in the cytoplasm of CA1 neurons in Sham group. Immunoreactivity of Bax was detected very strongly in CA1 neurons at 14 days after A $\beta$  25-35 i.c.v injection(C, D). In CA1 neurons of *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group, immunoreactivity of Bax was decrease obviously compare to Sham group. (A, C, E, G, I:  $\times 100$ , B, D, F, H, J:  $\times 200$ ). Scale bar A, C, E, G, I = 500  $\mu$ m ; B, D, F, H, J = 200  $\mu$ m.

#### 4. TUNEL 염색

뇌해마 CA1 영역의 뇌세포에 대하여 TUNEL 염색을 시행한 결과, 모의시술군의 실험동물의 뇌해마조직에서는 TUNEL 염색에 양성 반응을 보인 세포가 존재하지 않았으나 A $\beta$ 25-35 주입군에서 TUNEL 염색 양성 반응을 나타내는 세포가 관찰되었다. 원지투여군과 석창포투여군에서도 TUNEL 염색 양성 반응 세포가 관찰되었으나 미약한 편이었으며, 전체적으로 각 군의 TUNEL 염색에 대한 양성 반응은 유의성 있는 큰 변화를 보이지는 않았다 (Table 4, Fig. 3).

#### 5. MAP2 와 Tau 단백질의 면역조직화학염색

각 군의 실험동물 뇌해마 CA1 영역에서의 MAP2 단백질 면역염색에 대한 사진은 Fig. 4에 나타나 있다. MAP2 단백질에 대해 면역 반응을 나타내는 세포는 해마의 CA1 영역에서 쉽게 발견되었다. 모의시술군(Sham)의 경우 CA1 영역의 피라미드 신경세포(pyramidal neurons)의 세포체와 신경섬유에서 명확한 양성 반응을 나타냈다. 특히 수상돌기(dendrite)와 축색돌기(axon)가 세포체(cell body)에 비해 더 뚜렷한 반응을 보였으며 그 형태가 길고 규칙적인 모습이 관찰되었다. 반면에, A $\beta$ 25-35 주입군에서 뇌해마 CA1 영역에서 MAP2 면역 반응의 전반적인 감소가 보여졌으며 신경세포의 수상돌기와 축색돌기 또한 불규칙한 형태로 변했으며, 여기저기 절단된 형태로 관찰되었다(Fig. 4C). 그러나 원지투여군과 석창포투여군에서는 이러한 면역 반응의 감소와 형태적인 변형이 상당히 회복되었음이 관찰되었다(Fig. 4E, G).

실험동물 뇌실에 A $\beta$ 25-35 주입 후의 Tau 단백질 변화에 대한 총명탕과 그 구성약물인 원지와 석창포의 영향을 측정하기 위해서 각 군에서의 Tau 단백질의 인산화(phosphorylation) 정도와 응집(aggregation) 상태를 비교하였다. 그 결과, Tau 단백질의 인산화와 응집도는 모의시술군에 비해 A $\beta$ 25-35 주입군에서 증가하였으며, 총명탕투여군, 원지투여군과 석창포투여군에서는 상대적으로 감

소됨이 관찰되었다(Table 4, Fig. 4).

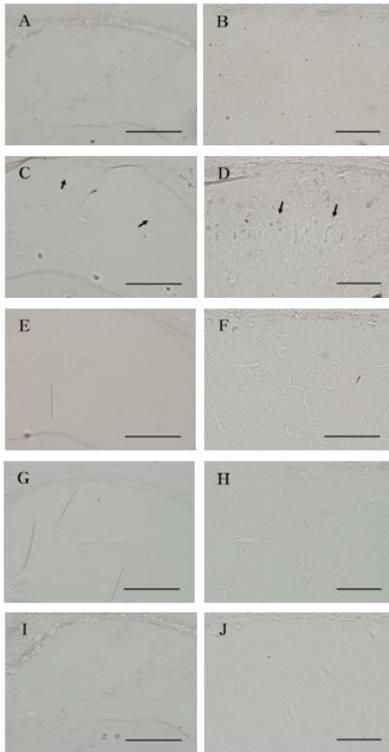


Fig. 3. Terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) staining of hippocampal CA1 pyramidal neurons in Sham (A, B), A $\beta$  injected (C, D) *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group 14 days after surgery.

A, C, E, G, I show the whole feature of hippocampus and B, D, F, H, J show magnified CA1 area in A, C, E, G, I. TUNEL reaction-positive neurons were not present in Sham group and positive stainings for TUNEL reaction in A $\beta$  injected group were detected. *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group slightly showed TUNEL reaction-positive neurons. But, there were no significant changes among groups. B, D, F, H, J shows magnified CA1 area in A, C, E, G, I. (A, C, E, G, I:  $\times 100$ , B, D, F, H, J:  $\times 200$ ). Scale bar A, C, E, G, I = 500  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, H, J = 200  $\mu\text{m}$ .

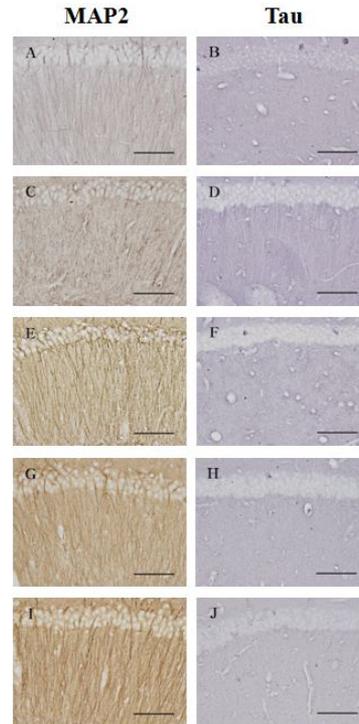


Fig. 4. Immunohistochemical analysis of MAP2 and Tau protein in sections from Sham (A, B), A $\beta$  injected (C, D), *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group.

A, C, E, G, I show the whole feature of hippocampus and B, D, F, H, J show magnified CA1 area in A, C, E, G, I. In Sham operated group, the bodies and fibers of CA1 pyramidal neurons were intensely stained with evident immunopositive processes (A, B). In A $\beta$  injected group, a decrease in MAP2 immunoreactivity was observed in the hippocampal CA1 sector. Dendrites and axons of CA1 pyramidal neurons also became irregular form and were cut off in places. But, it was shown that MAP2 immunoreactivity and the feature of neuron fiber were recovered in the hippocampal CA1 sector of *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated group. Aggregation of Tau were enhanced around the hippocampal CA1 neurons after A $\beta$  injection in compared with sham operated group. But in *Chongmyung-tang* (E, F), *Polygalae Radix* (G, H) and *Acori Graminei Rhizoma* (I, J) treated groups, the decreases of Tau immunoreactivity were observed.  $\times 400$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

#### IV. 고찰

본 실험에서는 뇌실내 A $\beta$ 25-35 주입으로 인한 알츠하이머형 치매 생쥐모델에서 수중미로 검사에서의 공간인지 학습수행과 기억력에 대한 행동변화의 관찰 및 2주간의 원지와 석창포의 개별적인 경구 투여가 학습수행과 기억력 증진에 미치는 효과를 살펴보았다.

A $\beta$ 는 아밀로이드 전구단백질(Amyloid precursor protein : APP)로부터 생성되는데 A $\beta$ 는 뇌독성이 있어 실험동물 뇌에 A $\beta$ 를 직접 주입하게 되면 기억력 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>. 즉, 알츠하이머병환자의 노인반으로 부터 얻어진 A $\beta$ 를 생쥐의 뇌에 주입한 결과 신경세포 손상과 함께 기억력 손실의 유발이 보고된 바 있다<sup>2</sup>. 따라서 A $\beta$ 는 알츠하이머 치매 형성 과정에 직접적인 관련이 있다고 추론되며, A $\beta$ 로부터 유발되는 기억력장애 동물모델은 알츠하이머 병에 대한 좋은 동물모델로서 다용되고 있다. 하지만, 비록 A $\beta$ 에 의한 신경독성이 입증되었다하더라도 기억력 장애를 일으키는 정확한 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 또한, A $\beta$ 의 경우 오래된 펩타이드를 사용했을 경우가 더 확실한 기억력 장애를 유발한다는 것이 동물실험을 통해 보고되었고, 며칠간의 A $\beta$ 의 속성이 구조적인 변형을 통해 세포독성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다<sup>15</sup>. 따라서, 본 실험에서는 실험동물에 알츠하이머병과 유사한 질병상태를 유도시키기 위해 A $\beta$ 로 유발되는 치매 동물모델을 채택하였으며, 특히 가장 직접적이며 신경세포독성이 강한 것으로 알려진 A $\beta$ 25-35를 3일간 37°C에서 응집시킨 후 실험쥐 뇌의 뇌실에 직접 주입함으로써 치매를 유발시켰다.

Morris 수중 미로(Morris water maze)는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간 정보 외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 주로 장기기억 능력을 측정하는 과제로서 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억력 측

공간기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다. Morris 수중미로를 통한 기존의 연구에서 동물은 연령증가에 따라 학습과 기억 능력이 저하되고, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고된 바 있다<sup>16</sup>.

치매유발 후 위에서 언급한 Morris 수중 미로(Morris water maze) 검사를 시행하였는데, 실험쥐들은 수조 속에서 자유롭게 수영하면서, 숨겨진 도피대를 찾아서 도달하는 시간을 측정하였다. 수중미로 실험은 A $\beta$ 25-35 주입 시술 후 14일째 되는 날로부터 3일간 시행되었는데 첫째날 5회, 둘째날 3회 시행한 후 마지막 날에는 자유수영 검사(retention test)를 시행하였다. 이 때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 그 결과, 수중 미로 장치 실험에서 각 군의 실험동물들이 도피대를 찾아서 오르기까지의 회피시간(escape latency)은 모의시술군(Sham)의 경우 학습검사 시행기간동안 전반적으로 측정 횟수가 증가함에 따라 회피시간이 점차 감소하는 것이 관찰되었다. 특히 첫째 날과 둘째 날의 첫 번째 시행 즉, 1회와 2회 사이 그리고 6회와 7회 사이에서 가장 큰 감소폭을 보였으며, 이는 실험쥐들이 수조속에서 유영하는 횟수가 증가함에 따라 도피대의 위치를 학습하고 있다는 것을 나타내는 결과라 할 수 있다. 반면에 A $\beta$ 25-35 주입군에서는 모의시술군에 비해 상대적으로 회피시간의 감소가 적었으며, 검사 둘째 날의 첫 번째 시행인 6회에서는 회피시간이 첫째 날의 1회의 그것과 비슷한 수준으로 다시 증가되는 것이 관찰되었다. 이것은 뇌실내로 A $\beta$ 25-35를 주입한 실험쥐의 경우 학습능력이 저하되었음을 나타낸다고 할 수 있다. 총명탕투여군, 원지투여군과 석창포투여군에서는 시행 횟수에 따른 회피시간이 A $\beta$ 25-35주입군에 비해 유의하게 감소되는 것이 관찰되었다. 특히 마지막 시행인 8회 시행에서는 총명탕, 원지와 석창포 모두 A $\beta$ 25-35주입군에 비해 뚜렷한 감소를 보였다. 이 같은 실험결과를 통해 볼때 총명탕과 그 구성약물인

원지, 석창포가 A $\beta$ 25-35의 뇌실 내 주입에 의해 발생하는 학습능력 감퇴에 방어 작용이 있음을 추측할 수 있다.

또한, 공간기억력 유지에 대한 총명탕, 원지, 석창포의 영향을 살펴보기 위해 수중 미로 검사 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유 수영 검사를 시행한 결과, 모의시술군(Sham)의 경우 실험 동물들이 이전 도피대가 있던 자리를 쉽게 찾아내고 그 주변에서 계속 맴도는 형태를 보이고 있음이 관찰되었다. 반면에 A $\beta$ 25-35 주입 군의 동물들은 이전 도피대의 자리를 잘 찾아내지 못하며 또한 활동성도 모의시술군에 비해 현저히 떨어짐이 관찰되었다. 그러나 총명탕투여군, 원지투여군과 석창포투여군은 이전의 도피대 위치를 찾아가는 능력이 활동성에 있어 상당한 호전이 있음이 관찰되었으며, 구역별 할당된 점수와 머문 시간의 곱을 합산한 총 점수에서도 A $\beta$ 25-35 주입군은 모의시술군에 비해 현저히 낮았으며 총명탕투여군, 원지 투여군과 석창포 투여군은 A $\beta$ 25-35 주입군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 이러한 결과는 원지와 석창포가 학습능력 감퇴에 방어작용 뿐 아니라 A $\beta$ 25-35의 뇌실 내 주입에 의해 발생하는 공간기억력 감퇴에도 유의한 방어작용이 있음을 입증하는 것이라 할 수 있다.

본 실험에서는 실험동물의 뇌실에 A $\beta$ 25-35를 주입함으로써 유발되는 치매모델과 연관된 apoptosis의 유발에 Bcl-2 family의 가능성 여부를 조사하였으며, 그 결과 Bax의 발현이 선택적으로 A $\beta$ 25-35의 주입에 의해 증가됨을 관찰하였으며, 2주간의 원지와 석창포의 투여는 A $\beta$ 25-35에 의한 Bax의 발현을 유의적으로 차단시켜 주었다. 또한 TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) 염색방법은 terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)를 이용하여 기질 반응 후에 염색하여 현미경으로 염색유무를 확인함으로써 in situ로 apoptosis를 확인할 수 있는 표준방법인데, 본 실험에서는 A $\beta$ 25-35

의 주입에 의해 발현이 미세하게 증가됨이 관찰되었으나 전체적으로 유의한 차이는 없었다.

신경소관(microtubule)에는 여러 종류의 신경소관 연합단백질(microtubule associated proteins, MAPs)이 있다. 이 신경소관 연합단백질은 미세소관의 안정성을 유지하고 중합과정을 촉진한다고 알려져 있다. 신경소관연합단백질에는 두 종류, 즉 분자량이 200,000-300,000 또는 그 이상인 MAP1과 MAP2, 분자량이 55,000-62,000 정도인 tau MAPs가 있으며, 이 중 MAP2는 핵주위부(perikaryon)와 수상돌기(dendrite)에는 있지만 축삭(axon)에는 없고, tau MAPs는 축삭에만 있다. 이러한 신경소관 연합단백질(MAPs)은 축삭과 수상돌기의 분화(differentiation)와도 관련이 있어 MAP2가 발현되면 수상돌기가 되고, tau MAPs가 발현되면 축삭으로 분화한다.

MAPs중에서 특히 MAP2는 수상돌기(dendrite)뿐만 아니라 신경세포체(cell body)에서 존재하기 때문에 MAP2는 중추신경계통의 신경세포 손상에 좋은 지표로서 활용된다. Gerbil을 이용한 뇌허혈 연구에서 모의시술군(Sham)에서는 핵주위부(perikaryon)와 수상돌기(dendrite)를 중심으로 MAP2 면역반응세포의 발현이 관찰되었으나 뇌허혈 시술 후 24시간이 경과한 후에는 MAP2 면역반응세포의 발현이 감소됨이 보고되었으며<sup>17</sup>, 생쥐 뇌해마에서의 주령에 따른 MAP2의 면역조직화학적 변화에 대한 연구에서는 8주령 생쥐에서는 해마의 CA1영역의 신경세포들이 선명한 MAP2 면역반응을 보인 반면, 59주령 이상의 생쥐에서는 면역반응의 상당한 감소를 나타내었다. 특히, 수상돌기나 축삭부위가 신경세포체에 비해 더 많은 영향을 받는 것으로 밝혀졌다<sup>18</sup>. 알츠하이머병은 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 병변 부위에는 plaque와 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 A $\beta$  단백질, MAP2, Tau, GFAP 등이 고밀도로 분포하게 된다<sup>19</sup>.

본 연구에서도 MAP2에 대해 면역반응을 나타

내는 세포는 해마의 CA1영역에서 쉽게 발견되어졌다. CA1 영역의 피라미드 신경세포(pyramidal neurons)의 세포체와 신경섬유에서 명확한 양성반응을 보였는데 특히 수상돌기와 축색돌기가 세포체에 비해 더 뚜렷한 반응을 보였으며 그 형태가 길고 규칙적인 모습임이 관찰되었다. 그러나, A $\beta$  25-35를 뇌실내로 주입한 후 14일이 지난 후의 뇌해마 CA1 영역에서는 MAP2 면역반응의 전반적인 감소가 보여졌으며 신경세포의 수상돌기와 축색돌기 또한 불규칙한 형태로 변했으며, 여기저기 절단된 형태로 관찰되었다. 그러나 원지투여군과 석창포투여군에서는 이러한 면역반응의 감소와 형태적인 변형이 상당히 회복됨이 관찰되었으며, 이는 원지와 석창포의 2주간의 경구투여가 A $\beta$ 25-35의 뇌실내 주입에 의한 신경세포 손상에 방어작용이 있음을 보인 것이라 할 수 있다.

또한, 본 연구에서는 실험동물 뇌실에 A $\beta$ 25-35 주입 후의 Tau 단백질 변화에 대한 총명탕, 원지, 석창포의 영향을 측정하기 위해서 각 군에서의 Tau 단백질의 인산화(phosphorylation) 정도와 응집(aggregation)상태를 비교하였다. 그 결과, Tau 단백질의 인산화와 응집도는 모의시술군에 비해 A $\beta$ 25-35주입군에서 증가하였으며, A $\beta$ 25-35주입+총명탕 투여군, A $\beta$ 25-35주입+원지 투여군과 A $\beta$ 25-35주입+석창포 투여군에서는 상대적으로 감소됨이 관찰되었다. 이를 통해 볼때 A $\beta$ 25-35의 뇌실내 주입에 의한 알츠하이머형 치매 모델에 대해 총명탕, 원지, 석창포의 2주간의 경구투여가 신경세포 손상에 방어작용이 있음이 밝혀졌고, 이러한 작용은 MAP2와 MAP-Tau의 조절 기전과 관계가 있음을 추측할 수 있다.

마지막으로, 아세틸콜린, 도파민, 세로토닌, GABA의 경우에는 노화에 따라 그 양이 감소하는 것으로 알려져 있는데, 알츠하이머병의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 콜린성 신경계와 밀접한 관련이 있다는 것이 밝혀졌다<sup>20</sup>. 알츠하이머병 환자에게서 나타나는 기억력 상실과 인식장애는 신호를 전달

해 주는 화학물질인 아세틸콜린을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있는데, 이 부족현상은 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린에스테라제로 더욱 심화된다<sup>20</sup>. 이러한 약물들은 아세틸콜린의 분해를 억제하여 감퇴된 인지기능을 개선시켜주는 효과가 있는데, 추후 연구를 통해 원지, 석창포와 신경전달물질인 아세틸콜린과의 관계를 규명할 필요가 있다고 사료된다.

## V. 결론

본 실험에서는 총명탕과 그 구성약물인 원지, 석창포의 알츠하이머 치매 동물 모델에서의 방어효과를 측정하기 위하여, 생쥐 뇌의 뇌실 내에 A $\beta$  25-35를 주입 후, 수중미로검사를 통해 학습과 기억력 장애의 회복정도를 측정하였고, 또한 생쥐 뇌해마조직에서 Bax, MAP2 및 Tau 단백질의 변화를 면역조직화학적 방법을 통하여 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총명탕, 원지 및 석창포 추출물이 각각 A $\beta$ 25-35에 의한 학습능력 저하와 기억유지능력의 감퇴에 방어효과가 있음이 밝혀졌다.
2. 총명탕 처방과 그 구성약물인 원지, 석창포 추출물은 A $\beta$ 25-35의 뇌실 내 주입 후에 발생하는 뇌해마 CA1 영역에서의 Bax 단백질의 발현을 감소시킴이 관찰되었다. 또한 A $\beta$ 25-35의 주입 후의 TUNEL 염색에 대한 양성반응을 감소시켰으나 유의한 차이는 없었다.
3. 총명탕, 원지, 석창포 추출물의 14일간의 경구투여는 A $\beta$ 25-35의 뇌실 내 주입 후에 발생하는 MAP2 면역반응의 감퇴와 neuron fiber의 형태적인 변화를 회복시킴과 Tau 단백질의 과인산화와 응집화를 감소시킴이 면역조직화학적 방법을 통해 관찰되었다.

이상의 결과 총명탕, 원지, 석창포 추출물의 14

일간의 경구투여는 Aβ25-35의 뇌실내 주입에 의한 알츠하이머형 치매 모델에 대해 신경세포 손상에 방어작용이 있으며, 이러한 작용은 MAP2와 MAP-Tau 단백질의 조절 기전과 관계가 있는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Ramsden M, Henderson Z, Pearson H. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res.* 2002;956:254-61.
- Patat A, Klein MJ, Surjus A, Hucher M, Granier J. RU 41656 does not reverse the scopolamine-induced cognitive deficit in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41:225-31.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당; 1991, p. 98.
- 강병수, 고운채, 김규열, 노승현. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p. 496-7, 523-4.
- 정인원, 오원근, 김용식, 박주배, 안종석, 이현선, 김운택, 이창인. 원지에 함유되어 있는 Polygalasaponin계 화합물이 Apomorphine으로 유발된 생쥐의 과행동에 미치는 효과. *대한정신약물학회지.* 2000;11(3):254-61.
- 황시영, 강형원, 류영수. 원지에 대한 뇌 성장세 포로부터 염증성 세포활성물질 분비의 억제 효과에 관한 연구. *동의신경정신과학회지.* 1999;10(1):95-108.
- 박용기, 강병수, 윤은경, 강소임, 박창훈, 이동웅, 하정희, 허근. 신경안정 생약 추출물이 in vitro에서 신경전달효소 및 항산화계에 미치는 영향. *약학회지.* 2000;44(1):22-8.
- 박대규, 이완하. 원지 Saponin의 이노효과 및 중추억제작용에 관한 연구. *생약학회지.* 1983;14(4):178-92.
- 김영환, 박준형. 석창포 정유가 토끼의 적출장관 운동에 미치는 영향. *경북대농학지.* 1992;10:19-33.
- 강선태, 이태호. 어혈병태모형에 미치는 천궁, 석창포 및 반하의 효능에 관한 실험적 연구. *동의병리학회지.* 1989;4:57-73.
- 정현우, 강성용, 백승화. 석창포가 혈압 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 1999;14(2):81-8.
- 이금수, 정현우, 강성용. 석창포가 백서의 뇌연막동맥의 직경에 미치는 기전연구. *대한본초학회지.* 2000;15(2):1-7.
- 박경수. 석창포 정유 향기의 흡입이 백서의 경련억제에 미치는 영향. *동국대학교대학원 학위논문.* 2001:1-47. .
- 강영록. 遠志와 石菖蒲의 單獨 및 混合投與가 白鼠의 腦損傷에 미치는 影響. *대전대학교대학원 학위논문.* 1997:1-34.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol.* 1994;45(3):373-9.
- Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courten-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphyxial arrest in rats. *Pediatr Res.* 1996;39(1):77-84.
- Araki T, Kato H, Fujiwara T, Kogure K, Itoyama Y. Post-ischemic changes of [3H]glycine binding in the gerbil brain after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 1995;278(2):91-6.
- Himeda T, Mizuno K, Kato H, Araki T. Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech Ageing Dev.* 2005;126(6-7):673-7.
- Zhao ML, Liu JS, He D, Dickson DW, Lee

- SC. Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Res.* 1998 ;813(2):402-5.
20. De Vente J, Markerink-van Ittersum M, van Abeelen J, Emson PC, Axer H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci.* 2000;12(2):507-19.