

ACM의 알츠하이머 생쥐 모델의 행동과 생체인자에 미치는 영향

김국기 · 최우창 · 김승형¹ · 남궁욱² · 박양춘³ · 강위창⁴ · 이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 1 : 대전대학교 동서생명과학연구원,
2 : 대전대학교 신경생리학교실, 3 : 대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 4 : 대전대학교 경영대학 응용통계학과

Effects of *Added Chongmyung-tang* on Behavior and Molecular Factors in the Alzheimer's Disease Model

Kook Ki Kim, Woo Chang Choi, Seung Hyung Kim¹, Uk Namgung², Yang Chun Park³, Wee Chang Kang⁴, Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, 1 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience,
2 : Department of Neuphysiology, College of Korean Medicine,
3 : Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine,
4 : Department of Business Information Statistics, College of Business Administration, Daejeon University

This experiment was designed to investigate the effect of *Added Chongmyung-tang* (ACM) on Alzheimer's disease mouse model. Effects of ACM on learning behavior were investigated using the Morris water maze method. Expression levels of molecular factors related to Alzheimer's disease such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), cluster of differentiation antigen 68 (CD68), and tau protein in the hippocampus of APP-SWE Tg2576 mice were analyzed by immunofluorescence staining method. ACM reduced escape latency in the Morris water maze test. ACM decreased the expression level of GFAP and tau protein in the hippocampus. These results suggest that ACM may be involved in regulating molecules that are known to play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

keywords : ACM, Dementia, Alzheimer disease

서 론

기억, 판단 및 사회생활 전반에 걸쳐 장애가 생기는 질환인 치매는 그 원인질환으로 약 80가지 이상의 질환이 보고되고 있는데¹, 가장 많은 부분을 차지하는 것이 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)으로 전체 치매의 50~60%를 차지한다². AD는 임상적으로 인지기능의 저하와 행동장애 등이 나타나며³, 병리조직학적으로 전반적인 뇌의 위축과 노인성 반점(senile plaques), 뇌신경섬유종(neurofibrillary tangle)등이 주요 특징인 신경퇴행성 질환이다⁴.

Senile plaque는 β -amyloid 물질이 대뇌의 세포외부에 국소적으로 집합된 것으로서 주변에 성상교세포(astrocyte)와 신경아교세포(neuroglial cell)들이 침착되어 있으며, 이 세포들 속에는 GFAP, CD68, β A, tau protein 등이 고밀도로 분포하며 neurite를 포함하는 neuritic plaque가 나타난다⁵⁻⁷.

한의학적으로는 呆病, 健忘, 癡狂 등의 범주로 치매를 이해할 수 있으며, 精氣不足, 脾胃虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 氣血虛弱 등

으로 辨證하여 치료한다².

聰明湯은 건망 및 치매 등을 치료하는데 임상적으로 널리 활용되는 처방으로, 기존의 다양한 실험적 연구를 통하여 聰明湯 또는 다양한 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있음이 제시된 바 있다⁸⁻¹².

치매 치료와 관련된 단미제 연구 중에서는 巴戟天和 山查肉을 활용한 연구결과가 보고된 바 있다. 김¹³ 등은 巴戟天이 항콜린 작용, APP, PS-1, PS-2 발현억제 효과가 있음을 보고하였고, 채¹⁴ 등은 山查肉이 CT105를 처리한 PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과, Alzheimer's disease병태 생쥐모델의 microglial cell에서 IL-1 β , TNF- α 의 발현, ROS, NO의 생성 억제 효과를 보고하였다.

또한 聰明湯에 巴戟天, 山查肉을 각각 가한 巴戟天聰明湯¹⁵과 山查肉聰明湯¹⁶의 항염증, 기억력 감퇴 억제, 뇌세포 보호, 행동개선 등의 효과가 보고된 바 있고, 聰明湯에 巴戟天和 山查肉을 가한 聰明湯加味方⁹의 경우, BACE 효소 활성과 β A 과다 생성을 억제하는

* Corresponding author

In-Chul Jung, Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Korea.

E-mail : npjeong@dju.kr Tel : +82-42-280-2600

Received : 2014/11/15 Revised : 2015/01/26 Accepted : 2015/02/06

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.39

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

효과가 보고된 바 있다.

이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구팀은 聰明湯에 巴戟天, 山查肉을 가한 처방을 ACM이라고 명명하고, 치매 치료를 위한 한약 제제 개발의 일환으로 GLP기관에서 SD Rat을 이용한 단회 경구투여 독성시험¹⁷⁾과 13주간 반복 경구투여 독성시험¹⁸⁾, 그리고 비글견을 이용한 단회 용량증가 경구투여 독성시험¹⁹⁾을 통해 ACM의 안정성에 대한 평가한 바 있다.

본 연구에서는, AD 동물모델의 하나인 APP-SWE Tg2576 생쥐를 이용한 동물 실험을 실시하여 ACM의 치매 예방 또는 치료효과에 대한 유효성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 ACM은 (주)경방산약에서 표준화하여 공급받았으며, 이를 200, 400 mg/kg 농도로 조제하여 사용하였다. 한 첨당약제구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of ACM(Added Chongmyung-Tang)

Herb	Scientific Name	Amount (g)
白茯苓	<i>Poria cocos Wolf</i>	4
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i>	2
石菖蒲	<i>Acori Gramineus Soland</i>	4
巴戟天	<i>Morinda officinalis</i>	2
山查	<i>Crataegus pinnatifida</i>	2
Total		14

2) 시약

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을 그리고, Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을, Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST)는 Dako사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-mouse GFAP (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Tau (DynaL, U.S.A.), anti-CD68-FITC (Pharmingen, U.S.A.) anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.) 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

3) 기기

機器는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer (sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA

FDU-540, Japan), Windows 1D main program (AAB, U.S.A.), brain matrix (ASI instruments, Warren, MI., U.S.A.), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), PCR 장치(Thermal Cycler T100, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), ELISA leader (Molecular devise, U.S.A.), CO2 incubator (Lepco, U.S.A.), Cytometry (BD, U.S.A.), probe-on plus slide(Fisher Scientific, U.S.A.), Microscope (Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec, U.S.A.), VIDEOTRACK (animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등의 것을 사용하였다.

4) 동물

(1) 동물실험 설계

본 실험에 사용된 APP-SWE Tg2576(이하 Tg2576) 마우스와 Non-Tg 마우스 (B6SJLF1/J, 11주령, 20±5 g)는 코아텍(Korea)으로부터 구매하였으며, 12시간의 조명주기(08:00~ 20:00)로 Semi-SPF 상태인 식약처 인가 대전대학교 동물실험실 (온도 22±2°C, 상대습도 50±10%)에서 사육하였다. 모든 마우스는 방사선 조사 사료(Purina Mills Inc., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였다. 또한 본 연구는 대전대학교 동물실험윤리위원회로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호:DJUARB2009-038)을 받아 수행되었다.

(2) Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 Tg2576 마우스의 확인

Tg2576 마우스와 Non-Tg 마우스를 확인하기 위해, PCR 증폭 유전자산물은 마우스 꼬리로부터 얻은 genomic DNA를 주형으로 APP유전자 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 통해 얻은 뒤 전기영동하여 확인하였다. 먼저, 마우스 꼬리를 1 cm정도 절단한 뒤 tail mix 용액(100 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 0.5% SDS)과 proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하여 56°C 항온수조에서 하루 동안 처리하였다. 배양액으로부터 8 M KAc 용액과 chloroform 용액을 이용하여 단백질을 제거한 후 genomic DNA를 분리하였다. PCR반응은 genomic DNA를 주형으로 95°C (30 sec), 62°C (30 sec), 72°C (45 sec) 25 cycle로 APP 특이적인 primer (sense: 5'-CTG ACC ACTCGA CCA GGT TCT GGT T-3', anti-sense: 5'-GTG GATAAC CCC TCC CCC AGC CTA GAC CA-3')을 이용하여 PCR 장치에서 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% 아가로스겔에서 전기영동하고, UV-transilluminator에서 사이즈를 관찰하였다. 그 결과 Figure 1은 Taconic사에서 수입한 Tg2576 생쥐의 APP 유전자 증폭된 결과로 100% Tg2576 알츠하이머 생쥐임을 확인하였다.

Table 2. TgN (APP) Oligonucleotide PCR Primers

Primer Name	Primer Sequence (5' → 3')
1502	CTGACCACTCGACCAGTTCTGGGT
1503	GTGGATAACCCCTCCCCAGCCTAGACCA
β-actin XAHR17	CGGAACCGCTCATTGCC
β-actin XAHR20	ACCCACACTGTGCCATCTA

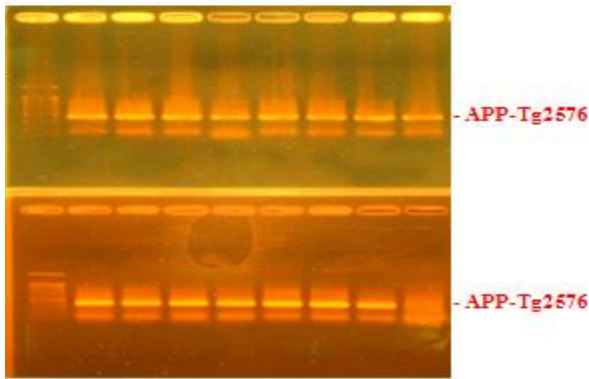


Fig. 1. DNA analysis of TG2576 mice

2. 방법

1) 군 분리

실험동물은 4개 그룹(vehicle 투여 Tg2576 대조군 그룹, Aricept™ 투여 Tg2576 양성대조군 그룹, ACM 200 mg/kg 투여 Tg2576 실험군 그룹, ACM 400 mg/kg 투여 Tg2576 실험군 그룹)으로 분류하였고, Tg2576 마우스는 그룹 당 5마리씩 배정하였다. Vehicle 투여 Tg2576 그룹이 증류수 (0.2 ml)을 투여하는 동안, Aricept™ 투여 Tg2576 그룹은 Aricept™(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 2 mg/kg으로 3개월 동안(3회/1주) 경구투여 하였다. 투여와 행동실험이 완료된 후 모든 마우스는 마취제 케타민(유한양행, SH35361504, 50 mg/ml) 0.5 ml과 렘폰(바이엘코리아, 41882) 0.2 ml을 혼합하여 0.1 ml 씩 생쥐의 복강에 주사하여 마취하고, 혈액과 뇌조직을 적출하여 분석에 사용하였다.

2) 공간학습 및 기억력 평가

Tg2576 알츠하이머 모델 생쥐는 3개월간 Morris water maze에서 1주 1회 약물투여 1시간 후 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90 cm이고 높이가 약 30 cm인 수조로 수온이 28°C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 hidden platform을 설치한 것이다. APP-SWE Tg2576 알츠하이머생쥐 모델에 ACM과 Aricept™를 3개월간 반복적으로 투여하며 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였고, 동시에 기억력 장애를 확인하기 위해 1달에 1회 Morris water maze로 hidden platform에 올라가는 시간과 운동량을 VIDEOTRACK으로 측정하고 videotrack software로 분석하였다.

3) 조직면역학적 분석

(1) 면역화학조직염색 (immunohistochemical staining)

분리된 Tg2576 생쥐의 뇌를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정된 후 파라핀 블록을 만든 후 조직절편을 4 μm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀(deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다.

(2) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

Primary mouse GFAT Ab(1:400)로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse post primary Ab를 8분간 염색 후 3회 PBST로 수세한 후 polymer-HRP로 8분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 5분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount (eBioscience, U.S.A.)를 수행하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluorescence microscope)을 사용하여 x200 배율로 관찰하였다.

(3) Tau protein

Primary mouse Tau Ab를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 3회 TBST용액으로 수세하였고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하여 형광위상차현미경(contrast fluorescence microscope)으로 관찰하였다.

(4) Cluster of differentiation antigen 68 (CD68)

Primary mouse CD68 mAb를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 3회 TBST용액으로 수세하였고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하여 형광위상차현미경(contrast fluorescence microscope)으로 관찰하였다.

(5) 뇌조직 내의 GFAT, CD68, Tau 단백질 발현량 측정

뇌조직에서 탐지된 GFAP, CD68, Tau 단백질 발현량은 NIKON bright Microscope / DP71 camera / DP-B software를 사용하여 이미지를 확보한 다음 Tomoro ScopeEye 3.6 program을 사용하여 분석하였다. 분석된 이미지에서 전체 이미지 크기(AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진상에 나타난 발색 면적, ST는 각각 section(2mm)의 전체 면적, BH(brain Hipocampus)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, 각각 GFAT, CD68, Tau 단백질 발현 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 단백질 발현 면적(LV)은 (AT of area at protein expression/ST of BH) x 100로 분석하였다.

3. 통계 처리

Tg2576 알츠하이머 생쥐들의 동물실험에서 얻은 결과는 SPSS v12.0을 이용하여 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 independent T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. AD 생쥐 모델의 기억력 감퇴 억제 효과

1) Escape latency

공간 반복학습 훈련을 시작한 후 12주차(24주령)에 Tg2576 생쥐가 hidden platform에 올라가는 시간은 대조군 79.2±2.75초, ACM 200 mg/kg 투여군 49.6±14.75초, 400 mg/kg 투여군

53±12.17초, Aricept™ 투여군 48.1±14.16초로 대조군에 비해 ACM 투여군 및 양성 대조군에서 유의한 시간 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

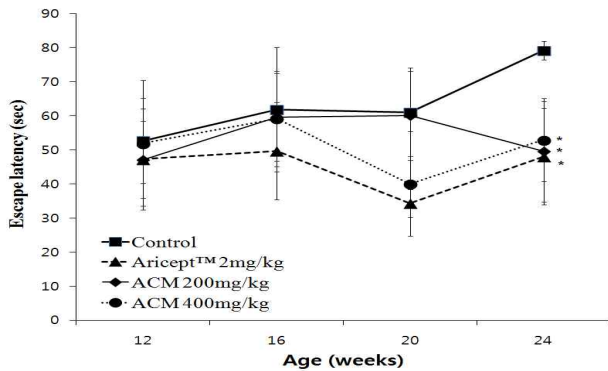


Fig. 2. Variation of escape latency in Morris water maze. Data represent mean±S.E (N=10). Control : APP-SWE Tg2576 mice, Aricept™ : Group treated with Aricept™(2 mg/kg , p.o), ACM : Group treated with Added Chongmyung-tang(400 mg/kg and 200 mg/kg p.o). Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Distance to platform

공간 반복학습 훈련을 시작한 후 12주차(24주령)에 Tg2576 생쥐가 hidden platform에 올라갈 때까지 운동량을 비교한 결과 대조군 532.5±165.88 cm, ACM 200 mg/kg 투여군 548.4±225.21cm, 400 mg/kg 투여군 705.1±198.86cm, Aricept™ 투여군 460.2±100.2cm로 군간 차이가 없었다(Fig. 3).

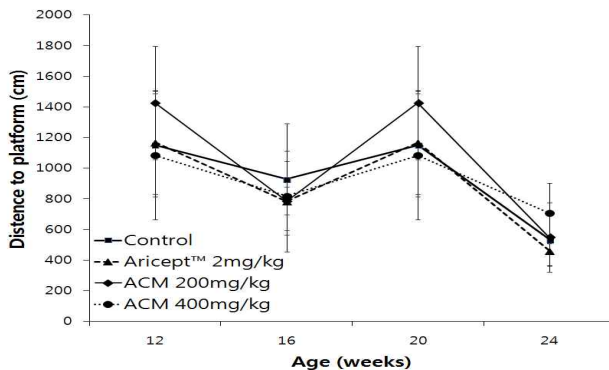


Fig. 3. Variation of distance to platform in Morris water maze. Data represent mean±S.E (N=10). Control : APP-SWE Tg2576 mice, Aricept™ : Group treated with Aricept™(2 mg/kg , p.o), ACM : Group treated with Added Chongmyung-tang(400 mg/kg and 200 mg/kg p.o). Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

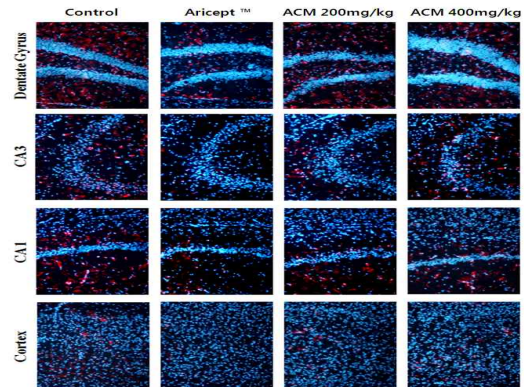
2. 조직면역학적 분석

1) GFAP protein 발현

뇌의 hippocampus 부위의 신경 병리학적 병변부위에서 면역조직화학염색을 통하여 GFAP 단백질을 측정하고(Fig. 4A, red profiles), 각각의 antibody 발현정도를 정량적으로 분석한 결과(Fig. 4B), dentate gyrus (DG), CA3, CA1, cortex 각각 부위에서

대조군의 발현정도 95.9±4.1%, 98.7±1.4%, 93.9±6.1%, 99.2±0.9%에 비하여, Aricept™ 2 mg/kg 투여군은 64.1±4.4%, 34.0±7.2%, 63.7±9.9%, 83.3±3.5%, ACM 200 mg/kg 투여군 80.1±3.2%, 65.2±5.5%, 84.3±2.2%, 89.9±1.5%, ACM 400 mg/kg 투여군 51.8±5.5%, 60.3±3.6%, 75.1±3.3%, 85.4±0.9%으로, Aricept™ 2 mg/kg 투여군과 ACM 400 mg/kg 투여군은 dentate gyrus, CA3, cortex 부위에서 유의한 감소를 보였고, ACM 200 mg/kg 투여군은 CA3, CA1 부위에서 유의한 감소를 보였다.

A)



B)

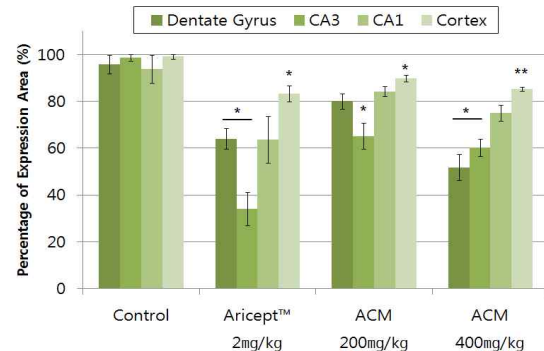


Fig. 4. A. Immunohistochemistry analysis of GFAP protein in the hippocampus of Tg2576 mice. Immunohistochemical staining for GFAP protein (red profiles) was performed on brain tissue sections. The panels are representative photomicrographs of these risks at fluorescence microscopy (Nikon, x200). B. Quantification of GFAP protein expression number in the hippocampus (dentate gyrus, CA3, CA1, cortex) of Tg2576 mice with ACM (200 mg/kg, 400 mg/kg) and Aricept™ (2 mg/kg). GFAP amount were counted using a Tomoro ScopeEye 3.6 program analysis system. Data (Lardist plus Smlidist) represent mean ± S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Tau protein 발현

뇌의 hippocampus 부위의 신경 병리학적 병변부위에서 면역조직화학염색을 통하여 Tau 단백질을 측정하고(Fig. 5A, red profiles), 각각의 antibody 발현정도를 정량적으로 분석한 결과(Fig. 5B), dentate gyrus, CA3, CA1, cortex 각각 부위에서 대조군의 발현정도 97.3±2.8%, 95.7±4.3%, 94.9±5.2%, 99.7±0.3%에 비하여, Aricept™ 2 mg/kg 투여군은 48.6±1.8%, 44.0±5.3%, 35.1±1.3%, 99.0±1.4%, ACM 200 mg/kg 투여군 71.6±1.9%,

78.0±2.4%, 76.2±2.7%, 98.3±0.6%, ACM 400 mg/kg 투여군 67.9±2.4%, 57.2±3.9%, 71.2±1.4%, 96.6±1.0%로, Aricept™ 2 mg/kg 투여군과 ACM 400 mg/kg 투여군은 dentate gyrus, CA3, CA1 부위에서, ACM 200 mg/kg 투여군은 dentate gyrus 부위에서 유의한 감소를 보였다.

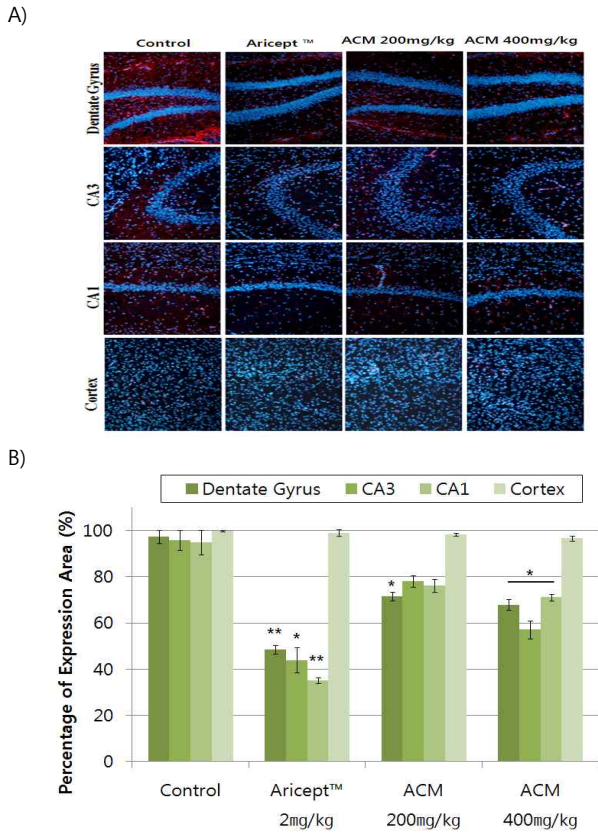


Fig. 5. A. Immunohistochemistry analysis of Tau protein in the hippocampus of Tg2576 mice. Immunohistochemical staining for Tau protein (red profiles) was performed on brain tissue sections. The panels are representative photomicrographs of these risks at contrast fluorescence microscopy (Nikon, x200). B. Quantification of Tau protein expression number in the hippocampus (dentate gyrus, CA3, CA1, cortex) of Tg2576 mice with ACM (200 mg/kg, 400 mg/kg) and Aricept™ (2 mg/kg). Tau amount were counted using a Tomoro ScopeEye 3.6 program analysis system. Data (Lardist plus Smlldist) represent means± S.E (N=8). Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) CD68 protein 발현

뇌의 hippocampus 부위의 신경 병리학적 병변부위에서 면역 조직화학염색을 통하여 CD68 단백질을 측정하고(Fig. 6A, red profiles), 각각의 antibody 발현정도를 정량적 분석한 결과(Fig. 6B), dentate gyrus, CA3, CA1, cortex 각각 부위에서 대조군의 발현정도 98.4±1.7%, 97.8±2.3%, 99.5±0.6%, 97.2±2.9%에 비하여, Aricept™ 2 mg/kg 투여군은 94.5±2.0%, 88.4±2.0%, 107.3±5.0%, 84.7±2.1%, ACM 200 mg/kg 투여군 97.2±0.7%, 94.7±0.4%, 93.9±0.3%, 96.3±0.5%, ACM 400 mg/kg 투여군 88.4±0.7%, 88.5±2.6%, 95.9±2.6%, 85.2±1.7%로, ACM 200 mg/kg 투여군의 CA1부위에서 유의한 감소를 보였다.

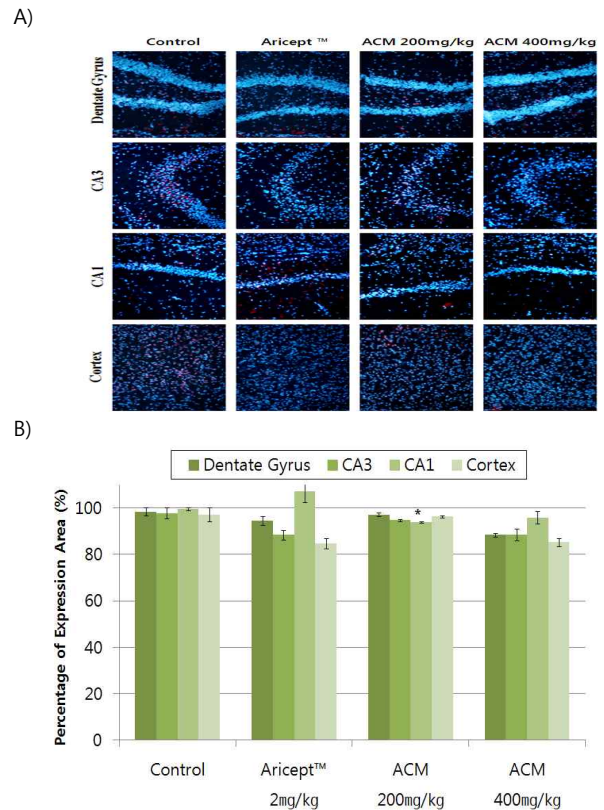


Fig. 6. A. Immunohistochemistry analysis of CD68 protein in the hippocampus of Tg2576 mice. Immunohistochemical staining for CD68 protein (red profiles) was performed on brain tissue sections. The panels are representative photomicrographs of these risks at contrast fluorescence microscopy (Nikon, x200). B. Quantification of CD68 protein expression number in the hippocampus (dentate gyrus, CA3, CA1, cortex) of Tg2576 mice with ACM (200 mg/kg, 400 mg/kg) and Aricept™ (2 mg/kg). CD68 amount were counted using a Tomoro ScopeEye 3.6 program analysis system. Data (Lardist plus Smlldist) represent means± S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

고찰

ACM은 白茯神, 遠志, 石菖蒲로 구성된 聰明湯에 山查肉, 巴戟天을 더한 처방으로, 이전의 연구⁸⁻¹⁶⁾에서 聰明湯 및 巴戟天, 山查肉 등은 치매 치료에 효과적으로 활용 될 수 있다는 결과가 보고된 바 있다.

AD는 치매의 원인 질환 중 가장 많은 비율을 차지하는 질환으로, 주요 병리학적 소견으로는 senile plaques, neurofibrillary tangle 등이 있지만 아직 명확한 원인이 밝혀지지 않았으며, 치료약물 또한 뚜렷하게 없는 상황이다²⁰⁾.

비록 AD의 정확한 원인은 알려져 있지 않지만, AD환자의 뇌에서 콜린성 신경세포와 콜린분해효소의 감소가 관찰되고²¹⁾, 임상적으로는 인지기능 장애와 콜린성 신경전달물질 결핍의 연관성이 보고^{22,23)}되는 등, AD의 병태생리에서 콜린성 신경계가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 최근 AD 치료제로서 콜린분해효소 억제제들이 개발되었고, AD의 인지기능을 호전시킨다고 알려져 있다²³⁾. Donepezil(상품명 Aricept™)은 piperidine계 콜린분해효소 억제제로, 기존의 약제에 비해 비교적 부작용이 적은 것으로 알려져

^{24,25)} AD 치료제로 많이 사용된다.

AD는 뇌 특정 부위의 neuron 소실이 관찰되며, 그 부분에는 oligodendrocytes, astrocytes, microglial cell 등이 많이 침적된다⁵⁾. Astrocyte와 microglial cell은 proinflammatory cytokine을 분비하는데, 이는 신경세포의 사멸을 촉진시키게 된다. AD 뿐만 아니라 뇌손상, 중추신경계감염 등에서 볼 수 있는 astrocyte, microglial cell의 특징적인 표식자로는 각각 GFAP, CD68 등이 있다⁶⁾. AD 환자에서는 GFAP, CD68 등이 증가하며, 이는 senile plaque 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다^{6,26)}.

본 실험에 쓰인 AD 동물모델인 APP-SWE Tg2576 생쥐는 Swedish mutation (APPSWE)을 갖는 APP 유전자가 과발현된 생쥐이다. APP-SWE Tg2576 생쥐가 3개월이 되면 A β level이 현저하게 증가하고 6개월에서 12개월 사이에는 cortex 및 hippocampus에서 extracellular plaque가 침착하기 시작한다. 그리고 6-8개월에는 lipid peroxidation이 증가한다고 알려져 있다²⁷⁾.

Morris water maze는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위한 장치로, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉽다는 장점이 있다. 이는 동물이 주변 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다²⁸⁾.

Morris water maze를 이용하여 escape latency와 distance to platform을 관찰한 결과, escape latency에서 200 mg/kg 투여군, 400 mg/kg 투여군 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였으나, 수영속도 및 운동량은 대조군과 실험군 간의 차이가 없었으며, 각 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2, 3). Donepezil의 경우 기존의 임상연구에서 경도에서 중등도의 AD 환자에서 인지기능의 호전이 보고된 바^{24,25)}, 유사한 효과를 나타낸 ACM 역시 유사한 인지기능 개선 효과를 기대할 수 있다고 판단된다.

한편, AD는 대개 뇌 속 해마(Hippocampus) 부위에서 시작된다고 알려져 있고, 해마는 뇌 속에서 기억을 담당한다고 알려져 있다. 해마는 두 개 얇은 뉴런 층들이 서로 겹쳐진 형태를 갖고 있으며, 한 층은 치상회(dentate gyrus)라고 하고 다른 층은 암몬각(Ammon's horn)으로 암몬각의 4개 부위 중 중요한 부위인 두 개 부위는 Cornu Ammonis 3(CA3)과 Cornu Ammonis 1 (CA1) 부위이다. 해마의 CA1과 CA3 부위는 recent memory(최근의 기억)에 관련되어 있고, 학습과 기억은 시냅스에서 일어날 수 있는데, 해마에서의 시냅스 가소성을 연구하는 데 유용하게 이용되고 있다²⁹⁾.

Tg2576 생쥐의 해마부위에서 GFAP, CD68, 그리고 tau protein의 발현량 변화를 측정한 결과, GFAP 발현량은 ACM 400 mg/kg 투여군 dentate gyrus, CA3, Cortex 부위에서, ACM 200 mg/kg 투여군 CA3, CA1 부위에서 유의한 감소를 보였고(Fig. 4), Tau 단백질의 발현량은 ACM 400 mg/kg 투여군은 dentate gyrus, CA3, CA1 부위에서, ACM 200 mg/kg 투여군은 dentate gyrus 부위에서 유의한 감소를 보였으며(Fig. 5), CD68의 발현량은 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나 ACM 200 mg/kg 투여군의 CA1부위를 제외하고는 유의한 감소를 보이지 않았다(Fig. 6). 종합하여 보면 ACM에서 관찰되는 발현량 감소는 부위에 따라 차이는 있으나 Donepezil과 유사한 경향을 보였다.

이러한 실험 결과는 AD치료제로서의 ACM의 가능성을 확인하

였다고 할 수 있고 향후 추가적인 연구를 통해 한약제제로의 개발을 기대하는 바이다.

결 론

ACM 200 mg/kg과 400 mg/kg은 Morris water maze를 통한 공간 반복학습 기억력 장애실험에서 유의성 있는 개선효과를 보였다. ACM 200 mg/kg과 400 mg/kg은 Tg2576 생쥐에서 해마부위의 GFAP, Tau 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 대전대학교 연구조성비로 수행되었음.

Reference

1. Oh, B.H. Diagnosis and Treatment for Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *Journal of Korean Medical Association* 52(11):1048-1054, 2009.
2. The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry. *Oriental Neuropsychiatry Enlarged Edition*. Seoul, Jipmundang pp 332-341, 2010.
3. Goedert, M., Spillantini, M.G. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777-781, 2006.
4. Oide, T., Kinoshita, T., Arima, K. Regression stage senile plaques in the natural course of alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32(5):539-556, 2006.
5. Troncoso, J.C., Sukhov, R.R., Kawas, C.H., Koliatsos, V.E. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease ; correlations with senile plaques and disease progression. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55: 1134-1142, 1996.
6. Fukuyama, R., Izumoto, T., Fushiki, S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *European Neurology* 46(1):35-38, 2001.
7. Love, S., Barber, R., Wilcock, G.K. Increased poly (ADP-ribose) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 122: 247-253, 1999.
8. Park, E.K., Shim, E.S., Jung, H.S., Sohn, N.W., Sohn, Y.J. Effects of Chongmyung-tang, Polygalae Radix and Acori Graminei Rhizoma on A β Toxicity and Memory Dysfunction in Mice. *Journal of Korean Oriental Internal Medicine* 29(3):608-620, 2008.
9. Lim, J.H., Jung, I.C., Lim, J.S., Kim, S.H., Lee, S.R. Effect

- of Chongmyung -Tang Prescription Combination on the Production of Amyloid β protein and β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme Activity in vitro. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 21(2):191-200, 2010.
10. Choi, K.W., Lee, S.R., Jung, I.C. Effects of ChongMyung-Tang and ChongMyung-Tang added Hibiscus syriacus hot water extract & ultra-fine powder on microglia and memory deficit model. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 20(2):1200-1210, 2006.
 11. Kim, H.W., Kim, K.Y., Cha, D.Y., Lee, S.Y., Kim, G.Y., Kim, H.J., Jeong, H.W. Effects of Gagam-ChongMeong-Tang on Changes in Cerebral Blood Flow in Rats. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 22(2):302-306, 2008.
 12. Kim, H.J., Lee, S.R. The Effects of KakamBoyang Hwanoh-Tang(KBHT) and PalMihapChongMung-Tang(PMCMT) on Protecting Microglia and Inhibiting Acetylcholinesterase and Oxidants. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 19(2):65-75, 2008.
 13. Kim, H.S., Jung, I.C., Lee, S.R. Effects of Morinda officinalis (MDOF) on inhibition of impairment of learning and memory, and acetylcholinesterase in amnesia mice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 14(1):45-58, 2003.
 14. Chae, J.G., Jung, I.C., Lee, S.R. The effects of Crataegus prinnatiflora BGE. var. major N.E. BR(CPVM) extract on the the Alzheimer's disease model induced by CT105. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 13(1):79-115, 2002.
 15. Lim, J.H., Jung, I.C., Lee, S.R. The Effects of ChongMyungTang(CMT) and ChongMyungTang added Moutan Cortex(PCMT) Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 20(4):997-1008. 2006.
 16. Ha, S.Y., Jung, I.C., Lee, S.R. The Effects of ChongMyungTang(CMT) and SanSaChongMyungTang (SCMT) on the Alzheimer's Disease Model. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 17(1):59-78, 2006.
 17. Choi, W.C., Jung, I.C., Lim, J.S., et al. Single Oral Dose Toxicity of ACM (Added Chongmyung-tang) in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 23(2):121-128, 2012.
 18. Park, D.M., Lee, S.R., Lim, J.S., et al. A Thirteen Week Repeated Oral Dose Toxicity Test and Four Week Recovery Test of ACM (Added Chongmyung-tang) in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 23(3):143-160. 2012.
 19. Lim, J.H., Lee, S.W., Jung, I.C. Single Oral Dose-increasing Toxicity Test and Four Weeks Repeated Oral Dose Determinating Test of ACM (Added Chongmyung-tang) in Beagle Dogs. *Journal of Oriental Neuropsychiatry* 24(1):131-144, 2013.
 20. Kim, S.R. A Literature Study on Alzheimer. *New Medical Journal* 40(10):9-56, 88-102, 1997.
 21. Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T. Alzheimer' disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239, 1982.
 22. Davies, P., Maloney, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer' disease. *Lancet* 2: 1403, 1976.
 23. Davis, R.E., Doyle, P.D., Carroll, R.T., Emmerling, M.R., Jaen, J. Cholinergic therapies for Alzheimer's disease. *Arzneimittel-Forschung* 45: 425-431, 1995.
 24. Rogers, S.L., Doody, R.S., Mohs, R.C., Friedhoff, L.T. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Archives of Internal Medicine* 158: 1021-1031, 1998.
 25. Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S., Mohs, R.C., Friedhoff, L.T. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer' disease. *Neurology* 50: 136-145, 1998.
 26. Rezaie, P., Patel, K., Male, D.K. Microglia in the human fetal spinal cord-patterns of distribution, morphology and phenotype. *Developmental Brain Research* 115(1):71-81, 1999.
 27. Thor, D.S., Jeffrey, A.J. Lack of Neurodegeneration in Transgenic Mice Overexpressing Mutant Amyloid Precursor Protein Is Associated with Increased Levels of Transthyretin and the Activation of Cell Survival Pathways. *Journal of Neuroscience* 22(17):7380-7388, 2002.
 28. Yamazaki, M., Matsuoka, N., Kuratani, K., Ohkubo, Y., Yamaguchi, I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 272(1):256-263, 1995.
 29. Fukutani, Y., Cairns, N.J., Shiozawa, M., Sasaki, K., Sudo, S., Isaki, K., Lantos, P.L. Neuronal loss and neurofibrillary degeneration in the hippocampal cortex in late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 54(5):523-529, 2000.