

## 알츠하이머병모형흰쥐뇌수조직의 몇가지 생화학적 및 생리학적지표에 미치는 염화에틸비스이미노메틸 구와아콜망간(EMC)의 영향

김광성, 김광원

세계적으로 인구의 로령화가 촉진되고 그로 인하여 발생하는 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 여러가지 노인성질환들을 예방치료하는것은 중요한 문제로 제기되고있다.

알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)은 인식기능장애와 기억력의 저하를 위주로 하는 진행성뇌신경세포의 기능장애를 동반하는 치매증이다. 알츠하이머병의 원인으로는 감염설, 유전자이상설, 자기면역설 등 여러가지 가설들이 제기되었으나 아직 정확하게 공인된 설은 없다. 알츠하이머병때에는 우선 대뇌전체가 쭈그러들고(신경세포의 감소) 신경세포에 로화색소인 리포푸스핀이 많아지며 신경세포의 알츠하이머섬유의 변화라고 하는 독특한 변화가 나타난다.[5] 또한 이러한 병리학적변화가 주로  $\beta$ -아밀로이드( $\beta$ -amyloid: A $\beta$ )의 비정상적침적에 의한것이라는것이 밝혀지고 그로 인하여 대뇌피질과 해마구역의 많은 신경원들이 소실되어 신경기능이 감퇴되는것으로 알려져있다.[2] 해마는 식물신경계통의 작용, 정서의 발현, 그것과 동반하는 행동과 짧은 기간의 기억, 그 보존과 재생에 관련되어 있으며 여러가지 감각신호가 들어올 때 시간 및 공간정보를 인식하여 일종의 통제작용을 한다. 해마가 손상되면 생명체는 학습과 기억 등의 기능이 감퇴되고 최종적으로는 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성질환이 발생한다. 해마의 각이한 부위조직은 서로 밀접히 련관되어있지만 뇌신경세포손상에 대한 감수성과 신경전달물질의 종류에서 현저한 차이가 있다. D-갈락토즈는 세포성장발육과 분렬증식을 억제하며 세포로화를 촉진시킨다.

일정한 기간 동물에게 련속적으로 D-갈락토즈를 주사하면 세포안에서 갈락토즈농도가 증가하여 알도즈환원효소의 작용으로 갈락토즈알콜로 환원되게 된다. 이 물질들은 세포내에서 대사과정에 참가할수 없으므로 세포안에 쌓이게 된다. 그리하여 정상삼투압에 영향을 주어 세포가 팽창되게 함으로써 여러가지 신경전달물질들의 분비를 저해하고 기능장애를 일으키며 대사를 혼란시키고 유기체의 항산화방어계통을 파괴, 소모하여 라디칼의 루적을 가져오게 한다. 이와 함께 갈락토즈가 갈락토즈알콜로 환원되는 과정에 파산화음이 온라디칼이 생겨 세포막이 파괴되고 파산화기름질과 지방갈색소가 증가되어 로화현상이 나타나게 된다.

우리는 D-갈락토즈를 주입하여 알츠하이머병모형흰쥐를 만들고 SOD/CAT모의화합물인 EMC가 뇌수조직의 몇가지 생화학적 및 생리학적지표에 미치는 영향을 보았다.

### 재료와 방법

EMC는 선행방법[1]에 준하여 합성하였다.

흰쥐는 평양의학대학에서 사육한 몸질량이 180~200g 되는 흰쥐를 암수구별없이 리용하였다.

흰쥐 총 32마리를 8마리씩 4개 무리로 나누고 첫 무리(정상흰쥐)에는 아무런 약물도 주

입하지 않았다. 나머지 3개 무리에는 공통적으로 D-갈락토스를 100mg/kg의 용량으로 잔등피하에 하루 한번씩 6주동안 주사하여 알츠하이머병을 일으켰다. 둘째 무리인 대조구(D-갈주입)에는 0.85% 생리적식염수를, 셋째 무리인 시험구(D-갈+EMC주입)에는 5mg/kg 용량으로 EMC를 각각 복강에 하루 한번씩 6주동안 주사하였다. 마지막무리인 양성대조구(D-갈+도네+비C주입)에는 도네페질을 0.5mg/kg의 용량으로, 비타민C는 100mg/kg의 용량으로 6주동안 경구주입하였다. 약물주입실험이 끝난 다음 뇌수질량과 몸질량을 측정하고 얼음욕우에서 뇌수조직을 떼내어 지표별검사를 진행하였다.

노르아드레날린(NA)함량은 Miller법으로, 모노아민산화효소-B(MAO-B)활성은 4-아미노안티피린페록시다제법으로 측정하였다.

흰쥐의 뇌조직을 분리하여 10% 포르말린에 24h이상 고정한 후 수세, 탈수, 투명, 파라핀포매 등의 공정을 거쳐 4~5 $\mu$ m의 파라핀절편을 만들어 H-E(헤마톡실린-에오진)염색을 진행하였다.

염색후 매 동물에 대해서 해마조직의 CA1구역, CA2구역, CA3구역을 대상으로 400배의 광학현미경상에서 추체세포층두터이와 추체세포밀도, 대뇌피질두터이를 측정하고 수자식사진기로 화상을 고착시켰다.

## 결과 및 논의

D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병모형흰쥐뇌수조직의 NA함량변화에 미치는 EMC의 영향을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 D-갈락토스를 주입하여 알츠하이머병을 일으킨 대조구에서는 뇌수조직의 NA함량이 정상흰쥐의 62.8%로서 낮아졌지만 EMC를 주입한 시험구에서는 NA함량이 정상흰쥐의 84.9%로서 대조구에 비하여 높았다. 도네페질과 비타민C를 주입한 양성대조구에서는 NA함량이 정상흰쥐의 70.9%로서 대조구보다 높았지만 시험구보다는 낮았다.

뇌속 특히 대뇌피질에 있는 NA의 감소는 기억력감소의 원인으로 된다. 또한 지능력에 직접 관계된다고 생각되는 대뇌기저핵이나 편도핵의 파괴로 낮아진 지능력이 NA의 주입으로 회복된 레도 있다.[1] 위의 실험결과는 EMC가 D-갈락토스로 유도한 NA의 감소를 효과적으로 막는다는것을 보여준다.

D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병모형흰쥐뇌수조직의 MAO-B활성변화에 미치는 EMC의 영향을 조사한 결과는 표 2와 같다.

표 2에서 보는바와 같이 D-갈락토스를 주입하여 알츠하이머병을 일으킨 대조구에서는 뇌수조직의 MAO-B활성이 정상흰쥐의 116%로서 높아졌지만 EMC를 주입한 시험구와 도네페질과 비타민C를 주입한 양성대조구에서는 MAO-B활성이 94.6, 96.0%로서 정상흰쥐와 별반 차이없었다.

MAO는 중추신경계에서 카테콜아민을 산화하여 비활성화함으로써 시냅스종말에서 신

표 1. D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병 모형흰쥐뇌수조직의 NA함량에 미치는 EMC의 영향

구분	NA함량 /( $\mu$ g·g <sup>-1</sup> )	상대 함량/%
정상흰쥐	0.86±0.16	100
대조(D-갈주입)	0.54±0.14*	62.8
시험(D-갈+ +EMC주입)	0.73±0.09 <sup>△</sup>	84.9
양성대조(D-갈+ +도네+비C주입)	0.61±0.13*	70.9

구별실험개체수 각각 8마리, \*  $p<0.05$ (정상 무리와 비교),  $\Delta$   $p<0.05$ (대조무리와 비교)

표 2. D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병모형흰쥐  
뇌수조직의 MAO-B활성에 미치는 EMC의 영향

구분	MAO-B활성 /(nmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> )	상대 합량/%
정상흰쥐	0.626±0.086	100
대조(D-갈주입)	0.724±0.088*	116
시험(D-갈+EMC주입)	0.592±0.069 <sup>△</sup>	94.6
양성대조(D-갈+도네+비C주입)	0.601±0.081 <sup>△</sup>	96.0

구별실험개체수 각각 8마리, \*  $p<0.05$ (정상무리와 비교),  $\Delta$   $p<0.05$ (대조  
무리와 비교)

경전달물질의 생리적수준을 유지하고 신경계통의 흥분전달기능과 생리적긴장도를 보장해 준다. MAO는 중추 및 말초신경계통에서 화학전달물질로 되는 NA, 도파민, 세로토닌 등을 산화분해하여 알데히드로 변화시킨다. 따라서 MAO가 증가하면 여러 신경전달물질들이 분해되는 양이 정상상태보다 증가하여 신경계통의 활동에 장애를 가져오며 여러가지 신경변성질환이 발생하게 된다. 우울증, 알츠하이머병때에 MAO-B활성이 현저하게 높아지며 동시에 아민합량은 낮아진다.[4]

대뇌피질두터이에 미치는 EMC의 영향을 조사한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 대뇌피질두터이에 미치는 EMC의 영향

무리	대뇌피질 두터이/ $\mu\text{m}$	정상흰쥐에 비한 비율/%
정상흰쥐	1 296±17	100
대조(D-갈주입)	988±16*	76.2
시험(D-갈+EMC주입)	1 102±15* <sup>△</sup>	85.0
양성대조(D-갈+도네+비C주입)	1 003±11* <sup>△</sup>	77.4

구별 실험개체수 각각 8마리, \*  $p<0.05$ (정상무리와 비교),  $\Delta$   $p<0.05$ (대조  
무리와 비교)

표 3에서 보는바와 같이 D-갈락토스를 주입하여 알츠하이머병을 일으킨 대조구에서는 대뇌피질두터이가 정상흰쥐의 76.2%로서 감소되었지만 EMC를 주입한 시험구에서는 대뇌피질두터이가 정상흰쥐의 85.0%로서 대조구만큼 감소되지는 않았다. 도네페질과 비타민 C를 주입한 양성대조구에서는 대뇌피질두터이가 정상흰쥐의 77.4%로서 대조구와 별로 차이 나지 않았다.

알츠하이머병이 심해지면 대뇌피질에서 병변이 확대되는데 그것은 주요하게 대뇌피질과 해마에서의 콜린작용성신경전달(cholinergic neurotransmission)이 약화되는것과 관련되어 있다.[5] 실험결과는 EMC가 알츠하이머병의 대뇌피질손상을 막는다는것을 보여준다.

경과일수에 따르는 알츠하이머병모형흰쥐 뇌수해마조직의 세포밀도에 미치는 EMC의 영향을 조사한 결과는 표 4와 같다.

표 4에서 보는바와 같이 D-갈락토스를 주입하여 알츠하이머병을 일으킨 대조구에서는 해마의 CA1, CA2, CA3구역에서 날이 감에 따라 추체세포밀도가 현저히 감소하였다. 마지막 42일에 CA1, CA2, CA3구역에서 EMC를 주입한 시험구에서 추체세포밀도는 대조구에 비해 각각 1.28, 1.25, 2.02배 높았으며 양성대조구에 비해서는 1.07, 1.11, 1.13 배 높았다.

표 4. 결과일수에 따르는 알츠하이머병 모형 흰쥐 뇌수해마조직의  
추체세포밀도에 미치는 EMC의 영향

해마 조직 부위	날자 /d	추체세포밀도/(개·(195 $\mu\text{m}$ ×95 $\mu\text{m}$ ) <sup>-1</sup> )			
		정상흰쥐	대조 (D-갈주입)	시험 (D-갈+EMC주입)	양성대조(D-갈+ 도네+비C주입)
CA1	14	21.0±2.2	18.1±2.8	19.3±1.4*	18.2±1.1*
	28	21.0±2.2	16.9±1.7	19.1±1.6*, $\Delta\Delta$	18.5±1.1**, $\Delta$
	42	21.0±2.2	15.1±1.6*	19.3±1.8 $\Delta\Delta$	18.1±1.2*, $\Delta\Delta$
CA2	14	24.4±1.7	20.9±1.6	16.7±1.3*	17.2±1.3**
	28	24.4±1.7	17.3±1.6**	18.7±2.6	17.7±1.3**
	42	24.4±1.7	15.9±1.2**	19.9±2.3 $\Delta\Delta$	18.0±1.2*, $\Delta\Delta$
CA3	14	22.9±2.4	18.9±1.4	20.1±1.4	19.4±2.1**
	28	22.9±2.4	15.9±1.9**	20.1±1.6 $\Delta\Delta$	19.1±1.3**, $\Delta\Delta$
	42	22.9±2.4	10.6±1.7**	21.4±1.6 $\Delta\Delta$	18.9±1.3**, $\Delta\Delta$

구별 실험개체수 각각 8마리, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ (정상무리와 비교),  $\Delta$   $p<0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $p<0.01$   
(모형무리와 비교)

해마의 CA1구역신경원은 가장 취약한 해마신경원이다. 자료에 의하면 카탈라제(CAT)가 과도하게 발현되면 해마경색면적을 현저하게 축소시키며 CA1구역에서 흥분성시냅스후전위를 감소시키고 신경원손상을 낮춘다.[5] 위의 실험결과는 EMC가 SOD와 CAT활성을 다같이 가지고있는 물질로서 해마의 CA1구역에서 신경세포손상을 막을수 있다는것을 보여준다.

이상의 실험결과들은 촉매성항산화제인 EMC를 미리 주입하였을 때 알츠하이머병 모형 흰쥐 뇌수에서 몇가지 신경전달물질들의 감소를 막고 해마의 CA1구역, CA2구역, CA3구역에서 D-갈락토스로 인한 병리적증상을 상당한 정도로 완화시켜 뇌수의 전반적인 위축을 막는다는것을 보여준다.

이 연구는 D-갈락토스를 주입한 흰쥐들에서 ROS생성의 증가로 인하여 해마조직에서 뇌신경세포손상이 일어난다는 선행연구자료[3]를 확증해주며 SOD/CAT모의화합물로 ROS축적을 막으면 이 선택적인 D-갈락토스유도성뇌신경세포죽음이 현저히 줄어든다는것을 보여준다.

이 ROS소거제의 기본효과는 D-갈락토스가 포도당으로 전환되는 대사과정에 갈락토스산화효소의 작용에 의해 생겨나는 산소라디칼이나 과산화수소를 제거하는 방법으로 산화스트레스를 막는데 있다고 보아야 할것이다.

EMC는 D-갈락토스의 대사활동의 결과로 생겨나는 대뇌위축과 세포밀도의 감소를 전부는 아니지만 대부분을 막았다. 이것은 ROS생성이외의 물립새들도 다른 원인으로 하여 활성화되어 뇌신경세포죽음에 기여한다는것을 시사해준다. 흥미있게도 CA1과 CA2, CA3구역에서 EMC의 효과가 차이났는데 이것은 서로 다른 이 세가지 뇌신경세포집단에서 흥분독성의 서로 다른 물립새들이 존재한다는것을 말해준다. 이 물립새들의 본태는 아직 밝혀지지 않았지만 산화스트레스응답이나 2차정보전달자경로들과는 다른 특이적유전자들의 유도가 포함될수 있다. 이 문제를 해명하자면 더 실험을 해보아야 할것이다. 또한 EMC가 D-갈락토스의 대사활동의 결과로 생겨나는 신경전달물질의 감소와 전반적인 대뇌위축을 막았다는 실험결과는 EMC가 뇌수의 다른 조직들에서 발생하는 병리학적증상들도 막는다는것을 보여준다. 이것은 살렌-망간착화합물들이 다른 각이한 신경질환모형들 특히  $\beta$ -아밀로이드독성에서 강한 보호작용을 나타낸다는 연구결과[5]와 일치하며 EMC가 알츠하이머병의 효과적인 치료제가 될수 있다는것을 보여준다.

## 맺 는 말

1) EMC는 D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병모형 흰쥐 뇌수조직의 NA함량의 감소를 막고 MAO-B활성을 정상흰쥐수준으로 유지되게 한다.

2) EMC는 D-갈락토스로 일으킨 알츠하이머병모형 흰쥐 뇌수조직의 대뇌위축과 대뇌 피질두터이, 추체세포밀도의 감소를 막는다.

## 참 고 문 헌

- [1] Lei Zhao et al.; Journal of Functional Foods, 52, 587, 2019.
- [2] Xuejuan Xia et al.; Journal of Functional Foods, 45, 355, 2018.
- [3] Zhiheng Xing et al.; Royal Society of Chemistry, 31646, 8, 2018.
- [4] L. L. Ma et al.; Clin. Sci., 132, 93, 2018.
- [5] Alain D. Dekker et al.; Alzheimer's and Dementia, 10, 99, 2018.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

## **Influence of Ethylbisiminomethylguaiacol Manganese Chloride(EMC) on Several Biochemical and Physiological Indices in Brain Tissue of Alzheimer's Disease Modeled Rats**

*Kim Kwang Song, Kim Kwang Won*

EMC inhibits the decrease of noradrenaline content in brain tissue of rat model of D-galactose-induced Alzheimer's disease and gets the activity of MAO-B to maintain with the level of normal rats. It also inhibits the atrophy of brain tissue, the decreases of the thickness of cerebral cortex and of pyramidal cell density.

Keywords: Alzheimer's disease, donepezil, hippocampus, EMC, D-galactose