

## 日黃連이 痴呆病態모델에 미치는 影響

朴智雲 · 鄭仁哲 · 李相龍  
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

### The Effects of *Coptis japonica* Makino(CJM) Extract on the Alzheimer's Disease Model

Ji-Un Park, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee

Department of Oriental Neuropsychiatry,  
College of Oriental Medicine, Daejeon University

#### Abstract

This experiment was designed to investigate the effect of *Coptis japonica* Makino(CJM) on the Alzheimer's disease.

The effects of CJM extract on IL-1 $\beta$ , IL-6, amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$  and AChE activity of PC-12 cell lysate treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$  and behavior of memory deficit rats induced by scopolamine and mice glucose, uric acid, AChE activity of memory deficit rats induced by scopolamine were investigated, respectively.

The results were summarized as follows ;

1. CJM extract suppressed IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA in PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$
2. CJM extract suppressed APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$
3. CJM extract suppressed AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$
4. CJM extract group showed significantly inhibitory effect on the memory deficit of mice induced by scopolamine in the experiment of Morris water maze.
5. CJM extract increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit rats induced by scopolamine.

According to the above results, it is suggested that CJM extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease and memory deficit symptom.

key word : Alzheimer's Disease, *Coptis japonica* Makino(CJM)

## I. 緒論

癡呆란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군<sup>1)</sup>으로 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 症狀을 나타내는 疾患이다<sup>2)</sup>.

韓醫學에서 “癡呆”라는 用語는 <景岳全書·癡狂癡呆><sup>3)</sup>에 痴獸이라고 최초로 언급되었으나 呆病<sup>4)</sup>, 健忘<sup>5)</sup>도 癡呆로 볼 수 있다.

癡呆를 일으키는 대표적 疾患<sup>6)</sup>인 AD의 誘發機轉에 대한 理論은 多樣한데<sup>7)</sup>, 그 중 代表的인 것이  $\beta$ -secretase나  $\gamma$ -secretase 遺傳子들의 突然變異에 의한 amyloid precursor proteins(APP)의 過多生成으로 인해 amyloid  $\beta$  protein(A $\beta$ )이 過量으로 만들어지게 되고, 이 A $\beta$ 의 沈積으로 생기는 老人癥(senile plaques)의 神經毒性으로 말미암아 神經細胞의 破壞가 일어난다는 假說이다<sup>8)</sup>.

또한 병원균의 침입, 물리적인 뇌손상 등에 의해 IL-1, IL-6 등의 proinflammatory cytokine을 過多하게 生成하여 中樞神經系의 炎症反應을 일으키고 이것이 細胞毒性을 일으킨다는 假說이 提起되고 있으며<sup>9,10)</sup>, 생화학적 측면으로는 acetylcholine이라는 신경전달 물질의 소실에 있는데, 이러한 現象은 acetylcholine의 분해효소인 acetylcholinesterase (AChE)의 증가로 더욱 深化된다<sup>11)</sup>.

日黃連(*Coptis japonica* Makino)은 淸熱燥濕藥으로 毛茛科(미나리아재비과 ; Ranunculaceae)에 속한 다년생 草本인 일본산 黃連의 뿌리를 건조한 것으로<sup>12,13)</sup>, 강<sup>14)</sup>은 黃連의 항콜린에스테라제의 작용을 명백히 하였다.

이에 著者는 日黃連이 痴呆에 미치는 影響을 실험적으로 糾明하고자 PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP의 遺傳子 發現과 AChE의 活性度를 관찰하였고, scopolamine을 注射한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 行動의 變化와 血清內 glucose, uric acid, AChE를 측정한 결과, 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바

이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

실험동물은 350~400g 3주령 SD계 雌性白鼠를 대한실험동물센터에서 공급받아 사용하였고, 30g 6주령의 ICR系 생쥐와 4주령의 BALB/C 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 동물은 실험실 환경(온도 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux)에 2주일간 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 사료는 고품사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사)를, 식수는 정제수를 자유로이 섭취케 하였다.

#### 2) 藥材

본 실험에 사용한 日黃連(*Coptidis japonica* Makino ; CJM)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 試藥 및 機器

試藥 중 cholinesterase kit, scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), D L-dithiothreitol (DTT), leupetin, diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq. polymerase와 deoxy nucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase in

hibitor는 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 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody (Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1 (OncoGen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2 (OncoGen U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab (Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.)과 그 외 試藥들은 특급 및 일급을 사용하였다.

機器는 원심 분리기(한일과학, Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator (녹십자, Korea), 혈액 분석기(Cobas Co, France), centrifuge(Beckman Co, U.S.A.), rotary vacuum evaporator(Büchi 461, Switzerland), bio-freezer(Sanyo, Japan), deep freezer(Sanyo Co, Japan), freeze dryer(Eyela Co, Japan), autoclave (Hiyama Co, Japan), ultrasonic cleaner(Branson ultrasonics Co, U.S.A.), roller mixer(Gowon scientific technology Co, Korea), vortex(비전과학, Korea), plate shaker (Lab-line, U.S.A.), ELISA Leader(Molecular devices Co, U.S.A.), Videotrac k(Viewpoint Co, France) 등을 使用하였다.

## 2. 방법

### 1) 檢液의 調製

日黃連 200g을 깨끗이 씻어 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 첨가하였다. 3시간 가열 추출하고 여과지를 이용하여 침전물을 3회 여과한 후, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator(Büchi 461, Switzerland)에서 감압 농축하였다.

이 농축액을 -84℃ deep freezer(Sanyo Co, Japan)에서 4시간 동안 방치하고 24시간 동안 freeze dryer(Eyela Co, Japan)로 동결 건조하여 47g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리 식염수에 희석하여 사용하였다.

### 2) mLFC와 PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정 (1) Mouth lung fibroblast cells(mLFC)와

pheochromocytoma cell line(PC-12 cell)의 배양  
BALB/C 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하고 conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였으며 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 이를 D-PBS를 넣어 약 2회 1,500rpm으로 원심 분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양하고 이를 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 培養器에서 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) 그리고 10µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

### (2) 세포독성 측정

세포독성 측정 방법은 SRB assay법<sup>15)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 2.0 × 10<sup>4</sup>개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 日黃連 추출물(최종 농도 400µg/ml, 250 µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다.

배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50µl를 가하고 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액 100µl/per을 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA Leader에서 540nm로 흡광도를 측정하였다.

### 3) PC-12 cell의 proinflammatory cytokine 및 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 측정

(1) mRNA 추출

PC-12 cell은 24 wells plate에  $1 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 日黃連 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 1시간 후  $\beta$ -amyloid(10 $\mu\text{M}$ )와 rIL-1 $\beta$ (100ng/ml)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

배양종료 후 상층액을 회수한 후 RNAzolB를 이용하여 PC-12 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 DEPC를 처리한 20 $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(2) RT-PCR

역전사 반응은 준비된 total mRNA 3 $\mu\text{g}$ 을 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 변성시킨 후 2.5 $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs mix, 1 $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25pmole/25 $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor 로써 1 $\mu\text{l}$  RNase inhibitor(20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1 $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5 $\mu\text{l}$  5 $\times$ RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT(200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20 $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20 $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}\text{C}$  항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 $\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOsII와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/ $\mu\text{l}$ )와 antisense primer(20pmole/ $\mu\text{l}$ )를 혼합하여 1 $\mu\text{l}$ 를 가하고, 다시 3 $\mu\text{l}$  2.5mM dNTPs, 3 $\mu\text{l}$  10 $\times$ PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu\text{l}$  Taq. polymerase(5U/ $\mu\text{l}$ )를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu\text{l}$  되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95 $^{\circ}\text{C}$ , 5분), denatu-

ration(95 $^{\circ}\text{C}$ ), annealing(55 $^{\circ}\text{C}$ , 1분), elongation(72 $^{\circ}\text{C}$ , 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 $\mu\text{l}$ 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 鹽基配列은 다음과 같다.

㉠ rat IL-1 $\beta$

sence oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCATTAC-3'

㉡ rat IL-6

sence oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTGACGCCACTG-3'
antisence oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTCTGTGACTACT-3'

㉢ rat APP

sence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

㉣ rat AChE

sence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

㉤ rat GFAP

sence oligonucleotide	5'-GAGCAGCTGGCCAGCAGCAG-3'
antisence oligonucleotide	5'-CTTGAGGTGGCCTTCTGACAC-3'

㉥ rat G3PDH

sence oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height : Ht)으로 측정하였다.

4) PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE activity 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 日黃連 추출물(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)과  $\beta$ -amyloid (10 $\mu$ M)와 rIL-1 $\beta$ (100ng/ml)를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다.

세포 용해액을 얻기 위하여 50 $\mu$ l의 lysis 완충 용액(Tris-HCl (200mM; pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 $\mu$ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후, Bradford 염색법<sup>16)</sup>으로 단백질을 정량하였다.

(2) AChE activity 측정

세포 용해액을 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml과 혼합하였다.

각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2 ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고, 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 Morris water maze 실험

(1) ICR계 생쥐의 반복 학습 및 약물 투여

ICR계 생쥐 100마리를 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 선별을 실시하고 선별된 ICR계 생쥐를 다시 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복 학습을 실시하였다.

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28 $^{\circ}$ C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치하고, 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 아무런 처치가 없는 대조군, tacrine(10mg/kg p.o)을 경구투여한 양성대조군, 日黃連(250mg/kg p.o)을 경구투여한 실험군으로 분류하였고 계속 21일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 측정

훈련과 약물 투여가 종료되고 1주와 3주 후 ICR계 생쥐에 scopolamine(1mg/kg i.p)을 복강에 처리한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 videotrack으로 행동을 측정하였고 그 결과를 VIDEOTRACK software로 분석하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 생쥐의 血清내 glucose, uric acid, AChE 측정

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

30주령 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처치를 하지 않은 대조군, tacrine(10mg/kg p.o)을 경구투여한 양성대조군, 日黃連 추출물(100mg/kg p.o)을 경구투여한 실험군으로 하여 각각 scopolamine(1mg/kg i.p)을 7일간 1일 1회 복강 주사하면서 약물을 함께 투여하였다.

(2) Glucose, uric acid 측정

血清内 glucose, uric acid의 양은 자동생화학 분석기(Ciba Coring, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE activity 측정

AChE activity 측정을 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. No. 150-3) 0.2ml과 serum 0.2ml을 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution(cat. No.420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 이후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 정확히 30분간 방치시킨 후 ELISA Leader로 420nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 바탕으로  $\Delta A = ABLANK - ATEST$  公式에 의해 검장선에서 활성도를 측정하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법<sup>17)</sup>을 이용하였다.

### III. 成績

은 32(Ht), CJM II는 37(Ht), CJM III는 48(Ht)로 나타나 발현이 억제되었다(Fig. 2).

#### 1. mLFC와 PC-12 cell에 대한 세포독성

mLFC의 생존율은 대조군에 비해 400 $\mu$ g/ml 에 서만 89 $\pm$ 2.8(%)로 나타나 약간의 세포독성이 나타났으며, 250 $\mu$ g/ml 이하에서 각각 90 $\pm$ 4.0, 98 $\pm$ 3.2, 98 $\pm$ 5.2, 103 $\pm$ 3.1, 101 $\pm$ 2.8(%)로 나타나 세포독성이 나타나지 않았고, PC-12 cell의 생존율은 대조군이 100 $\pm$ 4.8(%), 실험군의 400 $\mu$ g/ml이하에서 각각 92 $\pm$ 2.4, 98 $\pm$ 4.1, 97 $\pm$ 3.8, 103 $\pm$ 3.4, 102 $\pm$ 2.5, 103 $\pm$ 3.5(%)로 나타나 세포독성이 나타나지 않았다(Table I).

Table I. Cytotoxicity of CJM Extract on mLFC and PC-12 Cell

Group	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell
Control	0	100 $\pm$ 5.0a)	100 $\pm$ 4.8
CJM	1	101 $\pm$ 2.8	103 $\pm$ 3.5
	10	103 $\pm$ 3.1	102 $\pm$ 2.5
	50	98 $\pm$ 5.2	103 $\pm$ 3.4
	100	98 $\pm$ 3.2	97 $\pm$ 3.8
	250	90 $\pm$ 4.0	98 $\pm$ 4.1
	400	89 $\pm$ 2.8*	92 $\pm$ 2.4

a) : Mean  $\pm$  Standard error(N=6).

\* : Statistically significant value compared with control data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

#### 2. PC-12 cell의 proinflammatory cytokine과 APP, AChE, GFAP mRNA에 대한 효과

##### 1) PC-12 cell의 IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 발현 억제 효과

IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 있어서 정상군은 74(Ht)로 나타났고 대조군은 181(Ht)인데 비하여, CJM I은 92(Ht), CJM II는 98(Ht), CJM III는 105(Ht)로 나타나 발현이 억제되었다(Fig. 1).

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 21(Ht)로 나타났고 대조군은 53(Ht)인데 비하여, CJM I

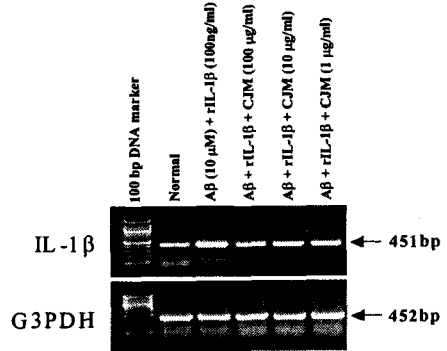


Fig. 1. Inhibitory effects of CJM extract on IL-1 $\beta$  gene mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with 10  $\mu$ M A $\beta$  plus 100ng/ml rIL-1 $\beta$  for 1 hour.

CJM I : Group pretreated with 10  $\mu$ M A $\beta$  plus 100ng/ml rIL-1 $\beta$  for 1 hour and 100 $\mu$ g/ml of CJM extract for 24 hours.

CJM II : Group pretreated with 10  $\mu$ M A $\beta$  plus 100ng/ml rIL-1 $\beta$  for 1 hour and 10 $\mu$ g/ml of CJM extract for 24 hours.

CJM III : Group pretreated with 10  $\mu$ M A $\beta$  plus 100ng/ml rIL-1 $\beta$  for 1 hour and 1 $\mu$ g/ml of CJM extract for 24 hours.

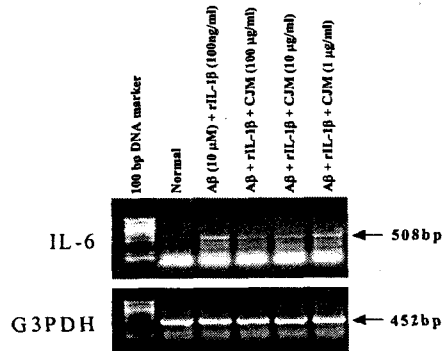


Fig. 2. Inhibitory effects of CJM extract on IL-6 gene mRNA expression in PC-12 cell.

##### 2) PC-12 cell의 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과

APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 83(Ht)로

나타났고 대조군은 105(Ht)인데 비하여, CJM I 은 67(Ht), CJM II는 65(Ht), CJM III는 108(Ht)로 나타나 CJM I 과 CJM II에서만 발현이 억제되었다 (Fig. 3).

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 20(Ht)로 나타났고 대조군은 82(Ht)인데 비하여, CJM I 은 32(Ht), CJM II는 35(Ht), CJM III는 76(Ht)로 나타나 발현이 억제되었다(Fig. 4).

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 87(Ht)로 나타났고 대조군은 106(Ht)인데 비하여, CJM I 은 74(Ht), CJM II는 89(Ht), CJM III는 87(Ht)로 나타나 발현이 억제되었다(Fig. 5).

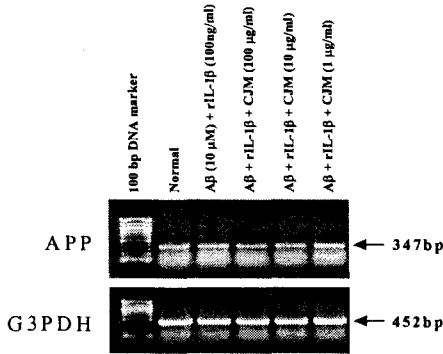


Fig. 3. Inhibitory effects of CJM extract on APP gene mRNA expression in PC-12 cell.

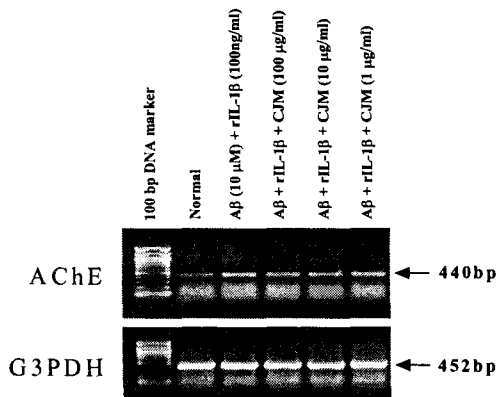


Fig. 4. Inhibitory effects of CJM extract on AChE gene mRNA expression in PC-12 cell.

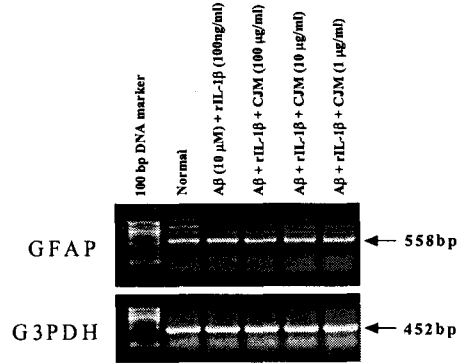


Fig. 5. Inhibitory effects of CJM extract on GFAP gene mRNA expression in PC-12 cell.

### 3. PC-12 cell 細胞性 蛋白質에서의 AChE activity 억제 효과

정상군의 AChE activity는  $24 \pm 3.6(\%)$ 로 나타났고 대조군은  $100 \pm 3.5(\%)$ 인데 비하여, CJM I 은  $49 \pm 4.9(\%)$ , CJM II는  $61 \pm 5.3(\%)$ , CJM III는  $89 \pm 4.7(\%)$ 로 나타나 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

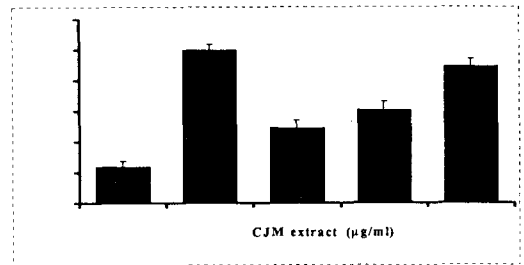


Fig. 6. Inhibitory effects of CJM extract on the AChE activity in PC-12 Cell.

### 4. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 기억력감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

약물 투여 1주 후와 3주 후 Platform 도달시간 (stop-through latency)을 관찰한 결과 대조군이 57.3±5.20(sec), 66.1±8.74(sec)로 나타났고, 양성대조군은 12.9±2.78(sec), 11.9±1.43 (sec)로 나타났으며, 실험군은 19.7±2.83 (sec), 16.3±2.29(sec)로 나타나 1주 후와 3주 후에 모두 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 7).

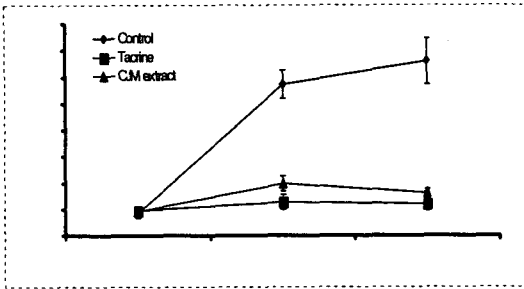


Fig. 7. Effects of CJM on the scopolamine-induced impairment of memory in the stop-through type morris water maze test.

a) : Mean ± Standard error(N=10).

\* : Statistically significant value compared with control data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 記憶力 減退 억제 효과  
약물 투여 1주 후와 3주 후의 Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1239±86.7 (cm), 1386±107(cm)로 나타났고, 양성대조군은 258±28.7(cm), 243±25.8(cm)로 나타났으며, 실험군은 506±33.1(cm), 341±20.5(cm)로 나타나 1주 후와 3주 후에 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였다(Fig. 8).

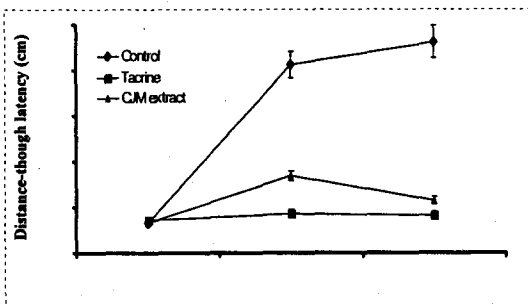


Fig. 8. Effects of CJM on the scopolamine-induced impairment of memory in the distance movement-through type morris water maze test.

Lardist : The total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : The total distance covered by the animal in small movement.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

### 5. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 血清內 glucose, uric acid, AChE에 미치는 효과

Glucose는 정상군이 119±5.8(mg/dl)로 나타났고, 대조군이 69.4±2.8(mg/dl)인데 비하여, 양성대조군과 실험군은 각각 92.7±5.3, 87.0±4.4(mg/dl)으로 나타나 모두 유의성 있는 상승효과를 나타냈다(Table II).

Uric acid는 정상군이 1.09±0.07(mg/dl)로 나타났고, 대조군이 2.29±0.16(mg/dl)인데 비하여, 양성대조군과 실험군은 각각 1.77±0.12, 1.82±0.09(mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table II).

AChE activity는 정상군이 18.9±1.4(U/ml)로 나타났고, 대조군이 76.5±3.9(U/ml)인데 비하여, 양성대조군과 실험군은 각각 28.4±4.0, 43.5±3.3(U/ml)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table II).

Table II. Effects of CJM on the Serum Level of Memory Deficit Rats Induced by Scopolamine

Group	Glucose (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)	AChE (U/ml)
Normal	119±5.8a)	1.09±0.07	18.9±1.4
Control	69.4±2.8	2.29±0.16	76.5±3.9
tacrine	92.7±5.3**	1.77±0.12*	28.4±4.0***
CJM	87.0±4.4**	1.82±0.09*	43.5±3.3***

a) : Mean ± Standard error(N=5).

Normal : Non-treatment group.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).



#### IV. 考 察

생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명이 최근 수십년 동안 크게 연장되어 노년층 인구가 늘어남에 따라 여러 가지 의학적 문제점들이 새롭게 부각되고 있는데, 그 중에서도 특히 고등정신기능 및 인격의 황폐화를 나타내는 대표적인 질환인 노년기 치매는 근래 들어 점차 증가 추세에 있어 인류의 커다란 사회문제로 대두될 것으로 보인다<sup>18)</sup>.

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군<sup>1)</sup>으로, 유발 질환에는 50~60%를 차지하는 Alzheimer's disease(AD), 뇌경색, 기타 급성 일산화탄소 중독의 후유증, 두부외상, 알콜중독 등이 있는데<sup>19)</sup>, 이중 AD와 뇌경색 등으로 인한 혈관성 치매가 많은 비율을 차지하고 있다<sup>20,21)</sup>.

韓醫學에서 “痴呆”라는 用語는 <景岳全書·癡狂癡呆><sup>3)</sup>에 痴獸라고 한 것이 최초로 되어 있으나 呆病<sup>4)</sup>, 健忘<sup>5)</sup>도 痴呆로 볼 수 있으며, 근래에는 老化에 따른 臟腑機能의 失調<sup>22)</sup>, 痰迷心竅<sup>22)</sup>, 氣滯血瘀<sup>22)</sup>, 思慮, 驚恐 등의 精神的 要因<sup>23)</sup> 등을 老年層에 發生하는 痴呆의 重要한 原因으로 보고 있으며, 이에 對한 臨床報告<sup>24~25)</sup>가 많이 발표되고 있다.

AD 誘發에는 뇌의 전반적인 위축 이외에도 amyloid β protein(Aβ), estrogen, apolipoprotein E, presenilin, free radicals, 炎症, 事故에 의한 損傷, 神經傳達物質의 不均衡 등의 많은 因子가 關與하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

이 중 Aβ의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 神經細胞의 破壞가 일어난다는 것이 代表的이다<sup>8)</sup>.

AD 기전과 관련된 다른 중요한 이론으로 면역계에서만 생산될 수 있다고 믿어져 왔던 많은 사이토카인들이 병원균의 침입 또는 물리적 뇌손상에 의해 손상된 BBB를 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포가 활성화되어

proinflammatory cytokine들이 과다하게 생성되고 이로 인하여 사이토카인 恒常性이 파괴됨으로써 神經細胞의 사멸이 促進된다는 假說이다<sup>26)</sup>.

이러한 가설은 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증 같은 퇴행성 腦疾患의 병변부위에서 proinflammatory cytokine의 발현을 보이는 정상 세포 및 마이크로글리아들의 활성화가 관찰됨으로써 많은 관심이 집중되고 있다<sup>27)</sup>.

이러한 proinflammatory cytokine의 작용과정은 腦損傷등의 외부자극인자들에 의하여 microglial cell이 활성화 되어 IL-1β 및 TNF-α를 생산하며, 이들 염증반응 사이토카인들은 astrocyte cell를 활성화시켜 이산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하고 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 일종인 peroxynitrite(OXOO) 등을 유도 하여 신경세포사를 야기시키게 된다<sup>27)</sup>.

특히 Aβ가 沈積된 老人癡 주변에 活性化된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 이들 神經膠細胞들은 Aβ에 의해 過剩生産된 ROS 등이 媒介되어 活性化되고 이러한 astrocyte와 microglial cell의 活性化는 proinflammatory cytokine의 발현을 통해 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있어 Aβ와 proinflammatory cytokine의 상관성이 注目되고 있다<sup>28)</sup>.

또한 이러한 과정에서 GFAP의 수치가 상승하는데 GFAP란 腦損傷, 中樞神經系感染, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서, AD 患者에서는 GFAP가 顯著하게 增加하는 경향을 보이는데, 이는 astrocyte가 活性化된다는 것을 의미하고 活性化된 astrocyte는 神經變成 過程을 促進하게 된다<sup>29)</sup>.

acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 神經傳達物質은 老化에 따라 減少하는데<sup>30)</sup>, AD의 主症狀인 記憶力 障礙가 해마 및 측두엽의 변연계에서 콜린성 신경전달 물질이 소실되어 생긴다고 알려져 있다<sup>19)</sup>. 특히 AD 환자에게서 나타나는 記憶力 減退는 acetylcholine을 만들어 내는 神經細胞의 退化 때문이며 이 現象은 acetylcholine을 分解하는 酵素인 AChE의 增加로 인해 더욱 深化된다<sup>11)</sup>.

이처럼 AD는 뇌조직 내에서 choline계 활성이 감소되어 기억력의 감퇴를 일으키기 때문에 신경 접합부에 작용하는 acetylcholine의 양을 증가 시키거나, acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 약물들이 개발중인데 대표적으로 FDA의 승인을 받은 acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 tacrine 등이 있다<sup>31)</sup>. 그러나 이들은 약물의 작용 시간이 짧아 1일 4회나 복용하여야 하며 간독성이 많이 나타나는 단점이 있으며, 환자의 20~40%에서만 효과가 나타나는 것으로 보고 되고 있다<sup>32)</sup>.

이외에 AD 誘發에는 심리적 요인도 중요한 문제로 제기되고 있는데, 특히 환경의 급변과 사회 경제적 조건에 의해서 많은 영향을 받는 것으로 보고 되고 있다<sup>5)</sup>.

黃連의 主治, 效能에 대하여 淸熱燥濕, 淸心除煩하는 效能이 있어 高熱神昏, 心煩不安 등을 治療한다<sup>12,13)</sup>고 하였고, 《神農本草經》<sup>33)</sup>에서는 “黃連味苦寒 …… 久服令人不忘”, 《本草綱目》<sup>34)</sup>에서는 “黃連能去心竅惡血”이라 하였으며, 강<sup>14)</sup>은 黃連의 항콜린에스테라제의 작용을 명백히 하였는데, 이러한 主治, 效能을 통하여 痰火, 瘀血, 心腎不交 등의 原因으로 발생하는 痴呆에 응용될 수 있겠다고 생각되었다.

이에 著者는 日黃連의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고, scopolamine을 주사한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하고 血清內 glucose, uric acid, AChE를 측정하였다.

정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell를 분리하여 日黃連의 세포독성을 측정한 결과 mLFC의 생존율은 대조군에 비하여, 실험군은 250, 100, 50, 10, 1 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고, 400 $\mu$ g/ml의 농도에서 약간의 세포독성이 나타났으며, PC-12 cell의 생존율은 대조군에 비하여, 실험군은 400, 250, 100, 50, 10, 1 $\mu$ g/ml의 농도에서 모두 세포독성이 나타나지 않았고, 실제 실험에서는 100 $\mu$ g/ml 이하로 실험하였다(Table I).

PC-12 cell의 proinflammatory cytokine의 mRNA 발현을 측정한 결과 10 $\mu$ M의 A $\beta$  와

100ng/ml rIL-1 $\beta$ 만을 處理한 대조군에 비해, A $\beta$ , rIL-1 $\beta$ 와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 발현이 억제되었는데(Fig. 1, 2) 이를 통하여 日黃連이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

AD를 유발할 수 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 cell에서 관찰한 결과 APP mRNA 발현에 있어서 10 $\mu$ M의 A $\beta$  와 100ng/ml rIL-1 $\beta$ 만을 處理한 대조군에 비해, A $\beta$ , rIL-1 $\beta$ 와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 발현이 억제되었고, AChE, GFAP의 mRNA 발현에서는 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 발현이 억제되었는데(Fig. 3, 4, 5), 이를 통하여 日黃連은 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었고 임상적으로 AD의 치료에 日黃連을 사용해 볼 수 있겠다.

PC-12 cell 細胞性 蛋白質에서의 AChE activity를 측정한 결과 대조군에 비해 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 6), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 日黃連의 투여로 PC-12 cell의 遺傳子 水準과 細胞性 蛋白質 水準에서 모두 AChE가 억제되었는데, 日黃連의 투여가 acetylcholine의 量을 增加시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과 약물 투여 1주 후와 3주 후 stop-through latency는 대조군에 비해 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 시간의 단축을 보였으며(Fig. 7), 약물 투여 1주 후와 3주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 결과 약물 투여 1주 후와 3주 후 stop-through latency는 대조군에 비해 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데(Fig. 8), 이것으로 볼 때 日黃連 투여 후 1주, 3주 모두에서 記憶力 減退를 억제했음을 볼

수 있었고, 약물을 계속 투여하면서 더욱 記憶力 減退 억제 효과가 있었음을 알 수 있었다.

glucose는 scopolamine 등에 의해 誘導된 記憶力 減退를 回復시키는 役割을 하는 것으로 생각 되고 있으며<sup>35)</sup>, uric acid는 核酸 중 purine 鹽基의 최종 代謝産物로<sup>36)</sup>, AD와 腦血管性 痴呆에서 增加되는 것으로 알려져 있다<sup>37)</sup>.

이를 토대로 日黃連 투여로 나타나는 혈청내의 glucose와 uric acid의 變化를 측정하였는데, Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 혈청내 glucose, uric acid에 미치는 효과를 분석한 결과 Glucose는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 투여군과 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 있는 증가를 보였고 (Table II), Uric acid는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 투여군과 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 나타내었는데 (Table II), 이로써 日黃連이 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켜 AD를 억제하는 作用이 있음을 알 수 있었다.

血清內 AChE를 분석한 결과 AChE activity는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 투여군과 日黃連 추출액을 함께 投與한 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데 (Table II), 이로써 日黃連이 PC-12 cell의 遺傳子, 細胞性 蛋白質 水準 뿐만 아니라 血清 水準에서 역시 AChE의 活性을 억제하므로써, AChE의 과다로 인한 acetylcholine의 作用 低下를 改善하여 記憶力 障礙에 대한 치료효과가 있을 것으로 判斷된다.

以上の 내용을 總括해 보면 日黃連은 PC-12 cell에서 遺傳子 水準에서 IL-1 $\beta$ , IL-6의 proinflammatory cytokine의 발현과 APP, AChE, GFAP의 발현을 억제하였고, 細胞性 蛋白質 水準에서 AChE의 活性을 감소시켰으며, Morris water maze 實驗에서 scopolamine으로 誘導된 생쥐의 記憶力 減退를 억제하였고, 血清內 glucose를 증가시키고 uric acid와 AChE를 減少시키는 것으로 나타났다.

따라서 日黃連은 microglial cell의 proinflammatory cytokine의 過多 發顯, APP의 過多 生成, AChE의 過剩 活性化로 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료에 活用될 수 있을 것으

로 思料된다.

## V. 結 論

日黃連의 痴呆에 대한 效果를 알아보고자, PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP의 遺傳子 發現과 AChE의 活性度를 관찰하였고, scopolamine을 注射한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 行動의 變化와 血清內 glucose, uric acid, AChE를 측정한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA의 發顯을 抑制하였다.
2. PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 發顯을 抑制하였다.
3. PC-12 cell의 細胞性 蛋白質에서 AChE의 活性을 有意性 있게 抑制하였다.
4. scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 有意性 있는 記憶力 改善 效果를 나타냈다.
5. scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 생쥐의 血清에서 有意性 있는 glucose의 增加, uric acid의 減少, AChE 活性의 減少를 나타내었다.

以上の 結果로 보아 日黃連은 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 발현과 AChE의 活性을 억제하여 AD의 治療에 使用될 수 있을 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. 이상복. 치매와 그 원인질환-診斷과 治療. 1991;13(4):119-252.
2. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-228.
3. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
4. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
5. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37,124,196,217-8,229.
6. 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256-71,327-30.
7. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia; loss of neurons in the basal forebrain. Science. 1982;215(4537):1237-9.
8. 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. 2000;95(1):1-4.
9. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
10. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture; role of tumor necrosis factor-alpha. Glia. 1999;28(2):114-27.
11. Costagli C, Galli A. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents ; focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol. 1998;55(10):1733-7.
12. 康秉秀. 本草學. 서울:永林社. 1992:180-1.
13. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1988:641-7.
14. 강소신의학원 편. 중약대사전. 서울:정담. 1996:6478-99.
15. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107-12.
16. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302-8.
17. 金宇哲. 統計學概論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
18. Butler R.N. geriatric psychiatry. In Kaplan HI, Sadock BJ, eds. Comprehensive textbook of psychiatry V. Baltimore Williams & Wilkins. 1989;pp.2014-9.
19. 이홍식. 神經科學協會誌. 1992;35(9):1126-33.
20. 裴旻星. 老人性 痴呆에 關한 體質學的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1992;9(703):101.
21. 서무규. 성인병·노인병학. 서울:高麗醫學. 1986:225-67.
22. 何 剛. 老年病證治精要. 中醫:中醫藥出版社. 1991:121-4.
23. 徐東白. 老年健康與長壽指南. 成都:四川科學技術出版社. 1987:407-9.
24. 施亦農. 老年性痴呆病機和治則探討. 山東中醫雜誌. 1989;5:6-7.
25. 傅 陸 등. 老年痴呆의辨證論治. 新中醫. 1992;2:49-50.
26. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. J Immunol. 1983;129(6):2413-9.
27. Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT, Brosnan CF. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial

- fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem.* 1991;57(3):823-30.
28. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes ; morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res.* 1998;785(2):195-206.
29. 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. *Eur Neurol.* 2001;46(1):35-8.
30. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(1):187-94.
31. Raskind MA, Sadowsky CH, Sigmund WR, Beitler PJ, Auster SB. Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1997;54(7):836-40.
32. Rupniak NM, Tye SJ, Field MJ. Enhanced performance of spatial and visual recognition memory tasks by the selective acetylcholinesterase inhibitor E2020 in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;131(4):406-10.
33. 吳 普. 神農本草經. 北京:新華書店北京發行所. 1982:25-6.
34. 李時珍. 本草綱目(上·下卷). 北京:新華書店北京發行所. 1982:771-80.
35. Messier C. The absence of effect of glucose on memory is associated with low susceptibility to the amnesic effects of scopolamine in a strain of mice. *Behav Brain Res.* 1998;96(1~2):47-57.
36. 이귀녕, 이종순. 임상병리파일. 서울:의학문화사. 1993:92-6.
37. Degrell I, Niklasson F, Purine metabolites in the CSF in presenile and senile dementia of Alzheimer type, and in multi infarct dementia. *Arch Gerontol Geriatr.* 1998;7(2):173-8.