

# 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향

임정화 · 정인철 · 이상룡\*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## Effects of ChongMyung-Tang and ChongMyung-Tang added Moutan Cortex Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model

Jung Hwa Lim, In Chul Jung, Sang Ryong Lee\*

Department of Oriental Neuropsychiatry, Oriental Medicine, Daejeon University

This experiment was designed to investigate the effect of the CMT and PCMT hot water extract & ultra-fine powder on microglia and memory deficit model. The effects of the CMT and PCMT hot water extract on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-II, COX-2, IL-10, TGF- $\beta$ 1 mRNA and production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO, ROS in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) ; serum glucose, uric acid, AChE activity of the memory deficit mice induced by scopolamine ; behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine and were investigated, respectively. The CMT and PCMT hot water extract suppressed the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-II, COX-2 mRNA, production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO, ROS and increased the expression of IL-10, TGF- $\beta$ 1 mRNA in BV2 microglial cell line treated by LPS. The PCMT hot water extract & ultra-fine powder increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine. The CMT and PCMT hot water extract & ultra-fine powder groups showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze. According to the above result, it is suggested that the CMT and PCMT hot water extract & ultra-fine powder might be usefully applied for prevention and treatment of dementia.

Key words : Microglia, Dementia, ChongMyung-Tang(CMT), ChongMyung-Tang added *Moutan Cortex*(PCMT), Hot water extract & Ultra-fine powder

### 서론

치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이나 질병 등에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지 기능과 고등 정신 기능이 감퇴하는 복합적인 임상증후군으로<sup>1)</sup>, 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)에 의한 치매, 혈관성치매(vascular dementia; VD), 중독성 치매 등이 있는데, 이 중 AD가 50% 이상을 차지하고 있다<sup>2)</sup>.

AD는 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전 반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실을 초래함으로써 나타내며<sup>3)</sup>, 뇌 내 microglia와 astrocyte에서 분비되는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokine<sup>4)</sup>, acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase(AChE)의 증가<sup>5)</sup>, oxidants(free radicals)<sup>6)</sup> 등이 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

한의학에서 痴呆는 《景岳全書·癡狂癡獸》<sup>7)</sup>에서 “癡獸”로, 《石室秘錄》<sup>8)</sup>, 《辨證奇門》<sup>9)</sup>에 “呆病”으로 언급되었으며, 원인으로 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이 있다<sup>10)</sup>.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》<sup>11)</sup>에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 健忘

\* 교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : 7575np@dju.ac.kr, · Tel : 041-521-7575

· 접수 : 2006/06/09 · 수정 : 2006/07/15 · 채택 : 2006/08/11

및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다<sup>12)</sup>.

최근 한의학계에서 痴呆에 대한 실험적 연구<sup>13,14)</sup>가 다수 진행되어 왔는데, 특히 聰明湯에 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯<sup>15)</sup>, 山査를 加한 山査聰明湯<sup>16)</sup>이 AD의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구와 巴戟天의 치매병태모델에 미치는 영향에 대한 연구<sup>17)</sup>로 미루어 볼 때, 聰明湯에 巴戟天를 加해 만든 巴戟天聰明湯 역시 치매의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 판단된다.

한편, 현재 가장 널리 사용되는 한약 제형인 湯劑는 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있다<sup>18)</sup>. 초미세 분말은 약재를 수십 μm로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 제형개발에 초미세 분말이 도입, 응용되어 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구<sup>19)</sup>성가로 볼 때, 한약의 초미세 분말 제형에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이에 저자는 聰明湯과 巴戟天聰明湯이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교 검토하고자 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물을 시료로 mLFC(mouse lung fibroblast cells)에서 세포독성을, BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)에서 세포 생존율을 관찰하였고, BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, NOS-II, COX-2, IL-10, TGF-β1의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, nitric oxide(NO), reactive oxygen species(ROS)의 생성을 관찰하였다. 또한 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, uric acid, AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정된 바 유사한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit(420-MC), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNazolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine

serum)은 Hyclone사(USA) 제품을 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), rotary vacuum evaporator(Büchi, B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, USA), bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech, Germany), plate shaker (Lab-Line, USA), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(molecular devices, USA), 및 homogenizer(OMNI, USA), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning Co., USA), VIDEOTRACK(Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy(Nikon, Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), Pin mill (대성제약기계제작소, Korea), Turbo mill(air-flow type mill, ATM-100, 부성분체, Korea), 공기분급장치(air classification system, ATM-100, 부성분체, Korea), Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA), 자동생화학분석기(Biochemical analyzer, Express 550) 등이다.

#### 2) 동물

평균체중 약 24g의 8주령 雌性 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명공학연구원에서 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 실온 22±2℃을 유지하고, 1일 중 12시간은 200~300Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(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, Korea)와 물을 충분히 공급하였다.

#### 3) 약제

처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of ChongMyung-Tang(CMT) & PaGuekCheon ChongMyung-Tang(PCMT)

韓藥名	生藥名	CMT(g)	PCMT(g)
白茯苓	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
巴戟天	Moutan Cortex	0	12
Total amount		36g	48g

#### 4) 검액의 조제

##### (1) 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

聰明湯 3첩 분량(108g)과 巴戟天聰明湯 3첩 분량(144g)에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 聰明湯 열수추출물 15.3g, 巴戟天聰明湯 열수추출물 23.1g을 얻었으며, 얻어진 열수추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

##### (2) 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말은 (주)허브월드에서 제작·협조하였으며, 白茯苓, 遠志, 石菖蒲, 巴戟天 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터 (beater)회전속도 6,750rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(air classifying wheel speed; ACWS) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 입도분석은 한국콜마(주)(GMP 인증업체)에서 실시·협조하였다. 이와 같이 얻은 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 400mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 세포독성 측정

#### (1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA), DNase type I (0.15mg/ml, Sigma, USA), antibiotics(penicillinm 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25µg/ml))을 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)는 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, NY, USA)으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

#### (2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법<sup>20)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10<sup>4</sup> 개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물(최종 농도 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10<sup>5</sup> cells/24 wells plate)에 lipopolysaccharide(LPS)(0.1µg/ml), 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물(100µg/ml)을 처리하고 72시간 동안 동시 배양하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA) 50µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540nm에서 흡광

도를 측정하였다. BV2 microglial cell line의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell line(1×10<sup>5</sup>cells/24 wells plate)에 LPS(0.1µg/ml), 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물(100µg/ml)을 처리하여, 6시간과 72시간 동안 동시 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

2) BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine 및 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 Real Time Quantitative PCR 분석

#### (1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10<sup>5</sup>세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물(100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml)을 첨가하고 1시간 후 LPS(0.1µg/ml)를 처리하여, 6시간 동안 동시 배양하였다.

#### (2) 유전자 발현분석

##### ① RNA 추출

배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzo1B 500µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl<sub>3</sub>) 50µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

##### ② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3µg을 DNase I (10U/µl) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5µl 10mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides(25pmole/25µl), RNA inhibitor로서 1µl RNase inhibitor(20U/µl), 1µl 100mM DTT, 4.5µl 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT(200U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20µl가 되도록 하였다. 이 20µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

##### ③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. 염증사이토카인 및 항염증사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 94℃ 10분, 50℃ 2분에서

pre-denaturation 후, 95°C 9초, 60°C 1분을 40 cycles 수행하였다. 실험군과 대조군의 real time quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

(x=starting quantity, y=yield, n=number of cycles, e=efficiency)

사용된 primers는 다음과 같다.

④ mouse G3PDH	Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
⑤ mouse IL-1β	Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATCTCCATG
	Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
⑥ mouse IL-6	Forward Primer: 5' ICCAGTTCCTTCTGGGAC 3'
	Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
⑦ mouse TNF-α	Forward Primer: 5' CTGTCTACTGAACCTCGGGTGATCGGTCC 3'
	Reverse Primer: 5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
⑧ mouse IL-10	Forward Primer: GGTGCCAAGCCITATCGGA
	Reverse Primer: ACCTGCTCCACTGCCITGCT
⑨ mouse TGF-β1	Forward Primer: TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG
	Reverse Primer: GGTTCATGTCATGGATGGTGC
⑩ mouse COX-2	Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
	Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
⑪ mouse NOS-II	Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

### 3) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture( $1 \times 10^5$  cells/ml)하여 96 wells plate에  $2 \times 10^5$  세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 1시간 후 LPS( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 48시간 동안 CO<sub>2</sub> 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청  $100 \mu\text{l}$ (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated  $100 \mu\text{l}$ 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회

washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated  $100 \mu\text{l}$ 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후  $100 \mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 NO 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 96 wells plate에  $2 \times 10^4$  세포로 분주하였다. 여기에 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 1시간 후 LPS( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심 분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액  $100 \mu\text{l}$ 를 96 wells plate에 분주하고 혼합 용액  $100 \mu\text{l}$ 를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 ROS의 분석

BV2 microglial cell line 내의 ROS를 측정하기 위하여 24 wells plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cells씩 첨가하고, 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 1시간 후 LPS( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA  $50 \mu\text{M}$ 을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

#### 6) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈액분석

##### (1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

10주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, galanthamine( $3 \text{mg}/\text{kg}$ , i.p) 투여군, 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물( $400 \text{mg}/\text{kg}$ , p.o) 실험군 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말( $400 \text{mg}/\text{kg}$ , p.o) 실험군으로 나누고, 4주간 약물을 투여하였다. 약물 투여 22일째부터 scopolamine( $1 \text{mg}/\text{kg}$ )을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

##### (2) 혈청 생화학 물질 함량의 측정

혈청 중 glucose, uric acid 치는 자동생화학분석기를 사용하여 측정하였다.

##### (3) AChE 활성도 측정

AChE 활성도는 cholinesterase kit로 측정하였다. 혈청 중 AChE 활성도를 측정하기 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3)  $0.2 \text{ml}$ 와 serum  $0.2 \text{ml}$ 를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에  $3.0 \text{ml}$  water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2)  $2 \text{ml}$ , acetylcholine chloride solution  $0.2 \text{ml}$ 을 첨가한다. acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25°C 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는  $\Delta A = \text{ABLANK} - \text{ATEST}$  공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

#### 7) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris

water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

선별된 ICR계 생쥐에 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm 이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습 시 ICR계 생쥐 중 30 초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, galanthamine(3mg/kg, i.p) 투여군, 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물(400mg/kg p.o) 실험군 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 조미세분말(400mg/kg p.o) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1mg/kg)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하고, 이를 videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 각 군의 유의성은 일원배치분산분석(ANOVA test)로 평가하였고, p<0.05 수준에서 Duncan test로 사후 검정하였다.

성 적

1. 聰明湯 및 巴戟天聰明湯의 세포독성

1) mLFC에 대한 세포독성

聰明湯 및 巴戟天聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율에서는 대조군에 비해 聰明湯 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml 실험군은 각각 93.1±1.8(%), 90.6±1.6(%), 88.1±1.7(%)로 대조군에 비해 감소되었으며, 巴戟天聰明湯 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml 실험군은 각각 95.6±0.7(%), 91.3±0.6(%), 85.6±1.0(%), 81.5±1.4(%)로 대조군에 비해 감소되었으나, 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

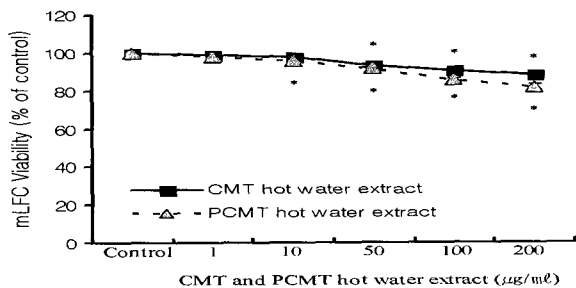


Fig. 1. Cytotoxicity of CMT and PCMT hot water extract on mLFCs.

2) BV2 microglial cell line의 형태학적 변화와 세포 생존율

BV2 microglial cell line에 LPS를 처리하여 6시간이 경과하면 대조군은 구형인 세포가 넓게 퍼지면서 세포가 활성화된 형

태적 변화를 보였고 72시간 경과 시, 세포 중 절반 이상이 사멸됨을 관찰할 수 있다. 그에 비하여 巴戟天聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 잘 유지됨을 볼 수 있다(Fig. 2A).

BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군 52.3±5.8(%), 聰明湯 실험군 87.7±1.9(%), 巴戟天聰明湯 실험군 81.3±2.3(%)로 나타나 대조군에 비해 聰明湯과 巴戟天聰明湯 실험군 모두 유의성 있게 높았다(Fig. 2B).

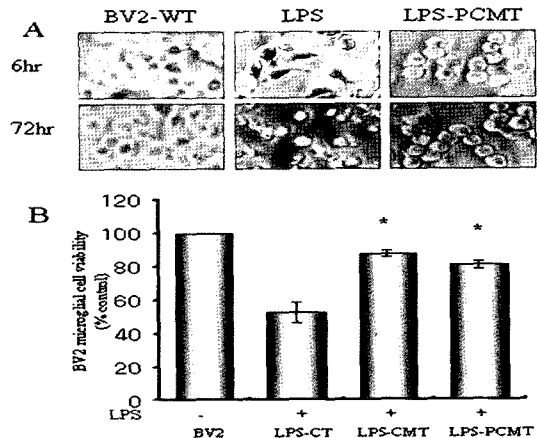


Fig. 2. The effect of CMT and PCMT hot water extract on morphological change and cell viability in LPS-treated BV2 microglial cell line.

2. BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II, IL-10, TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군 0.078(RQ), 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml 실험군은 각각 0.748(RQ), 0.874(RQ), 0.975(RQ), 巴戟天聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml 실험군은 각각 0.579(RQ), 0.748(RQ), 0.829(RQ)로 나타났다(Fig. 3).

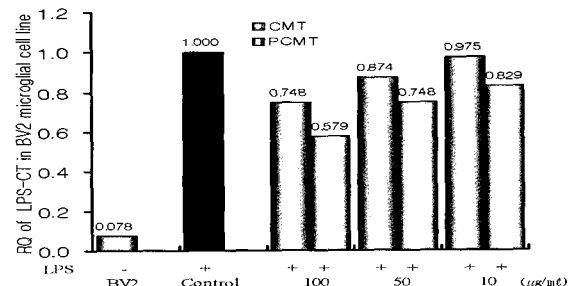


Fig. 3. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on IL-1β mRNA expression in BV2 microglial cell line.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군 0.141(RQ), 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml 실험군은 각각 0.688(RQ), 0.815(RQ), 0.968(RQ), 巴戟天聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml 실험군은 각각 0.478(RQ), 0.699(RQ), 0.851(RQ)로

나타났다(Fig. 4).

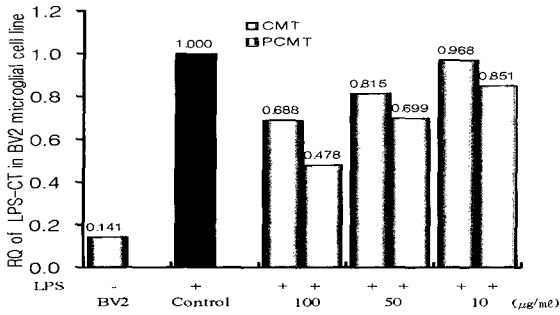


Fig. 4. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on IL-6 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

3) TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 정상군 0.245(RQ), 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.827(RQ), 0.895(RQ), 0.911(RQ), 巴戟天聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.813(RQ), 0.899(RQ), 0.975(RQ)로 나타났다(Fig. 5).

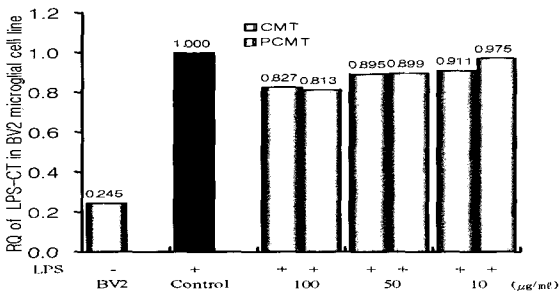


Fig. 5. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on TNF- $\alpha$  mRNA expression in BV2 microglial cell line.

4) COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 COX-2 mRNA 발현은 정상군 0.322(RQ), 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.744(RQ), 0.865(RQ), 0.991(RQ), 巴戟天聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.552(RQ), 0.684(RQ), 0.825(RQ)로 나타났다(Fig. 6).

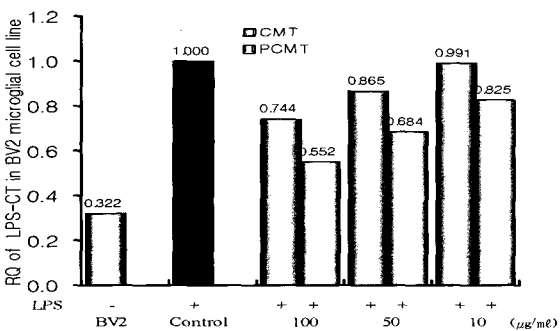


Fig. 6. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on COX-2 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

5) NOS- $\Pi$  mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 NOS- $\Pi$  mRNA 발현은 정상군 0.103(RQ), 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.623(RQ), 0.744(RQ), 0.865(RQ), 巴戟天聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 0.465(RQ), 0.768(RQ), 0.985(RQ)로 나타났다(Fig. 7).

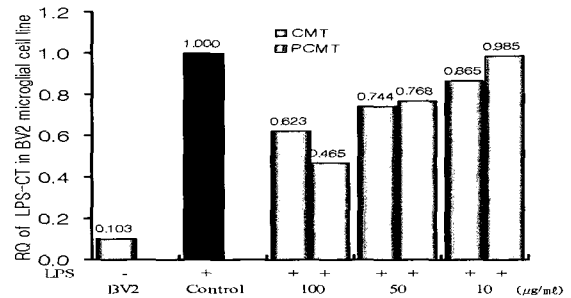


Fig. 7. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on NOS-II mRNA expression in BV2 microglial cell line.

6) IL-10 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-10 유전자 mRNA 발현은 정상군 0.747(RQ), 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 1.345(RQ), 1.140(RQ), 0.985(RQ), 巴戟天聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 1.754(RQ), 1.414(RQ), 1.002(RQ)로 나타났다(Fig. 8).

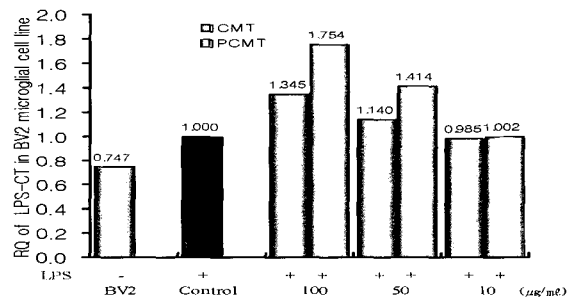


Fig. 8. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on IL-10 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

7) TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현은 정상군 0.564(RQ), 聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 1.442(RQ), 1.105(RQ), 0.988(RQ), 巴戟天聰明湯 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 실험군은 각각 1.594(RQ), 1.521(RQ), 1.024(RQ)로 나타났다(Fig. 9).

3. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 $\beta$  생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1 $\beta$  생성량은 정상군 31.3 $\pm$ 8.8pg/ml, 대조군 633 $\pm$ 35.3pg/ml, 聰明湯 실험군과 巴戟天聰明湯 실험군이 각각 522 $\pm$ 66.0pg/ml, 552 $\pm$ 55.2pg/ml로

대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

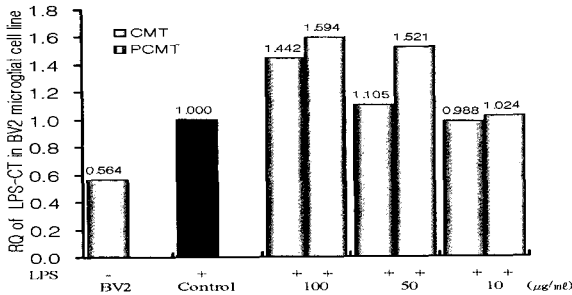


Fig. 9. Inhibitory effects of CMT and PCMT hot water extract on TGF-β1 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

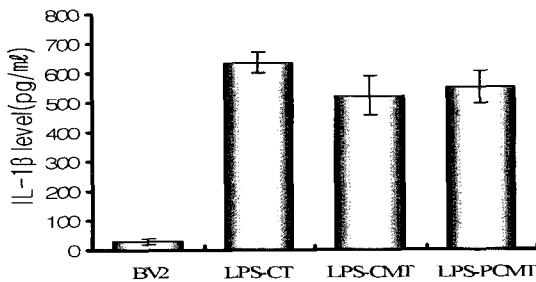


Fig. 10. Inhibitory effect of CMT and PCMT hot water extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-6 생성량은 정상군 168±44.6pg/ml, 대조군 5896±742.3pg/ml, 聰明湯 실험군과 巴戟天聰明湯 실험군이 각각 5015±275.0pg/ml, 4891±1296.0pg/ml로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

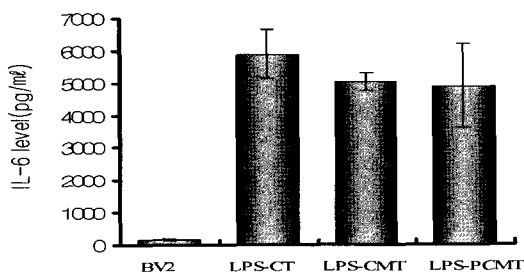


Fig. 11. Inhibitory effect of CMT and PCMT hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.

3) TNF-α 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군 455±105.8pg/ml, 대조군 2664±295.9pg/ml, 聰明湯 실험군과 巴戟天聰明湯 실험군이 각각 2465±185.9pg/ml, 2432±294.7pg/ml로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 12).

상군 9.4±1.8(mM), 대조군 65.4±7.8(mM), 聰明湯 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml 실험군은 각각 52.3±5.9(mM), 57.6±6.7(mM), 63.2±6.0(mM), 巴戟天聰明湯 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml 실험군은 각각 46.7±6.0(mM), 55.1±5.1(mM), 57.3±6.0(mM)로 나타나 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 13).

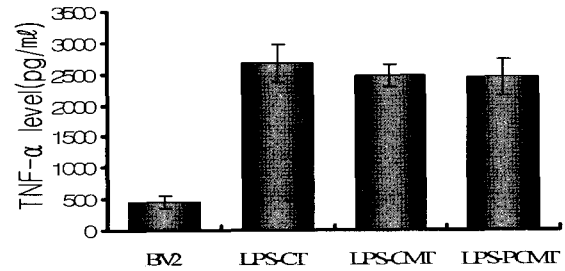


Fig. 12. Inhibitory effect of CMT and PCMT hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.

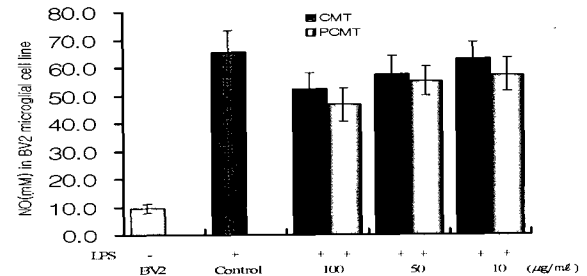


Fig. 13. Inhibitory effect of CMT and PCMT hot water extract on the NO production in BV2 microglial cell line.

5. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 ROS의 분석

BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 ROS를 발현하는 염증세포의 수를 분석한 결과, 정상군 3.2%, 대조군 46.9%, 巴戟天聰明湯 100μg/ml 실험군(C) 24.7%, 巴戟天聰明湯 10μg/ml 실험군(D) 34.7%로 나타났다(Fig. 14).

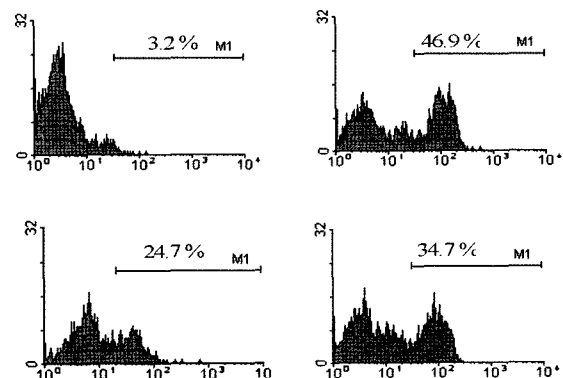


Fig. 14. Inhibitory effect of CMT and PCMT hot water extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

4. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

6. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 Glucose, Uric acid, AChE에 미치는 영향

1) Glucose에 미치는 영향

혈청 내 glucose는 정상군이 127.8±3.7(mg/dl)이었고, 대조군이 112.8±9.3(mg/dl), galanthamine 투여군이 88.7±5.5(mg/dl), 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 실험군이 각각 123.6±12.1(mg/dl), 162.7±15.3(mg/dl) 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군이 각각 120.8±8.6(mg/dl), 161.8±4.9(mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 巴戟天聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 투여한 실험군에서 유의하게 증가하였으며 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 15).

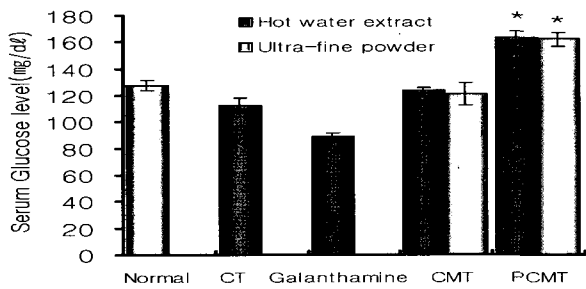


Fig. 15. Effects of CMT and PCMT on the serum glucose level in scopolamine-induced memory deficit mice. Normal : Non-treatment group, CT : Control. Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*), Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*), CMT and PCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and PCMT hot water extract(400mg/kg *p.o.*), CMT and PCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). After ICR mice were administered of CMT and PCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days. Data represent mean±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(\*p<0.05)

2) Uric acid에 미치는 영향

혈청 내 uric acid는 정상군이 2.6±0.7(mg/dl), 대조군이 7.1±0.4(mg/dl), galanthamine 투여군이 2.5±0.4(mg/dl), 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 실험군이 각각 5.3±0.3(mg/dl), 6.4±0.3(mg/dl) 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군이 각각 5.0±0.3(mg/dl), 4.9±0.4(mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 galanthamine 투여군, 聰明湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군과 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 16).

3) AChE 활성도에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 25.3±5.4(U/ml), 대조군이 100.0±7.6(U/ml), galanthamine 투여군이 36.7±7.2(U/ml), 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 실험군이 각각 69.0±9.3(U/ml), 49.7±6.4(U/ml) 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군이 각각 54.3±6.5(U/ml), 53.3±3.7(U/ml)로 나타나 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 17).

7. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과, 대조군이 66.5±5.9(sec),

galanthamine 투여군이 10.8±2.4(sec), 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 실험군이 각각 31.7±3.4(sec), 46.1±10.0(sec) 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군은 각각 25.2±11.9(sec), 29.5±9.0(sec)로 나타나 대조군에 비해 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 단축되었으며, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 18).

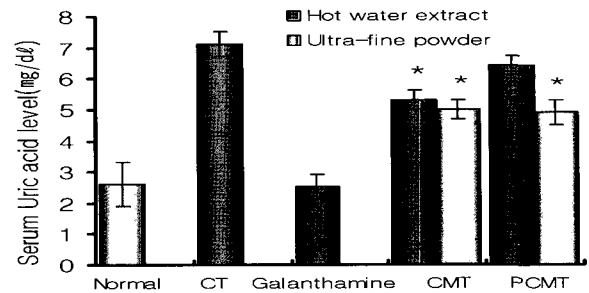


Fig. 16. Effects of CMT and PCMT on the serum uric acid level in scopolamine-induced memory deficit mice. Normal : Non-treatment group. CT : Control. Group Treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*), Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*), CMT and PCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and PCMT hot water extract(400mg/kg *p.o.*), CMT and PCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). After ICR mice were administered of CMT and PCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(\*p<0.05).

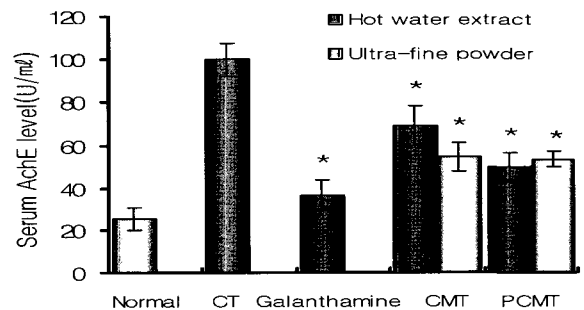
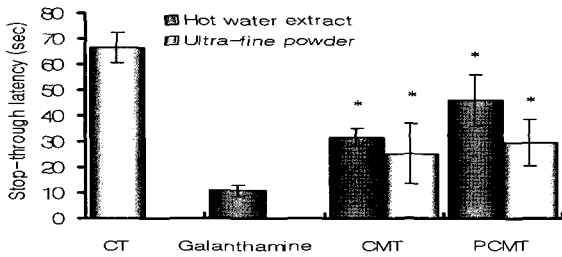


Fig. 17. Effects of CMT and PCMT on the serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice. Normal : Non-treatment group. CT : control. Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*), Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*), CMT and PCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and PCMT hot water extract(400mg/kg *p.o.*), CMT and PCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). After ICR mice were administered of CMT and PCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7days. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(\*p<0.05)

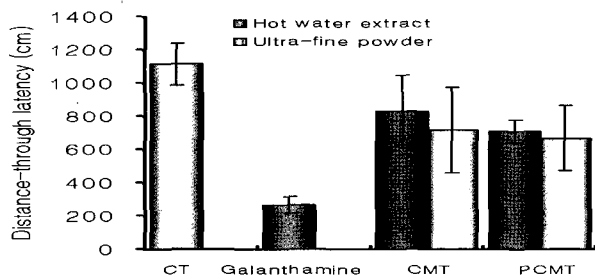
2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과 대조군이 1113.8±123.7(cm), galanthamine 투여군이 263.1±50.3(cm), 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물 실험군이 각각 835.0±210.7(cm), 712.2±65.4(cm) 그리고 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군이 각각 717.4±259.4(cm), 666.0±196.1(cm)로 단축되었으나 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성은 없었다(Fig. 19).





**Fig. 18. Effects of CMT and PCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test.** Normal : Non-treatment group. CT : Control, Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p*) Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p*) and galanthamine (3mg/kg *i.p*) CMT and PCMT : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p*) and CMT and PCMT hot water extract(400mg/kg *p.o*). CMT and PCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o*). ICR mice were administered of CMT and PCMT orally or injected galanthamine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(\* $<0.05$ ).



**Fig. 19. Effects of CMT and PCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.** CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p*) Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p*) and galanthamine (3mg/kg *i.p*) CMT and PCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p*) and CMT and PCMT hot water extract(400mg/kg *p.o*). CMT and PCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o*). ICR mice were administered of CMT and PCMT orally or injected galanthamine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(\* $<0.05$ ).

## 고찰

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타낸다<sup>1)</sup>. 치매의 종류로는 AD, VD, 중독성 치매 등이 있으며 이 중 AD는 50% 이상을 차지하고 있고, VD는 20~30% 정도이며 여성이 남성에 비해서 2-3배 정도 발병율이 높은 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. AD는 증상이 서서히 나타나며 경과는 일정하게 점진적으로 진행되는데, 초기에는 기억력 장애가 주증상이나 후기에는 주의력 결여, 지적 능력의 상실, 특히 기억력, 판단력, 추상적 사고, 기타 고유 피질기능의 장애와 인격 및 행동의 변화가 나타난다<sup>1)</sup>.

이러한 AD 유발에는 뇌의 전반적인 위축 이외에도 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokine의 증가<sup>4)</sup>, acetylcholine의 감소 및 AChE의 증가<sup>5)</sup>, free radicals<sup>6)</sup> 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.

AD의 원인에 대한 대표적인 가설 중 하나는 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이다. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자이며 cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여한다. 그러나 일단 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증반응 등의 자극에 의해 손상된 뇌혈관장벽을 통해 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 astrocyte와 microglial cell 등이 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다<sup>21)</sup>.

또한 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고<sup>22)</sup>, 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 연구가 보고되고 있어 acetylcholine을 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다<sup>23)</sup>.

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 AChE의 저해제로 잠복기의 AD에 효과가 있는 것으로 알려진 galanthamine<sup>24)</sup>이 있는데, galanthamine은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 학습과 단기기억력을 개선시킨다고 한다<sup>25)</sup>.

韓醫學의으로 痴呆는 ‘呆病<sup>8,9)</sup>, ‘健忘<sup>26,27)</sup> 등의 범주에 속하며, 《景岳全書·癲狂痴訣》<sup>7)</sup>에는 痴呆와 유사한 개념으로 ‘痴訣’가 언급되어 있는데, “痴訣症, ..... 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....”, “凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴訣이라 하였다.

痴呆의 病因에은 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이 있으며, 精氣不足, 脾胃虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱으로 辨證하여 補益精氣, 補腎健脾, 割痰化濁, 開竅醒神, 行氣活血, 通竅醒腦, 清熱解毒, 益氣養血, 健腦益腎 등의 治法을 응용하고 있다<sup>10)</sup>.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》<sup>11)</sup>에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다<sup>12)</sup>. 巴戟天은 西草科에 속한 藤本植物인 巴戟天의 뿌리를 건조한 것으로 性味는 甘·辛, 微溫 無毒하며 補腎陽의 효능이 있어<sup>28)</sup>, 脾胃虧虛型 치매에 응용할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 木槿皮聰明湯, 山查聰明湯의 AD 치료와 예방효과에 대한 연구<sup>15,16)</sup>와 金 등<sup>17)</sup>의 치매병태모델에 대한 巴戟天의 효능 연구의 결과를 볼 때 聰明湯에 巴戟天을 加한 巴戟天聰明湯 역시 치매의 치료 및 예방에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

현재 가장 광범위하게 응용되는 한약 제형인 湯劑는 품질 균일성 확보가 어렵고 한약 교유의 맛과 향 등에 의해 복용순응

도가 낮으며 보관 및 저장에 불편함이 많은 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 오늘날 탕제를 대신할 새로운 제형이 요구되고 있는데, 현재 처방에 따라 배합된 약제를 탕전의 조제 과정과 동일한 공정을 거쳐 추출한 여액을 분무건조법이나 동결 건조법 등을 이용하여 건조시킨 엑스분말을 원료로 하여 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제 등을 개발하여 이용하고 있다<sup>18)</sup>.

약물의 초미세 분말화는 약의 생리적 활성도와 용출성을 증가시키는 방법 중 하나인데<sup>29)</sup>, 약물 제형 개발에 있어 초미세 분말을 응용한 연구<sup>19)</sup>가 이루어졌으나 한약의 초미세 분말에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

이에 저자는 聰明湯과 巴戟天聰明湯이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교 검토하고자 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물을 시료로 하여 mLFC에서 세포독성을 관찰하고 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율을 관찰하였다. LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA, NOS-II, COX-2의 mRNA와 anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF- $\beta$ 1의 mRNA 발현을 관찰하고, BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO, ROS의 생성을 관찰하였다. 또한 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, uric acid, AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정하였다. 먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 세포독성을 측정된 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 聰明湯 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml 실험군과 巴戟天聰明湯 10 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml 실험군에서 유의성 있게 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타내었다(Fig. 1). 또한 LPS를 처리한 BV2 microglial cell line의 세포 생존율을 측정된 결과, 聰明湯과 巴戟天聰明湯 실험군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2B).

이러한 결과로 상기의 농도에서 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물은 정상세포에 대한 세포독성을 나타내지 않으며, AD 병태에서 나타나는 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다고 판단된다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 LPS에 의해 활성화된 microglial cell은 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokine과 NO, ROS 등의 oxidants 그리고 IL-10, TGF- $\beta$ 1 등의 anti-inflammatory cytokine를 생산, 분비한다<sup>30)</sup>. COX-2는 arachidonic acid가 prostanoid로 전환될 때 촉매작용을 하며 prostaglandine(PGs)을 형성하는 중요한 효소로<sup>31)</sup>, COX-2의 발현증가는 유해한 prostanoid와 자유기들의 과잉생성을 유도하여 신경손상을 매개하며, AD 질환의 뇌에서도 COX-2 mRNA와 단백질의 발현 상승이 보고되었다<sup>32)</sup>. NOS-II (inducible NOS ; iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소로 장기간 다량의 NO를 생성하며, 필요이상으로 생성된 NO는 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는

것으로 보고되었다<sup>33)</sup>.

본 실험에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 열수추출물(100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-II, COX-2, IL-10, TGF- $\beta$ 1의 mRNA 발현을 관찰하였다.

그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA와 COX-2, NOS-II의 mRNA의 발현이 억제되었고, anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF- $\beta$ 1의 mRNA의 발현은 증가하였다(Fig. 3-9). 또한 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생산량을 측정된 결과, 모든 실험군에서 생산량이 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10-12).

이는 聰明湯 및 巴戟天聰明湯이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 억제한 것으로, 聰明湯 및 巴戟天聰明湯의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokines으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이 되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질로 NO와 ROS가 있다. NO는 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관 확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>33)</sup>. ROS는 세포막의 지질, 조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 이들 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경 질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다<sup>34)</sup>.

이러한 관점에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 NO와 ROS의 생성을 관찰한 결과, NO의 생성량은 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 감소하였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 13). ROS의 생성은 대조군에 비해 巴戟天聰明湯 실험군에서 모두 감소하였다(Fig. 14). 이로써 聰明湯과 巴戟天聰明湯이 산화적 손상을 유발하는 NO, ROS의 생성을 억제함으로써 AD의 예방에 활용될 수 있음을 알 수 있다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력 감퇴를 회복시키는 역할을 하며, 이 작용은 choline계와 기능적인 상호작용으로 이루어지는 것으로 생각되고 있다<sup>35)</sup>. 치매에서 uric acid의 작용은 뚜렷이 밝혀지지 않았지만, AD와 VD에서 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>.

본 실험에서 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose의 변화를 측정된 결과, 대조군에 비해 巴戟天聰明湯 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 유의하게 증가하였으나 열수추출물과 초미세분말 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 15). 혈청 내 uric acid는 대조군에 비해 聰明湯 열수추출물과 초미세분말 그리고 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군에서 유의성 있게 감소하였으나 이들 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 16).

또한, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게

감소되었으나 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 17). 이로써 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말이 AChE를 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키리라 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있게 단축되었으나, 聰明湯과 巴戟天聰明湯 실험군, 열수추출물과 초미세분말 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 18). Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 거리의 단축을 보였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 19). 이상의 실험 결과를 살펴볼 때, 기억력감퇴에 대한 치료제로써 聰明湯 및 巴戟天聰明湯을 활용할 수 있다고 판단된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA와 NOS- II, COX-2 mRNA의 발현을 억제하고 anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현을 증가시켰다. 또한 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켰으며, AChE의 활성을 억제하였다. Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

본 실험에서 聰明湯과 巴戟天聰明湯의 효과를 비교하여 보면, BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine mRNA 발현의 억제와 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현의 증가, proinflammatory cytokine 및 NO 생성량의 감소 및 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose의 증가, uric acid의 감소, AChE의 활성 억제 효과 그리고 Morris water maze 실험을 통한 stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 개선 효과에 대해 두 실험군 간 유의한 차이는 없었다. 또한 열수추출물 및 초미세분말을 비교하면 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose의 증가, uric acid의 감소, AChE의 활성 억제 효과 그리고 Morris water maze 실험을 통한 stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 개선 효과에 있어 유의한 차이는 없었다.

결과적으로 聰明湯 및 巴戟天聰明湯은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현, 산화적 스트레스 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 치매에 대한 임상적 활용에 대한 연구, 새로운 제형의 개발 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 모델에 미치는 영향을 실험적으로 연

구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS- II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하고, IL-10, TGF- $\beta$ 1의 mRNA의 발현을 증가시켰다. 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO, ROS의 생산량을 감소시켰다. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 glucose는 巴戟天聰明湯 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 유의성 있게 증가하였고, uric acid는 聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 실험군, 巴戟天聰明湯 초미세분말 실험군에서 유의성 있게 감소하였으며, AChE 활성은 聰明湯 및 巴戟天聰明湯 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 유의성 있게 억제되었다. Morris water maze를 통한 stop-through latency측정을 관찰한 결과 聰明湯 및 巴戟天聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 유의성 있는 기억력 개선효과가 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯 및 巴戟天聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말은 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 민성길, 최신정신의학, 서울, 일조각, pp 189-198, 2003.
2. Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D., Dchmeridler, J., Kanof, P., and Davism, K.L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits, Journal of Neurochemistry, 64:749-760, 1995.
3. 조추용, 최현자 역저, 치매 예방과 케어, 서울, 창지사, p 49, 2002.
4. Cacquevel, M., Lebourrier, N., Cheenne, S., Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease, Current Drug Targets, 5(6):529-534, 2004.
5. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficaró, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease, Neurology, 52(4):691-699, 1999.
6. Mhatre, M., Floyd, R.A., Hensley, K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets, Journal of Alzheimers disease, 6(2):147-157, 2004.
7. 張介賓, 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
8. 陳士鏞, 石室秘錄, 北京, 中國中醫藥出版社, p 125, 1991.
9. 錢鏡湖, 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
10. 대한한방신경정신과학회, 한방신경정신과학, 서울, 집문당, pp 311-320, 2005.
11. 許 浚, 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp 55-56, 1996.
12. 李尙仁 외, 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp 151-153, 308-313,

- 419-420, 426-428, 1990.
13. 최병만 외, 木槿皮가 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 15(2):119-140, 2004.
  14. 김명진 외, 木瓜가 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 16(1):97-118, 2005.
  15. 박지운 외, 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와  $\beta$ A로 유도된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향, 대전대학교대 학원, 박사학위논문, 2004.
  16. 하수영 외, 聰明湯과 山查聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響, 대전대학교대 학원, 박사학위논문, 2004.
  17. 김현수 외, 巴戟天이 痴呆病態모델에 미치는 영향, 동의신경 정신과학회지, 14(1):45-58, 2003.
  18. 최현정, 방나영 외, 한약제형 선호도에 관한 설문조사, 경희 의학, 20(1):356-367, 2004.
  19. Song, L.L., Du, G.J., Zhang, D.L. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 27(6):436-439, 2002.
  20. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, D., Warren, J.T., Kennedy, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, Journal of the National Cancer Institute, 82(13):1107-1112, 1990.
  21. Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., Hirsch, E.C. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells, The Journal of Neuroscience, 19(9):3440-3447, 1999.
  22. Trabace, L., Cassano, T., Steardo, L., Pietra, C., Villetti, G., Kendrick, K.M., Cuomo, V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 294(1):187-194, 2000.
  23. Kasa, P., Papp, H., Torok, I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain, Neuroscience, 101(1):89-100, 2000.
  24. Geerts, H. Indicators of neuroprotection with galantamine, Brain Research Bulletin, 64(60):519-524, 2005
  25. Spassov, A., Getova, D.P. Dimitrova, D.S. P4.025 Study of ancholinesterase drugs galanthamine and donepezil on scopolamine-induced amnesia in rats, European Neuropsychopharmacology, 14, S333, 2004.
  26. 洪元植, 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, pp 217-218, 229, 1985.
  27. 朱震亨, 金櫃鉤玄, 서울, 鼎談出版社, pp 306-307, 1992.
  28. 康秉秀 외, 本草學, 서울, 永林社, pp 549-550, 1992.
  29. Xu, Y.H., Wang, N.S. Review and analysis of present status of the micronization of Chinese traditional medicine, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 29(6):497-500, 2004.
  30. Woo, M.S., et al. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells, Molecular Brain Research, 113(1-2):86-96, 2003.
  31. Marcheselli, V.L., Bazan, N.G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide-2 by seizure in hippocampus, The Journal of biological chemistry, 271:24794-24799, 1997.
  32. Pasinatti, G.M., Alsen, P.S. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain, Neuroscience, 87(2):319-324, 1998.
  33. Yen, G.C., Lai, H.H. et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Uraria crinita root, Food Chemistry, 74:471-478, 2001.
  34. Mates, J.M. Perez-Gomez C et al., Antioxidant enzymes and human disease, Clinical Biochemistry, 32:595, 1999.
  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, Behavioural Brain Research, 96(1-2):47-57, 1998.
  36. Degrell, I., Niklasson, F. Purine metabolites in the CSF in presenile and senile dementia of Alzheimer type, and in multi infarct dementia, Archives of Gerontology and Geriatrics, 7(2):173-178, 1998.