

洗心湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

김현수 · 정인철* · 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of Sesim-tang Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model

Hyun Soo Kim, In Chul Jung*, Sang Ryong Lee

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

This experiment was designed to investigate the effect of the SST hot water extract & ultra-fine Powder on Alzheimer's Disease Model Induced by β A. The effects of the SST hot water extract on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2 mRNA and production of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS). The effects of the SST hot water extract & ultra-fine powder on (1) the behavior (2) expression of IL-1 β , TNF- α , MDA, (3) Glucose, AChE in serum (4) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with β A were investigated. The SST hot water extract suppressed the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA in BV2 microglia cell line treated with LPS. The SST hot water extract suppressed the production of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO in BV2 microglial cell line treated with LPS. The SST hot water extract & ultra-fine powder a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by β A in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency. The SST ultra-fine powder suppressed the expression of TNF- α protein significantly in the microglial cell of mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SST hot water extract & ultra-fine powder reduced the MDA and suppressed the over-expression of CD68, CD11b in the mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SST hot water extract & ultra-fine powder decreased AChE significantly in the serum of the mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SST hot water extract & ultra-fine powder reduced infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SST hot water extract & ultra-fine powder reduced the tau protein, GFAP, and presenilin1, 2 of hippocampus in the mice with Alzheimer's disease induced by β A. These results suggest that the SST hot water extract & ultra-fine powder may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the SST hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key words : Alzheimer's disease, Sesim-tang(SST), hot water extract & ultra-fine powder

서론

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말한다¹⁾. 임상유형으로는 Alzheimer형 치매가 50% 정도로 가장 많고 혈관

* 교신저자 : 정인철, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대청주한방병원

· E-mail : npjeong@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3727

· 접수 : 2007/05/25 · 채택 : 2007/06/11

성 치매가 20% 정도를 차지하며 15~20%는 이 둘을 함께 가지고 있는 혼합형 치매이다²⁾.

Alzheimer's Disease(AD)는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반, 신경섬유다발 및 신경세포의 과립공포 변성 등을 특징으로 하며, 증상으로는 기억력 저하, 추상적 사고 장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화 등을 보인다³⁾.

韓醫學的으로 癡呆는 '癡'과 '呆'의 범주에 속하며, 明代 張⁴⁾의 《景岳全書·癡狂癡》에서는 "癡症, ……

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……”이라 하여痴呆와 유사한痴狀에 대해 최초로 기술하였고 清代의 陳⁷⁾ 등은痴呆와 유사한 개념으로 ‘呆病’에 대해 상세히 서술하고 있다.

痴呆의 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등으로, 治法은 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다¹⁾.

洗心湯은 《辨證奇門·呆病門》⁵⁾에 처음으로 수록된 처방으로 “終日悠悠, 忽不言不語, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭” 등의 증상을 치료하는데 사용하였고, 《實用中醫內科學》⁸⁾과 《實用中醫腦病學》⁹⁾에서는 脾虛痰阻型的 呆病을 치료하는 처방으로 제시되고 있으며, 金 등¹⁰⁾은 洗心湯이 뇌조직의 산화 작용을 억제하여 AD의 예방과 치료에 활용할 수 있음을 실험적으로 입증하였다.

현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 탕제이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데¹¹⁾, 특히 초미세 분말은 약재를 수십 μ m로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구¹²⁾와 한약의 열수추출물과 초미세 분말 제형이 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 연구¹³⁾가 있다.

이에 저자는 洗心湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 洗心湯의 열수추출물을 시료로 mLFC(mouse lung fibroblast cells)에서 세포독성을 관찰하고, LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 L-1 β , IL-6, TNF- α , NOS- Π , COX-2의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO의 생성량을 관찰하였다. 또한 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였고, 역시 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 발현과 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA), CD68과 CD11b의 발현 세포 수, 혈청 내 AChE의 변화 및 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화 및 hippocampus에서의 tau protein, GFAP, presenilin-1, 2의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether), leupetin, N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl₂)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였

으며, 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(USA) 제품을, RNazolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(USA) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, β -amyloid peptide(Calbiochem, USA), anti-CD14(Pharmingen, USA), anti-mouse IgG-bead(Dynal, USA), anti-IL-1 β 와 anti-TNF- α (Pharmingen, USA), 그리고 anti-CD44-PE(Pharmingen, USA), anti-CD68-FITC(Pharmingen, USA), anti-CD11b-FITC(Pharmingen, USA), anti-GFAP-FITC(Pharmingen, USA), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, USA)와 ECL-Hybond film(Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), 원심분리기(한 일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column(Invitrogen, USA), Windows 1D main program(AAB, USA), stereotaxic frame(Adamec, USA), CELLlection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, USA), brain matrix(ASI instruments, Warren, USA), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, USA), CO₂ incubator(Lepco, USA), Cytometry(BD, USA), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome(Serotec, USA), VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, USA) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐와 BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 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 공급하고 실온 22 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 洗心湯(Sesimtang, SST)의 처방구성은 《辨證奇門》⁷⁾을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 Table 1과 같다.

4) 검액의 조제

(1) 洗心湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

洗心湯 1첩 분량(140 g)에 증류수 1,300 mL를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건

조하여 얻은 洗心湯 열수추출물(12.3 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 615 mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 洗心湯 초미세분말 제작용 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)허브월드에서 실시·협조하였으며, 白茯苓, 酸棗仁, 半夏, 神曲, 陳皮, 人蔘, 附子炮, 石菖蒲, 甘草 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1 mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750 rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(air classifying wheel speed) 5,000~7,500 rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 615 mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Sesim-tang

한약명	생약명	용량(g)
白茯苓	<i>Poria(Hoelen)</i>	40
酸棗仁	<i>Zizyphi Semen</i>	40
半夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	20
神曲	<i>Massa Medicata Fementata</i>	12
陳皮	<i>Aurantii Nobiliis Pericarpium</i>	12
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
附子炮	<i>Aconiti Tuber</i>	4
石菖蒲	<i>Acori Rhizoma</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhiae Radix</i>	4
Total amount		140 g

2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척하고 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA), DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma, USA), antibiotics(penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)을 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간 계속 배양하였다. 이후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하고 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법¹⁴⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10⁴개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO₂)에서 2시간 배양한 후 洗心湯 열수추출물(최종 농도 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였고 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50 µl를 가하고 1시

간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) BV2 microglial cell line에서의 proinflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 real time quantitative PCR 분석

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아 24 wells plate에 2×10⁵세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 洗心湯 열수추출물(100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1 µg/ml를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 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 3 µg을 DNase I (10 U/µl) 2 U/tube와 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor(20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가하고, 다시 1 µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 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 PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Proinflammatory cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min 50°C, 10 min 94°C, 그리고 40 cycles는 0.15 min 95°C, 1min 60°C에서 수행하였다. 각 군의 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.

① mouse G3PDH

Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

② mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

③ mouse IL-6

Forward Primer: 5' TCCAGTTCGCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCCTCCGACTTG 3'

④ mouse TNF-α

Forward Primer: 5' CTGTCTACTGAACCTCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer: 5' ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'

⑤ mouse COX-2

Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'

⑥ 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(1×10⁵ cells/ml)하여 96 wells plate에 2×10⁵ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight시켰다. 洗心湯 열수추출물(100 μg/ml, 50 μg/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 μg/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 다음, 새로운 배양액으로 48시간 동안 CO₂ 조식 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 즉, 각 well에 배양상층액을 100 μl씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 μl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로

450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

BV2 microglial cell line을 96 wells plate에 2×10⁴ 세포로 분주하였다. 여기에 洗心湯 열수추출물(100 μg/ml, 50 μg/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 μg/ml)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 새로운 96 wells plate에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5% H₃PO₄)를 1:1로 혼합하여 처리하고 회수한 배양 상층액 100 μl를 분주한 다음 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조

① βA(1~40)

βA는 Calbiochem 회사에서 공급받아 사용하였다.

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10 μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10 μM)를 Hippocampus에 주입하는 데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽으로) 1.2 mm, midline에서 right로 0.7 mm, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1 mm로 microinjector의 injection speed 0.1 μl/min와 total volume 0.5 μl의 조건으로 수행하였다.

(2) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주간 洗心湯을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 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 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine), 洗心湯 열수추출물 실험군(615 mg/kg)과 洗心湯 초미세분말 실험군(615 mg/kg)로 분류하였고 2주 경과(1주 경과 시점에 βA 투여) 후, 8주간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다. 훈련과 약물투여 완료 후 각 군 생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다.

6) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 洗心湯 열수추출물(615 mg/kg)과 초미세분말(615 mg/kg) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. Brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 다시 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척하고 Collection Pan anti-mouse

IgG-bead로 미세아교세포를 분리한 다음 세포 release buffer로 anti-CD14⁺ 세포만 포집하였다.

(2) Microglial cell 내 proinflammatory cytokines 분석

포집한 미세아교세포를 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284 μ l와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1 β 와 FITC-anti-TNF- α 를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 뇌조직 내 지질과산화도(MDA) 측정

MDA측정은 Suematsu 등의 방법¹⁵⁾에 따라 clean test tube 에 뇌조직 현탁액 200 μ l를 넣고, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) solution 225 μ l를 가하고 5초 동안 vortex mixer로 mixing한 후, 20% acetic acid 1.5 ml를 가하고 75 μ l 증류수를 넣고 5초 동안 다시 vortex mixer로 mixing했다. 이후 1.2% thiobarbituric acid solution 1 ml을 tube에 더해 clean dry marble로 cover하고, 30분간 water bath에서 끓이고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 얻어 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 뇌조직 내 CD68과 CD11b 세포수 분석

AD 유발 생쥐의 뇌조직을 잘게 chopping한 후 cell strainer(BD, Falcon)에 넣고 3 ml syringe rubber로 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수했다. Hypaque-1077 5 ml과 뇌세포 부유액 5 ml gradient를 만든 다음 2000 rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 buffy coat 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 얼어진 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 뇌세포를 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 $^{\circ}$ C에서 면역형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD68, FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD68 세포수를 분석하였다.

7) AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 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 ml와 serum 0.2 ml를 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0 ml water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2 ml, acetylcholine chloride solution 0.2 ml을 첨가했다. Acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과로 $\Delta A = ABLANK - ATEST$ 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

8) β A에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에서의 허혈상태 및 조직손상 분석

(1) 허혈면적 측정

AD 유발생쥐를 미취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2 mm의 두께로 자른 후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법¹⁶⁾으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진 상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2 mm)의 전체 면적, BH(brain Hippocampus)는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의%로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) \times 100로 분석하였다.

(2) 뇌조직 손상 분석

① 병리조직검사

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정하고 세절한 후 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & eosin 염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

② 면역화학조직염색(immunohistochemical stainings)

분리된 AD 병태 생쥐 모델의 뇌를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정, 파라핀 블록을 만든 후, 조직절편을 4 μ m 두께로 세절하고 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 탈파라핀한 후 합수시키고 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)를 이용해 microwave oven에서 15분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질 결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다.

㉠ Tau protein

Primary mouse Tau Ab를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 3회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 용액으로 수세하고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색한 후 2회 수세하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하고 광학현미경으로 관찰하였다.

㉡ GFAP와 preserillin 1,2 protein

Primary mouse GFAP Ab(1:400)와 preserillin 1,2 Ab(1:50)로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse post primary Ab를 8분간 염색하고 3회 PBST로 수세한 후, polymer-HRP로 8분간 염색하고 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 5분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하였다. 형광위상차현미경(contrast fluorescence microscope)을 사용하여 \times 100 배율로 관찰하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean \pm standard deviation으로 기록하였다. 각 군의 유의성은 일원배치분산분석(ANOVA test)로 평가하였고, p<0.05 수준에서 Duncan's method로 사후 검정하였다.

성적

1. 洗心湯의 세포독성

洗心湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 洗心湯 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군에서 각각 92.9 \pm 0.7(%), 88.1 \pm 2.0(%), 81.2 \pm 3.0(%로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

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

1) IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1 β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.047(RQ)로 나타났으며, 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 0.584(RQ), 0.674(RQ), 0.879(RQ)로 나타났다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.202(RQ), 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 0.345(RQ), 0.578(RQ), 0.774(RQ)로 나타났다.

3) TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TNF- α mRNA 발현은 정상군이 0.351(RQ), 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 0.740(RQ), 0.859(RQ), 1.024(RQ)로 나타났다.

4) COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 COX-2 mRNA 발현은 정상군이 0.362(RQ), 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 0.415(RQ), 0.571(RQ), 0.687(RQ)로 나타났다.

5) NOS-II mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 NOS-II mRNA 발현은 정상군에서 0.354(RQ)로, 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군은 각각 0.656(RQ), 0.769(RQ), 0.887(RQ)로 나타났다.

3. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1 β 생성량은 정상군 30.9 \pm 9 (pg/ml), 대조군은 671.0 \pm 132.9 (pg/ml)이었고 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 440.5 \pm 53 (pg/ml), 666 \pm 144.2 (pg/ml)로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 149.5 \pm 38.9 (pg/ml), 대조군은 6283.0 \pm 1128.5 (pg/ml), 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 3589.5 \pm 801.2 (pg/ml), 5665.5 \pm 71.4 (pg/ml)로 나타나 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

3) TNF- α 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF- α 생성량은

정상군이 594.5 \pm 112.4 (pg/ml), 대조군이 2850.5 \pm 447.6 (pg/ml)이었으며, 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 1961.0 \pm 272.9 (pg/ml), 2458.5 \pm 149.2 (pg/ml)로 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

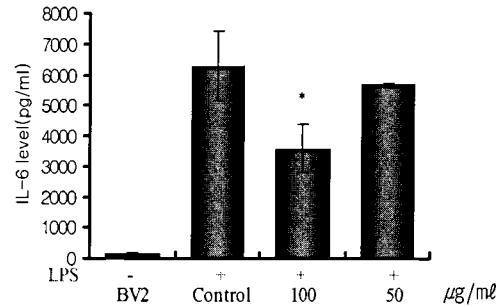


Fig. 1. Inhibitory effect of SST hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of SST hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Data are represented as means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p < 0.05$).

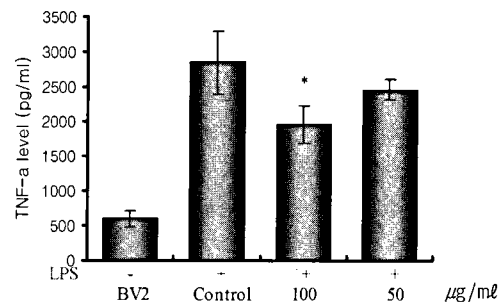


Fig. 2. Inhibitory effect of SST hot water extract on the TNF- α production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were pretreated with various concentrations of SST hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. Total TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Data are represented as means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p < 0.05$).

4. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 NO 생성량은 정상군이 5.6 \pm 0.3 (μM), 대조군이 95.0 \pm 10.4 (μM)이었으며, 洗心湯 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 47.9 \pm 6.2 (μM), 49.0 \pm 9.1 (μM)로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

5. βA 로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency 측정에서 정상군이 9.9 \pm 5.0 (sec), 대조군이 62.9 \pm 25.1 (sec), cognex 투여군이 25.3 \pm 3.5 (sec), 洗心湯 열수추출물, 洗心湯 초미세분말 실험군은 각각 28.3 \pm 12.4 (sec), 36.4 \pm 11.7 (sec)로 cognex 투여군과 洗心湯 실험군 모두 대조군에 비해 유의한

시간 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

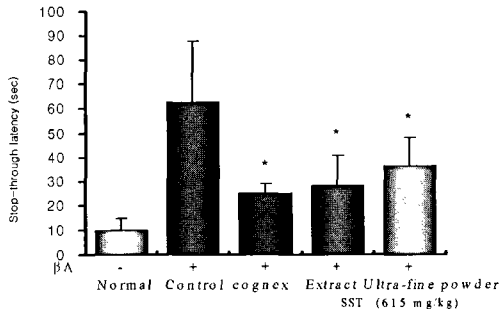


Fig. 3. Effects of SST hot water extract & ultra-fine powder on the Memory Impairment of β A-induced Alzheimer's Mice in the stop-through type of Morris water maze test. C57BL/6 mice were trained once a day during 1 week, then they were divided into each group and treated by β A. And the retention training was carried out once a day during 1 wk. And then they were orally administered of SST hot water extract, SST ultra-fine powder or cognex. And the acquisition training trial was continued once a day for 8 wks. When 8 weeks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated. Control, β A-induced alzheimer's mice: Cognex(10 mg/kg, p.o); SST hot water extract, and SST ultra-fine powder(575 mg/kg, p.o). Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency 측정에서 정상군이 156.5 \pm 133.8 (cm), 대조군이 706.8 \pm 232.8 (cm), 洗心湯 열수추출물 실험군은 295.5 \pm 82.7 (cm), 洗心湯 초미세분말 실험군은 505.1 \pm 77.9(cm)로 cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 실험군이 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였다(Fig. 4).

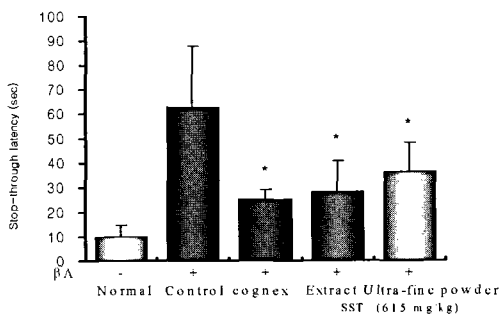


Fig. 4. Effects of SST hot water extract & ultra-fine powder on the Memory Impairment of β A-induced Alzheimer's Mice in the stop-through type of Morris water maze test. C57BL/6 mice were trained once a day during 1 week, then they were divided into each group and treated by β A. And the retention training was carried out once a day during 1 wk. And then they were orally administered of SST hot water extract, SST ultra-fine powder or cognex. And the acquisition training trial was continued once a day for 8 wks. When 8 weeks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated. Control, β A-induced alzheimer's mice: Cognex(10 mg/kg, p.o); SST hot water extract, and SST ultra-fine powder(575 mg/kg, p.o). Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

6. β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 대한 영향

1) Microglial cell에서의 IL-1 β 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 IL-1 β 의 발현을 관찰한 결과, IL-1 β

의 발현은 대조군에서 75.3 \pm 10.5 (%), cognex 투여군에서 51.0 \pm 9.3 (%), 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말 실험군에서 각각 60.4 \pm 11.3 (%)와 64.5 \pm 8.3 (%)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다.

2) Microglial cell에서의 TNF- α 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 TNF- α 의 발현은 대조군은 86.8 \pm 6.5 (%)이었고, cognex 투여군은 56.5 \pm 10.9 (%), 洗心湯 열수추출물 실험군은 63.8 \pm 15.1 (%)였으며, 洗心湯 초미세분말 실험군은 60.9 \pm 1.1 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

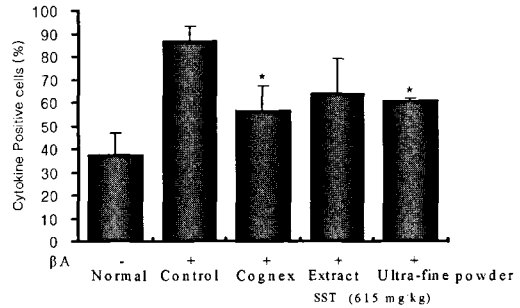


Fig. 5. Effects of SST hot water extract & ultra-fine powder on TNF- α activity on the microglial cell in β A-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SST hot water extract, and SST ultra-fine powder(615mg/kg, p.o) and cognex(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. TNF- α activity measured by FACSscanbur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to β A-induced Alzheimer's disease model. Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

3) 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA) 양에 미치는 영향

생쥐의 뇌조직에서의 MDA 양을 관찰한 결과, 대조군이 95.4 \pm 24.0 (pg/mg)이었고, cognex 투여군이 49.9 \pm 10.9 (pg/mg)였고, 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말 실험군은 각각 71.0 \pm 9.3과 72.1 \pm 10.3 (pg/mg)로 대조군에 비하여 감소를 하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

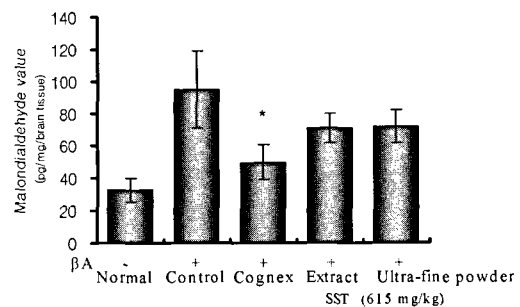


Fig. 6. Effect of SST hot water extract & ultra-fine powder on the malondialdehyde value on the brain tissue in β A-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SST hot water extract and SST ultra-fine powder(615 mg/kg, p.o) and cognex(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. Malondialdehyde(MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry. Tissue in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to β A-induced Alzheimer's disease model. Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

7. β A로 유도된 AD 병태 생쥐 혈청내 AChE에 미치는 영향
 생쥐 혈청 내 AChE 활성도는 정상군이 24.6 ± 6.1 (U/ml), 대조군은 59.5 ± 7.1 (U/ml)이었고, cognex 투여군은 34.7 ± 8.4 (U/ml), 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말 실험군은 각각 38.4 ± 8.6 (U/ml)과 37.9 ± 4.9 (U/ml)로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 감소하였으며, 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 7).

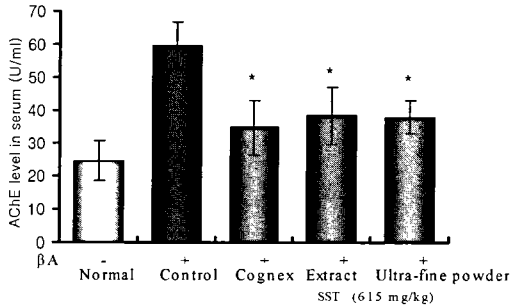


Fig. 7. Effects of SST hot water extract & ultra-fine powder on the serum AChE activity level in β A-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SST hot water extract and SST ultra-fine powder (615 mg/kg, p.o) and cognex (10 mg/kg, p.o) for 8 wks. Serum AChE activity measured by cholinesterase kit and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method ($p < 0.05$).

8. β A로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 병태 생쥐 모델의 허혈에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 79.6 ± 2.9 (%)이었고, cognex 투여군은 45.7 ± 20.1 (%)였고, 洗心湯 열수추출물, 洗心湯 나노분말 실험군은 각각 51.7 ± 7.9 (%), 66.5 ± 16.8 (%)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

2) AD 병태 생쥐 모델 hippocampus의 조직손상에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 대조군은 hippocampus와 entorhinal, fimbriaformix 등의 형태가 뚜렷하지 않았으나 cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 비교적 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있었다.

또한 대조군에서는 hippocampus의 neuronal line의 형태가 뚜렷하지 않았으나 cognex 투여군은 정상과 가깝게 뚜렷한 hippocampus의 neuronal line를 보였고, 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서도 희미하게 hippocampus의 neuronal line를 보였다.

또한 대조군은 hippocampus 조직에 neuronal line이 사라졌으나, cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 neuronal line이 비교적 뚜렷이 보였고, 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복되었다.

3) AD 병태 생쥐 모델 hippocampus에서의 tau protein, GFAP, presenilin-1, 2 억제 효과

AD 병태 생쥐 모델의 hippocampus를 anti-tau Ab로 면역

조직화학염색을 실시한 결과, 대조군에서는 tau protein에 positive한 조직세포가 많이 보였으나, cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 tau protein에 positive한 조직세포가 현저히 감소하였다.

또한 GFAP에 대한 면역조직화학염색의 결과에서, 대조군에서 GFAP에 positive한 astrocyte가 많이 보였으나, cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 GFAP에 positive한 astrocyte가 현저히 감소하였다.

Presenilin-1과 presenilin-2 Ab로 면역조직화학 염색을 실시한 결과, 대조군에서 presenilin-1/presenilin-2에 positive한 뇌조직세포가 많이 보였으나, cognex 투여군과 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 presenilin-1/presenilin-2에 positive한 조직세포가 현저히 감소하였다.

고찰

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노년반 (senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며³⁾, 증상은 서서히 나타나며 경과는 일정하게 점진적으로 진행되는데, 초기에는 기억력 장애가 주증상이나 이후에는 주의력 결여, 지적 능력의 상실, 특히 기억력, 판단력, 추상적 사고, 기타 고유 피질기능의 장애와 인격 및 행동의 변화가 나타난다²⁾.

AD는 β A, estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), proinflammatory cytokine, 신경전달물질의 불균형, 사고에 의한 손상 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데¹⁷⁾, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 만들어지게 되고, 이 β A의 침적으로 생기는 senile plaque의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다¹⁸⁾.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 β A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 β A가 신경세포를 손상시켜 결국 치매의 증상이 나타나게 된다고 한다¹⁹⁾.

극세소관으로 구성된 단백질인 tau protein은 AD 환자의 뇌에서 발견되는 주된 세포내 극세사 침전물의 성분으로 과인산화되면 응집되어 neurofibrillary tangle를 만들어 AD를 유발시키는데 중요한 역할을 하고 있다²⁰⁾.

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고²¹⁾, 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 평가하는 방법들이 모색되고 있다²²⁾.

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 acetylcholine 분해억제제로 미국 FDA에서 AD 치료제로 최초의 승인을 받은 tacrine(cognex) 등²³⁾이 있다.

또 다른 AD의 원인에 대한 가설로 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에

의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌 손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglial cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다²⁴⁾.

정상상태의 뇌에서 신경교세포인 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 일단 뇌손상이 발생하면 먼저 병변 부위에서 microglial cell이 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF- α 를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고²⁴⁾, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 cytokine를 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다²⁵⁾.

특히 β A가 침적된 senile plaque 주변의 microglial cell은 β A에 의해 더욱 활성화되어 IL-1, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine를 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를, microglial cell의 가장 특징적인 표식자로 CD68, CD11b를 들 수 있으며, astrocyte와 microglial cell은 proinflammatory cytokine의 분비를 통해 신경세포의 사멸을 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP, CD68, CD11b가 증가하는 경향을 보이는데, 이는 astrocyte, microglial cell이 활성화되어 된다는 것을 의미하고 또한 senile plaque 형성 및 신경변성 과정을 촉진하게 된다²⁷⁾.

韓醫學的으로 痴呆는 ‘痴狀⁴⁾’, ‘呆病⁵⁾’, ‘健忘⁶⁾’등의 범주에 속하며, 《黃帝內經·素問·調經論》⁶⁾에서는 “血并於上 氣并於下 心煩惋善怒 血并於下 氣并於上 亂而喜忘”이라 하여 치매증상중 기억장애에 대한 원인에 대하여 언급하였다. 明代 張³⁾의 《景岳全書·癡狂痴狀》에서는 呆病의 병인으로 “痴狀症 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮 或以疑貳 或以驚恐而漸致痴狀”라 하였고 병리로 “脈必惑惑感數 惑大惑小 變易不常 此其逆氣在心 惑肝膽二經 氣有不清而然”을 제시하였고 증상은 “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”이라 하였다. 치법으로 “但察其形體強壯 飲食不感別無虛脫等證……而致失神昏亂者 此當以速扶正氣爲主 宜七福飲 惑大補元煎主之”를 제시하였다. 清代의 陳⁷⁾ 등은 치매와 유사한 개념으로 ‘呆病’에 대해 상세히 서술하고 있는데, 원인으로 “此等症雖有崇凭之 實亦胸腹之中 無非痰氣 故治呆無奇法 治痰即治呆也” “呆病內鬱抑不舒 憤怒而成者有之 羞恚而成者有之”를 제시하였고 “呆病如癡 而默默不言也 如饑而悠悠如失也 意慾癡而不能心欲狂而不敢 有時睡數日不醒 有時將己身衣服密密縫補 有時將他人物件深深藏藏掩與人言則煎語而神遊 背人言則低聲而泣訴 與之食則厭薄而不吞 不與食則吞炭而若快” 등의 증상을 제시하고 치법으로 “無非痰氣 故治呆無奇法 治痰即治呆也 然而痰勢最盛 呆其最深 若以尋常二陳湯治之 安得護效 方用逐呆仙丹”이라 하였다. 또한 錢鏡湖의

《辨證奇門·呆病門》⁵⁾에서는 “人有終日悠悠忽不言不語 不飲不食 忽笑忽歌 忽愁忽哭 與之所饑則不受 與之糞則大喜 與之衣不服 與之草木之葉則又大喜 人以此爲呆病也 不必治之也”와 “終日閉戶獨居 口中喃喃 多不可解 將自己衣服 用鍼線密縫 與之飲食 時而用 時而不用 嘗有數日 枵腹 而不呼飢餓者 見炭最善 食之如爽 口之物 人皆棄之” 등의 증상을 제시하였다. “呆病之始 必有其因 大約其始也 起於肝氣之鬱 其終也 由於胃氣之衰 肝鬱則木剋土 而痰不能化 胃衰則土制水而痰不能消 於是痰積於胸中 盤據於心外 使神明不清而成其呆病矣 治之法 開其鬱結逐其痰 健其胃 以通其氣 則心地光明 而呆景盡散矣 方用洗心湯”이라하여 기전과 치법에 대해서도 언급하였다. 치매의 병기는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이고 치법으로는 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血 등의 치법을 사용한다¹⁾.

洗心湯은 《辨證奇門·呆病門》⁵⁾에 처음으로 수록된 처방으로 “終日悠悠, 忽不言不語, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭” 등의 증상을 치료하는데 사용하였고, 처방구성을 살펴보면 心脾二經에 들어가 寧心, 安神利水の 효능이 있는 白茯神, 心肝膽脾經에 들어가 補肝, 寧心, 斂汗, 生津하는 酸棗仁, 脾胃經에 작용하여 燥濕化痰, 降逆止嘔 시키는 半夏, 脾胃經에 작용하여 健脾和胃, 消食調中의 작용이 있는 神曲, 脾肺二經에 들어가 理氣, 調中, 燥濕, 化痰의 효능이 있는 陳皮, 脾肺心經에 들어가 大補元氣, 固脫生津, 安神 등의 작용을 하는 人蔘, 心脾腎經에 들어가 回陽補火, 散寒除濕의 효능이 있는 附子, 心胃經에 들어가 化濕開胃, 開竅豁痰, 醒神益智의 작용을 하는 石菖蒲, 心肺脾胃經에 들어가 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸毒의 효능이 있는 甘草²⁸⁾로 구성되어 있음을 알 수 있다. 《實用中醫內科學》⁸⁾에서는 “本方補正與攻痰并重, 補正是益脾胃之氣以生心氣, 攻痰是濕滯干優心宮之濁邪, 再加養心之品, 以治痴呆”라 하여, 脾虛痰阻형의 呆病에 응용할 수 있음을 제시하였다. 또한 金 등¹⁰⁾은 洗心湯이 뇌조직의 산화 작용을 억제하여 AD의 예방과 치료에 활용할 수 있음을 실험적으로 입증하였다. 洗心湯의 처방구성으로 볼때 치매 중에서도 특히 氣血虧虛, 痰濁阻竅형 치매에 응용할 수 있으리라 사료되었다.

현재 약물의 제형에 있어서는 탕제와 열수추출물 제제를 주로 이용하고 있는데, 한 설문결과에서 탕제는 약을 달이는 것과 휴대하기 불편하다는 점, 탕제의 기미가 불쾌할 수 있다는 점이 단점이고 열수추출물 제제는 약효가 떨어지거나 효과가 느릴 것 같다는 선입견과 복용시 물이 필요하다는 점이 단점으로 지적되고 있다¹¹⁾.

한편, 최근 초미세 분쇄 기술이 한약제형에 응용하여 활용되고 있으며 초미세 분말 제형이 약물생체 이용률, 약리 기작, 약의 경량화 등에서 우수하다는 연구결과가 있고¹²⁾, 한약의 열수추출물과 초미세분말 제형이 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 실험 결과¹³⁾가 보고되었으나, 연구 성과는 부족한 실정이다.

이에 저자는 洗心湯 열수추출물과 초미세분말 제형의 AD에 대한 효과를 실험적으로 규명하고자 洗心湯의 열수추출물을 시료로 mLFC에서 細胞毒성을 관찰하고, LPS를 처리한 BV2 microglial cell에서 L-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6,

TNF- α , NO의 생성을 관찰하였다. 또한 洗心湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 β A로 유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 β A로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 발현과 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA), CD68과 CD11b의 발현 세포수, 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고, 뇌 조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화 및 hippocampus에서의 tau protein, GFAP, presenilin-1, 2의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 洗心湯의 세포독성을 측정할 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 洗心湯 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 실험군에서 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타났다 이후의 실험에서는 100 μ g/ml이하의 농도로 洗心湯을 사용하였다.

Microglial cell은 뇌의 손상에 대한 반응으로 활성화되는데, microglial cell의 활성화는 AD와 파킨슨병과 같은 신경사멸질환의 개시와 진행에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁹). 지금 까지 microglial cell을 활성화시키는 가장 효과적인 물질은 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)로, 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시켜 각종 cytokine을 분비하도록 하고 염증 및 면역반응을 일으킨다³⁰). 활성화된 microglial cell은 IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine과 NO 등의 oxidants를 생산, 분비하게 된다³¹).

COX-2는 arachidonic acid가 prostanoid로 전환될 때 촉매 작용을 하며 prostaglandine(PGs)을 형성하는 중요한 효소이다³²). PGs는 과량이 존재할 경우 자가 독성을 나타내며 신경변성에 관여한다. COX-2의 발현증가는 유해한 prostanoid와 자유기들의 과잉생성을 유도하여 신경손상을 매개하며, AD 질환의 뇌에서도 COX-2 mRNA와 단백질의 발현 상승이 보고되고 있다³³).

NOS-II(inducible NOS ; iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소로 LPS, TNF- α , IL-1 β 또는 IFL- γ 에 의해 자극 받은 대식세포, 간세포, 신장세포 등에서 생성된다. iNOS는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장기간 다량의 NO를 생성하며, 필요이상으로 생성된 NO는 shock에 의한 혈관 확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다³⁴). 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다³⁵).

이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 洗心湯의 열수추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 투여한 후, IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS-II의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS-II의 mRNA의 발현이 억제되었음을 볼 수 있다.

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정할 결과, IL-1 β 생성량은 모든 실험군에서 다소 감소하였으나 유의성은 없었고, IL-6, TNF- α 의 생성량은 洗心湯 100 μ g/ml 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

이상의 결과로 洗心湯은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있다.

신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이 되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질 중 하나인 NO는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 저분자 라디칼로서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절, 종양세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능에 관여하고 있으나, 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁴). NO 등에 의한 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다³⁶).

BV2 microglial cell line 배양상층액의 NO의 생성을 관찰할 결과, NO의 생성량은 洗心湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 실험군 모두에서 유의성 있는 감소를 보였다. 이로써 洗心湯이 산화적 손상을 유발하는 NO의 생성을 억제함으로써 AD의 예방에 활용될 수 있음을 알 수 있으며 이는 최¹³)의 연구에서 총명탕과 목근피총명탕이 NO의 생성을 억제하여 AD의 예방에 활용될 수 있다는 결과와 비교된다.

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로³⁷), 이 방법을 이용하여 β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 洗心湯 열수추출물 및 洗心湯 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 stop-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, stop-through latency는 洗心湯 열수추출물 및 洗心湯 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 시간의 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었고, distance movement-through latency는 洗心湯 열수추출물 실험군만이 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였다(Fig. 3, 4).

β A로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine의 일종인 IL-1 β , TNF- α 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 β A를 뇌에 주입한 대조군에서는 발현이 증가되었으나 실험군 모두에서 발현이 감소했고, 洗心湯 초미세분말 실험군에서 TNF- α 발현이 유의성 있게 억제되었다.

인체 조직의 산화적 손상과정은 세포막에서 지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어남으로써 진행되는 것으로 알려져 있다³⁸). 지질 과산화(malondialdehyde, MDA)의 과정은 메틸기(CH₂)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 PUFA와 반응할 때 시작된다. 형성된 라디칼(peroxyl radical)은 다음 단계의 연쇄 반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있다³⁹).

이런 점에서 AD 병태 생쥐 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정할 결과 대조군에 비해 洗心湯 열수추출물 및 洗心湯 초미세분말을 투여한 실험군에서 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과, 洗心湯 열

수추출물, 洗心湯 나노분말 실험군은 대조군에 비하여 허혈의 크기가 다소 감소하였으나 유의성은 없었다.

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 대조군에서는 hippocampus 조직에 astrocytes와 microglial cell이 침투하여 hippocampus의 cell line이 뚜렷하지 않았고 cognex 투여군은 정상군과 가깝게 뚜렷한 hippocampus의 cell line을 보였으며 洗心湯 실험군에서도 희미하게 hippocampus의 cell line을 보였고, 대조군에 비해 cognex투여군과 洗心湯 실험군에서는 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus등이 회복된 것을 볼 수 있었다. 이는 洗心湯이 AD에서 보이는 뇌조직의 손상과 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 염증과 허혈에 관련된 AD의 기전을 억제할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다.

AD 병태 생쥐 모델의 hippocampus를 면역화학조직염색을 실시하여 관찰한 결과, 대조군에서는 정상군과 비교하여 tau protein, GFAP, PS-1/PS-2에 양성반응을 보이는 조직 세포가 현저히 증가하였고 실험군에서는 이러한 조직세포가 감소했음을 확인할 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 洗心湯은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS- II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하였고, BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO의 생성량을 감소시켰으며, β A로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈고, β A로 유도된 AD 병태 모델 생쥐의 microglial cell에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , TNF- α 의 발현을 억제하였고, 뇌조직에서의 MDA, CD68과 CD11b 발현 세포수를 감소시켰으며, β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 혈청 내 AChE 활성도를 유의성 있게 억제하였고, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상을 개선하였으며 hippocampus에서의 tau protein, GFAP, PS-1/PS-2를 감소시키는 것으로 나타났다.

洗心湯 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency에서 기억력 감퇴개선효과, microglial cell의 IL-1 β 의 발현 억제, 뇌조직에서의 MDA, CD68과 CD11b 발현 세포수, 혈청 내 AChE 활성도 측정, 뇌조직의 허혈상태 개선효과에 있어 모두 효과가 있었으나 제형에 따른 유의한 차이는 없었고, Distance-through latency에서의 기억력 감퇴효과에서는 洗心湯 열수추출물만이, microglial cell에서 TNF- α 의 발현 측정에서는 洗心湯 초미세분말만이 유의한 효과를 나타냈다.

따라서 洗心湯은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현, 산화적 스트레스 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대해 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 처방구성으로 볼때 특히 氣血虧虛, 痰濁阻礙형 치매에 응용할 수 있을 것으로 보며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

洗心湯 열수추출물과 초미세분말이 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

洗心湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS- II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하였다. 洗心湯 열수추출물은 100 μ g/ml 실험군에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 IL-6, TNF- α , NO의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고, distance movement-through latency 측정에서 洗心湯 열수추출물이 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다. 洗心湯 초미세분말은 microglial cell에서의 TNF- α 의 발현을 유의성 있게 억제하였다. 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말은 AD 병변 뇌조직에서의 MDA를 감소시켰으나 유의성은 없었다. 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말은 β A로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다. 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다. 洗心湯 열수추출물과 洗心湯 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 tau protein, GFAP, presenilin 1, 2의 생성을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 洗心湯 열수추출물과 초미세분말은 AD의 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울, 집문당, pp 311-316, 2005.
2. 민성길. 최신정신의학. 일조각, pp 189-200, 611-612, 2004.
3. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1988.
4. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
5. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
6. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, pp 37, 124, 196, 229, 217-218, p.229, 1985.
7. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울, 書苑堂, p 102, 1984.
8. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 378-381, 1989.
9. 陳輝 외. 實用中醫腦病學. 北京, 學苑出版社, pp 242-251, 1993.
10. 金聖賢 외. 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 8(2):39-50, 1997.
11. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학, 20(1):356-367, 2004.
12. Song, L.L., Du, G.J., Fan, B.Y., Zhang, D.L. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 27(6):436-439, 2002.
13. 최강욱, 이상룡, 정인철. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물,

- 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(5):1200-1210, 2006.
14. 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.
 15. Abu-Absi, N.R., Zamamiri, A., Kacmar, J., Balogh, S.J., Srienc, F. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. *Cytometry* 51A(2):87-96, 2003.
 16. Michael, L.H., Entman, M.L., Hartley, C.J., Youker, K.A., Zhu, J., Hall, S.R., Hawkins, H.K., Berens, K., Ballantyne, C.M. Myocardial ischemia and reperfusion ; a murine model. *Am J Physiol*. 269: 2147-2154, 1995.
 17. Cacquevel, M., Lebeurrier, N., Cheenne, S., Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Current Drug Targets* 5(6):529-534, 2004.
 18. Li, W.Y., Butler, J.P., Hale, J.E., McClure, D.B., Little, S.P., Czilli, D.L., Simmons, L.K. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 95(1):1-4, 2000.
 19. Mattson, M.P., Guo, Z.H., Geiger, J.D. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem* 73(2):532-537, 1999.
 20. Chun, W., Johnson, G.V. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front Biosci*. 12: 733-756, 2007.
 21. Kasa, P., Papp, H., Torok, I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience* 101(1):89-100, 2000.
 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. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(1):187-194, 2000.
 23. Wu, D.C., Xiao, X.Q., Ng, A.K., Chen, P.M., Chung, W., Lee, N.T., Carlier, P.R., Pang, Y.P., Yu, A.C., Han, Y.F. Protection against ischemic injury in primary cultured mouse astrocytes by bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Neurosci Lett*. 288(2):95-98, 2000.
 24. Pyo, H., Joe, E., Jung, S., Lee, S.H., Jou, I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*. 274(49):34584-34589, 1999.
 25. Simmons, M.L., Murphy, S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* 59(3):897-905, 1992.
 26. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem* 74(3):1017-1025, 2000.
 27. 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* 46(1):35-38, 2001.
 28. 전국한의과대학 본초학교수공저. *本草學*. 서울, 영림사, p 302, 331, 347, 370, 448, 493, 523, 531, 540, 1999.
 29. Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology* 150(7):2659-2667, 1993.
 30. Nick, J.A., Avdi, N.J., Gerwins, P., Johnson, G.L., Worthen, G.S. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 156(12):4867-4875, 1996.
 31. Woo, M.S. et al. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyl-cAMP in BV2 microglial cells. *Molecular Brain Research* 113(1-2):86-96, 2003.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Yen, G.C., Lai, H.H. et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry* 74: 471-478, 2001.
 35. Fernández-Vizarra, P. et al. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 15(2):287-305, 2004.
 36. Mates, J.M., Perez-Gomez, C. et al. Antioxidant enzymes and human disease. *Clinical Biochemistry* 32: 595, 1999.
 37. 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. *J Pharmacol Exp Ther*. 272(1):256-263, 1995.
 38. Nakaya, H., Tohse, N., & Nanno, M. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. *Am J Physiol*. 253: 1089-1097, 1987.
 39. Holley, A.E. and Cheeseman, K.H. Measuring free radical reaction in vivo. *Bri. Med. Bull*. 49(3):494-505, 1993.