

醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

민경직 · 이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

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

Kyung Jik Min, Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

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

This experiment was designed to investigate the effect of the SSJHT hot water extract & ultra-fine Powder on Alzheimer's Disease Model Induced by β A. The effects of the SSJHT hot water extract on expression of IL-1RA, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , NOS-II, COX-2 mRNA and production of IL-1 β , IL-6, TNF- α in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS). The effects of the SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on (1) the behavior (2) expression of IL-1 β , TNF- α , MDA, CD68, CD11b and AChE (3) and the infarction area of the hippocampus in Alzheimer's diseased mice induced with β A were investigated. The SSJHT hot water extract suppressed the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , NOS-II, COX-2 mRNA and increased IL-1RA, IL-10 in BV2 microglia cell line treated with LPS. The SSJHT hot water extract suppressed the production of IL-1 β , IL-6, TNF- α significantly in BV2 microglial cell line treated with LPS. The SSJHT 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 step-through latency. The SSJHT hot water extract & ultra-fine powder suppressed the expression of TNF- α , IL-1 β protein significantly in the microglial cell of mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SSJHT 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 SSJHT hot water extract & ultra-fine powder significantly decreased AChE activity in the serum of the mice with Alzheimer's disease induced by β A. The SSJHT 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 results suggest that the SSJHT hot water extract & ultra-fine powder may be effective for treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the SSJHT hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key words : Alzheimer's disease, Sungsimjihwang-tang(SSJHT), ultra-fine powder, β -amyloid

서 론

痴呆는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말하며¹⁾痴呆의 임상유형으로는 Alzheimer형痴呆가 가장 많다²⁾.

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

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

· 접수 : 2008/08/21 · 수정 : 2008/09/19 · 채택 : 2008/10/01

Alzheimer's disease(AD)의 원인으로는 β -amyloid(β A)로 유발된 신경독성³⁾, 콜린성 신경원의 소실⁴⁾, 산화적 손상⁵⁾, 에너지 대사 결함, amyloid precursor protein(APP)의 변화된 과정, 글루탐산염 독성, 미토콘드리아의 결함 등이 제시되고 있다⁶⁾.

韓醫學으로痴呆는 '痴獸⁷⁾', '呆病⁸⁾', '健忘⁹⁾' 등의 범주에 속하며, 明代 張¹⁰⁾의 《景岳全書·癡狂痴獸》에서는 "痴獸症, …… 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 痴獸에 대해 기술하였으며 淸代의 陳⁷⁾ 등은 痴呆와 유사 개념으로 '呆病'에 대해 서술하였다.

주로 稟賦不足, 精氣不足, 脾胃虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등으로 辨證하고 治법은 補腎益精, 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등으로 구분하고 있다¹¹⁾.

醒心地黃湯은 心虛熱을 다스리는 醒心散과 腎水不足을 다스리는 六味地黃湯¹²⁾을 합방한 후에 益智仁和 甘草를 加味한 처방으로 김 등¹³⁾은 醒心地黃湯이 활성산소의 생성과 노화물질의 축적을 막을 수 있다고 발표한 바 있어 醒心地黃湯이 精氣不足型 痴呆의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 판단하여 본 연구를 시행하였다.

현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 탕제이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 있어 이를 개선하기 위한 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데¹⁴⁾, 특히 초미세 분말은 약재를 수십 μm 로 분쇄하여 분말로 만든 것으로¹⁵⁾, 흡수성이 높아¹⁶⁾ 우수한 효과를 보여¹⁷⁾ 최근 한약 제형에 초미세분말을 응용하는 것에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{18,19)}.

이에 저자는 醒心地黃湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, in vivo 실험에서 열수추출물을 시료로 mouse lung fibroblast cells(mLFC)에서 세포독성을 관찰하고, lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 cytokine, 관련효소 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량을 관찰하였다.

in vitro 실험에서 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA 로 유도된 AD 동물 병태 모델을 통하여 interleukin-1 beta(IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), malondialdehyde(MDA), cluster designation 68(CD68), cluster designation 11b(CD11b) 등의 유관 병리 인자들을 검색하고 행동실험과 해부학적 관찰을 통해 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 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 Takaras사(Japan) 제품을, Moleoy murine

leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을 사용하였다.

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)을 사용 하였다.

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 sceondary Ab(1:4000, Amersham, USA)와 ECL-hybond film(Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

β -amyloid peptide는 Calbiochem사(USA) 제품을, anti-mouse IgG-bead는 Dynal사(USA) 제품을, anti-CD14, anti-IL-1, anti-TNF- α , anti-CD44-PE, anti-CD68-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-GFAP-FITC는 Pharmingen사(USA) 제품을 사용하였다

anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(1:4000)와 ECL-hybond film은 Amersham(USA)사 제품을 사용하였고 상기 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), rotary evaporator, (BÜCHI B-480, Switzerland), freeze dryer, (EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column(Invitrogen, USA), Windows 1D main program(AAB, USA), stereotaxic frame(Adamec, USA), CELlection 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/6생쥐는 (주) 샘타코에서 분양받아 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±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 醒心地黃湯(SungSimJiHwang-Tang, SSJHT)은 大田大學校 附屬韓方病院 處方集²⁰⁾에 준하였으며 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of SungsimjHwang-Tang(SSJHT)

Herb	Galenical	Dose(g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12.0
山茱萸	<i>Comi Fructus</i>	8.0
山 藥	<i>Discoreae Rhizoma</i>	4.0
白茯苓	<i>HOELEN CUM RADIX</i>	4.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	4.0
澤 瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4.0
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
遠 志	<i>Polygalae Radix</i>	4.0
白茯苓	<i>HOELEN CUM RADIX</i>	4.0
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	4.0
石菖蒲	<i>Acori Graminej Rhizoma</i>	4.0
益智仁	<i>Alpiniae Oxyphyllae Fructus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
Total amount		72.0

4) 검액의 조제

(1) 醒心地黃湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

醒心地黃湯 1첩 분량(72 g)에 증류수 1,300 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 醒心地黃湯 열수추출물(14.375 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 400 mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 醒心地黃湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수 제약에서 실시하였는데 熟地黄, 山茱萸, 山藥, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉, 人蔘, 麥門冬, 五味子, 遠志, 白茯苓, 生地黃, 石菖蒲, 益智仁, 甘草를 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1 mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beat) 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 400 mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3 회 세척하고 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 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 30 분간 계속 배양하였다. 이후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2 회 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 assay법²¹⁾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 醒心地黃湯 열수추출물(최종 농도 200, 100, 50, 10, 1 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2 회 세척하였고 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50 µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 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 醒心地黃湯 열수추출물(100, 50 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 15 초간 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 20 µl의 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(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°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 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 200 nM이 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, 1 min 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.

Table 2.

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' TCCAGTTGCCTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

④ mouse TNF-α

Forward Primer: 5' CTGTCTACTGAACTTCGGGGTATCGGTC 3'
Reverse Primer: 5' ATGAGATAGCAAATCGCTGACGGTGTGGG 3'

⑤ mouse COX-2

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

⑥ mouse NOS-II

Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

3) 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. 醒心地黃湯 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 100μl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조

① βA(1~40)

βA는 Calbiochem 회사에서 공급받아 사용하였고 그 아미노산 배열은 다음과 같다.

Table 3. Sequence of βA(1~40)

H-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH
--

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10 μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 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

생쥐를 적응시키기 위해 2주간 Morris water maze에서 1일 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. distance movement-through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement)과 많은 운동량(large movement)의 합을 분석한 것이다. step through latency는 반복학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 시간을 threshold로 지정하여 분석한 것이다. 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하고, 선별된 생쥐 4마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine 10 mg/kg), 醒心地黃湯 열수추출물 실험군(400 mg/kg)과 醒心地黃湯 초미세분말 실험군(400 mg/kg)로 분류하고, βA를 투여한 후 2주간 안정시켰다. 그 후 7주간 1일 1회 약물 투여를 하였으며, 마지막 1주간 약물 투여와 함께 1주일간 3회 각 군의 생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다.

5) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

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

8주간의 醒心地黃湯 열수추출물(400 mg/kg)과 초미세분말(400 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 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 rpm1640을 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 CELlection 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 μl와 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-1β와 FITC-anti-TNF-α를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 Cellquest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 뇌조직 내 지질과산화도(MDA) 측정

MDA측정은 Suematsu 등의 방법²¹⁾에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200 μl를 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 μl를 가하고 5초 동안 vortex mixer로 mixing한 후, 20% acetic acid 1.5 ml를 가하고 75 μl 증류수를 넣고 5 초 동안 다시 vortex mixer로 mixing했다. 이후 1.2% thiobarbituric acid solution 1 ml를 tube에 더해 clean dry marble로 cover하고, 30 분간 water bath에서 끓이고 실온에서 30 분간 cooling한 후에 3000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상층액을 얻어 532 nm에서 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 뇌 세포 부유액을 회수했다. Hypaque-1077 5 ml과 뇌세포 부유액 5 ml gradient를 만든 다음 2,000 rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 buffy coat 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 얻어진 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 뇌세포를 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4°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.

6) AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 acetylcholinesterase(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°C 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 $\Delta A = ABLANK - ATEST$ 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

7) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에서의 허혈상태 및 조직손상 분석

(1) 허혈면적 측정

AD 유발생쥐를 마취한 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 방법²²⁾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 Hipocampus)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 %로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 $(AT \text{ of area at risk} / ST \text{ of BH}) \times 100$ 으로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation으로 기록하였다. Morris water maze 이외의 실험에서 각 군의 유의성은 일원배치분산분석(ANOVA test)로 평가하였고 p<0.05 수준에서 Duncan's method로 사후 검정하였고, Morris water maze 실험의 유의성은 Kruskal-Wallis test로 평가하였고 역시 p<0.05 수준에서 Mann-Whitney U test로 사후 검정하였다.

성 적

1. 醒心地黃湯의 세포독성

醒心地黃湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 醒心地黃湯 1, 10, 50, 100, 200 μg/ml 실험군에서 각각 98.1±1.4, 94.3±1.2, 92.3±1.5, 87.2±2.2, 80.2±3.1%로 나타나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다(그림생략).

2. Cytokine, 관련효소 mRNA 발현

1) IL-1β mRNA

IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.22로 나타났으며, 醒心地黃湯 100, 50 μg/ml의 실험군은 각각 0.574, 0.782로 나타났다(그림생략).

2) IL-6 mRNA

IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.005, 醒心地黃湯 100, 50 μg/

mL의 실험군은 각각 0.473, 0.637로 나타났다(그림생략).

3) IL-10 mRNA

IL-10 mRNA 발현은 정상군이 0.292, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군은 각각 1.926, 1.601로 나타났다(그림생략).

4) IL-1 receptor antagonist(IL-1RA) mRNA

IL-1RA mRNA 발현은 정상군이 0.148, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군은 각각 1.212, 1.295로 나타났다(그림생략).

5) TNF- α mRNA

TNF- α mRNA 발현은 정상군이 0.031, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군은 각각 0.175, 0.415로 나타났다(그림생략).

6) COX-2 mRNA

COX-2 mRNA 발현은 정상군이 0.025, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군은 각각 0.406, 0.642로 나타났다(그림생략).

7) NOS-II mRNA

NOS-II mRNA 발현은 정상군에서 0.035로, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군은 각각 0.716, 0.864로 나타났다(그림생략).

3. proinflammatory cytokine 생성량

1) IL-1 β

IL-1 β 생성량은 정상군 34.5 \pm 18.8 pg/mL, 대조군은 813.0 \pm 63.1 pg/mL이었고 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 실험군은 각각 271.5 \pm 22.8, 335.4 \pm 83.9 pg/mL로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

2) IL-6

IL-6 생성량은 정상군이 447.0 \pm 96.7 pg/mL, 대조군은 7291.0 \pm 794.8 pg/mL, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 실험군은 각각 3926.5 \pm 1666.7, 5508.5 \pm 918.5 pg/mL로 나타나 醒心地黃湯 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

3) TNF- α

TNF- α 생성량은 정상군이 508.0 \pm 94.8 pg/mL, 대조군이 2274.0 \pm 321.0 pg/mL이었으며, 醒心地黃湯 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 실험군은 각각 1215.0 \pm 268.7, 1659.5 \pm 136.5 pg/mL로 나타나 醒心地黃湯 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

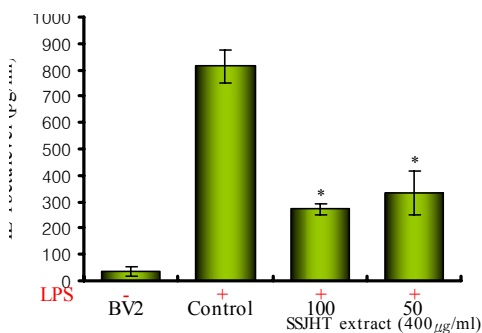


Fig. 1. Inhibitory effect of SSJHT hot water extract on the IL-1 β production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of SSJHT hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6hrs. Total IL-1 β 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($p < 0.05$).

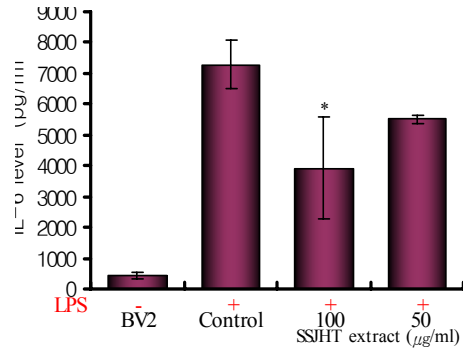


Fig. 2. Inhibitory effect of SSJHT hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of SSJHT hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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($p < 0.05$).

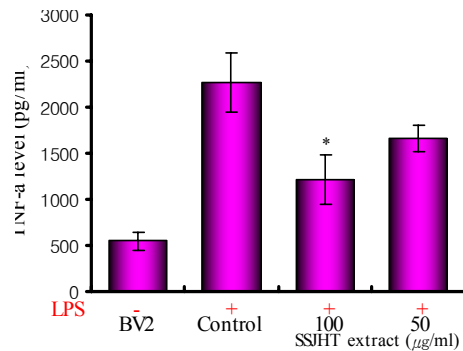


Fig. 3. Inhibitory effect of SSJHT hot water extract on the TNF- α production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were pretreated with various concentrations of SSJHT hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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. β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴에 대한 영향

1) Step-through latency

step-through latency 측정에서 정상군이 3.9 \pm 1.3 sec, 대조군이 85.9 \pm 5.8 sec, tacrine 투여군이 14.3 \pm 4.0 sec, 醒心地黃湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 26.0 \pm 14.3, 10.9 \pm 5.7 sec로 tacrine 투여군과 醒心地黃湯 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 醒心地黃湯 초미세분말, 열수추출물 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

2) Distance movement-through latency

Distance movement-through latency 측정에서 정상군이 145.3 \pm 35.3 cm, 대조군이 1976.7 \pm 427.2 cm, tacrine 투여군은 476.3 \pm 286.1 cm, 醒心地黃湯 열수추출물 실험군은 622.3 \pm 291.5 cm, 초미세분말 실험군은 150.3 \pm 108.6 cm로 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였고 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

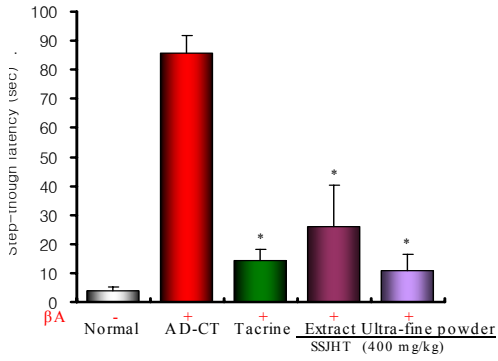


Fig. 4. Effects of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on the Memory Impairment of β A-induced Alzheimer's Mice in the step-through type of Morris water maze test. C57BL/6 mice were trained once a day for 1 wk., then they were divided into each group and treated by β A. And then they were orally administered of SSJHT hot water extract, SSJHT ultra-fine powder or tacrine for 8 wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week. Control, β A-induced Alzheimer's mice; tacrine(10 mg/kg, p.o); SSJHT hot water extract, and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o). Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U Test(p<0.05). (N=4)

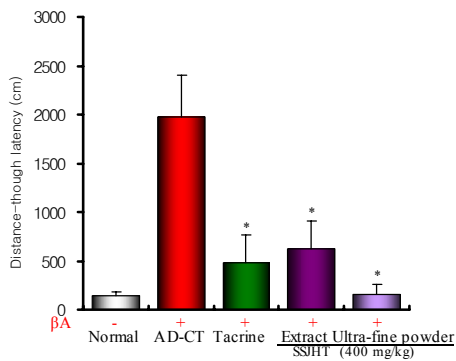


Fig. 5. Effects of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on the Memory Impairment of β A-induced Alzheimer's Mice in the distance movement-through type Morris water maze test. C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk., then they were divided into each group and treated by β A. And then they were orally administered of SSJHT hot water extract, SSJHT ultra-fine powder or tacrine for 8wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week. Control, β A-induced alzheimer's mice; Tacrinr(10 mg/kg, p.o); SSJHT hot water extract, and SSJHTultra-fine powder(400 mg/kg, p.o). Data represent means \pm S.D. * Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U Test(p<0.05). (N=4)

5. β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 대한 영향

1) Microglial cell에서의 IL-1 β 발현

Microglial 세포내에서의 IL-1 β 의 발현을 관찰한 결과, IL-1 β 의 발현은 대조군에서 88.6 \pm 2.5%, tacrine 투여군에서 19.0 \pm 1.9%, 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 각각 42.0 \pm 5.2, 35.3 \pm 12.4%로 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

2) Microglial cell에서의 TNF- α 발현

Microglial 세포내에서의 TNF- α 의 발현은 대조군은 94.9 \pm 2.3%이었고, tacrine 투여군은 21.1 \pm 4.6%, 醒心地黃湯 열수추출물 실험군은 44.0 \pm 9.0%였으며, 초미세분말 실험군은 32.6 \pm 8.6%으로 tacrine 투여군, 醒心地黃湯 열수추출물 및 초미세분말 실험

군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

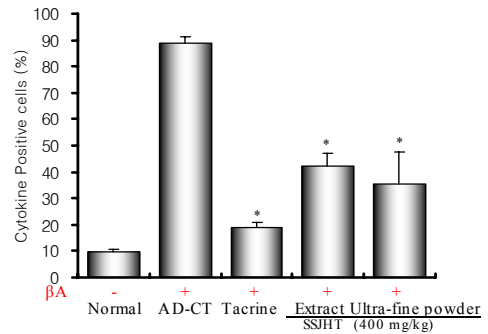


Fig. 6. Effects of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on IL-1 β activity on the microglial cell in β A-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract, and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. IL-1b activity measured by FACScalibur., 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.

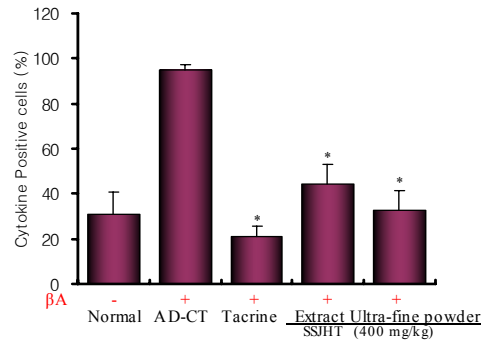


Fig. 7. Effects of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on TNF- α activity on the microglial cell in β A-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract, and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. TNF- α activity measured by FACScalibur., 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). # Statistically significant value compared with SSJHT ex group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

3) MDA 양

생쥐의 뇌조직에서의 MDA 양을 관찰한 결과, 대조군이 133.5 \pm 17.3 pg/mg이었고, tacrine 투여군이 39.4 \pm 2.4 pg/mg였고, 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군은 각각 54.6 \pm 13.9, 64.9 \pm 9.1 pg/mg로 실험군 모두에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

4) CD68과 CD11b

생쥐의 뇌조직에서 CD11b+/CD68+가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, 정상군은 7.2 \pm 2.1%이었고, 대조군은 51.2 \pm 2.3%였으나, tacrine 투여군은 26.1 \pm 2.2%였고 醒心地黃湯 열수추출물 실험군은 35.5 \pm 1.7%, 초미세분말 실험군은 31.9 \pm 7.8%로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 감소되었다(Fig. 9).

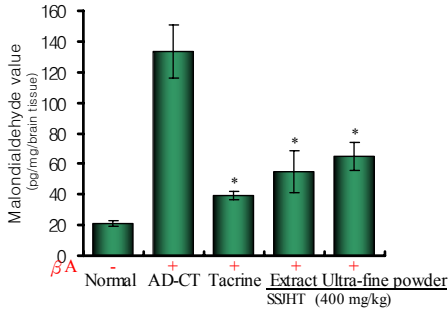


Fig. 8. Effect of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on the malondialdehyde value on the brain tissue in βA-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. 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 βA-induced Alzheimer's disease model. Data represent means±S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05). (N=2)

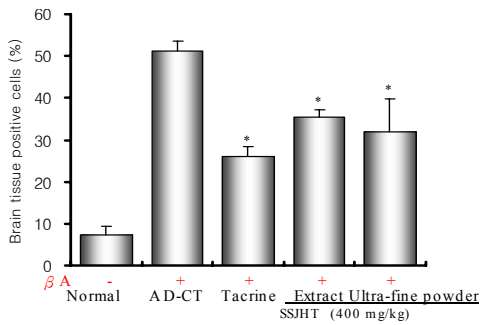


Fig. 9. Effects of SSJHT hot water extract & ultra-fine powder on the CD68 and CD11b gated cells on the brain tissue in βA-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. Number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model. CD68/CD11b cell population(%) were measured by analyzed by flow cytometer. Data represent means±S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05). (N=2)

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 혈청의 AChE 활성도에 미치는 영향
 생쥐 혈청내 AChE 활성도는 정상군이 15.0±3.7 U/ml, 대조군은 214.0±24.9 U/ml이었다. Tacrine 투여군은 33.0±17.9 U/ml, 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군은 각각 92.9±4.9, 100.9±0.6 U/ml로 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고 열수추출물과 초미세분말의 유의한 차이는 없었다(Fig. 10).

7. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈상태에 대한 효과
 1) 허혈상태

AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 86.7±2.8%이었고, tacrine 투여군은 49.5±5.9%였고, 醒心地黃湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 66.0±8.9, 64.8±1.9%로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군간 유의한 차이는

없었다(Fig. 11).

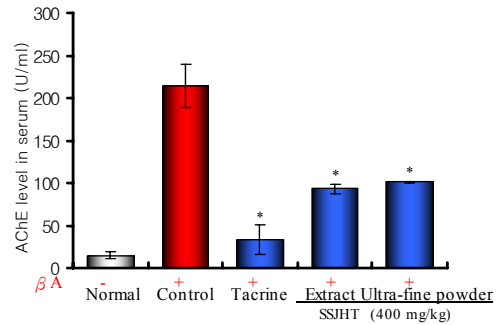


Fig. 10. Effects of SSJHT hot water extract and ultra-fine powder on the serum AChE level in βA-induced Alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract and ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8wks. Serum AChE activity measured by cholinesterase kit and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means±S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05). (N=2)

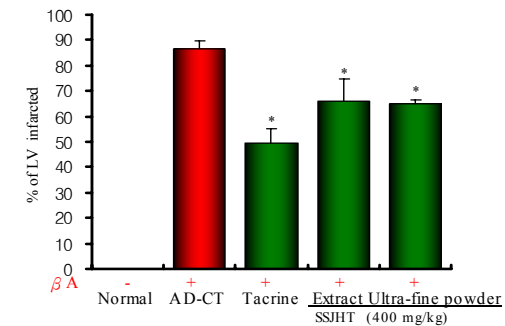


Fig. 11. Effects of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice brain. C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as the LV that was at risk(a percentage of the total area). Data represent means± S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05). (N=2)

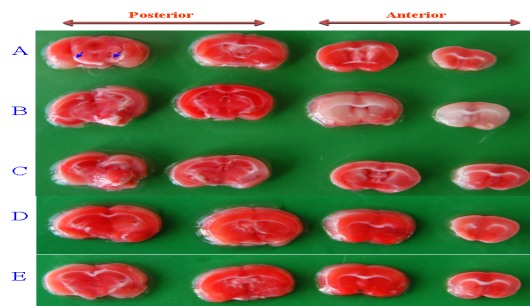


Fig. 12. Effects of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice brain(coronal section). C57BL/6 mice were orally administered of SSJHT hot water extract and SSJHT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8 wks. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride. Normal tissues are stained as strong red color. Infarcted area is not stained as white color which localizes at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6-12mm from frontal pole. A: normal, B: AD-CT C: tacrine D: SSJHT extract E: SSJHT ultra-fine powder (N=2)

고찰

痴呆는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군으로 유병률이 65세 이상의 노년 인구에서 2.2~8.8%에 이르고 있다. 그중 痴呆의 중요한 유형인 AD의 경우는 유병률이 1.6~15.3%로 보고되고 있고, 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되며 가족과 痴呆 환자와의 갈등 혹은 적절한 관리의 부재로 인하여 여러 가지 사회적 문제를 초래하는 질환이다²³⁾.

AD는 뇌의 전반적인 신경세포상실과 senile plaque(SP), neurofibrillary tangles(NFT) 및 신경세포의 과립공포변성 등의 소견을 보이며, 서서히 증상이 나타나며 경과를 일정하게 점진적으로 진행되는데, 초기에는 기억력 장애가 주증상이나 병이 진행함에 따라 주의력 결여, 지적 능력의 상실, 특히 기억력, 판단력, 추상적 사고, 기타 고위 피질기능의 장애와 인격 및 행동의 변화가 나타나 차차 완전히 자신을 돌볼 수 없는 상태가 되어 사망하게 되는 질환이다²⁴⁾.

Alzheimer's disease(AD)의 원인으로는 β -amyloid(β A)로 유발된 신경독성³⁾, 콜린성 신경원의 소실⁴⁾, 산화적 손상⁵⁾, 에너지 대사 결함, amyloid precursor protein(APP)의 변형된 과정, 글루탐산염 독성, 미토콘드리아의 결함 등이 제시되고 있다⁶⁾.

이중 APP의 변화과정이 AD 원인으로 작용함에 있어 큰 분자량의 APP는 β -secretase나 γ -secretase에 의해 일부가 잘라져서 β A가 생성되는데^{25,26)} β A는 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 β A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 β A가 신경세포를 손상시켜 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. β A는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉬운 상태가 됨으로써 痴呆의 증상이 유발되는 것이다^{30,31)}.

또한 β A의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 reactive oxygen species (ROS)의 생산을 증가시키며 세포내 Ca^{2+} 항상성의 파괴를 초래함으로써 senile plaque를 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다³²⁻³⁴⁾.

Tau protein은 세포 소기관, 당단백 및 다른 중요한 신경세포 내 물질의 이동에 관여하는 미세소관을 연결하고 안정화 시키는 역할을 하는 미세소관 연관 단백질이다. Tau protein의 미세소관 분절에 결합하는 능력은 부분적으로는 인산염 그룹의 수에 의해 결정되며, tau protein의 인산화의 증가는 신경세사로 구성된 신경섬유다발을 만들기 때문에 AD의 주요한 기전이 된다³⁵⁾.

AD는 다수의 신경전달물질계의 영향을 받는데 그 중에서도 콜린계와 특별히 많은 관계가 있다³⁶⁾. Acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가^{27,37)}와 같은 콜린계의 기능장애는 기억력과 많은 연관이 있으며 tacrine과 같은 AChE inhibitor에 의해 강화될 수 있다³⁷⁾. tacrine은 1940년에 정맥의 방부제로 합성되었고 1981년부터 AD에 효

과가 있다는 연구결과가 나오기 시작했고 1993년에는 FDA에서 AD의 치료제로 승인을 받았다³⁸⁾.

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 활성화시키고³⁹⁾, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다⁴⁰⁾. 특히 β A가 침적된 senile plaque 주변의 microglial cell은 β A에 의해 더욱 활성화되어 IL-1, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다⁴¹⁾.

IL-10은 TNF- α 와 같은 proinflammatory와 반대로 염증 반응을 억제시켜 종결시킨다. IL-10은 AD와 잠재적으로 연관된 것으로 조사된 TNF- α , IL-1, IL-6의 효과적인 억제인자이다⁴²⁾.

IL-1 시스템은 IL-1 α 와 IL-1 β 의 작용제, IL-1RA와 같은 내인성 수용체 길항제와 같은 3개의 주요 리간드로 구성된다. 세포내 반응은 IL-1 α 또는 IL-1 β 가 1형 IL-1 신호 수용체에 결합하여 IL-1R accessory protein(IL-1RAcP)에 관계됨으로써 시작되는데 IL-1RA는 선택적이고 경쟁적인 IL-1RAcP에 대한 길항제로서 IL-1RAcP가 IL-1receptor type I(IL-1RI)에 붙지 못하게 자신이 신호 IL-1RI에 결합하며 IL-1 신호를 조절하는 것으로 여겨진다⁴³⁾.

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP⁴⁴⁾를, microglial cell의 가장 특징적인 표식자로 CD68⁴⁴⁾, CD11b⁴⁵⁾를 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 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다^{44,46)}.

痴呆와 관련된 韓醫學 記錄을 살펴보면 《內經》⁹⁾에서는 “血并於上 氣并於下 心煩善怒 血并於下 氣并於上 亂而善忘”라 하여 ‘善忘’이라는 기억력이 감퇴하는 증상을 서술하였고 朱⁴⁷⁾는 “健忘者爲事有始無終言談不知首尾 此以爲病之名 非比生成之愚頑 不能人事也”라 하여 健忘이 언어, 사유장애까지 나타날 수 있고 특히 ‘不能人事’라 하여 정상적인 사회생활에 지장을 초래할 수 있음을 언급하였다. 張¹⁰⁾은 “痴呆症 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮 或以疑貳 或以驚恐而漸致痴呆 言辭顛倒, 舉動不經, ……此其逆氣在心 惑肝膽二經 氣有不清而然”이라고 하여 구체적으로는 언어와 사회, 정서, 감정, 사유기능에 장애가 초래되며 사람에 따라 그 증상이 매우 다양하게 나타난다고 하였다.

陳⁴⁾은 ‘雷公眞君曰 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 …… 呆病內鬱抑不舒 憤怒而成者有之 羞羞而成者有之…’라고 하여 痴呆의 여러 原因과 症狀에 대하여 자세히 거론하였다.

痴呆의 病機는 稟賦不足, 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣

滯血瘀 등이고 治法으로는 補腎益精, 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血 등을 사용한다¹¹⁾.

醒心地黃湯은 心虛熱을 다스리는 醒心散과 腎水不足을 다스리는 六味地黃湯¹²⁾을 합방한 후에 溫脾, 暖腎, 固氣하는 益智仁⁴⁸⁾과 和中緩急, 潤肺, 調和諸藥하는 甘草⁴⁸⁾를 加味한 처방으로 大田大學校附屬韓方病院 癡呆클리닉에서 癡呆나 健忘 등의 증상에 활용하고 있다.

이를 구성하는 약물에 대한 각각의 효능을 살펴보면, 熟地黃은 滋陰補血, 益精補水하고, 山茱萸는 補益肝腎, 滋精固脫하며, 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하며, 白茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心하며, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀하며, 澤瀉는 利水滲濕, 泄熱하며, 人參은 大補元氣, 固脫生津, 安神하며, 麥門冬은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하며, 五味子는 斂肺, 滋腎, 生津, 收汗, 滋精하며, 遠志는 寧心安神, 祛痰利竅, 消散癰腫하며, 白茯苓은 寧心, 安神利水하며, 生地黃은 清熱涼血, 養陰生津하며, 石菖蒲는 化濕開胃, 開竅割痰, 醒神益智하며, 益智仁은 溫脾, 暖腎, 固氣, 滋精하며, 甘草는 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하며⁴⁹⁾. 최근의 연구에서 김 등¹³⁾은 醒心地黃湯이 활성산소의 생성과 노화물질의 축적을 막을 수 있다고 보고하였는데 이를 근거로 醒心地黃湯을 癡呆의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 판단하여 본 연구를 시행하였다.

현재 약물의 제형에 있어서는 당제와 열수추출물 제제를 주로 이용하고 있는데, 한 설문결과에서 당제는 달이는 시간의 소요와 후대의 불편함, 열수추출물 제제는 효과가 저하되거나 지연될 것 같다는 선입견과 복용시 물이 필요한 점이 단점으로 지적되고 있다¹⁴⁾

잘 녹지 않는 약물의 생물학적 유용성을 개선하기 위한 방법이 연구되고 있는데 그중 약물을 분자크기로 축소하는 방법은 약물의 표면면적의 증가를 가져와 흡수성을 높이게 되므로¹⁶⁾ 우수한 효과를 보인다¹⁷⁾. 이러한 장점 때문에 한약제형에 초미세분말을 응용한 연구도 활발히 진행되고 있다^{18,19)}.

이에 저자는 醒心地黃湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 醒心地黃湯의 열수추출물을 시료로 mLFC에서 세포독성을 관찰하고, LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1RA, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, NOS-II, COX-2의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 관찰하였다. 또한 醒心地黃湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였고, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α 발현과 뇌조직에서의 MDA, CD68과 CD11b의 발현 세포수, 뇌조직의 허혈상태를 관찰하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 醒心地黃湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 醒心地黃湯 1, 10, 50, 100, 200 μg/ml 실험군에서 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타났다(Fig. 1).

지금까지 microglial cell을 활성화시키는 가장 효과적인 물질은 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS로, 세포막

수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시켜 각종 cytokine을 분비하도록 하고 염증 및 면역반응을 일으킨다⁴⁹⁾. 활성화된 microglial cell은 IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine과 NO 등의 oxidants를 생산, 분비하며⁵⁰⁾ 이와 같이 분비된 cytokine들은 AD에서 특징적인 senile plaque와 NFT의 발전과 진행에서 중요한 신경독성 변화를 일으킨다⁵¹⁾.

COX-2는 arachidonic acid가 prostanoid로 전환될 때 촉매 작용을 하며 prostaglandine(PGs)을 형성하는 중요한 효소이다⁵²⁾.

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 있다⁵³⁾.

NOS-II(inducible NOS ; iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소로 LPS, TNF-α, IL-1β 또는 IFL-γ에 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 있다⁵⁴⁾.

그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 염증매개의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾.

이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 醒心地黃湯의 열수추출물(100, 50 μg/ml)을 투여한 후, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-1RA, TNF-α, COX-2, NOS-II의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II의 mRNA 발현이 억제되고 IL-10과 IL-1RA mRNA는 발현이 증가하였다(Fig. 2-8).

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정된 결과, IL-1β의 생성량은 모든 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였고 IL-6과 TNF-α의 생성량은 100 μg/ml 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9-11).

이상의 결과로 醒心地黃湯은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있으며, 임⁵⁶⁾의 연구에서 聰明湯과 巴戟天聰明湯이 proinflammatory cytokine의 과잉발현을 억제한다는 결과와 비교해 볼 수 있다.

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 것으로⁵⁷⁾, 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 醒心地黃湯 열수추출물 및 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 step-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, 두 실험모두에서 醒心地黃湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의한 시간의 단축을 보였다(Fig. 4, 5). 이는 김¹²⁾이 제시한 洗心湯이 AD병태모델에 미치는 영향에 대한 연구결

과와 유사하며 醒心地黃湯 역시 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 활용할 수 있다는 것을 시사한다.

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine의 일종인 IL-1β, TNF-α 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 발현이 증가되었으나 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두에서 유의성 있게 억제되었고 초미세분말 실험군과 열수추출물 실험군간 차이는 없었다(Fig. 6, 7).

인체 조직의 산화적 손상과정은 세포막에서 지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어남으로서 진행되는 것으로 알려져 있다⁵⁸⁾. 그러나 미토콘드리아의 기질 및 각 조직에는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPX), glutathione reductase(GRD) 등 산화스트레스(oxidative stress)에 대한 항산화효소들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 전자 전달계에서 생긴 산소 자유라디칼에 대해 어느 정도의 방어력을 유지하고 있고, 비정상적으로 증가하는 산소 자유라디칼이나 ROS의 제거를 위하여 그 생성이 증가하거나 활성도가 높아지는 기전을 통해 항상 손상을 입지는 않는다. 그러나 생체막에서 과도하게 생성된 지질 과산화 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격, 변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실시키고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin이 축적되며, 세포 구성에 손상을 가져와, 결국은 세포를 죽게 만든다⁵⁹⁾.

MDA의 과정은 메틸기(CH₂)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 polyunsaturated fatty acid(PUFA)와 반응할 때 시작된다. 형성된 라디칼은 그들이 다음 단계의 연쇄 반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있다⁶⁰⁾.

이런 점에서 AD 병태 생쥐 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정할 결과 대조군에 비해 醒心地黃湯 열수추출물 및 초미세분말을 투여한 실험군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌 부분에는 neuron, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglial cell등이 많이 침적되어⁶¹⁾ senile plaque과 신경섬유다발 등을 유발하며, senile plaque 주위에는 astrocyte와 microglial cell들이 침착되어 있다. 이를 이루는 세포들 속에는 MAP2, GFAP, CD11b, CD68, βA 또는 tau protein 등이 고밀도로 발현되어 분포하며, proinflammatory cytokine과 ROS도 높은 농도로 축적되어 있다⁶²⁾.

본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 생검하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포 형광분석기로 CD68과 CD11b를 관찰하였는데, CD11b+/CD68+의 세포수는 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보여 醒心地黃湯의 투여로 microglial cell의 활성이 감소했음을 알 수 있다(Fig. 9). 이는 최¹⁹⁾의 연구에서 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CD68과 CD11b의 발현세포수를 억제한 것과 유사하다.

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성도

는 Tacrine을 투여한 양성대조군, 醒心地黃湯 열수추출물 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 열수추출물과 초미세분말 실험군간 유의한 차이는 없었다. 이로써 醒心地黃湯이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키는 효과가 있으리라 판단된다(Fig. 10).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 醒心地黃湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 대조군에 비하여 허혈의 크기가 유의성 있게 감소하였고 초미세분말 실험군과 열수추출물 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 11, 12).

이상의 내용을 총괄해 보면 醒心地黃湯은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, NOS-II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하였고 IL-1 RA와 IL-10의 mRNA는 발현을 증가시켰으며, BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 감소시켰으며, βA로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈고, βA로 유도된 AD 병태 모델 생쥐의 microglial cell에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, TNF-α의 발현을 억제하였고, 뇌조직에서의 MDA, CD68과 CD11b 발현 세포수와 혈청내 AChE를 감소시키고, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상을 개선하였으며, hippocampus에서의 tau protein, GFAP, PS-1,2를 감소시키는 것으로 나타났으며 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말은 모든 실험에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

따라서 醒心地黃湯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 볼 때 특히 精氣不足型 癩癩에 응용할 수 있을 것으로 보며, 醒心地黃湯의 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 유의한 차이는 미미한 것으로 나타나 향후 더 많은 종류의 제형 연구가 필요하리라 사료된다.

결론

醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말이 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

醒心地黃湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, NOS-II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하고 IL-1RA와 IL-10의 mRNA는 발현을 증가시켰다. 醒心地黃湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line 배양상층액의 IL-1β의 생성을 50 μg/ml, 100 μg/ml 실험군에서 유의성 있게 감소시켰고 100 μg/ml 실험군에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 TNF-α, IL-6의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 step-through latency 측정과 distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다. 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말은 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α의 발현을 유의성 있게 억제하였다. 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말

은 AD 병변 뇌조직에서의 MDA와 CD68과 CD11b 발현 세포수를 유의성있게 감소시켰다. 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말은 β A로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다. 醒心地黃湯 열수추출물과 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 醒心地黃湯 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. Oide, T., Kinoshita, T., Arima, K. Regression stage senile plaques in the natural course of alzheimer's disease, neuropathology appl neurobiology, 32(5):539-556, 2006.
4. David, S. Treatment guidelines for alzheimer's disease: redefining perceptions in primary care, primary care companion J clinic psychiatry, 9(2):113-121, 2007.
5. L.T. McGrath. et al. Increased oxidative stress in alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde, Q J medicin, 94: 485-490, 2001.
6. Ramazan Ozcankaya, Namik Delibas. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study, Clinical sciences, 43(1):28-32, 2002.
7. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京, 中國中醫藥出版社, p 125, 1991.
8. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
9. 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, 229, 1985.
10. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
11. 許沛虎 외. 中醫腦病學. 北京, 中醫醫藥科技出版社, pp 464-465, 1998.
12. 黃度淵. 方藥合編. 서울, 남산당, p 165, 1992.
13. 김명진, 이상룡. 醒心地黃湯이 老化 白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 10(2):71-83, 1999.
14. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학, 20(1):356-367, 2004.
15. 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.
16. Moschwitzer, J, Muller. R.H. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals, J Nanosci Nanotechnol, 6(9-10):3145-3153, 2006.
17. Zhong, X.I. Yi Jie, He Xue Bao. Effect of ultra-fine powder

- technique on dissolution rates of andrographolide and dehydroandrographolide in Andrographis paniculata, journal of chinese intergrative medicine 2(6):456-458, 2004.
18. 김현수, 정인철, 이상룡. 洗心湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향 동의생리병리학회지 21(3):688-699, 2007.
19. 최강욱, 이상룡, 정인철. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영., 동의생리병리학회지 20(5):1200-1210, 2006.
20. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院處方集. 大田, 韓國出版社, p 189, 1999.
21. 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.
22. 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.
23. 대한한방신경정신과학회편. 한의신경정신의학. 서울, 집문당, pp 324-333, 2007.
24. 민성길. 최신정신의학. 일조각, pp 189-200, 611-612, 2004.
25. Downen, M., Amaral, T.D., Hua, L.L., Zhao, M.L., Lee, S.C. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. Glia, 28(2):114-127, 1999.
26. Miyazaki, H., Murayama, T., Ono, S., Narita, H., Nomura, Y. EffectsofR(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-N,N-diethyl-amino) ethoxy]ethanol hydrochloride(T-588), a novel cognitive enhancer, on noradrenaline release in rat cerebral cortical slices. Biochem Pharmacol, 53(9):1263-1269, 1997.
27. Gomez-Isla, T., Price, J.L. McKeel, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. J Neurosci, 16(14):4491-4500, 1996.
28. Reznik-Wolf, H., Machado, J., Haroutunian, V., DeMarco, L., Walter, G.F., Goldman, B., Davidson, M., Johnston, J.A., Lannfelt, L., Dani, S.U., Friedman, E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains. J Neurogenet, 12(1):55-65, 1998.
29. Forsell, C., Froelich, S., Axelman, K., Vestling, M., Cowburn, R.F., Lilius, L., Johnston, J.A., Engvall, B., Johansson, K., Dahlkild, A., Ingelsson, M., St. George-Hyslop, P.H., Lannfelt, L. A novel pathogenic mutation(Leu262Phe) found in the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 234(1):3-6, 1997.

30. 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.
31. Gridley, K.E., Green, P.S., Simpkins, J.W. Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-S-H neuroblastoma cells. *Brain Res*, 778(1):158-165, 1997.
32. Kontush, A. Amyloid- β ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1120-1131, 2001.
33. Kourie, J.I. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems; implications for neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 21(3):173-213, 2001.
34. Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., Shea, T.B. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity; role of oxidative stress. *J Neurochem*, 78(2):249-253, 2001.
35. 대한내과학회 편. Harrison's 내과학(5판). 서울, 도서출판 MIP, pp 2466-2467, 2003.
36. William, K. Summers, Tacrine(THA, cognex), *Journal of Alzheimer's Disease*, 2(2):85-93, 2000.
37. 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.
38. William, K., Summers. Tacrine, and Alzheimer's treatments, *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(3):439-445, 2006.
39. 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.
40. Simmons, M.L., Murphy, S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*, 59(3):897-905, 1992.
41. 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.
42. Ramos, E.M. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease, *Archives of neurology*, 63(8):1165-1169, 2006.
43. Oprica, M. Studies on brain volume, Alzheimer-related proteins and cytokines in mice with chronic overexpression of IL-1 receptor antagonist, *J Cell Mol Med*, 11(4):810-825, 2007.
44. 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.
45. Oleg Butosky, et al. Glatiramer acetate fight against Alzheimer's disease by inducing dendriticlike microglia expressing insulin-like growthfactor 1, *Proc Acad Sci U S A*, 103(31):11784-11789, 2006.
46. Rezaie, P., Patel, K., Male, D.K. Microglia in the human fetal spinal cord-patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res*, 115(1):71-81, 1999.
47. 方廣. 丹溪心法附餘. 서울, 대성문화사, p 368, 1982.
48. 康秉秀 외. 本草學. 서울, 永林社, p 649, 650, 1991.
49. 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.
50. 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.
51. Woo M.S. et al. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyl-AMP in BV2 microglial cells, *Molecular Brain Research*, 113(1-2):86-96, 2003.
52. 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.
53. 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.
54. Yen, G.C., Lai, H.H. et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root, *Food Chemistry*, 74: 471-478, 2001.
55. 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.
56. 임정화, 정인철, 이상룡. 聰明湯 과 巴戟天聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 20(4):997-1008, 2006.
57. Yamazaki, M., Matsuoka, N., Kuratani, K., Ohkubo, Y.,

- Yamaguchi, I. FR121196, a potential antimentia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1):256-263, 1995.
58. Nakaya, H., Tohse, N., & Nanno, M. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue, *Am J Physiol*, 253: 1089-1097, 1987.
59. Tappel, A.L. Lipid Peroxidation Damage to Cell Components, *Fed*, 1973.
60. Holley, A.E. and Cheeseman, K.H. Measuring free radical reaction in vivo, *Bri. Med. Bull*, 49(3):494-505, 1993.
61. Troncoso, J.C., Sukhov, R.R., Kawas, C.H., Koliatsos, V.E. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease ; correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 1134-1142, 1996.
62. Love, S., Barber, R., Wilcock, G.K. Increased poly(ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*, 122: 247-253, 1999.