동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 15. No. 2, 2004

木槿皮가 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

최병만, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의학과대학 신경정신과학교실

The Effects of Hibiscus syriacus(HSS) Extract on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT-105 and βA

Byung-Man Choi, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Department of Oriental Neuropsychiatry.
College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

This research investigates the effect of the Hibiscus syriacus(HSS) on Alzheimer's disease.

Specifically, the effects of the HSS extract on (1) IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA of PC-12 cells treated with LPS; (2) amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), and glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cells treated with CT-105; (3) the AChE activity and the APP production of PC-12 cell treated with CT-105; (4) the behavior; (4) expression of IL-1β, TNF-α, IL-1β mRNA, TNF-α mRNA, and reactive oxygen species(ROS); (5) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

The results were summarized below ;

1. The HSS extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA in THP-1 cells treated with LPS.
2. The HSS extract suppressed the expression of APP, AChE, and GFAP mRNA in PC-12 cells treated with CT-105.
3. The HSS extract suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT-105.
4. For the HSS extract group a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by βA in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency, and distance movement-through latency.
5. The HSS extract suppressed the over-expression of IL-1β, TNF-α, IL-1β and TNF-α mRNA, CD68/GFAP, ROS in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
6. The HSS extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

These results suggest that the HSS extract may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the HSS extract for Alzheimer's disease is suggested for future research.

교신저자 : 이상룡 주소 : 충남 천안시 구성동 476-8 대전대학교 부속 천안한방병원
전화 : 041-560-8781 Fax : 041-553-2225 E-mail : 7575np@dju.ac.kr
◆ 접수: 11 / 4 수정: 11/10 채택: 11/15

Ⅰ. 緖 論

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 여러 가지 방면에서 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며[1~6], 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래한다[7].

치매를 일으키는 대표적인 질환인 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며[8], 또, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 microglial 세포와 astrocyte들이 염증반응 싸이토카인을 과다하게 생성하여 뇌의 싸이토카인 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 설이 제기되고 있다[9,10].

또한, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다[11,12].

韓醫學에서 痴呆는 景岳全書[13]에 의해 처음으로 기재되어 있으며, 역대의서에는 주요한 原因을 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등[14~17]으로 보고 있는데, 木槿皮는 性味는 甘·苦, 凉 無毒하고 大腸, 肝, 脾經에 歸하며 淸熱利濕, 活血의 효능[18~20]이 있어 痰火와 瘀血로 인한 痴呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 木槿皮가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木槿皮와 βA를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로 βA보다 강한 허혈을 유발하는 CT-105의 세포독성을 mouse lung fibroblast cells(mLFC)와 PC-12 세포주에서 관찰하고, lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, acetylcholin- esterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) 유전자 발현과 AChE의 활성도, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 싸이토카인과 CD68/GFAP의 발현, reactive oxygen species(ROS)의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 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($MgCl_2$)는 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRas사(Japan)제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.)제품을, RNAzol[B]는 Tel-Test사(U.S.A.)제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.)제품을 그리고, Agarose는 FMC사(U.S.A.)제품을 사용하였고, β-amyloid peptide(Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1β와 anti-TNF-α(Pharmingen, U.S.A.), 그리고 anti-CD44-PE(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, U.S.A

.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(Sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidine affinity column(Invitrogen. U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), stereotaxic frame(Adamec, U.S.A.), CELLection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), brain matrix(ASI instruments, Warren, MI., U.S.A.), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA leader(Molecular device, U.S.A.), CO_2 incubator(Lepco, U.S.A.), Cytometry(BD, U.S.A.), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., U.S.A.), VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.) 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%이라, 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) 약재

본 실험에 사용한 木槿皮(*Hibiscus syriacus*, HSS)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

4) 검액의 조제

木槿皮 200g에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer 냉동고(-84℃)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) in vitro 연구(PC-12 및 THP-1 세포주)

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640{containing collagenase A(5㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15㎎/㎖, Sigma), antibiotics(penicillin 10^4U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

PC-12(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721) 세포주는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였고, THP-1(acute monocytes(ATCC TIB-202; American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) 세포주에서는 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin(100U/㎖), streptomycin(100㎍/㎖) 그리고 10㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO_2인 37℃ 배양기에서 배양하였다.

(2) CT-105 복제

CT-105를 *E. coli*에서 발현 정제하기 위해

APP 105 아미노산을 coding 하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 *Bam* HI site를 넣어주었다. PC-12 세포를 LPS로 자극하고 유전자를 추출하여 reverse transcription- polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다.

증폭된 절편을 *Bam* HI로 절단하여 insert를 취해 6×his·tag을 갖는 pRSET B vector의 *Bam* HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다.

얻어진 발현 벡터를 *E. coli* BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 *E. coli*를 획득하였다.

이 *E. coli*는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트리고 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidine affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT-105를 얻었다.

(3) βA(1~40)

βA는 Calbiochem 회사에서 공급받아 AD 병태 생쥐모델을 만들었고, 그 아미노산 배열은 다음과 같다(Fig. 1).

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

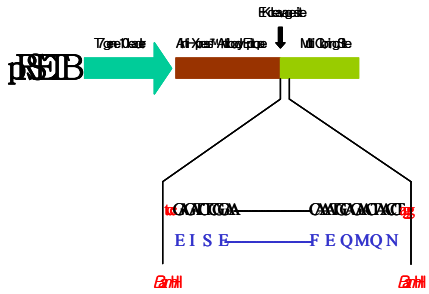


Fig. 1. Sequence of βA(1~40).

(4) 세포독성(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[21]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 자란 것을 Trypsin-EDTA 용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 木槿皮 추출물(최종농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)과 CT-105(최종농도 80μM, 40μM, 20μM, 10μM, 5μM, 1μM)를 72시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한, 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA leader에서 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 약물처리

① PC-12 세포주에서 AD 관련 유전자 발현 분석

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10^6세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 木槿皮 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 CT-105(20μM)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 처리하여 5시간 동안 동시 배양하였다.

② THP-1 세포에서 염증반응 싸이토카인 발현

THP-1 세포주에 LPS(2㎍/㎖)를 동시 처리하여 염증반응 싸이토카인을 유발시켰다. 木槿皮 추출물은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution(HBSS)으로 세척한 후에 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(6) 유전자 발현 분석

① RNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 木槿皮 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM), rIL-1β(100ng/㎖)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol[B] 500㎕를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다.

이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(150mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ 항온수조에서 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 cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행한다.

반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 interleukin-1β(IL-1β), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)-α, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/㎕)와 antisense primer(20pmole/㎕)를 혼합하여 1㎕를 가하고, 다시 3㎕ 2.5mM dNTPs, 3㎕ 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl2), 그리고 0.18㎕ Taq polymerase(5U/㎕)를 첨가한 다음 최종 부피가 30㎕가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation(72℃, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

ⓐ rat APP

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

ⓑ rat AChE

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

ⓒ rat GFAP

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

ⓓ rat G3PDH

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

ⓔ rat IL-1β

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

ⓕ rat IL-6

sence oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'
antisence oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

ⓖ rat TNF-α

sence oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB, U.S.A.)을 이용하여 최고값(height; Ht)으로 측정하였다.

(7) AChE 활성도 측정 및 western blot

① 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 木槿皮 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖, 0.1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20㎛M)와 rIL-1β(100ng/㎖)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM; pH 8.0), 150mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법[22]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

② AChE 활성도 측정

세포성 lysate를 label한 후 sodium chloride solution 0.2㎖와 혼합하였다. 각 tube에 3.0㎖ water, nitrophenol solution 2㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA leader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였다.

③ APP의 immunoblotting 분석

세포 lysate(50㎍)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후 anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4℃에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

2) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력과 microglial 세포의 분석

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 βA 주입

βA(10㎛M)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10㎛M)를 hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽)으로 1.2㎜, midline에서 right로 0.7㎜, 그리고 표면에서 깊이 1.1㎜로 microinjector의 injection speed 0.1㎕/min와 total volume 0.5㎕의 조건으로 수행하였다. βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 양성대조군인 tacrine 투여군(10㎎/㎏)과 木槿皮 투여군(250㎎/㎏)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

② AD 병태 생쥐의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주일간 木槿皮를 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine), 木槿皮 투여군(250㎎/㎏)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

③ 행동관찰

훈련과 木槿皮 투여를 실시한 4주와 8주 후에 AD 병태 생쥐를 Morris water maze에 한마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2).

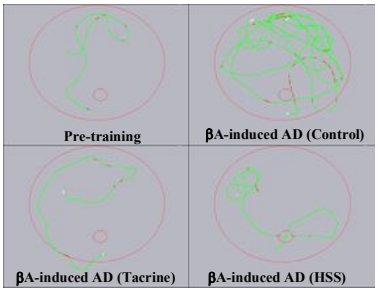


Fig 2. photograph of water maze of βA-induced AD

(2) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

① Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial 세포 분리

8주간의 木槿皮 추출물(250㎎/kg) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 CELLection Pan anti-mouse IgG-bead로 microglial 세포를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

② microglial 세포내 염증반응 싸이토카인 염색법

포집한 microglial 세포를 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 250㎕와 동량의 인산완충용액 (2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정한 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 세포내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 CellQuest 프로그램[23]으로 분석하였다.

③ AD 병태 생쥐의 뇌세포 형광 유세포 분석

AD 유발 생쥐에서 허혈이 일어난 뇌조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1㎎/㎖(in 2% FBS+RPMI 1640)을 넣고 37℃ shaker (1800rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복한다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK 용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD44, FITC-anti- GFAP, FITC-anti-CD68, FITC-anti-CD11b을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD44, 그리고 CD68/GFAP 세포수를 분석하였다.

④ AD 병태 생쥐 뇌조직의 ROS 분석

AD 병태 생쥐의 뇌에서 분리한 $CD14^+$인 Microglial 세포에 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA) 50μM을 처리한 5분 후에 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

⑤ AD 병태 생쥐 뇌조직의 RT-PCR

적출한 뇌조직을 조직분쇄기로 우측 뇌조직(1g)과 $RNAzol^B$ 1000㎕를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 100㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리, 약 300㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 300㎕와 동량혼합한 뒤 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시

13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) AD 병태 생쥐 뇌조직에서 허혈 및 조직손상에 미치는 영향

① 뇌조직의 허혈크기 측정

AD 병태 생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2㎜의 두께로 자르고 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다.

TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈크기의 측정은 Michael의 방법[24]으로 수행하였다.

허혈의 크기(AT)는 $[(A_1/ST_1)+(A_2/ST_2)+(A_3/ST_3)+(A_4/ST_4)]$이고, A는 사진상에 나타난 허혈면적, ST는 각각 section(2㎜)의 전체면적. BH(brain hippocampus)는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈크기는 전체면적의 percent로 표현하였다. 즉, BH부위의 허혈면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH)×100으로 분석하였다.

3) 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법[25]을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 木槿皮와 CT-105에 대한 세포독성

1) mLFC와 PC-12 세포주에서 木槿皮의 세포독성

mLFC의 생존율은 대조군에 비해 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 木槿皮 투여군은 각각 73±5.3(%), 81±4.8(%)로 감소되었으며, PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 木槿皮 투여군은 각각 80±4.8(%), 84±5.2(%)로 감소되었다(Fig. 3).

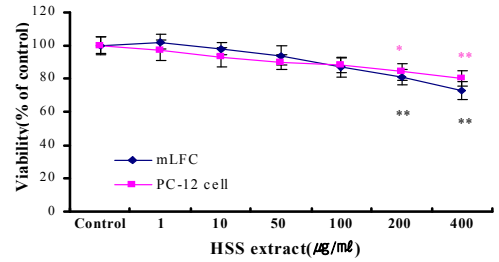


Fig. 3. Cytotoxicity of HSS extract on mLFC and PC-12 cell.

mLFC and PC-12 cell were pretreated with various concentration HSS extract for 72h. The results are expressed the mean±S.E.(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) PC-12 세포주에서 CT-105의 세포독성

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되었다.(Fig. 4).

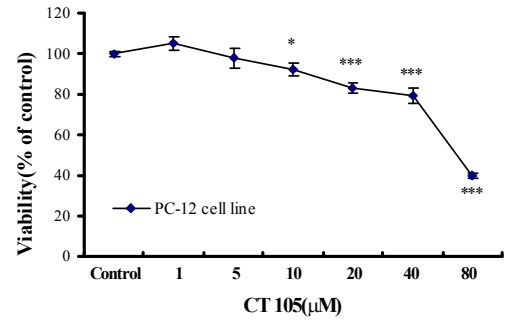


Fig. 4. Cytotoxicity of CT 105 in PC-12 cell.

PC-12 cell were pretreated with 1μM, 5μM, 10μM, 20μM, 40μM, and 80μM of CT105 for 72h. The results are expressed the mean±S.E.(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. THP-1 세포주에서 木槿皮의 염증반응 싸이토카인 유전자 발현 억제효과

THP-1 세포주에서 발현된 염증반응 싸이토카인 중, IL-1β 유전자 발현에 있어서 LPS만을 투여한 대조군이 163(Ht)인데 비해 100μg/mℓ, 10μg/mℓ, 1μg/mℓ의 木槿皮를 투여한 실험군은 각각 18(Ht), 17(Ht), 24(Ht)으로 모두에서 IL-1β 유전자 발현이 억제되었고(Fig. 5),

IL-6 유전자 발현에 있어서는 LPS만을 투여한실험군이 186(Ht)인데 비해 100μg/mℓ, 10μg/mℓ, 1μg/mℓ의 木槿皮를 투여한 실험군은 각각 21(Ht), 19(Ht), 40(Ht)으로 나타나 모두에서 IL-6 유전자 발현이 억제되었으며(Fig. 6),

TNF-α 유전자 발현에 있어서는 LPS만을 투여한 대조군이 162(Ht)인데 비해 100μg/mℓ, 10μg/mℓ, 1μg/mℓ의 木槿皮를 투여한 실험군은 각각 21(Ht), 18(Ht), 76(Ht)으로 나타나 모두에서 TNF-α 유전자 발현이 억제되었다(Fig. 7).

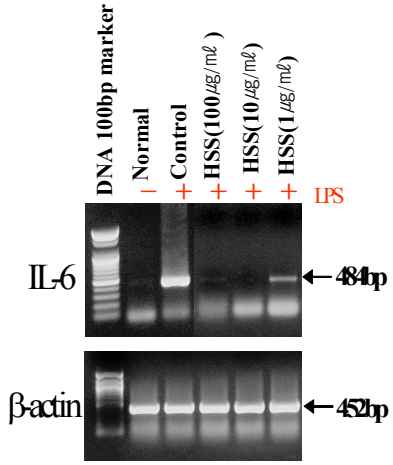


Fig. 6. Inhibitory effects of HSS extract on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell cultures after treatment with LPS.

THP-1 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1μg/mℓ) in the presence of LPS(2μg/mℓ) for 6h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in IL-6 mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell.

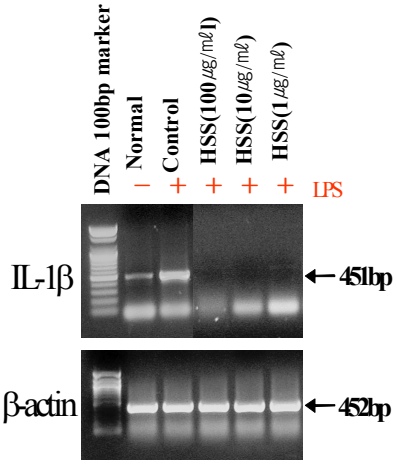


Fig. 5. Inhibitory effects of HSS extract on IL-1β mRNA expression in THP-1 cell cultures after treatment with LPS.

THP-1 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1μg/mℓ) in the presence of LPS(2μg/mℓ) for 6h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in IL-1β mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell.

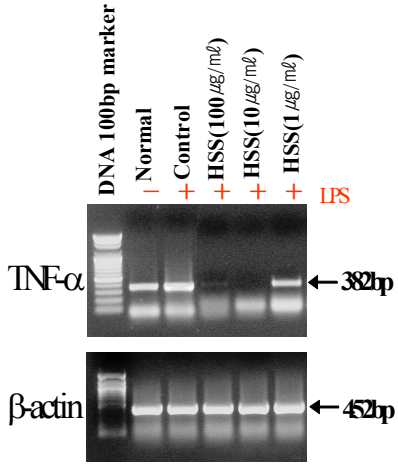


Fig. 7. Inhibitory effects of HSS extract on TNF-α mRNA expression in THP-1 cell cultures after treatment with LPS.

THP-1 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1μg/mℓ) in the presence of LPS(2μg/mℓ) for 6h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in TNF-α mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell.

3. 木槿皮가 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE 활성도에 미치는 억제효과

1) APP, AChE, GFAP 유전자 발현 억제효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 132(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 실험군은 각각 19(Ht), 102(Ht), 97(Ht)으로 나타나 100㎍/㎖의 농도에서 발현이 억제되었고(Fig. 8), AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 147(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 실험군은 각각 32(Ht), 33(Ht), 56(Ht)으로 나타나 농도에 관계없이 발현이 억제되었으며(Fig. 9), GFAP 유전자 발현은 대조군이 203(Ht)인데 비해, 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 실험군은 각각 111(Ht), 157(Ht), 199(Ht)으로 나타나 100㎍/㎖의 농도에서 발현이 억제되었다(Fig. 10).

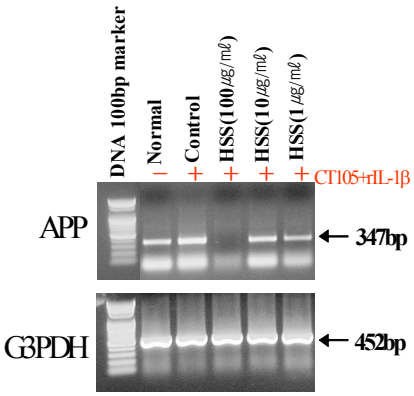


Fig. 8. Inhibitory effects of HSS extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1β.

PC-12 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence of CT105(20μM) plus recombinent IL-1β(100ng/㎖) for 24h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in APP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell.

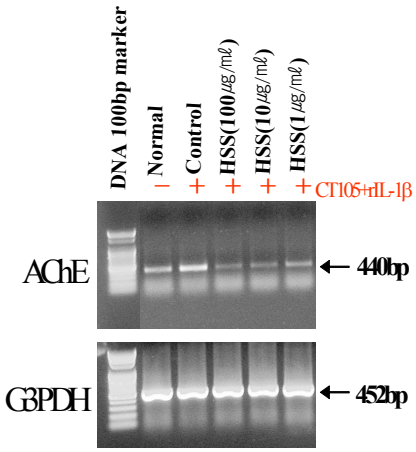


Fig. 9. Inhibitory effects of HSS extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1β.

PC-12 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence of CT105(20μM) plus recombinent IL-1β(100ng/㎖) for 24h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in AChE mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell.

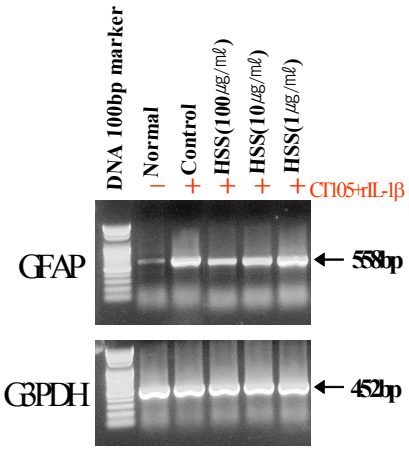


Fig. 10. Inhibitory effects of HSS extract on GFAP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1β.

PC-12 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1㎍/㎖) in the presence of CT105(20μM) plus recombinent IL-1β(100ng/㎖) for 24h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed in GFAP mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell.

2) AChE 활성도와 APP의 immunoblotting 분석

(1) AChE 활성도의 억제효과

AChE 활성도를 측정한 결과, 대조군이 100.0±4.4(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 투여군은 각각 15.3±4.1(%), 25.6±3.2(%), 65.1±5.4(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제효과를 보였다(Fig. 11).

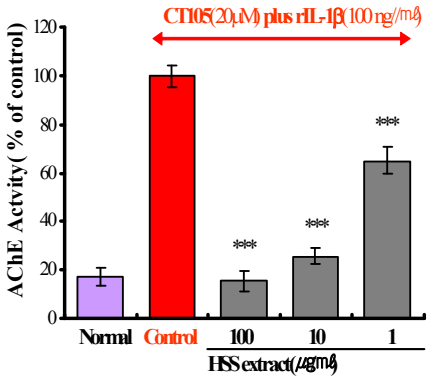


Fig. 11. Inhibitory effects of HSS extract on the AChE activity in CT105 plus rIL-1β stimulated PC-12 cell.

PC-12 cell were pretreated with various concentration of HSS extract(100, 10, 1㎍g/㎖) in the presence of CT105(20μM) plus rIL-1β(100ng/㎖) for 24h. The lysate were measured using AChE diagnostic kits(Sigma). The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Normal was not treated, CT105 plus rIL-1β was control, CT105 plus rIL-1β+HSS(100㎍g/㎖), CT105 plus rIL-1β+HSS(10㎍g/㎖), and CT105 plus rIL-1β+HSS(1㎍g/㎖). Statistically significant value compared with CT105 control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

(2) APP의 immunoblotting 분석

APP를 western blot을 통해 관찰한 결과, 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 투여군에서 유의성 있게 APP 발현이 억제되었다(Fig. 12).

4. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난

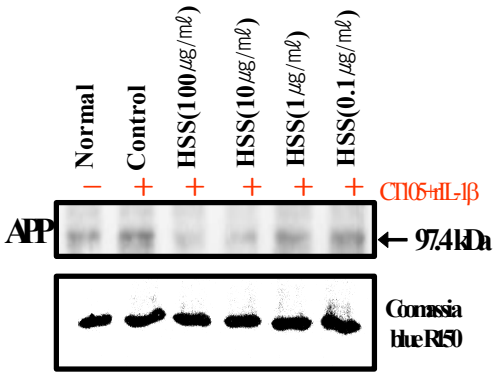


Fig. 12. Suppression effects of HSS extract on APP in PC-12 cell stimulated CT105 plus rIL-1β by western blot analysis.

PC-12 cell were pretreated with various concentration of HSS extract in the presence CT105(20μM) plus rIL-1β(100ng/㎖) for 24h. APP expression was measured by immune western blot assay. Cell lysate(50㎍/lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Lane 1, RPMI-1640 Normal was not treated, Lane 2, control treated with CT105 plus rIL-1β; lane 3, treated with CT105 plus rIL-1β+HSS(100㎍g/㎖); lane 4, treated with CT105 plus rIL-1β+HSS(10㎍g/㎖); lane 5, treated with CT105 plus rIL-1β+HSS(1㎍g/㎖); lane 6, treated with CT105 plus rIL-1β+HSS(0.1㎍g/㎖).

기억력 감퇴 억제효과

木槿皮 투여 4주와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 木槿皮 투여군은 각각 40.7±5.7(sec), 35.1±7.8(sec)로 모두 양성대조군에 비해서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 13).

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 운동성 감퇴효과

약물투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과 木槿皮 투여군은 4주 후 639±152(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 451±182(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내었으나, 양성대조군과는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 14).

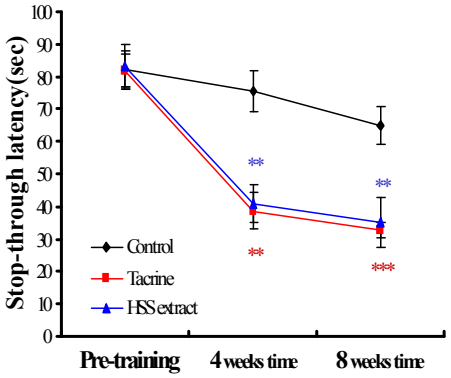


Fig. 13. Effects of HSS extract on the βA–induced Alzheimer's mice with impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 weeks and 8 weeks after orally administered of HSS(250㎎/㎏) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial(pre-training) and injected βA-induced mice. Data represent means±S.E.(N=10). Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250 ㎎/㎏ *p.o.*). **Stop-through latency**; each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with βA -induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

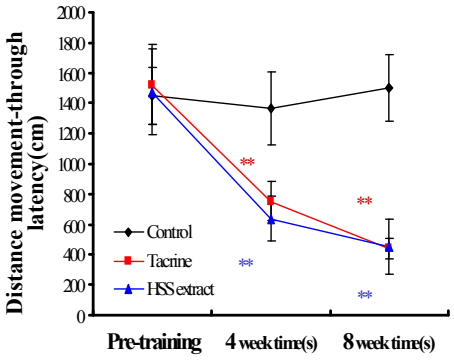


Fig. 14. Effects of HSS extract on the βA-induced Alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract or Tacrin.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 weeks and 8 weeks after orally administered of HSS(250㎎/㎏) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial(pre-training) and injected βA-induced mice. Data represent means±S.E.(N=10). Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250㎎/㎏ *p.o.*). **Lardist**; this is the total distance(in ㎝) covered by the animal in large movement, and **Smldist**; this is total distance covered by the animal in small movement. Data(**Lardist** plus **Smldist**) represent means±S.E(N=10). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5.βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

1) AD 병태 생쥐의 microglial 세포에서 세포내 면역형광염색 결과

(1) 세포내 IL-1β 발현 억제효과

Microglial 세포에서의 IL-1β 발현을 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군이 78.4±6.5(%), tacrine을 투여한 양성대조군이 59.4±4.3(%), 木槿皮 투여군은 46.5±5.3(%)로 나타나 대조군과 양성대조군 모두에 비해 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 15).

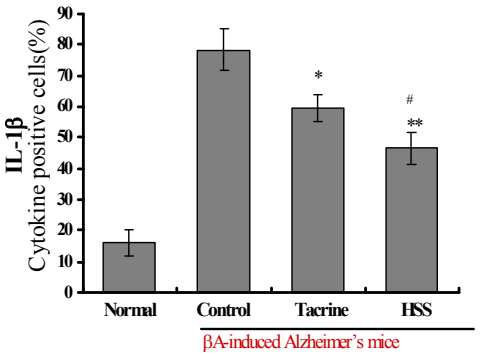


Fig. 15. Intracellular staining of IL- 1β activity on the brain $CD14^+$cells in βA-Alzheimer disease mouse model with or without by the administration of HSS extract.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The intracellular staining IL-1β activity were measured by FACScalibur., the number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model followed by the administration of tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*) and HSS(250㎎/㎏ *p.o.*) for 60 days. Data represent means±S.E.(N=3). Statistically significant value compared with βA -induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Statistically significant value compared with βA -induced Alzheimer's mice group(Tacrine) data by T test(#p<0.05).

(2) 세포내 TNF-α 발현 억제효과

Microglial 세포에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군이 94.5±6.7(%), tacrine을 투여한 양성대조군이 80.5±5.2(%), 木槿皮 투여군은 72.5±4.5(%)로 나타나 대조군에 비해 木槿皮를 함께 투여한 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 16).

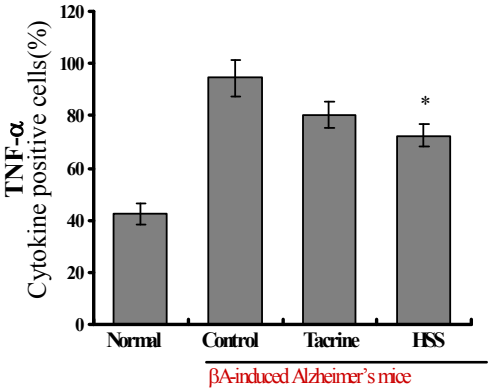


Fig. 16. Intracellular staining of TNF-α activity on the brain $CD14^+$cells in βA-Alzheimer disease mouse model with or without by the administration of HSS extract.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The intracellular staining TNF-α activity were measured by FACScalibur., the number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model followed by the administration of tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*) and HSS(250㎎/㎏ *p.o.*) for 60 days. Data represent means±S.E.(N=3). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

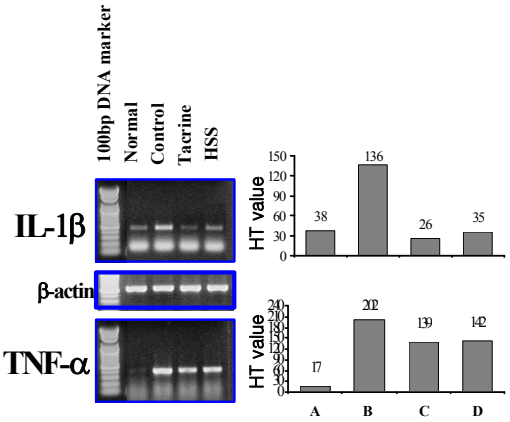


Fig. 17. Effects of HSS extract on the proinflammatory mRNA gene expression in brain tissue in normal and βA-Alzheimer disease mice.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal(**A**, not treated group). βA-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue(**B**, Control). βA-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue + tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*; **C**, Tacrine treated). βA-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue + HSS(250㎎/㎏ *p.o.*; **D**, HSS). Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β-actin) and the analysis(Ht) was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described *in Materials and Methods.*

2) AD 병태 생쥐의 뇌조직에서 IL-1β와 TNF-α 유전자 발현 억제효과

Microglial 세포에서의 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현을 관찰한 결과 IL-1β의 유전자 발현은 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군은 증가하였으나 木槿皮 투여군은 발현이 감소했고, TNF-α의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 木槿皮 투여군은 발현이 감소했다(Fig. 17).

3) AD 병태 생쥐의 CD68/GFAP 발현 세포수 분석 결과

CD68/GFAP의 발현을 관찰한 결과 정상군은 2.30(%), βA를 뇌에 주입한 대조군은 7.58(%)이었고, 양성대조군인 tacrine 투여군은 4.08(%)이었고, 木槿皮 투여군은 4.86(%)로 대조군에 비하여 CD68/GFAP의 발현이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 18)

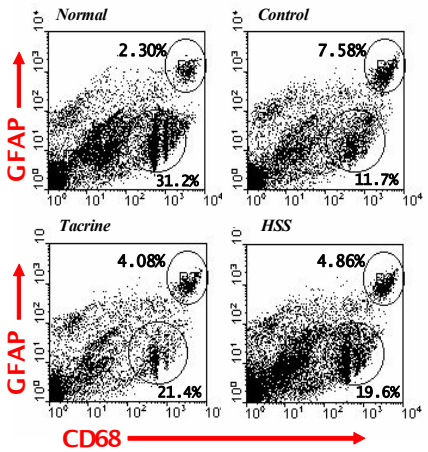


Fig. 18. Effects of HSS extract on the percentage of CD68/GFAP-gated cells in βA-Alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were orally administered of HSS extract and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells($5x10^5$cell/㎖) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, the number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model followed by the administration of tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*) and HSS(250㎎/㎏ *p.o.*) for 60 days. Data represent means±S.E.(N=3). Statistically significant value compared with βA -induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4) AD 병태 생쥐의 ROS 발현 억제효과

정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 木槿皮 투여군에서는 ROS의 생산이 억제되었으며, 양성대조군에 비해서도 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 19).

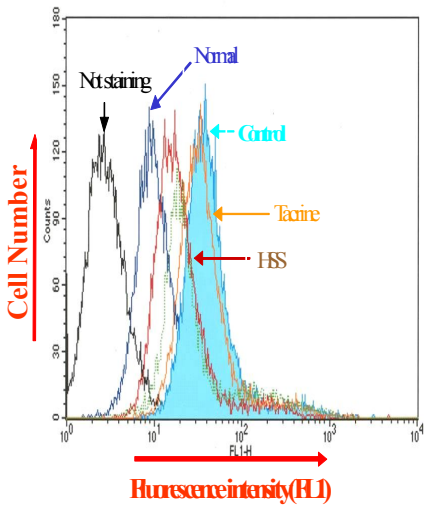


Fig. 19. Inhibitory effects of HSS extract on the ROS production in βA-Alzheimer's disease mouse model with or without by the administration of HSS extract.

The ROS were measured, the number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model followed by the administration of tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*) and HSS extract(250㎎/㎏ *p.o.*) for 60 days. After 5 min cultured, DCFH-DA reagent(50 ㎕) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS production by FACS caliber, and the other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 병태 생쥐의 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 대조군 94±5.8(%), 양성대조군 55±6.8(%), 실험군 47±7.4(%)로 양성대조군에 비해서는 유의성 있는 차이는 없었으나 대조군에 비해서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 20, 21).

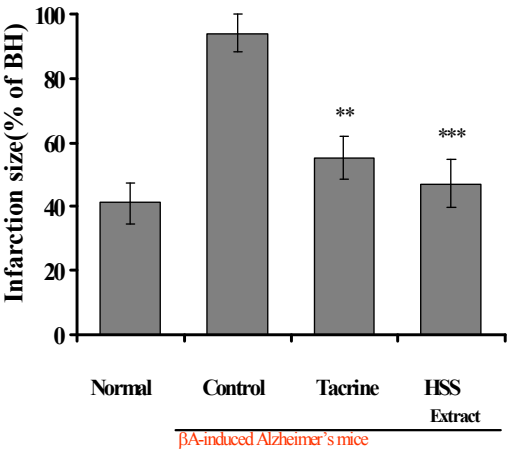


Fig. 20. Effects of HSS extract on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of HSS or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250㎎/㎏ *p.o.*). Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as a percentage of the total area of the LV myocardium that was at risk(see *Methods* for details). Data represent means±S.E.(N=3). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

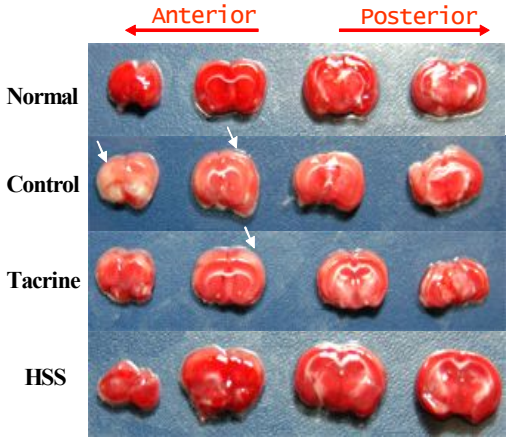


Fig. 21. Effects of HSS extract on the coronal section of βA-induced Alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of HSS or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. Normal C57BL/6 mice was not treated; Control, βA -induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250㎎/㎏ *p.o.*). 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 localizies at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6-12㎜ from frontal pole.

2) AD 병태 생쥐의 조직손상에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고, dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 허혈상태로 hippocampus에서의 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus 등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum이 유도되고, oligodendrocytes-like cells와 astrocytes-like cells가 강하게 나타남을 볼 수 있었으나, 木槿皮 투여군에서는 대조군에서 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cells 등은 보였지만, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 22, 23).

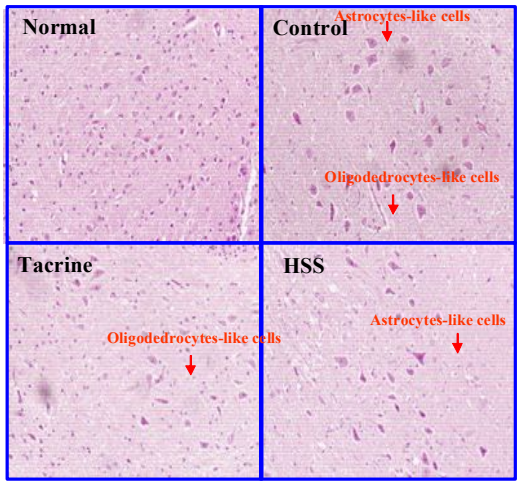


Fig. 22. Histological analysis of brain tissue of βA-induced Alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of HSS or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250㎎/㎏ *p.o.*), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope(Nikon, x100).

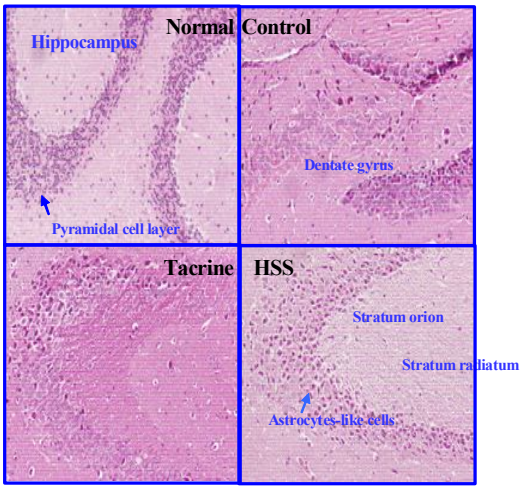


Fig. 23. Histological analysis of brain tissue of βA-induced Alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of HSS or tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10㎎/㎏ *p.o.*); HSS(250㎎/㎏ *p.o.*), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope(Nikon, x100).

Ⅳ. 考 察

痴呆는 여러가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며[1~6], 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래된다[7].

이런 痴呆에는 AD, VD 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로[26], 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[1~3], 발병은 서서히, 경과는 점진적인 것이 특징이다[2].

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[27], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노

인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[28].

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데[29~31], AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonin, GABA 등의 수준이 병적으로 낮아지며[30], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[11,12], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[29,30].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial 세포 등의 신경교세포에서 생성되는 염증반응 싸이토카인에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia 세포가 IL-1, IL-6, TNF 등의 염증반응 싸이토카인들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 싸이토카인 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[16,17,32,33].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴呆[13]', '呆病[14,15]', '健忘[34~37]' 등의 범주에 속하며, ≪景岳全書·癲狂痴獃≫[13]에서 痴呆에 대한 최초의 언급이 있었는데, 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다[13~17].

原因에 대해서는 역대 문헌에서 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 제시되고 있는데[13~17],

木槿皮는 錦葵科에 속한 落葉灌木인 무궁화의 莖皮 혹은 根皮로 性味는 甘·苦, 凉 無毒하고 大場, 肝, 脾經에 歸하며 淸熱利濕, 活血의 효능[18~20]이 있어 痰火와 瘀血로 인한 痴呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 木槿皮가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木槿皮와 CT-105의 세포독성을 mLFC와 PC-12 세포주에서 관찰하고, LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인의 유전자 발현을 관찰하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현과 AChE의 활성도, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 싸이토카인과 CD68/GFAP의 발현, ROS의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(木槿皮)와 처리물질(CT-105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 木槿皮를 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 木槿皮 투여군은 각각 73±5.3(%), 81±4.8(%)로 감소되었으며, PC-12 세포주의 생존율 역시 대조군에 비해 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 木槿皮 투여군은 각각 80±4.8(%), 84±5.2(%)로 감소되었다(Fig. 3).

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타내어(Fig. 4), 이후 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 80% 이상의 생존율을 나타낸 20μM 농도의 CT-105를 주로 처리하기로 하였다.

THP-1 세포주에서 발현된 염증반응 싸이토카인 중, IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자는 대조군에 비해 실험군 모두에서 발현이 억제되었다.(Fig. 5, 6, 7). 이것으로 木槿皮가 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 과잉발현을 감소시켰음을 알 수 있는데, 이는 木槿皮가 AD의 원인 중 하나로 알려진 microglial 세포의 활성화를

효과적으로 억제하는 것으로 추론된다.

PC-12 세포주의 APP, GFAP 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 100㎍/㎖의 木槿皮를 함께 투여한 실험군에서 발현이 억제되었고(Fig. 8, 10), AChE 유전자 발현은 대조군에 비해 실험군은 木槿皮의 농도에 관계없이 발현이 억제되었음을 볼 수 있었으니(Fig. 9), 이는 木槿皮가 CT-105와 rIL-1β로 인해 PC-12 세포주에 과도하게 발현되는 APP, AChE, GFAP를 효과적으로 억제시킨 결과로 노인반 형성에 관여하는 APP, 기억력 장애에 중요한 역할을 하는 AChE, 그리고 astrocyte 활성화의 특징적 표식자인 GFAP를 억제함으로써 AD의 예방과 기억력 감퇴 등의 증상 치료에 기여할 수 있음을 보여준 것으로 사료된다.

AChE 활성도는 대조군이 100.0±4.4(%)인데 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 농도로 처리한 실험군은 각각 15.3±4.1(%), 25.6±3.2(%), 65.1±5.4(%)로 유의성 있는 AChE 활성도 억제효과를 보였는데(Fig. 11), 이를 AChE 유전자 발현 결과와 함께 보면 木槿皮의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 AChE가 억제된 것으로 木槿皮의 투여가 acetylcholine의 양이 증가시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

APP는 western blot을 통해 측정하였는데, 대조군에 비해 실험군에서 농도에 따른 유의성 있는 APP 억제효과를 보였다(Fig. 12). 이를 APP 유전자 발현 결과와 함께 보면 木槿皮의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준 모두에서 APP가 억제된 것으로 木槿皮의 투여가 βA의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써 임상적으로 AD의 예방과 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

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 空間準據記憶을 측정하는 것으로[38], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 木槿皮의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

AD 병태 생쥐모델을 만드는 실험에서 김 등[39~40]의 논문에서와 같이 CT-105를 사용하지 않고 βA를 사용한 이유는, CT-105와 βA는 AD 유발에 원인이 되는 peptide 40개의 아미노산 염기로 이루어져 있는 것으로 CT-105는 cloning과정에서 완전정제가 이루어지지 않아 생쥐의 뇌에 주사했을 때 아주 강한 허혈과 원하지 않은 뇌조직의 뇌세포 활성을 나타내었다. 이에 반하여 βA는 완전 정제 순수단백질로 정확하게 hippocampus 주위에 만들어지는 허혈과 plaque, tangle 등이 사람 AD 환자의 그것과 유사하게 만들어져 *in vivo*인 AD 병태 생쥐에서는 CT-105보다 βA사용이 적절하다고 사료되었으며, CT-105는 *in vitro*에서 rIL-1β와 함께 동시 사용하였다.

木槿皮 투여 4주와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.7±5.7(sec), 35.1±7.8(sec)로 양성대조군에 비해서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여(Fig. 13), 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement-through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 실험군은 4주 후 639±152(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 451±182(㎝)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 운동성 감퇴효과가 있음을 알 수 있었으며, 양성대조군과는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 14).

결국 Morris water maze의 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 실험군이 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 木槿皮를 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있었다.

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial 세포에서의 염증반응 싸이토카인, CD68/GFAP 및

ROS 발현을 관찰하였는데, 먼저 microglial 세포에서의 염증반응 싸이토카인의 일종인 IL-1β 발현과 IL-1β의 유전자 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 증가되었으나 실험군에서는 그 발현이 감소했고(Fig. 15, 17), TNF-α와 TNF-α의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 감소했음을 볼 수 있었으며(Fig. 16, 17), 특히 IL-1β 발현에 있어서 양성대조군보다도 유의성 있는 발현의 감소를 보였다(Fig. 15). 이는 木槿皮가 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 싸이토카인의 활성화를 세포성 단백질 수준과 유전자 수준 모두 효과적으로 억제한 것으로, 木槿皮의 투여를 통해 과잉 생산된 염증반응 싸이토카인으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 생검하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포 형광분석기로 병변부분의 CD68 /GFAP를 관찰하였는데, 이는 astrocyte와 microglia 세포의 표면표지인자인 CD68/GFAP를 관찰하여 astrocyte와 microglia 세포수를 알아본 것으로 대조군에 비하여 실험군이 CD68/GFAP 세포수 감소 결과를 얻었다(Fig. 18). 이는 木槿皮 성분이 BBB막을 통과하였는지 아니면 다른 활성인자로 기인된 것인지는 확인할 수 없었지만 AD 유발 동물의 뇌 병변부위를 이루고 있는 염증세포수가 크게 감소한 결과이고 또한 신경과 뇌세포가 정상으로 회복되었음을 의미하는 것이기도 하다.

microglial 세포내에서의 ROS 발현을 관찰하기 위하여 AD 병태 생쥐의 뇌에서 분리한 $CD14^+$인 microglial 세포에 DCFH-DA 50μM을 처리한 후 5분 후에 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정한 결과, 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 실험군에서는 ROS의 생산이 억제되었으며, 양성대조군에 비해서도 ROS의 생산이 억제되었음을 알 수 있는데(Fig. 19), 이것으로 木槿皮가 ROS로 매개되는 microglial 세포의 활성화를 억제하고 세포내의 과산화 과정을 감소시켜 AD에 대해 예방적 효과를 나타낸 것으로 예측된다.

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 양성대조군에 비하여는 유의성 있는 감소를 나타내지 못했으나, βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 20, 21), 木槿皮가 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 hippocampus 주위에서 정상군과 비교할 때 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes-like cells과 astrocytes-like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 실험군은 대조군에서 뇌의 hippocampus 주위에 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 22, 23), 이는 木槿皮가 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 木槿皮는 LPS를 처리한 THP-1 세포주에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 억제하였고, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP 유전자의 발현과 AChE의 활성도, APP의 발현을 억제하였으며, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 microglial 세포에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현과 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현을 모두 억제하

였고, CD68/GFAP와 ROS의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 木槿皮는 βA의 과다생성, microglial 세포의 염증반응 싸이토카인의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 木槿皮의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結 論

木槿皮가 CT-105와 βA로 유도된 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 木槿皮는 THP-1 세포주의 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자 발현을 억제하였다.

2. 木槿皮는 PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP 유전자 발현을 억제하였다.

3. 木槿皮는 PC-12 세포주의 AChE의 활성도와 APP 발현을 억제하였다.

4. 木槿皮는 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다.

5. 木槿皮는 microglial 세포에서의 IL-1β, TNF-α의 발현과 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현, CD68/GFAP의 발현과 ROS의 생산을 억제하였다.

6. 木槿皮는 뇌조직의 허혈상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 木槿皮는 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 木槿皮의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 金知赫, 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256~71, 327~30.
2. 郭隆璨. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27~31.
3. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87~8, 465~7, 514~8, 600.
4. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1998:138, 216~28.
5. 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울:고려의학. 1992:225~8, 230~2.
6. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울: 고려의학. 1997:199~210.
7. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994:114~32.
8. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1~4.
9. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584~9.
10. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis

factor-alpha. Glia. 1999;28(2):114~27.
11. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(1):187~94.
12. de Vente J, Markerink-van Ittersum M, van Abeelen J, Emson PC, Axer H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain ; effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. Eur J Neurosci. 2000;12(2):507~19.
13. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610~1.
14. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
15. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222~5, 233~5.
16. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京: 學苑出版社. 1993:242~51, 784~91.
17. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378~81.
18. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1991:649~50.
19. 凌一揆. 中藥本草學. 서울:保健新聞社. 1998:793~4.
20. 錢超塵 외. 本草綱目譯釋. 山西: 山西科學技術出版社. 1999:1663~4.
21. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107~12.
22. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302~8.
23. Abu-Absi NR, Zamamiri A, Kacmar J, Balogh SJ, Srienc F. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. Cytometry. 2003;51A(2):87~96.
24. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion ; a murine model. Am J Physiol. 1995;269:2147~54.
25. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177~9.
26. Borchelt DR, Thinakaren G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron. 1996;17:1005~13.
27. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1991;33(5):371~8.
28. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1~4.
29. Kasa P, Papp H, Torok I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinoceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain. Neuroscience. 2003;213:145~9.
30. Miyazaki H, Murayama T, Ono S, Narita

H, Nomura Y. Effects of R(−)−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. 1997;53(9):1263~9.
31. 延炳吉. 치매의 약물요법. 대한의사협회지. 1999;42(10):1010~4.
32. Foster NL, Petersen RC, Gracon SI, Lewis K. An enriched−population, double−blind, placebo−controlled, crossover study of tacrine and lecithin in Alzheimer's disease. Dementia. 1996;7(5):260~6.
33. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor−alpha in glial

cells. J Neurosci. 1999;19(9):3440~7.
34. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學硏究院. 1985:217~8, 229.
35. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學硏究院. 1985:68, 342.
36. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982:129~35, 534, 545, 550.
37. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987:822~5.
38. 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 Phamacol Exp Ther. 1995;272(1):256~63.
39. 김보경, 이상룡. 安神淸腦湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 2001.
40. 정인철, 이상룡. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2001;15(2):260~76.