동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 1, 2006

聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

박지운, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

◆ 투고 : 2/17, 채택 : 3/3
교신저자 : 이상룡 주소 : 충남 천안시 구성동 621 번지 대전대학교 부속 천안한방병원
T디 : 041-521-7575 Fax : 041-521-7005 E-mail : 7575np@dju.ac.kr

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

Ji-Un Park, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental Neuropsychiatry College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : This research investigates the effect of the CMT and MCMT on Alzheimer's disease.

Methods : The effects of the CMT and MCMT extract on (1) amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE) mRNA of PC-12 cells treated with CT-105; (2) the AChE activity and the APP production of PC-12 cell treated with CT-105; (3) the behavior; (4) expression of IL-1β, TNF-α, MDA, GFAP, CD68 abd CD11b; (5) the infarction area of the hippocampus in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Results :

1. The CMT and MCMT extract suppressed the expression of APP, AChE, and mRNA in PC-12 cells treated with CT-105.
2. The CMT and MCMT extract suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT-105.
3. For the CMT and MCMT 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.
4. The CMT and MCMT extract suppressed the over-expression of IL-1β, TNF-α, MDA, GFAP, CD68 abd CD11bCD68/GFAP, in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
5. The CMT and MCMT extract reduced the infarction area of hippocampus with Alzheimer's disease induced by βA.
6. The MCMT showed more excellent effects than CMT in the every experiments except PC-12 cells.

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

Key Words : ChongMyungTang(CMT), ChongMyungTang added Hibiscus syriacus(MCMT), Alzheimer's Disease

Ⅰ. 緖 論

Alzheimer's disease(AD)는 痴呆 중 많은 비율을 차지하는 원인질환으로, 뇌의 전반적 위축 및 특유의 조직학적 소견과 함께, 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며[1], 발병과 경과가 점진적인 것이 특징이다[2].

AD는 β amyloid peptide(βA), apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), 염증, 신경전달물질 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[3,4], 이 중 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[5], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[6], acetylcholine을 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[7,8].

韓醫學에서는 痴呆의 유사한 개념으로 《景岳全書》[9]에 "癡獃"로 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[10,11]으로 보고 있다. 聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》[12]에 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며[13], 또한 木槿皮가 崔의 연구[14]에서 淸熱利濕, 活血의 효능[15]이 있는 약물로 AD 치료와 예방에 효과적이라는 연구로 볼 때, 聰明湯에 木槿皮를 加해 만든 木槿皮聰明湯은 더욱 치매의 치료 및 예방 효과가 좋을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮을 가한 木槿皮聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명, 비교검토해 보고자, 聰明湯, 木槿皮聰明湯과 CT-105의 세포독성을 mLFC(mouse lung fibroblast cells)와 PC-12 세포주에서 관찰하고, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE(acetylcholinesterase) 유전자 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여, Microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α 발현과 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA), GFAP, CD68과 CD11b의 발현 세포수, 뇌조직의 허혈상태의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

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 聰明湯(ChongMyungTang, CMT)의 처방구성은 《東醫寶鑑》[12]을 기준으로 하였고 木槿皮聰明湯(MokGuenPiChongMyung Tang, MCMT)은 聰明湯에 木槿皮 20g을 가미한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of ChongMyungTang(CMT) & MokGuenPiChongMyung Tang(MCMT)

韓藥名	生 藥 名	CMT 用量(g)	MCMT 用量(g)
白茯神	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
木槿皮	Hibiscus syriacus	0	20
Total amount		36g	56g

4) 검액의 조제

聰明湯(36g)과 木槿皮聰明湯(56g)에 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(-84℃)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

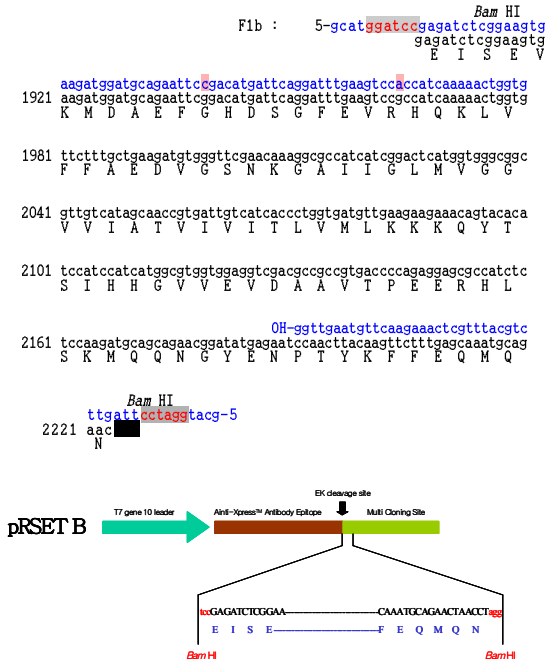
mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640{containing collagenase A(5㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15㎎/㎖, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillin 10^4U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}를 넣고 37℃ 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% 말혈청과 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 넣어 주었다. 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(Table 1).

Table 1. Construction of pRSET-CT105



(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[16]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 세포주는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 자란 것을 Trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물(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 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) PC-12 세포주에서의 유전자 발현 분석

(1) PC-12 세포주에서의 약물처리

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

(2) 유전자 발현 분석

① RNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)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 IL-1β
sense oligonucleotide
5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisense oligonucleotide
5'-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3'

ⓑ rat IL-6
sense oligonucleotide
5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'
antisense oligonucleotide
5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

ⓒ rat TNF-α
sense oligonucleotide
5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

ⓓ rat APP
sense oligonucleotide
5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

ⓔ rat AChE
sense oligonucleotide
5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide
5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

ⓕ rat G3PDH
sense oligonucleotide
5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide
5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

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

3) AChE 활성도 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 聰明湯과 木槿皮聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT-105(20μM)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[17]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 reader로 420㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(3) APP의 western blot 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.

4) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 βA 주입

βA(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10μM)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㎎/kg)과 聰明湯 투여군(216㎎/kg) 및 木槿皮聰明湯 투여군(576㎎/kg)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여 하였다.

② AD 병태 생쥐의 기억력 측정

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 것이다. Morris water maze에서 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다.

선별된 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, tacrine 투여군(10㎎/kg), 聰明湯 투여군(216㎎/kg) 및 木槿皮聰明湯 투여군(576㎎/kg)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실

시한 후, βA(10μM)로 AD를 유발하였다.

AD 병태 생쥐에게 지속적으로 tacrine(10㎎/㎏), 聰明湯(216㎎/㎏) 및 木槿皮聰明湯(576㎎/㎏)을 투여하면서 4주와 8주 후에 AD 유발 생쥐를 Morris water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 관찰하고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2).

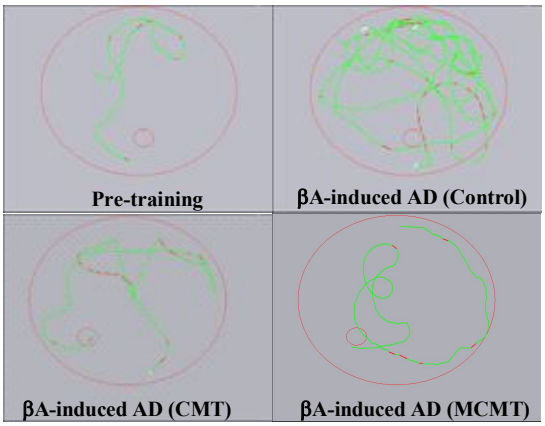


Fig 2. Photograph of water maze of βA-induced AD

5) βA에 의한 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체를 이용한 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 聰明湯 추출물(216㎎/㎏)과 木槿皮聰明湯 추출물(576㎎/㎏) 투여가 종료된 AD 병태 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 CELLection™ Pan anti-mouse IgG-beads로 $CD14^+$ cell을 분리한 후 cell release buffer로 microglial cell만 포집하였다.

(2) Microglial cell 내 proinflammatory cytokines 분석

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284μℓ와 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 microglial cell내 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 유세포형광 분석기로 CellQuest 프로그램을 이용하여 분석하였다.

(3) 뇌조직내 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[18]에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200μℓ를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225μℓ를 가하여 5초 동안 vortex mixer로 mixing했다. 20% acetic acid 1.5㎖을 가하고 75μℓ 증류수를 넣고 5초 동안 vortex mixer로 혼합했다. 1.2% thiobarbituric acid solution.을 각각의 1㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였으며, 532nm의 흡광도에서 측정하였다.

(4) 뇌조직내 GFAP, CD68과 CD11b 세포수 분석

AD 유발 생쥐의 뇌조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1㎎/㎖(in 2%

FBS+RPMI1640)을 넣고 37℃ shaker (1800rpm, 20) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복한다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 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 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD44, 그리고 CD68/GFAP 세포수를 분석하였다.

6) βA에 의한 허혈에 미치는 영향 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개골을 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 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. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법[19]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 허혈 면적, ST는 각각 section(2㎜)의 전체 면적. BH는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다.

7) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation으로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법[20]을 이용하여 통계처리하였고, $p<0.05$수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯과 CT-105의 세포독성

1) mLFC와 PC-12 세포주에서 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성

聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 聰明湯 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 60.4±6.1(%), 75.3±5.4(%), 木槿皮聰明湯 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 42.0±7.3(%), 68.4±5.2(%)로 대조군에 비해 감소되었으며, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군에서는 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

PC-12 세포주의 생존율 역시 聰明湯 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 66.0±5.2(%), 75.3±7.3(%), 木槿皮聰明湯 400㎍/㎖, 200㎍/㎖의 실험군은 각각 62.8±5.5(%), 72.6±6.1(%)로 대조군에 비해 감소되었으며, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 실험군에서는 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 3, 4).

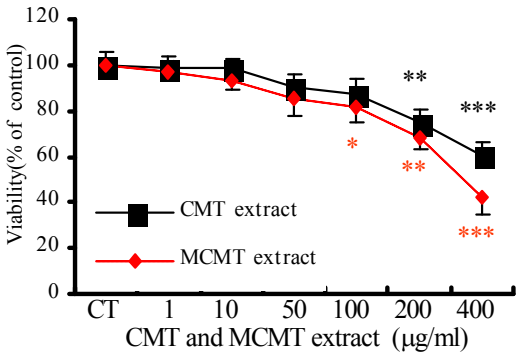


Fig.3. Cytotoxicity effects of CMT and MCMT extract on mLFCs.

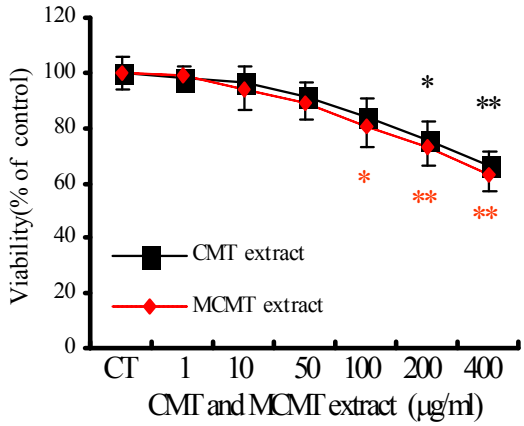


Fig.4. Cytotoxicity effects of CMT and MCMT extract on PC-12 Cell. mLFCs and PC-12 Cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract. The results are expressed the mean±S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) PC-12 세포주에 대한 CT-105의 세포 독성

CT-105를 PC-12 세포주에 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되었으나, 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT-105 투여군은 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 5).

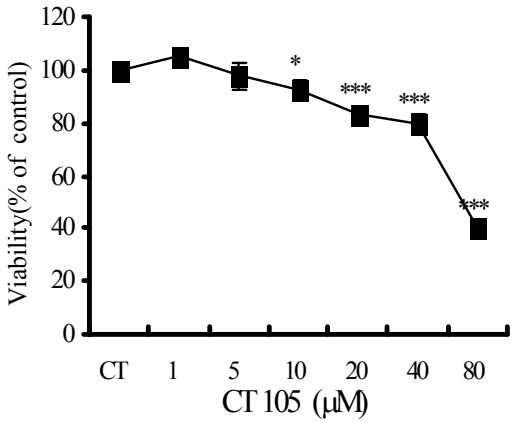


Fig.5. Cytotoxicity of CT105 in PC-12 cell.
PC-12 cell line were pretreated with 1μM, 5μM, 10μM, 20μM, 40 μM, and 80μM of CT105 for 72h. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. PC-12 세포주의 APP, AChE의 유전자 발현 억제 효과

PC-12 세포주의 APP 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 136(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/mℓ, 10μg/mℓ의 실험군은 각각 56(Ht), 117(Ht), 木槿皮聰明湯 100μg/mℓ, 10μg/mℓ의 실험군은 각각 40(Ht), 94(Ht)로 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 6).

AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군이 45(Ht)인데 비해, 聰明湯 100μg/mℓ, 10μg/mℓ의 실험군은 각각 20(Ht), 25(Ht), 木槿皮聰明湯 100μg/mℓ, 10μg/mℓ의 실험군은 각각 18(Ht), 28(Ht)로 모두에서 억제되었다(Fig. 7).

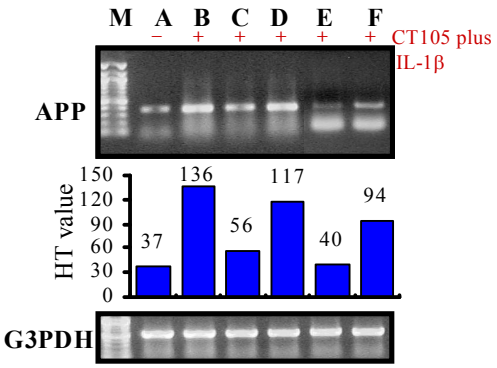


Fig.6. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1β.
Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated wit various concentration CMT and MCMT extract(100, 10㎍/mℓ) in the presence CT105(20 μM) plus recombinent IL-1β(100ng/mℓ) for 6h. APP mRNA express were measured RT-PCR. 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. PC-12 cell line media(A), CT105 20μM plus recombinent IL-1β 100ng/mℓ Control(B), CMT 100㎍/mℓ(C), CMT 10㎍/mℓ(D), MCMT 100㎍/mℓ(E), MCMT 10㎍/mℓ (F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

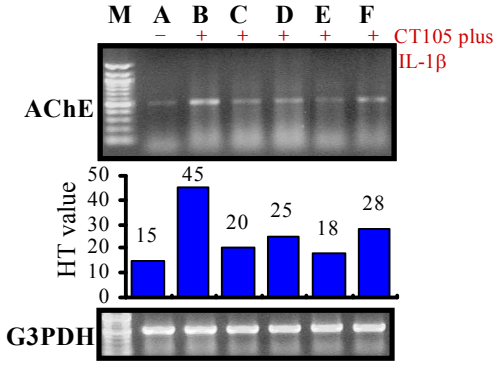


Fig.7. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with CT105 plus rIL-1β. Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated wit various concentration CMT and MCMT extract(100, 10㎍/㎖) in the presence CT105(20 μM) plus recombinent IL-1β(100ng/㎖) for 6h. AChE mRNA express were measured RT-PCR. 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. PC-12 cell line media(A), CT105 20μM plus recombinent IL-1β 100ng/㎖ Control(B), CMT 100㎍/㎖(C), CMT 10㎍/㎖(D), MCMT 100㎍/㎖(E), MCMT 10㎍/㎖(F) and 100bp DNA marker (M). The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell line.

3. PC-12 세포주의 AChE activity와 APP의 발현 억제효과

1) AChE activity 억제 효과

PC-12 세포주에서의 AChE activity를 측정한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군이 100.0±8.6(%)인데 비해, 聰明湯 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군은 각각 68.4±9.5(%), 87.5±5.9(%), 木槿皮聰明湯 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군은 각각 43.4±6.6(%), 75.4±7.2(%))로 聰明湯 10㎍/㎖의 실험군을 제외한 모두에서 발현이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 8).

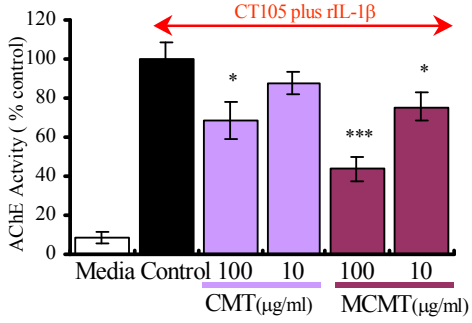


Fig.8. Inhibitory effects of CMT and MCMT extract on the AChE activity in PC-12 cell. PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract(100, 10 ㎍/㎖) in the presence CT105(20μM) plus rIL-1β(100ng/㎖) for 24h.The lysate(100㎕, ㎍/㎖) were measured using AChE diagnostic kits (Sigma). The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Media was not treated, CT105 plus rIL-1b was control, CT105 plus rIL-1b + CMT and MCMT(100㎍/㎖), and CT105 plus rIL-1β + CMT and MCMT(10㎍/㎖). Statistically significant value compared with CT105 plus rIL-1b control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) APP의 발현 억제효과

PC-12 세포주에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, CT-105와 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군 모두에서 발현이 억제되었다(Fig. 9).

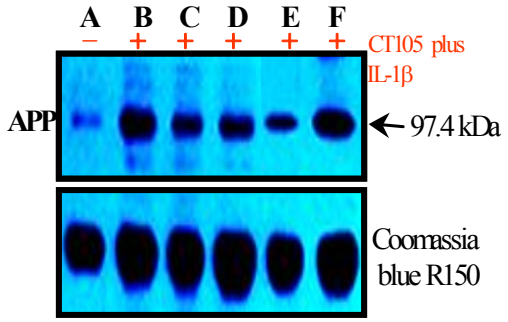


Fig.9. Suppression effects of CMT and MCMT on APP in PC-12 cell by Western blot analysis.
PC-12 cell line were pretreated with various concentration CMT and MCMT extract in the presence CT105(20μM) plus rIL-1β (100 ng/㎖) for 24h, APP expression was measured by immune Western blot assay. Cell lysate(50㎍/lane) were separated by SDS-polyacryamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. RPMI-1640 media control was not treated(A), CT105 20μM plus recombinent IL-1β 100ng/㎖ Control(B), CMT 100㎍/㎖(C), CMT 10㎍/㎖(D), MCMT 100㎍/㎖(E), MCMT 10 ㎍/㎖(F).

4. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

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

약물 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 聰明湯 투여군은 각각 56.4±8.5(sec.), 39.8±7.7(sec.) 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 45.4±5.9(sec.), 28.4±6.8(sec.)로 모두 대조군에 비해 단축을 보였다(Fig. 10).

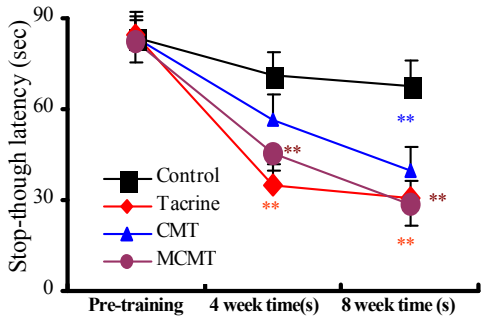


Fig.10. Effects of CMT and MCMT extract on the β-induced Alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT and MCMT extract or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of CMT(216 ㎎/kg) and MCMT(576㎎/kg) 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㎎ /kg , p.o): CMT(216 ㎎/kg p.o): MCMT (576 ㎎/kg p.o). Stop-though 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).

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

약물 투여 4주 후와 8주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 聰明湯 투여군은 각각 1127±176(㎝), 608±140(㎝) 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 633±145(㎝), 347±89(㎝)로 모두 대조군에 비해 거리의 단축을 보였다(Fig. 11).

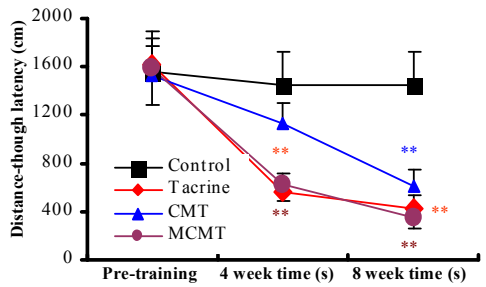


Fig.11. Effects of CMT and MCMT extract on the β-induced Alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT and MCMT extract or Tacrine.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 4 week and 8 week after orally administered of CMT(216㎎/kg) and MCMT(576㎎/kg) 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㎎ /kg, p.o): CMT(216㎎/kg p.o): MCMT(576㎎/kg p.o). Lardist this is the total distance (in cm) 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 뇌세포에 미치는 효과

1) Microglial cell에서의 IL-1β 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1β 발현을 관찰한 결과, 대조군이 75.9±8.1(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 50.4±7.6(%), 聰明湯 투여군은 53.6±5.3(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 34.7±7.3(%)로 나타나 양성대조군과 실험군에서 모두 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 12).

2) Microglial cell에서의 TNF-α 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과, 대조군이 89.5±6.3(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 68.4±5.0(%), 聰明湯 투여군은 65.3±4.8(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 46.7±4.3(%)로 나타나 양성대조군과 실험군에서 모두 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 13).

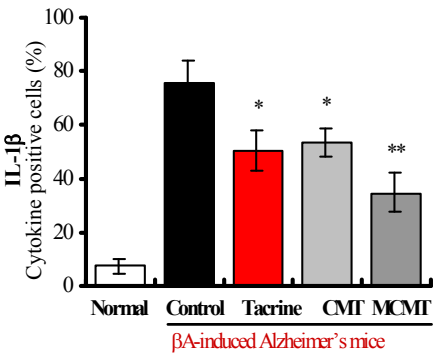


Fig.12. Effects of Intracellular staining of IL-1β activity on the brain CD14+cells in βA-Alzheimer disease mouse model with or without by the administration of CMT and MCMT extract.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg), MCMT (576mg/kg) and tacrine(10mg/kg, p.o) for 60days, continued once a day for 60days. IL-1β activity measured by FACScalibur., 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. Data represent means±S.E(N=3). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control, CT) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

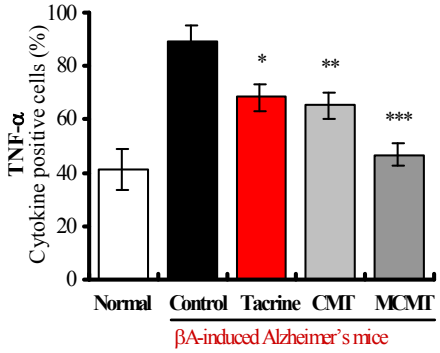


Fig.13. Effects of Intracellular staining of TNF-α activity on the brain CD14+cells in βA-Alzheimer disease mouse model with or without by the administration of CMT and MCMT extract.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg), MCMT (576mg/kg) and tacrine(10mg/kg, p.o) for 60days, continued once a day for 60days. TNF-α activity measured by FACScalibur., 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. Data represent means±S.E(N=3). Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control, CT) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA) 양에 미치는 영향

생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, 대조군이 62.8±8.7(pg/㎎), Tacrine을 투여한 양성대조군이 35.3±6.3(pg/㎎), 聰明湯 투여군은 38.4±6.6(pg/㎎), 木槿皮聰明湯 투여군은 22.2±4.7(pg/㎎)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 14).

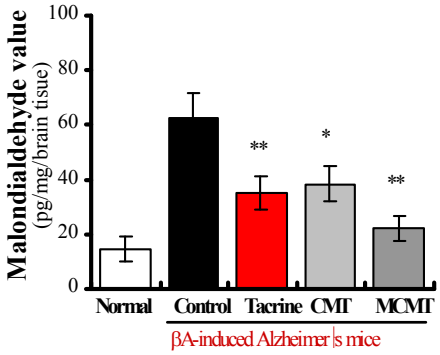


Fig.14. Effect of CMT and MCMT extract on the malondialdehyde value in the brain tissue in βA-Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg), MCMT (576mg/kg) and tacrine(10mg/kg, p.o) for 60 days. Malondialdehyde (MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry, Tissue(mg) in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model. 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) 뇌조직에서의 GFAP 발현 세포수에 미치는 영향

생쥐의 병변 뇌조직에서 GFAP가 발현된 세포수를 관찰한 결과, 생쥐의 병변 뇌조직에서 GFAP이 발현된 세포수를 관찰한 결과 정상군은 1.2(%), 대조군은 81.4(%)이었고, 聰明湯 투여군은 51.3(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 46.5(%)로 대조군에 비하여 감소한 것으로 나타났다(Fig. 15).

5) 뇌조직에서의 CD68과 CD11b 발현 세포수 에 미치는 영향

생쥐의 병변 뇌조직에서 CD68과 CD11b가 동시에 발현된 세포수를 관찰한 결과 정상군은 5.5(%), 대조군은 72.7(%)이였고, 聰明湯 투여군은 41.9(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 29.9(%)로, 대조군에 비하여 감소한 것으로 나타났다(Fig. 16).

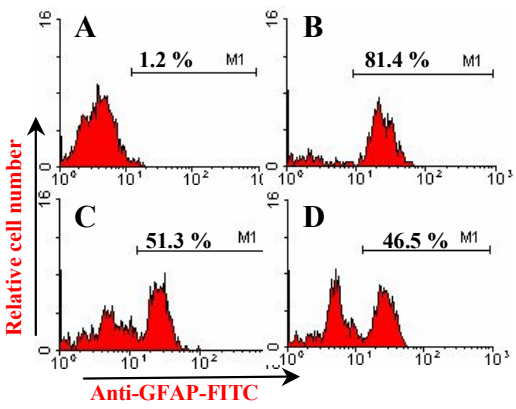


Fig.15. Effects of CMT and MCMT extract on the percentage of GFAP-gated cells in βA-Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg), MCMT (576mg/kg) and tacrine(10mg/kg, p.o) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells(5×105 cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, 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. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and normal brain cells(A), βA-induced Alzheimer's disease model control GFAP+(B), and CMT orally administered GFAP+ (C) and MCMT orally administered GFAP+(D) cell population(%) were measured by analyzed by flow cytometer.

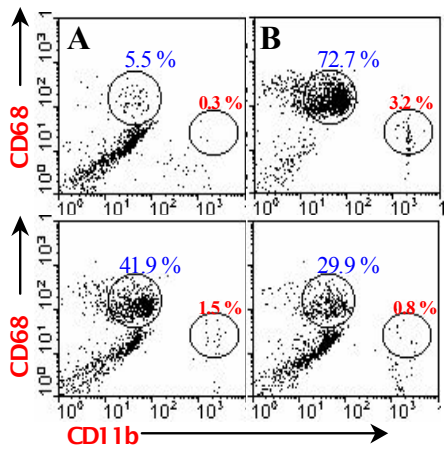


Fig.16. Effects of CMT and MCMT extract on the percentage of CD68 and CD11b-gated cells in βA-Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg), MCMT (576mg/kg) and tacrine(10mg/kg, p.o) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells(5×105 cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, 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. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and normal brain cells(A), βA-induced Alzheimer's disease model control CD68+ and CD11b+(B), and CMT orally administered CD68+ and CD11b+(C) and MCMT orally administered CD68+ and CD11b+(D) cell population(%) were measured by analyzed by flow cytometer.

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과 대조군에서 허혈의 크기가 커진 것에 비해 聰明湯, 木槿皮聰明湯 투여군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 17, 18).

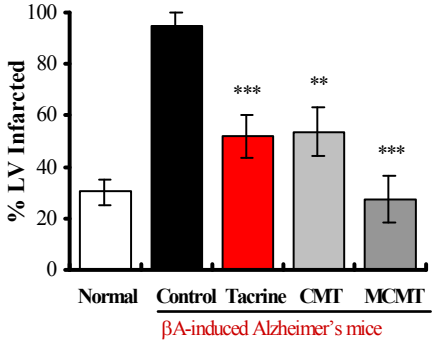


Fig.17 Effects of CMT and MCMT extract on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216mg/kg, p.o), MCMT(576mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice: Tacrine(10mg/kg, 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.18. Effects of CMT and MCMT extract on the coronal section of βA-induced Alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of CMT(216 mg/kg, p.o), MCMT(576 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated. Control, βA-induced Alzheimer's mice: Tacrine(10 mg/kg, 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 mm from frontal pole.

Ⅲ. 考 察

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로[1], 유발 질환에는 AD, 뇌경색, 기타 급성 일산화탄소 중독의 후유증, 두부외상, 알콜중독 등이 있는데, 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로[21], 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며, 발병은 서서히, 경과는 점진적인 것이 특징이다[2]. 증상으로는 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등을 보인다[1].

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[3,4], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[5].

최근에는 APP의 일부분인 CT-105가 βA보다 더 독성이 있다는 보고[22]와, βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고[23] 등, βA와 CT-105의 독성기전에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다[24].

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있으며[4], 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[7,8].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[25]과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[26]이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[27].

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 Barrier가 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[28].

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte 세포의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를, microglial 세포의 가장 특징적인 표식자로 CD68, CD11b를 들 수 있으며, astrocyte와 microglial 세포는 신경교세포로서 염증반응 싸이토카인에 의해 신경세포의 사멸을 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP, CD68, CD11b가 증가하는 경향을 보이는데, 이는 신경교세포인 astrocyte, microglial 세포가 활성화된다는 것을 의미하고 이는 노인반 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다[29].

韓醫學的으로 痴呆는 '呆病'[11], '健忘'[30,31]

등의 범주에 속하며, 痴呆의 관련 症狀으로는 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 등이 기술되고 있으며[10,11], 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 있다[10,11]. 현재 中醫學[11,32]에서는 비록 일관된 치료는 아니지만, AD를 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 주로 肝腎陰虛 心脾兩傷 腎精虧虛 脾腎陽虛로 辨證하여 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 益氣補血 補益腎精 溫補脾腎 등의 治法을 응용하며, 實證으로는 痰火와 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內阻 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 등의 治法을 응용하고 있다.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》[12]에 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 癡呆 등의 병증에 활용되고 있으며[13], 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하며, 淸熱利濕, 活血의 효능[15]이 있어 痰火와 瘀血로 인한 痴呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 木槿皮가 崔의 연구[14]에서 AD 치료와 예방에 효과적이라는 결과로 볼 때, 聰明湯에 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯은 치매의 치료 및 예방 효과가 더욱 좋을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮를 加味한 木槿皮聰明湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고 비교 검토해 보고자, 聰明湯, 木槿皮聰明湯과 CT-105의 세포독성을 mLFC(mouse lung fibroblast cells)와 PC-12 세포주에서 관찰하고, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE(acetylcholinesterase) 유전자 발현과 AChE의 activity, APP의 발현을 관찰하였다. 또한 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여, Microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α 발현과 뇌조직에서의 지질과산화도(MDA), GFAP, CD68과 CD11b의 발현 세포수, 뇌조직의 허혈상태의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 먼저 적당한 실험약물(聰明湯 및 木槿皮聰明湯)과 처리물질(CT-105)의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, 정상생쥐의 mLFC, PC-12 세포주에 각각 다른 농도의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 처리한 후 세포독성을 측정한 결과, mLFC, PC-12 세포주의 생존율 모두에서 대조군에 비해 100 ㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 모든 실험군에서는 80% 이상의 생존율를 나타내었으나, 400㎍/㎖, 200㎍/㎖에서는 mLFC에서 聰明湯 투여군은 각각 60.4±6.1(%), 75.3±5.4(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 42.0±7.3(%), 68.4±5.2(%)로 감소되었으며, PC-12 에서는 聰明湯 투여군은 각각 66.6±5.2(%), 75.3±7.3(%), 木槿皮聰明湯 투여군은 각각 62.8±5.5(%), 72.6±6.1(%)로 감소되었다(Fig. 3, 4). 이러한 결과는 100㎍/㎖이하의 농도로 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 PC-12 세포주에서 생존율이 80% 이상을 나타낸 것으로, 이후의 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 100 ㎍/㎖이하의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 사용하였다.

CT-105를 PC-12 세포주에 72시간 동안 처리한 후의 생존율을 관찰한 결과, 대조군에 비해 20μM, 10μM, 5μM, 1μM의 CT-105 투여군은 큰 변화가 없었고, 80μM, 40μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%)로 감소되어 농도 의존적으로 세포독성을 나타내어(Fig. 5), 이후 PC-12 세포주를 재료로 한 실험에서는 80% 이상의 생존율을 나타낸 20μM 농도의 CT-105를 주로 사용하였다.

PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 聰明湯 및 木

槿皮聰明湯을 투여한 실험군에서 모두 발현이 억제되었으며, 10㎍/㎖ 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 투여군 간의 큰 차이는 없었다(Fig. 6, 7).

PC-12 세포주에서의 AChE 활성도와 APP를 측정하기 위하여 20㎛M의 CT-105와 100ng/㎖의 rIL-1β을 처리한 뒤 서로 다른 농도의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 24시간 동안 처리하여 관찰한 결과, AChE 활성도에서 聰明湯, 木槿皮聰明湯 실험군은 모두에서 AChE 활성도 억제효과를 보였으며, 木槿皮聰明湯이 聰明湯에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 우수한 억제효과를 보였다(Fig. 8).

APP는 western blot을 통해 측정하였는데, 대조군에 비해 실험군에서 농도에 따른 유의성 있는 APP 억제효과를 보였다(Fig. 9).

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[33], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

聰明湯 및 木槿皮聰明湯 투여 4주와 8주 후 stop-through latency와 distance movement-through latency을 관찰한 결과 聰明湯과 木槿皮聰明湯 투여군이 모두 대조군에 비해 시간과 거리의 단축을 보였으며, 木槿皮聰明湯이 聰明湯에 비해 우수한 효과를 나타내었으며, 특히 8주 후에는 木槿皮聰明湯 투여군이 양성대조군인 Tacrine 투여군 보다 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 우수한 효과를 나타내었다(Fig. 10, 11).

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial 세포에서의 염증반응 싸이토카인의 일종인 IL-1β, TNF-α 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 발현이 증가되었으나 실험군에서는 모두 그 발현이 감소했고(Fig. 12, 13), IL-1β, TNF-α 모두에서 木槿皮聰明湯 투여군은 聰明湯 투여군 보다도 유의성 있는 억제 효과를 나타내었으며, 특히 양성대조군인 Tacrine 투여군과 유사한 우수한 효과를 나타내었다.

인체 조직의 산화적 손상과정은 세포막에서 지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어남으로서 진행하는 것으로 알려져 있다[34]. 그러나 미토콘드리아의 기질 및 각 조직에는 Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase 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 자유라디칼과 ROS의 제거를 위하여 그 생성이 증가하거나 활성도가 높아지는 기전을 통해 항상 손상을 입지는 않는다. 그러나 생체막에서 과도하게 생성된 지질 과산화(lipid peroxide)의 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격, 변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin축적, 세포 구성에 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다[35]. 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 지질 과산화(malonedialdehyde, MDA)의 과정은 메틸기(CH_2)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 PUFA와 반응할 때 시작된다. 형성된 라디칼(peroxyl radical)은 그들이 다음 단계의 연쇄 반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있다[36].

이런 배경으로 본 실험에서 AD 병태 생쥐 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정한 결과 대조군에 비해 聰明湯 및 木槿皮聰明湯을 투여한 실험군에서 모두 유의성 있게 감소하였으며

(Fig. 14), 특히 木槿皮聰明湯 투여군은 聰明湯 투여군에 비해 유의성 있는 감소효과를 보였다.

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌 부분에는 neuron, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglia 등이 많이 침적된 특징을 나타낸다[37].

이러한 병변 부위는 plaques와 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 microtubule-associated protein 2(MAP2), GFAP, CD11b, CD68, βA-protein 또는 tau 단백질 등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuron, astrocyte, macrophage 그리고 microglian 등의 세포들의 분화를 나타내는 표지인자(MAP2, GFAP, CD11b and CD68)를 사용하여 확인되었고 또한, 염증유발 싸이토카인(IL-1β, TNF-α) 그리고 ROS도 높은 농도로 축적되어 있다[38].

이러한 배경으로 본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 생검하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포 형광분석기로 병변부분에서 astrocyte 세포의 가장 특징적인 표식자인 GFAP[39]와 microglial 세포의 가장 특징적인 표식자 CD68과 CD11b[40]를 관찰하였는데, 이는 astrocyte와 microglia 세포의 표면표지인자를 관찰하여 astrocyte와 microglia 세포수를 알아본 것으로 대조군에 비하여 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 투여군 모두에서 GFAP, CD68과 CD11b의 세포수 감소 결과를 얻었으며, 木槿皮聰明湯 투여군이 聰明湯 투여군 보다 우수한 세포수 감소 결과를 보였다(Fig. 15, 16).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 17, 18), 聰明湯 및 木槿皮聰明湯이 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났으며, 木槿皮聰明湯 투여군이 聰明湯 투여군 보다 유의성 있는 우수한 억제효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 PC-12 세포주에서 APP, AChE 유전자의 발현과 AChE의 활성도, APP의 발현을 억제하였으며, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 microglial 세포에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현을 억제하였고, 뇌조직에서의 MDA, GFAP, CD68과 CD11b 발현 세포수에 유의성 있는 감소효과를 나타내었으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났다.

또한 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 효과를 비교하여 보면, PC-12 세포주 수준의 *in vitro* 연구에서는 큰 차이를 보이지는 않았으나, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 기억력 감퇴 억제, microglial 세포에서 IL-1β, TNF-α 발현 억제, MDA 감소, GFAP, CD68과 CD11b 발현 세포수 감소, 허혈 크기 감소효과에서는 모두 木槿皮聰明湯이 聰明湯에 비해 우수한 효과를 보였으며, 특히 microglial 세포에서 IL-1β, TNF-α 발현 억제, MDA 감소, 허혈 크기 감소효과에서 木槿皮聰明湯은 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받아 현재 사용되는 tacrine에 비해 우수한 효과를 나타내는 것으로 조사되었다.

따라서 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 βA의 과다생성, astrocyte, microglial 세포등의 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 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료

된다.

V. 結 論

聰明湯 및 木槿皮聰明湯이 CT-105와 βA로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하였다.

2. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 PC-12 세포주의 AChE의 활성도와 APP 발현을 억제하였다.

3. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다.

5. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 microglial 세포에서의 IL-1β, TNF-α의 발현과 뇌조직에서의 MDA 양의 감소, GFAP, CD68과 CD11b 발현 세포수를 억제하였다.

6. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 뇌조직의 허혈상태를 유의성 있게 개선하였다.

7. 木槿皮聰明湯은 PC-12 세포주에서의 실험을 제외한 모든 실험에서 聰明湯에 비해 우수한 효과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 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, 1992.
3. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβ 42 deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med, 1996;2(10):1146-50.
4. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
5. 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.
6. 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.
7. 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. 2000;101(1):89-100.
8. Sramek JJ, Frackiewicz EJ, Cutler NR. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. Expert Opin Investig Drugs. 2000;9(10):2393-402.
9. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
10. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
11. 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.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6.
13. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
14. 최병만 외. 木槿皮가 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 大田大學校大學院. 2003.
15. 康秉秀 외. 本草學. 서울:永林社. 1991:649-50.
16. 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.
17. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302-8.
18. 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.
19. 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.
20. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
21. 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울:고려의학, 1992:225-8, 230-2.
22. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na+/Ca2+ gradients. Neuroreport. 2000;11(15):3357-60.
23. Breakefield XO, Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1987;1(4):339-71.
24. Kourie JI. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. Cell Mol Neurobiol. 2001;21(3):173-213.
25. Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine ; relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Biochim Biophys Acta. 1999;1454(2):143-52.
26. Cheng DH, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. Pharmacol Biochem Behav. 1998;60(2):377-86.
27. Chapman CA, Yeomans JS, Blaha CD, Blackburn JR. Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculopontine nucleus. Neuroscience. 1997;76(1):177-86.
28. 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.
29. Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. Eur Neurol. 2001;46(1):35-8.
30. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:217-8, 229.
31. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306-7.
32. 楊思澎 외. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:224-30.
33. 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.
34. Nakaya, H., Tohse, N., & Nanno, M. Electrophysiological derngements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. Am J Physiol. 1987;253:1089-97.
35. Tappel, A.L. Lipid Peroxidation Damage to Cell Components. Fed. 1973.
36. Holley, A.E., and Cheeseman, K.H. Measuring free radical reaction in vivo, Bri. Med. Bull. 1993;49(3):494-505.
37. Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE. 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. 1996;55:1134-42.
38. Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. Brain. 1999;122:247-53.
39. Zhao W, Bing-sheng L, Alkon DL, Barker JL, Chang YH, Wu M, Rubinow DR. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. Neuroreport. 2000;11(2):409-12.
40. Rezaie P, Patel K, Male DK. Microglia in the human fetal spinal cord--patterns of distribution, morphology and phenotype. Brain Res Dev Brain Res. 1999;8;115(1):71-81.