동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 1, 2007

馬尾連이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

배재용, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의학과대학 신경정신과교실

The Effects of Thalictrum foetidum(TFD) on the Alzheimer's Disease Model

Jae-Yong Bae, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental Neuropsychiatry
College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : This experiment was designed to investigate the effect of Thalictrum foetidum(TFD) on the Alzheimer's disease.

Method : The effects of TFD on amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by amyloid β protein(Aβ) and IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA of THP-1 cell treated by lipopolysaccharide(LPS), AChE activity of PC-12 cell lysate treated by Aβ and behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine, and glucose, AChE in serum of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated, respectively.

Results : The results were summarized as follows ;

1. TFD suppressed APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by Aβ.
2. TFD suppressed IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in THP-1 cell treated by LPS.
3.. TFD suppressed AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by Aβ.
4. TFD increased glucose and decreased AChE significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine.
5. TFD group showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of learning and memory in the experiment of Morris water maze.

Conclusion : According to the above results, it is suggested that TFD might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key Words : Alzheimer's disease, amyloid precursor proteins, acetylcholinesterase, cytokine, *Thalictrum*

투고일 : 2/16 수정일 : 3/14 채택일 : 3/15
교신저자 : 정인철 주소 : 충북 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대학교 청주한방병원 신경정신과
전화 : 043-229-3726 Fax : 031-253-8757 E-mail npjeong@dju.ac.kr

Ⅰ. 서 론

Alzheimer's Disease(AD)는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며[1], 증상으로는 기억력 저하, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화 등을 보인다[2]

AD는 β amyloid peptide(βA), estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants (free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[2], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설로 PS 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins (APP)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 있고[4], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상에 대해서는 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어[5], acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[6~8].

또한, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 proinflammatory cytokines를 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다[9].

한의학에서 痴呆는 《景岳全書·癲狂癡獃》[10]에서 "癡獃"으로, 《石室秘錄》[11], 《辨證奇門》[12]에 "呆病"으로 언급되었으며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있는데[10,11], 馬尾連의 性味는 苦, 寒, 無毒하며 心, 大腸, 肝, 膽經에 歸하며 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어[14,15], 痰火로 인한 AD에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

최근 痴呆에 대한 연구동향을 살펴보면 임상에서 활용되는 여러 複合處方과 單味藥物들이 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향[16,17], AD 病態 모델에 미치는 影響에 대한 연구들[18,19]이 이루어 졌으나 馬尾連에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 馬尾連이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, 馬尾連을 시료로 하여 PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA와 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하였고 PC-12 세포주에서 AChE 활성도를 관찰하였으며, scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, AChE에 대한 馬尾連의 효능을 관찰하였고 Morris water maze를 이용하여 VIDEOTRACK을 통한 생쥐의 행동 변화를 측정한 바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 材料

1) 試藥 및 器機

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit(420-MC), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl

fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly acrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan), 역전사효소(Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A.), RNAzol^{B}는 Tel-Test사(U.S.A.), 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.), Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품 등을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), rotary vaccum evaporator(BUCHI B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, U.S.A.), Bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(molecular devices, U.S.A.) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning co., U.S.A.), VIDEOTRACK(Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 등의 것이 본 연구에 사용되었다.

2) 動物

8주령인 체중 32g 전후의 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명과학연구원에서 분양 받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 藥材

본 실험에 사용한 馬尾連(*Thalictrum foetidum ; TFD*)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

馬尾連 200g에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 馬尾連 추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) mLFC와 PC-12 세포주에 대한 細胞毒性測定

(1) 세포배양

정상 생쥐의 폐 조직 세포(mouse lung fibroblast cell ; mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척, 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.), DNase type I (0.15 ㎎/㎖, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillinm 104U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin

B 25㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양했다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

PC-12(ATCC, CRL1721) 세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 DMEM에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법[20]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. PC-12 세포주와 mLFC는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 馬尾連 추출물(최종 농도 400㎍/㎖, 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB / 1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA 및

THP-1 세포주에서 IL-1β, Il-6,TNF-α mRNA 發顯 分析

(1) 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2×10^6세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 馬尾連 추출물을 100㎍/㎖,과 10㎍/㎖의 농도로 첨가하고 1시간 후 β-amyloid(Aβ) 10μM를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

THP-1(ATCC, TIB-202) 세포주는 acute monocytes로 DMEM 배양액{10% 우태아 혈청, antibiotics(penicillin 100U/㎖, streptomycin 100㎍/㎖, gentamycin 10㎍/㎖)}을 넣고 95% air/5% CO_2인 37℃ 배양기에서 배양한 것에 lipopolysacchride(LPS) 2㎍/㎖를 동시 처리하여 proinflamatory cytokine을 유발시켰다. 馬尾連 추출물은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution(HBSS)으로 세척한 후에 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(2) mRNA 추출

① PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 馬尾連 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)와 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol[B] 500㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치, 13,000rpm에서 원심분리하고, 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 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하

였다. 추출한 RNA는 diethyl pyro-carbonate(DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 120℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) RT-PCR

역전사 반응(Reverse Transcriptase ; RT)은 준비된 total RNA 3㎍을 120℃에서 5분 동안 변성 시키고, 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, 3120mM KCl, 15mM MgCl2)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 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG, Germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 APP, AChE, glial fibrillary acidic protein(GFAP), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF)-α 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 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 $MgCl_2$), 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 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

ⓐ rat APP
sence oligonucleotide
5′-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3′
antisence oligonucleotide
5′-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3′
ⓑ rat AChE
603-910181-77307
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 program을 이용하여 최고값(height ; Ht)으로 측정하였다.

4) PC-12 세포주의 細胞性 蛋白質에서 AChE 活性度 測定

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 馬尾連 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)를 24시간 동시 배양한 후 세포 용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다.

세포 용해액을 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM, pH8.0), 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 원심 분리한 후 Bradford 염색법[21]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포 용해액을 표시한 후 sodium chloride solution 0.2㎖와 혼합하였다. 각 tube에 water 3.0㎖, nitrophenol solution 2.0㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 誘導된 記憶力減退 생쥐 모델의 血液分析

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

10주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 정상군, Tacrine(10㎎/㎏)을 경구투여한 양성대조군, 馬尾連 추출물(98㎎/㎏)을 10일 동안 경구 투여한 실험군으로 나누고, scopolamine(1㎎/㎏)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) Glucose의 측정

혈청 중 glucose치는 자동생화학분석기(Express 550)를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE 활성도 측정

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

6) Scopolamine으로 誘導된 記憶力減退 생쥐 모델의 Moris water maze 實驗

(1) 반복 학습 및 약물 투여

Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는

직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 학습시 ICR계 생쥐가 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다.

선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine 10㎎/kg p.o), 실험군(馬尾連 98㎎/kg p.o)으로 분류하였고, 21일간 계속 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

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

3. 統計 分析

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법[22]을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. mLFC와 PC-12 세포주에 대한 細胞毒性

mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 100㎍/㎖ 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 200, 400㎍/㎖의 실험군은 80±4.9, 74±5.6(%)로 감소를 보였으며, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 100㎍/㎖ 이하의 실험군에서는 큰 변화가 없었고 200, 400㎍/㎖의 실험군에서는 78±5.3, 72±7.2(%)로 감소되었다.

2. PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP mRNA 發顯 抑制 效果

APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 12(Ht)로 나타났고 대조군은 103(Ht)로 나타났으며, 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 37(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 79(Ht)로 나타났다(Fig. 1).

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 64(Ht)로 나타났고 대조군은 189(Ht)로 나타났으며, 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 121(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 125(Ht)로 나타났다(Fig. 2).

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 26(Ht)로 나타났고 대조군은 122(Ht)로 나타났으며, 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 72(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 114(Ht)로 나타났다(Fig. 3).

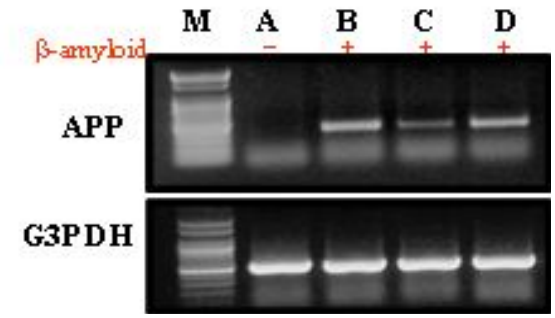


Fig. 1. Inhibitory effects of TFD on APP mRNA expression in PC-12 cell line.

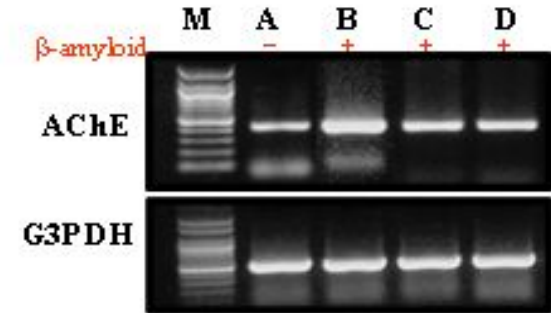


Fig. 2. Inhibitory effects of TFD on AChE mRNA expression in PC-12 cell line.

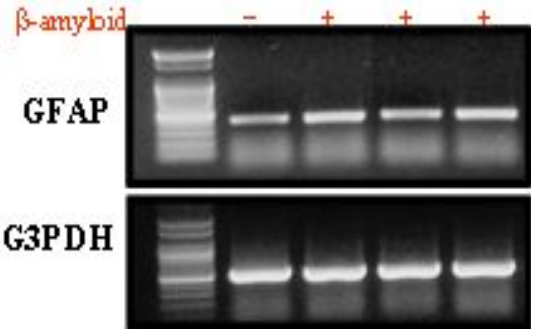


Fig. 3. Inhibitory effects of TFD on GFAP mRNA expression in PC-12 cell line.

3. THP-1 세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현 억제 효과

IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 35(Ht)로 나타났고 대조군은 207(Ht)로 나타났으며 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 112(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 204(Ht)로 나타났다(Fig. 4).

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 18(Ht)로 나타났고 대조군은 182(Ht)로 나타났으며 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 42(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 132(Ht)로 나타났다(Fig. 5).

TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 98(Ht)로 나타났고 대조군은 193(Ht)로 나타났으며 馬尾連 100㎍/㎖ 실험군은 196(Ht), 馬尾連 10㎍/㎖ 실험군은 192(Ht)로 나타났다(Fig. 6).

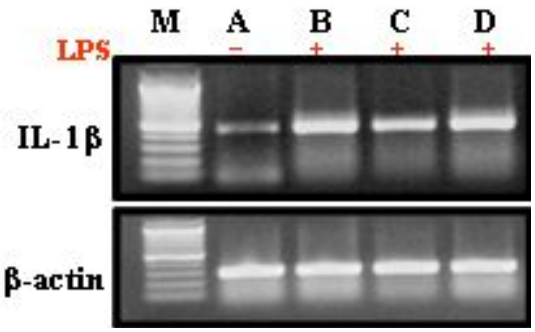


Fig. 4. Inhibitory effects of TFD on IL-1b mRNA expression in THP-1 cell line.

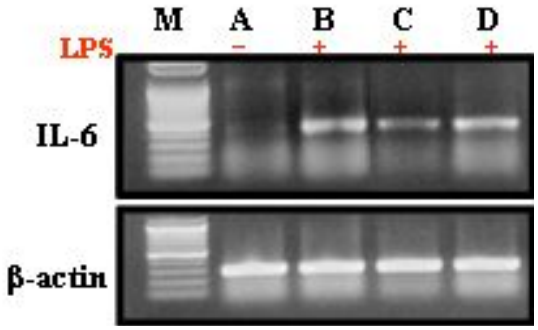


Fig. 5. Inhibitory effects of TFD on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell line.

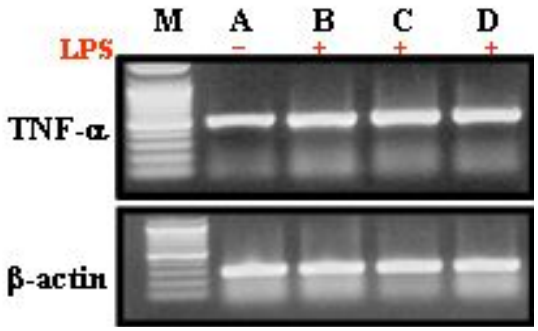


Fig. 6. Inhibitory effects of TFD on TNF-a mRNA expression in THP-1 cell line.

4. PC-12 세포주 細胞性 蛋白質에서 AChE 活性度 抑制 效果

PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도 억제 효과를 본 결과 대조군에 비해 馬尾連을 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖를 투여한 실험군은 각각 46.8±8.9, 68.6±7.0, 97±5.7로 나타나 농도 의존적으로 억제효과를 보였다(Fig. 7).

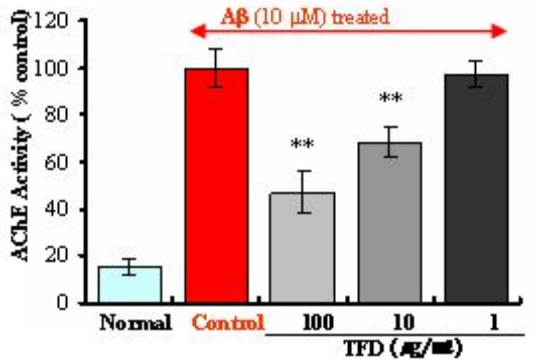


Fig. 7. .Inhibitory effect of TFD on the AChE activity in PC-12 cell line.
Statistically significant value compared with Aβ control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

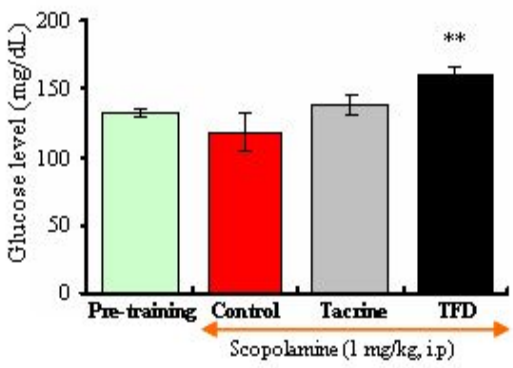


Fig. 8. Effects of TFD on the glucose level of memory deficit mice induced by scopolamine.
Statistically significant value compared with scopolamine only group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. Scopolamine으로 誘導된 記憶力減退 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, AChE에 대한 效果

혈청 중 glucose 수치는 정상군이 123.7±3.0 (㎎/dℓ)이었고, scopolamine을 투여한 대조군은 118.2±14.3(㎎/dℓ)으로 측정되었고 tacrine과 馬尾連을 투여한 실험군은 각각 139.1±7.3(㎎/dℓ)과 160.2±5.6(㎎/dℓ)로 나타나 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8).

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 20.3±3.1(U/㎖)이었고, scopolamine을 투여한 대조군은 78.8±4.8(U/㎖)로 측정되었고 tacrine과 馬尾連 추출물을 투여한 실험군은 각각 26.3±8.0(U/㎖)과 31.8±8.8(U/㎖)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

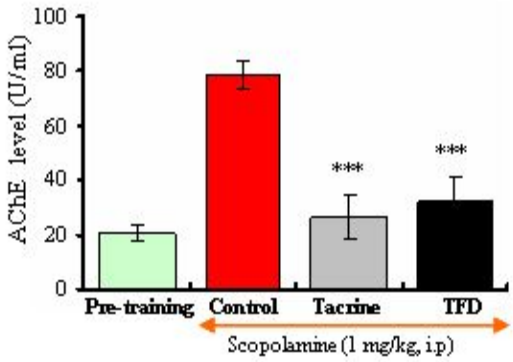


Fig. 9. Effects of TFD on the AChE activity in the serum of memory deficit mice induced by scopolamine.
Statistically significant value compared with scopolamine only group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. Sopolamine으로 誘導된 記憶力減退 생쥐 모델에 대한 效果

1) Stop-through latency 測定에서의 記憶力減退 抑制 效果

Stop-through latency를 관찰한 결과 대조군이 85.0±16.3(sec.)로 나타났고, tacrine 투여군은 17.9±10.3(sec.)로 나타났으며, 실험군은 27.4±3.4(sec.)로 나타나 유의성 있는 단

축을 보였다(Fig. 10).

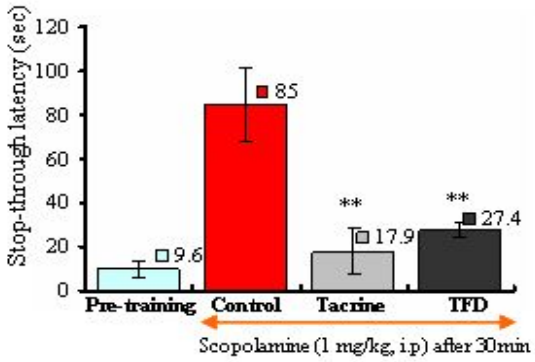


Fig. 10. Effects of TFD on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type Morris water Maze. Statistically significant value compared with scopolamine-induced mice group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Distance movement-through latency 測定에서의 記憶力減退 抑制 效果

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1730±269(㎝)로 나타났고, tacrine 투여군은 451±89(㎝)로 나타났으며, 실험군은 684±138(㎝)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다Fig. 11, 12).

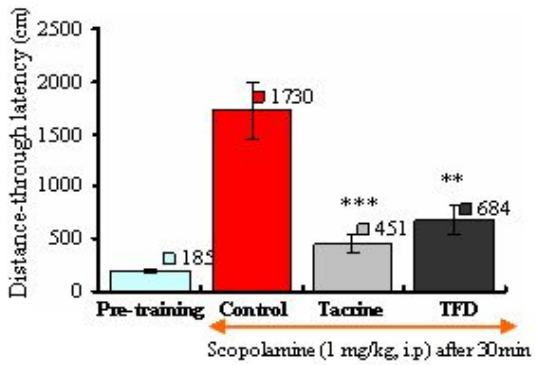


Fig. 11. Effects of TFD on the memory deficits mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze.
Statistically significant value compared with scopolamine-induced mice group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

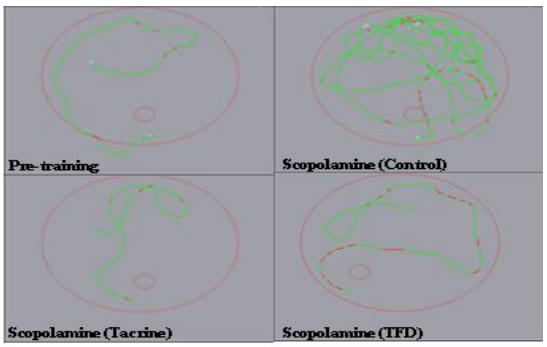


Fig. 13. Photograph on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze

Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Tacrine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and tacrine(10㎎/㎏ p.o).
TFD : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and TFD(98 ㎎/㎏ p.o).
Lardist : The total distance covered by the animal in large movement.
Smldist : The total distance covered by the animal in small movement.

Ⅳ. 고 찰

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 지능저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타낸다.[1,23)]

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[2)], 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 파

괴가 일어난다는 것이다[4].

βA는 β-secretase나 γ-secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로[9], 일부가 잘라져서 비정상적인 공정과정을 거쳐 βA를 만드는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다[24].

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 βA의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 βA가 신경세포를 손상시켜 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. βA는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉬운 상태가 됨으로써 치매의 증상이 유발되는 것이다[25].

또한 최근에는 βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[24], βA의 독성 기전에 대한 연구가 발표되고 있으며, βA의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다[26].

APP는 21번 염색체에 encord되어 있는 단백질으로[27], 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자의 경우 30, 40대에 조기치매 현상을 빈번히 나타내고, 그 환자의 뇌에서 노인반과 신경섬유다발이 발견됨이 보고되고 있는데, 이는 유전자 수가 증가한 효과에 의해 APP가 과도 생성되었기 때문이라고 추측되고 있으며[24], AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되고 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가된다는 보고로 볼 때, APP가 노화와 치매 형성과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[28].

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데[6,7,29], AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonine, GABA 등의 수준이 병적으로 낮아진다[8]. AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[6], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 증거를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[6~8].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[30]과 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[31]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[31].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokines에 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 cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 proinflammatory cytokines들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[9,30].

정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial

cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 microglial cell로 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[9,32], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다[32].

또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 proinflammatory cytokines이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다[33]. 특히 βA가 沈積된 老人癡 주변의 microglial cell은 βA에 의해 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 proinflammatory cytokines을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다[34].

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를 들 수 있는데, AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이며 이는 신경교세포인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 노인반 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다[35].

한의학에서 痴呆는 《景岳全書·癲狂癡獃》[10]에 "癡獃"로, 《石室秘錄》[11], 《辨證奇門》[12]에서 "呆病"으로 언급되었으며, 內經[36]과 歷代醫書[37,38]에서 기억력저하의 증상 면에서 健忘과 유사한 점을 찾을 수 있다.

痴呆는 呆病과 健忘을 근거로 변증되며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻竅, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있고[2,10~12], 증상은 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 등이고, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 언급되고 있다[2].

馬尾連(*Thalictrum foetidum*)은 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)에 속한 다년생식물인 꿩의 다리의 全草와 根을 건조한 것으로, 性味는 苦, 寒, 無毒하며 心, 大腸, 肝, 膽經에 歸하며 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어[14,15], 痰火로 인한 AD에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

이에 著者는 馬尾連의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, 馬尾連을 시료로 하여 PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고 THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 관찰하였으며, scopolamine으로 처리한 생쥐에서의 혈청 내 glucose, AChE를 측정하였으며 역시 scopolamine으로 처리한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 세포주를 분리하여 馬尾連의 세포독성을 측정한 결과, mLFC 및 PC-12 세포주 모두의 생존률에 있어서 대조군에 비해 100㎍/㎖ 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 200, 400㎍/㎖의 실험군은 각각 80±4.9, 74±5.6(%)와 78±5.3, 72±7.2(%)로 감소되었다. 따라서 본 실험에서는 세포독성의 영향을 받지 않는 농도인 100㎍/㎖ 이하의 馬尾連을 使用하여 馬尾連이 AD 유발 인자에 미치는 영향을 살펴보았다.

AD 유발과 관련되어 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 세포주에서 관찰한 결과, APP, AChE, GFAP mRNA 발현에 있어서 10μM의 Aβ만을 처리한 대조군에 비해, 10μM의 Aβ와 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 馬尾連을 함께 투여한 실험군에서 모두 농도 의존적으로

APP, AChE, GFAP의 mRNA의 발현이 억제되었는데(Fig. 2, 3, 4), 이를 통하여 馬尾連은 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

THP-1 세포주는 사람의 monocyte로 LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태를 나타내므로 사람의 microglial cell의 모델로 사용할 수 있고[34] 또한 LPS와 Aβ를 처리한 THP-1 세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다는 것이 보고된 바 있다[39]. 본 실험에서는 THP-1을 LPS로 처리한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 관찰함으로써 馬尾連이 microglial cell의 proinflammatory cytokine 발현에 미치는 억제 효과를 측정한 결과 IL-1β, IL-6 mRNA 발현에서 2㎍/㎖의 LPS만을 처리한 대조군에 비해, 2㎍/㎖의 LPS와 100㎍/㎖, 10㎍/㎖의 馬尾連을 함께 투여한 실험군에서 유전자 발현이 농도 의존적으로 억제되었으나(Fig. 4, 5), TNF-α mRNA 발현에 있어서는 10㎍/㎖의 馬尾連을 투여한 실험군이 대조군에 비해 약간의 억제효과를 보였다(Fig. 6). 이를 통하여 馬尾連이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

PC-12 세포주의 세포성 단백질에서의 AChE 활성도를 측정한 결과 10μM의 Aβ 만을 처리한 대조군에 비해 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 馬尾連을 함께 투여한 실험군에서 모두 농도 의존적으로 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 7), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 馬尾連의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되어, 馬尾連의 투여가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력감퇴를 회복시키는 역할을 하며 이 작용은 choline계와의 기능적인 상호작용으로 이루어지는 것으로 생각되고 있다[40]. 이런 관점에서 馬尾連이 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose 및 AChE에 미치는 효과를 분석한 결과, glucose는 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 증가를 나타내었고(Fig. 8), AChE 활성도는 tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데(Fig. 9), 이로써 馬尾連이 glucose가 유의성 있게 증가되며, AChE의 활성을 억제함으로써 기억력감퇴에 대한 치료효과가 있을 것으로 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 시간의 단축을 보였고(Fig. 10), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데(Fig, 11, 12), 이것으로 馬尾連 투여 후 기억력감퇴가 억제되었음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 馬尾連은 PC-12 세포주에서 유전자 수준에서 APP, AChE, GFAP의 발현과 IL-1β, IL-6의 proinflammatory cytokine의 발현을 억제하였고, 세포성 단백질 수준에서 AChE의 활성을 감소시켰으며, scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose를 증가 시키고, AChE 활성을 억제시켰다. Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

이러한 결과를 종합하면 馬尾連은 기억력 감퇴 및 AD에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

馬尾連이 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였다.

2. THP-1 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 발현을 억제하였다.

3. PC-12 세포주의 세포성 단백질에서 AChE의 활성을 유의성 있게 억제하였다.

4. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내에서 유의성 있게 glucose를 증가시키고, AChE 활성을 억제하였다.

5. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있게 기억력감퇴를 억제시켰다.

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

참 고 문 헌

1. 郭隆璨 . 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, 1992:27~31

2. Whitehouse PJ · Price DL · Struble RG · Clark AW · Coyle JT · Delon MR . Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. Science, 1982;215(4537):1237~9

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. Tabaton M · Cammarata S · Mandybur T · Richey P · Kawai M · Perry G · Gambetti P . Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abmediaities. Brain Res, 1992;593(2):299~303

5. 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

6. Kuhl DE · Koeppe RA · Minoshima S · Snyder SE · Ficaro EP · Foster NL · Frey KA · Kilbourn MR . *In vivo* mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology, 1999;52(4):691~9

7. Costagli C · Galli A . Inhibition of cholinesterase-associated aryl

acylamidase activity by anticholinesterase agents ; focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol, 1998;55(10):1733~7

8. 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
9. 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
10. 張介賓 . 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, 1978:610~1
11. 陳士鐸 . 石室秘錄, 北京, 中國中醫藥出版社, 1991:125
12. 錢鏡湖 . 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, 1990:222~5, 233~5
13. 李經緯, 鄧鐵壽 외 . 中醫大辭典, 北京, 人民衛生出版社, 1998;155
14. 배병철 . 중약대사전, 서울, 강소신의학원, 1982:287-8
15. 박종희, 박성수 . 꿩의 다리의 생약학적 연구, 생약학회지, 1997;30(2): 182-91
16. 金聖賢, 李相龍 . 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 1997;8(2):39~50
17. 鄭仁哲, 李相龍 . 溫膽湯이 腦組織이 酸化作用에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 1997;8(2):51~62
18. 김보경, 이상룡 . 安神淸腦湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향, 東醫生理病理學會誌, 2001;15(5):708~22
19 정인철, 이상룡 . 導痰益氣活血湯이 알츠하이머 질환 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, 東醫生理病理學會誌, 2001;15(2):260~76
20. 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
21. Zor T, Selinger Z . Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem, 1996;236(2):302~308
22. 金宇哲 외 . 統計學槪論, 서울, 英志文化社, 1990:177~9
23. 김지혁 외 . 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, 1992:256~71, 327~30
24. Gomez-Isla T · Price JL · McKeel DW J r · Morris JC · Growdon JH · Hyman BT . Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. J Neurosci, 1996;16(14):4491~500
25. Mattson MP · Guo ZH · Geiger JD . Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. J Neurochem, 1999;73(2):532~7
26. Kim HJ · Suh YH · Lee MH · Ryu PD . Cation selective channels formed by a

C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein. Neuroreport, 1999;10(7):1427~31

27. Racchi M · Johnston JA · Flood FM · Cowburn RF · Govoni S . Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein (APP) gene. Biochem J, 1999;338:777~82
28. Breakefield XO · Geller AI . Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol, 1987;1(4):339~71
29. 延炳吉 . 치매의 약물요법, 대한의사협회지, 1999;42(10):1010~4
30. 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
31. Raskind MA · Sadowsky CH · Sigmund WR · Beitler PJ · Auster SB . Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. Arch Neurol, 1997;54(7):836~40
32. SC Lee · W Liu · DW Dickson · CF Brosnan and JW Berman . Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. The Journal of Immunology, 1993;150(7):2659~67
33. Selmaj K · Shafit-Zagardo B · Aquino DA · Farooq M · Raine CS · Norton W T · Brosnan CF . Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. J Neurochem, 1991;57(3):823~30
34. Stephen LY · Loyd HB · June KA · Joyce MA · Michael DD · Paula BE · Anthony MP · Piorkowski · Kurt RB . Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. J Neurochem, 2000;74(3):1017~25
35. 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
36. 洪元植 . 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學硏究院, 1985;68~70, 79~96, 134~137, 174, 175, 217~8, 229, 241~3, 342
38. 孫思邈 . 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, 1982:129~35, 534, 545, 550
39. Araujo DM, Cotman CW . Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. Brain Res, 1992;569(1):141~5
40. Messier C . The absence of effect of glucose on memory is associated with low susceptibility to the amnestic effects of scopolamine in a strain of mice. Behav Brain Res, 1998;96(1~2):47~57