6. The NYDBT extract reduced the Tau protein, GFAP protein, and presenilin1/2 protein (immunohistochemistry) of hippocampus in the mice with Alzheimer's disease induced by Aβ.

Conclusions : These results suggest that the NYDBT extract may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key Words : NogYongDaeBoTang,(NYDBT), Alzheimer's disease, CT105, Cytokine

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 2, 2007

녹용대보탕이 βAmyloid로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

The Effects of NogYongDaeBoTang,(NYDBT) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT-105 and Aβ

Gyoo-Tae Seo, Eun-Kyung Lee, Chael-Hong Choi, Dae-Kyoo Chung
서규태, 이은경, 최철홍, 정대규
Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University
대구한의대학교 한의과대학 신경정신과 교실

Abatract

Objective : This research investigates the effect of the NogYongDaeBoTang,(NYDBT) on Alzheimer's disease.

Method : The effects of the NYDBT extract on (1) IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA of PC-12 cells treated with LPS; (2) acetylcholinesterase(AChE), amyloid precursor proteins(APP), and glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA 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, IL-1β mRNA, and TNF-α mRNA; (5) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Results :

1. The NYDBT extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA in BV2 microglia cell line treated with LPS.
2. The NYDBT extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α protein production in BV2 microglia cell line treated with LPS.
3. For the NYDBT extract group a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by Aβ in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency, and distance movement-through latency.
4. The NYDBT extract suppressed the over-expression of IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, and CD68/CD11b, in the mice with Alzheimer's disease induced by Aβ.
5. The NYDBT extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by Aβ.

투고일 : 6/7 수정일 : 7/6 채택일 : 7/11
교신저자: 정대규. 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대 부속 대구한방병원
Tel.: 053-770-2178. Fax. : 053-770-2169. E-mail : dkjung55@hanmail.net

I. 緖 論

痴呆는 뇌의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 병적인 뇌 노화 증후군[1,2]으로 뇌의 퇴행성 변화에 의한 Alzheimer's Disease(AD)와 뇌경색등으로 유발된 뇌혈관성 치매 그리고 중독성 치매 등이 있으며, 이중에서 Alzheimer's Disease(AD)가 50%이상 차지하고 있고 여성이 남성에 비해서 2~3배 정도 더 발생하는 것으로 알려져 있다[3].

AD는 뇌의 전반적인 위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하는 인격의 본질적인 면까지 상실되는 질병이다[1-2,4].

AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 Preseniline(PS) 유전자들의 돌연변이와 APP(Amyloid Precursor Proteins)의 과다생성으로 인해 Aβ가 과량으로 만들어지게 되고, 이 Aβ의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며[5], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 Choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어[6], Acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[7-8].

또한, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 미세아교세포와 Astrocyte들이 염증반응 Cytokine을 과다하게 생성하여 뇌의 Cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 細胞毒을 일으킨다는 假說이 提起되고 있다[9].

한의학에서 呆病은 明代 張景岳의 《景岳全書》[10]에 痴獃라는 병명이 언급된 이후 淸代의 《石室秘錄》[11], 《辨證奇聞》[12]등에 呆病의 병인병기와 증상에 관해 기술되었다. 呆病의 증상은 終日悠悠, 忽不言不語, 不食不飮, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 與之所饌則不受, 與之糞則大喜, 與之衣不服, 與之草木之葉大喜 등이며, 실증으로는 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛 등이 있고, 허증으로는 精氣不足, 脾腎虧虛, 氣血虛弱 등이 있으며, 대개 허증은 先天稟賦不足과 기혈이 허약한 것이 많다고 보았다.

녹용대보탕은 明代 李梴의 《醫學入門》[13]에 기재된 방제로 虛勞로 少氣하며 얼굴에 핏기가 없고 정신상태가 우울하며 陽氣가 虛하여 피로를 빨리 느끼며 심신이 쇠약하고 빈혈, 心悸, 시력감퇴 등 일체의 虛損과 久病을 앓고 난 사람에게 쓰는 방제이다.

최근 학의학계에서 치매, 기억장애 등과 관련하여 다수의 문헌적[14-15], 임상적[16-17], 실험적 연구[18-19]가 보고 되었으나, 先天稟賦不足과 虛損에 다용되는 녹용대보탕이 치매에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 녹용대보탕이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 녹용대보탕의 細胞毒性을 mLFC(mouse Lung Fibrast Cells) 세포에서 관찰하였고, LPS(Lipopolysacchride)를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 Cytokine의 유전자 발현을 관찰하였다. 또한 Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 기억 행동변화를 측정하였으며, 역시 Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 Cytokine, 지질과산화도 (MDA)와 CD68/CD11b의 발현을 관찰하여, 뇌조직의 虛血상태, 조직손상의 변화를 면역조직염색법으로 관

찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 機器

본 연구에 사용된 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 sceondary Ab(Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

器機는 spectrophotometer(Shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(Sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japen), histidin affinity column (Invitrogen. U.S.A.), Windows 1D main program(AAB, 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 devise, 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) 등이 본 연구에 사용되었다.

2) 動物

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 Co. Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 藥材

본 실험에 사용한 녹용대보탕(NogYongDaeBoTang, NYDBT)에 사용한 약제는 대구한의대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 녹용대보탕의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of NogYongDaeBoTang (NYDBT) used in this study.

韓藥名	生 藥 名	用 量(g)
肉蓯蓉	Cistanche Deserticola	1.5
杜冲	Eucommia Ulmoides	1.5
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	1.125
白朮	Atractylodes Macrocephala	1.125
附子	Aconiti lateralis Preparat Radix	1.125
人蔘	Panax Ginseng	1.125
肉桂	Cinnamomi Cortex	1.125
半夏	Pinellia Ternata	1.125
石斛	Dendrobium Nobile	1.125
五味子	Schizandra Chinensis	1.125
鹿茸	Cervi Pantotrichum	0.75
黃芪	Astragalus Membranaceus	0.75
當歸	Angelica Sinensis	0.75
白茯苓	Poria Cocos	0.75
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	0.75
甘草	Glycyrrhiza Uralensis	0.375
	Total amount	15.125g

4)檢液의 調製

녹용대보탕에 각각 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

I. in vitro 연구

1) Aβ(1-40)

Aβ는 AD 환자의 뇌에서 senile plaques 와 diffuse deposits를 주로 유도하는 것으로 알려졌다. Calbiochem 회사에서 공급받아 AD 病態 생쥐모델을 만들었고, 그 아미노산 배열은 다음과 같다 (Table. 2).

Table. 2. Sequence of Aβ(1~40).

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

2) mLFC 세포에 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 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 cornical 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 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 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.

BV2 microglia (immortalized murine cell line) 세포주는 미세아교세포의 phenotypic과 functional을 모두 갖춘 세포주로 Tong H. Joh (Burke Institute, Cornell University, NY,

USA)으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

3) BV2 microglia 세포주에서 pro - inflammatory 및 anti - proinflammatory cytokine mRNA 發顯에 대한 Quantitative real - time - PCR 分析

(1) 약물처리

BV2 microglia 세포주는 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 녹용대보탕 추출물을 100㎍/㎖, 50 ㎍/㎖과 10㎍/㎖의 농도로 첨가하고 1시간 후 lipopolysacchride (LPS) 0.1㎍/㎖를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하여 proinflamatory cytokine와 anti - inflamatory cytokine의 유전자 발현을 유도하였다.

(2) BV2 microglia 세포주에서 RNA 분리

먼저 BV2 microglia 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 녹용대보탕 추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (0.1 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가한 후 6 시간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^B 500㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다.

이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 세척하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75 ℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I (10U/㎕) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/ 25㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer (250mM 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 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

사용된 primers는;

① mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)
Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

② mouse TNF-alpha
Forward Primer:5'
CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer:
5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'

③ mouse IL-6
Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

④ mouse IL-1beta

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
⑤ mouse COX-2
Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
⑥ mouse NOS-II
Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

염증cytokine 및 항염증cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50 ℃, 10 min 94 ℃, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 ℃, 1 min at 60 ℃에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

y = x(1+e)n
x = starting quantity
y = yield
n = number of cycles
e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

4) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

BV2 microglia 세포주를 96 well plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 녹용대보탕 추출물을 (100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖) 처리하고 1시간 후 LPS (0.1㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonylamide in 5% H_3PO_4)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100㎕를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) BV2 세포주 배양상층액내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglia세포주를 실험 3일전에 subculture (1×10^5cells/㎖) 하여 96 well plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 녹용대보탕 (100 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (0.1 ㎍/ml)를 각각의 well에 첨가한다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 녹용대보탕 (100 ㎍/㎖)을 처리하고 48 시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 종료후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100㎕ (1/100 dilution)씩 분주하한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 暗所에서 30분간 방치한 후 100㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

II. Aβ에 의한 AD 病態 생쥐 모델의 기억력과 미세아교세포의 분석

1) AD 病態 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

(1) 녹용대보탕 검액제조

녹용대보탕를 증류수 녹여 생쥐에 1주일에 3회 400mg/kg과 200mg/kg으로 경구투여 하였다.

(2) C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 Aβ 주입

Aβ(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과

xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 病態 생쥐 모델을 만들기 위하여 Aβ(10μM)를 Hippocampus에 주입하는 데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽으로) 1.2㎜, midline에서 right로 0.7㎜, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1㎜로 microinjector의 injection speed 0.1㎕/min와 total volume 0.5㎕의 조건으로 수행하였다. Aβ 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 陽性對照群인 tacrine 投與群(10㎎/㎏), 녹용대보탕 投與群(400, 200 ㎎/㎏)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

(3) AD 病態 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 病態 생쥐는 8주일간 녹용대보탕을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 對照群, 陽性對照群(tacrine), 녹용대보탕 投與群(400, 200 ㎎/㎏)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(4) 행동 관찰

훈련과 녹용대보탕을 투여후 4주와 8주 후에 AD 유발생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다.

2) AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 미세아교세포 분리

8주간의 녹용대보탕 投與群(400, 200 ㎎/㎏) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. Brain을 작은 조각으로 절단한 후 cornical 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-bead로 미세아교세포를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

(2) 미세아교세포내 염증반응 cytokine 염색법

포집한 미세아교세포를 ice - cold FACS 완충용액 (0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 세척하고, FACS 완충용액 284㎕와 동량의 인산완충용액 (2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice - cold FACS 완충용액으로 세척하고, 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 permeabilization완충용액으로 3회 세척하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 마아크로글리아 세포내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[20]에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 가하고 5초동안 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5㎖을 가하고 그리고 75ul 증류수를 넣고 5초동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% Thiobarbituric

acid solution을 각각의 tube에 1㎖씩 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 532nm에서 흡광도를 측정하였다

(4) AD 病態 생쥐의 뇌세포 형광 유세포 분석

AD 유발 생쥐에서 虛血이 일어난 뇌조직을 잘게 chopping한 후 cell strainer (BD, Falcon)에 넣고 3ml sylinge rubber로 뇌조직을 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수한다. 회수된 부유액을 Hypaque-1077 (Sigma) 5ml과 뇌세포 부유액 5ml을 gradient를 만든 다음 2000 rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 buffy coat 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE - anti - CD68, 그리고 FITC -anti-CD11b을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 세척한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD68 세포수를 분석하였다.

3) 혈청단백질 함량의 측정

혈청중 glucose, AST, Total chololesterol, HD-cholesterol치는 자동생화학분석기 (Biochemical analyzer, Express 550)를 사용하여 측정하였다 (Table 3).

Table 3. Abbreviation Units and Analysis Method of the Items

Abbreviation	Full name	Unit	Method
	Serum biochemistry		
Glucose	Glucose	mg/㎗	Biochemical analyzer
AST	Aspartateamino-transferase	mg/㎗	Biochemical analyzer
T-Chol.	Total cholesterol	mg/㎗	Biochemical analyzer
HD-Chol.	High density cholesterol	mg/㎗	Biochemical analyzer

4) AChE 활성도 측정

AChE (Acetylcholinesterase) 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 첨가하였다. Acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 ΔA = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다

5) AD 病態 생쥐 뇌조직에서 虛血 및 조직손상에 미치는 영향

(1) 뇌조직의 虛血 크기 측정

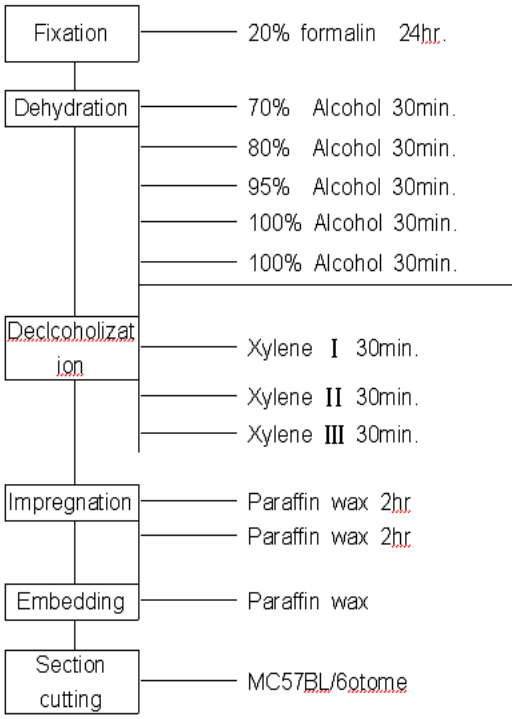
AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 brain matrix를 이용하여 2㎜의 두께로 자른후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 虛血된 부분은 염색이 되지 않는다. 虛血 크기의 측정은 Michael의 방법[21]으로 수행하였다. 虛血의 크기(AT)는 $[(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]$이고, A는 사진상에 나타난 虛血 면적, ST는 각각 section(2㎜)의 전체 면적, BH(brain Hipocampus)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 虛血 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 虛血 면적(LV)은 (AT of area at

risk/*ST* of BH) x 100로 분석하였다.

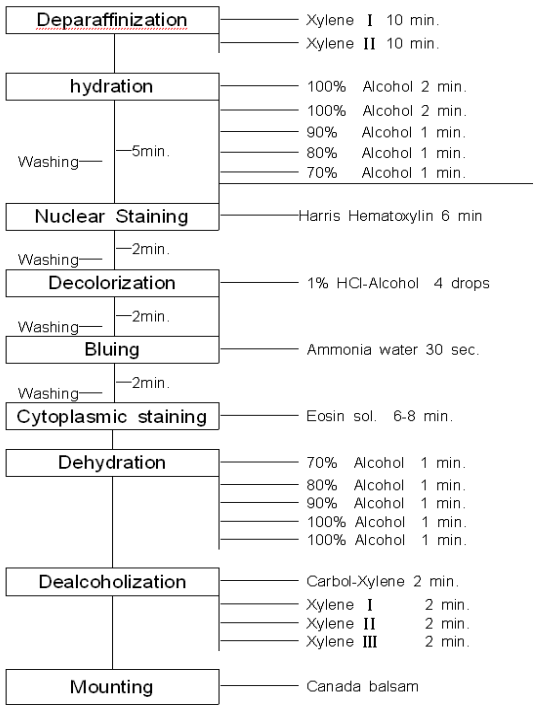
(2) 병리조직검사

분리된 AD 病態 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의 scheme 1과 같은 과정을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining



(3) 면역화학조직염색 (immunohistochemical stainins)

분리된 AD 病態 생쥐의 뇌를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 조직절편을 6 ㎛ 두께로 세절한 후 probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 (Deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전 처리하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다.

㉠ Tau protein

Primary mouse Tau Ab를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 세척하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 3회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA)용액으로 세척하였고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 세척하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색 후 2회 세척하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 세척하여 permount를 수행하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

㉡ GFAT와 preserillin 1,2 protein

Primary mouse GFAT Ab(1:400)와

preserillin 1,2 Ab (1:50)로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 세척하였다. 다시 mouse post prymary Ab를 8분간 염색 후 3회 PBST로 세척한 후 polymer-HRP로 8분간 염색 후 다시 2회 세척하였다. 그리고 DAB로 5분간 염색 후 2회 세척하고 hematoxylen로 5분 염색 후 2회 세척하여 permount를 수행하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluoroseince microscope, Nikon, Japan)을 사용하여 x100 배율로 관찰하였다.

3. 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법[38]을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 녹용대보탕에 대한 細胞毒性

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서는 녹용대보탕 200, 100, 50, 10, 1㎍/㎖의 농도에서 48시간 배양한 결과, 대조군(100%)에 비해 각각 90.2±4.4, 92.3±3.2, 95.6±4.0, 97.8 ±3.3, 102.3±6.5%로 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

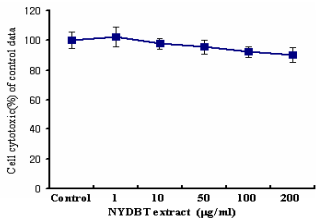


Fig. 1. Cytotoxicity of NYDBT extract on mLFCs. mLFCs were treated with various concentrations of NogYongDaeBoTang (NYDBT) extract. The data (% cytotoxicity) in the figure are expressed as the mean ± SEM. Comparison between NYDBT-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher (*p < 0.05).

2. Quantitative real-time-PCR on BV2 cell line

BV2 세포주에서 mRNA를 분리하여 real-time PCR로 분석하였다. Fig.2A는 각각의 실험군에 대한 dissociation 곡선을 그린 것으로 GAPDH, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, COX-2, 그리고 NOS-II에 대한 분석으로 primer의 design이 정확히 이루어진 상태를 보여주고 있다. 그리고 Fig.2B는 real-time PCR의 실시간 증폭되는 곡선을 보여주는 것으로 40 cycle이 반복되면서 GAPDH와 염증cytokine의 증폭에 대한 상대정량(RQ)치를 분석할 그림이다.

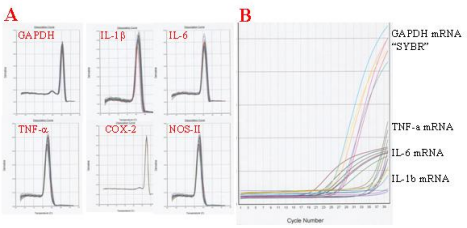


Fig. 2. Dissociation curves (A) and Amplification profiles (B) of inflammatory gene expression in BV2 cell line. Messenger RNA of GAPDH, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, COX-2, and NOS-II gene expression in BV2 cells samples were amplified using mouse inflammatory mRNA gene primers by SYBR Green PCR. The dissociation curves (A) for GAPDH, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, COX-2, and NOS-II mRNA and GAPDH products are shown in panels B, respectively. The Tm values of inflammatory gene and GAPDH amplicons are indicated alongside their corresponding dissociation curves.

1) IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-1β mRNA유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때 무처리군의 IL-1β mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.058이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 녹용대보탕(NYDBT: 100, 50, 10 ㎍/㎖) 처리군에서는 각각 0.658, 0.747, 0.896 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

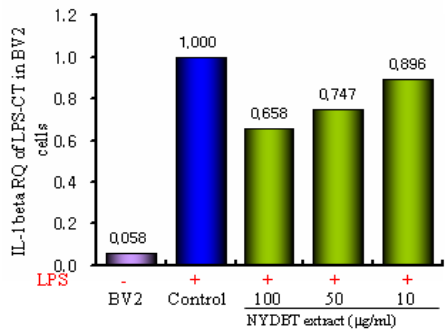


Fig.3 Inhibitory effects of NYDBT extract on IL-1β mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1beta mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-6 mRNA유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때 무처리군의 IL-6 mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.205이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 녹용대보탕(NYDBT: 100, 50, 10 ㎍/㎖) 처리군에서는 각각 0.584, 0.778, 0.918 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4).

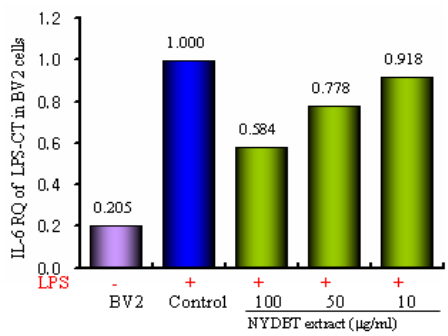


Fig. 4. Inhibitory effects of NYDBT extract on IL-6 mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 TNF-α mRNA유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때 무처리군의 TNF-α mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.334이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 녹용대보탕(NYDBT: 100, 50, 10 ㎍/㎖) 처리군에서는 각각 0.787, 0.845, 0.911 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

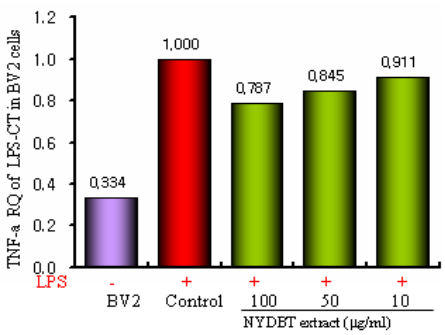


Fig. 5. Inhibitory effects of NYDBT extract on TNF-α mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TNF-α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 COX-2 mRNA유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때 무처리군의 COX-2 mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.265이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 녹용대보탕 (NYDBT: 100, 50, 10 ㎍/㎖) 처리군에서는 각각 0.665, 0.784, 0.848 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

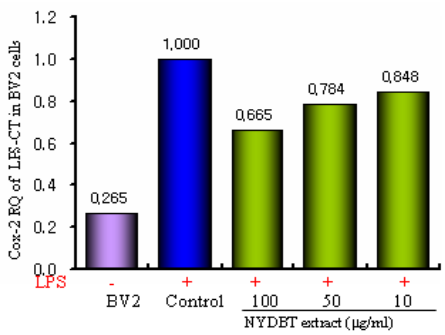


Fig.6. Inhibitory effects of NYDBT extract on COX-2 mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. COX-2 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 NOS-II mRNA유전자 발현은 LPS로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때 무처리군의 NOS-II mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.221이었고, LPS로 활성화시킨 실험군에 녹용대보탕 (NYDBT: 100, 50, 10 ㎍/㎖) 처리군에서는 각각 0.674, 0.755, 0.964 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 7).

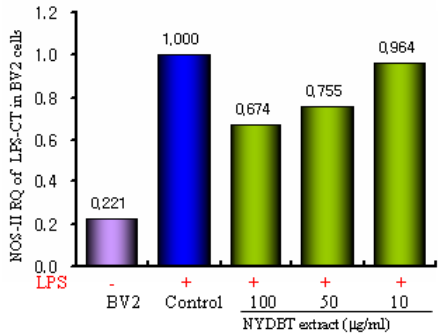


Fig. 7. Inhibitory effects of NYDBT extract on NOS-II mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. NOS-II mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

3. cytokine 단백질 생성량에 미치는 영향

1) BV2 세포주 배양상층액에서 IL-1β 생성량에 미치는 영향

배양상층액에서 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 30.4±12.1 (pg/㎖)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 654±67.5 (pg/㎖)로 나타났다. NYDBT 투여군은 100㎍/ml에서 485±33.3 (pg/㎖)로 나타났고, 50㎍/ml에서는 658±24.4 (pg/㎖)로 나타났다(Fig. 8).

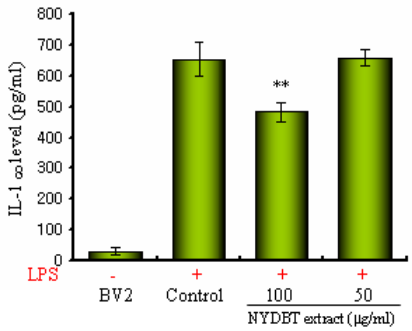


Fig. 8. The effect of NYDBT extract on IL-1β production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

2) BV2 세포주 배양상층액에서 IL-6 생성량에 미치는 영향

배양상층액에서 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 174±26.5 (pg/㎖)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 5589±554 (pg/㎖)로 나타났다. NYDBT 투여군은 100㎍/ml에서 4651±356 (pg/㎖)로 나타났고, 50㎍/ml에서는 5262±401 (pg/㎖)으로 나타났다(Fig. 9).

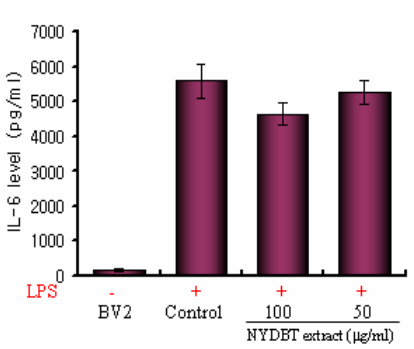


Fig. 9. The effect of NYDBT extract on IL-6 production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

3) BV2 세포주 배양상층액에서 TNF-a 생성량에 미치는 영향

배양상층액에서 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 462±66.5 (pg/㎖)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군은 2748±225 (pg/㎖)로 나타났다. NYDBT 투여군은 100㎍/ml에서 2256±154 (pg/㎖)로 나타났고, 50㎍/ml에서는 2415±205 (pg/㎖)로 나타났다(Fig. 10).

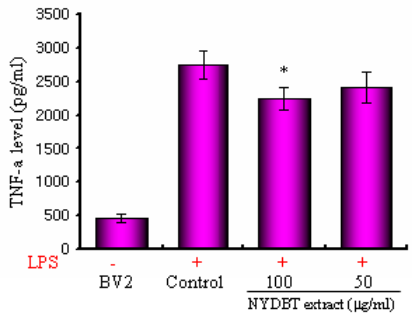


Fig. 10. The effect of NYDBT extract on TNF-α production in culture supernatant sera following LPS co-treatment.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hr. Total TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

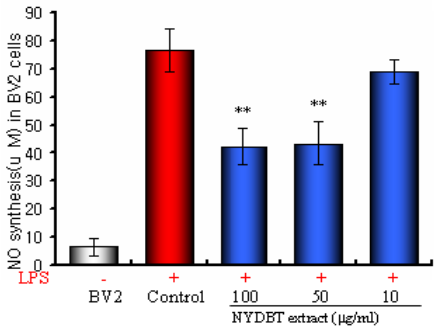


Fig. 11. Inhibitory effect of NYDBT extract on the nitric oxide release in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of NYDBT extract (100, 50, 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of ipopolysacchride (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 48 hr. The culture supernatant was collected 24 hr later and NO (nitric oxide) concentration in the supernatent was assayed. The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher (**p < 0.01, ***p < 0.001).

4. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

BV2 세포주에서 NO 생성량을 세포배양 상층액에서 측정하였다. 검정선은 sodium nitrite를 이용하여 정량하였다. BV2 세포주 정상군의 NO 생성량은 6.5±3.2 (μM)이었고, LPS로 활성화시킨 대조군의 NO 생성량은 76.8±7.6 (μM)로 나타났다. NYDBT 추출물 100, 50, 10 ㎍/㎖ 처리군에서 NO 생성량은 각각 42.3±6.7, 43.5±7.8, 그리고 68.9±4.3 (μM)로 나타나 대조군에 비하여 100 ($p<0.01$), 50 ($p<0.01$) ㎍/㎖의 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다 (Fig.11).

5. Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과

AD 病態 생쥐는 8주일간 녹용대보탕을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다 (Fig. 12).

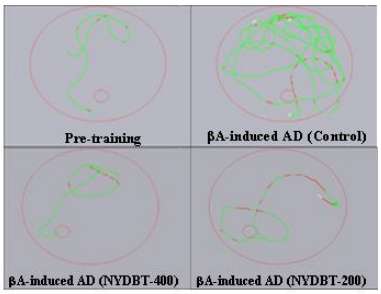


Fig. 12. photograph of water maze of Aβ-induced AD

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과

녹용대보탕 투여 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, Fig. 13에서 보듯이 Aβ로 유발시키 알츠하이머 대조군은 62.6±6.2 (sec)이었고, 8주간 tacrine 투여군은 15.3±5.2 (sec)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소를 나타내었다 ($p<0.001$). 녹용대보탕은 8주간 400 mg/kg 투여군은 33.2±3.5 (sec)과 200 mg/kg 투여군은 41.8±2.3 (sec)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 현저한 감소를 나타내었다 ($p<0.001$).

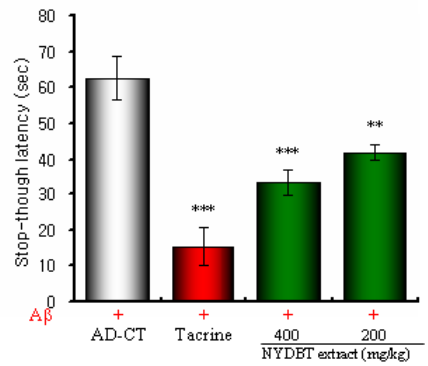


Fig.13. Effects of NYDBT extract on the Aβ-induced alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT extract or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected Aβ-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, Aβ-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); NYDBT (400, and 200 mg/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 Aβ -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 운동성 감퇴 효과

녹용대보탕 투여 8주 후 distance movement - through latency를 관찰한 결과, Fig. 14에서 보듯이 Aβ로 유발시킨 알츠하이머 대조군은 1127±132 (cm)이었고, 8주간 tacrine 투여군은 513±121.2 (cm)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소를 나타내었다 ($p<0.01$). 녹용대보탕은 8주간 400 mg/kg 투여군은 627.4±130.4 (cm)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 현저한 감소를 나타내었다 ($p<0.01$). 그리고 200 mg/kg 투여군은 847.5±153.4 (cm)으로 대조군에 비하여 감소했지만 유의성은 없었다.

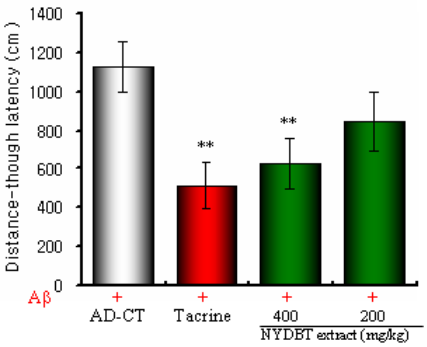


Fig.14. Effects of NYDBT extract on the Aβ-induced alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected Aβ-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, Aβ-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg , p.o); NYDBT (400, and 200 mg/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 Aβ-induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

1) AD 病態 생쥐의 microglial 세포에서 세포내면역형광염색

(1) 세포내 IL-1β and TNF-α발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 IL-1β과 TNF-α 발

현을 관찰한 결과, Fig. 15에서 보는 것처럼 IL-1β의 세포내 단백질은 Aβ를 뇌에 주입한 對照群이 85.7±6.7(%)이었고, Tacrine을 투여한 陽性對照群이 41.3±5.4(%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.001$), 녹용대보탕 投與群은 400mg/kg에서 55.6 ± 5.9(%)로 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 200mg/kg에서 73.2 ± 4.6(%)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다. TNF-α의 세포내 단백질은 Aβ를 뇌에 주입한 對照群이 95.6±7.7 (%)이었고, Tacrine을 투여한 陽性對照群이 45.6±12.3(%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.05$), 녹용대보탕 投與群은 400mg/kg과 200mg/kg에서 각각 66.0 ± 5.8(%)와 76.7 ± 11.3(%)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다.

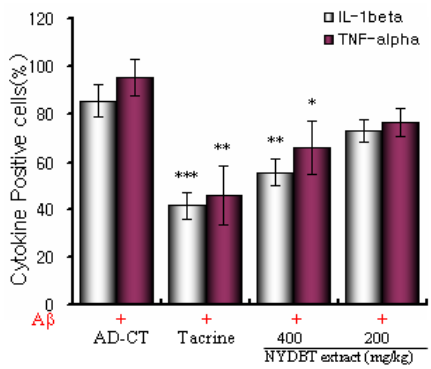


Fig.15. Intracellular staining of IL-1β and TNF-α activity on the brain CD14+cells in Aβ-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of NYDBT extract. C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o)and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. continued once a day for 60 days. IL-1b and 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 Aβ-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control, CT) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

(2) 지질과산화도 측정(MDA측정)

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, Fig.16에서 보는 것처럼 Aβ를 뇌에 주입한 對照群이 78.9±7.6 (pg/mg brain tissue)이었고, Tacrine을 투여한 陽性對照群이 46.2±5.3 (pg/mg brain tissue)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p<0.01$), 녹용대보탕 投與群은 400mg/kg과 200mg/kg에서 각각 51.3±7.4 ($p<0.01$)와 71.6±6.4 (pg/mg brain tissue)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다.

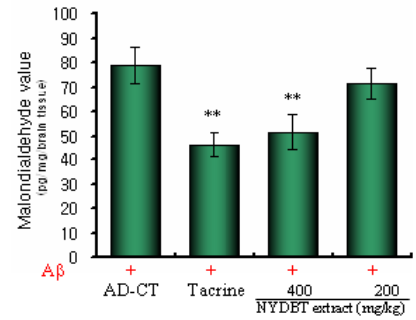


Fig.16. Effect of NYDBT extract on the malondialdehyde value in the brain tissue in Aβ-alzheimer disease mouse model. C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Malondialdehyde (MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry. Tissue (mg) in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to Aβ-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

(3) AD 病態 생쥐의 CD68/CD11b 발현 세포수 분석

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서 astrocyte세포와 microglial세포의 활성표면 분자인 $CD68^+/CD11b^+$가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, Fig 17에서 보듯이 Aβ를 뇌에 주입한 對照群의 $CD68^+/CD11b^+$은 42.6(%)이었고,

陽性對照群인 tacrine 投與群은 7.4(%)으로 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다. 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 18.7(%)이었고, 200 mg/kg 投與群은 24.2(%)로 對照群에 비하여 현저히 발현되는 활성세포가 감소한 것으로 나타났다. 그러나 $CD68^{+}/CD11b^{+}$에 비하여 $CD68^{-}/CD11b^{+}$인 대식세포 비율은 녹용대보탕 투여군이 대조군에 비하여 증가되는 결과를 나타냈다.

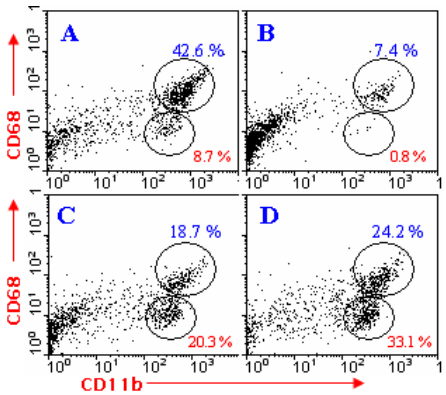


Fig.17. Effects of NYDBT extract on the percentage of CD68 and CD11b-gated cells in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400 and 200 mg/kg) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells (5x105 cell/ml) were isolated, and the brain 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 Aβ-induced alzheimer's disease model. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and Aβ-induced alzheimer's disease model control CD68+ and CD11b+ (A), tacrine (10 mg/kg, p.o B) treated, and NYDBT orally administered 400 mg/kg (C) and 200 mg/kg (D), CD68/CD11b cell population (%) were measured by analyzed by flow cytometer.

2) AD 病態 생쥐의 혈청단백질 함량 측정

C57bl/6 생쥐의 뇌에 stereotaxic으로 Aβ (10 ㎛)를 주입한 생쥐의 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 陽性對照群인 tacrine 投與群(10㎎/㎏), 녹용대보탕 投與群(400㎎/㎏, 200 mg/kg)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여한 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

Fig.18에서 보는 것처럼 혈청중 AST 수치는 정상군이 99.8±2.7 (IU/L)이었고, Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 101.3±19.5 (IU/L)으로 측정되었다. 陽性對照群인 tacrine 投與群의 혈중 AST는 77.6±2.2 (IU/L)로 나타났고, 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 58.1±4.1 (IU/L)이었고, 200 mg/kg 投與群은 101.9±13.0 (IU/L)로 측정되어 약물에 의한 간독성은 나타나지 않았다.

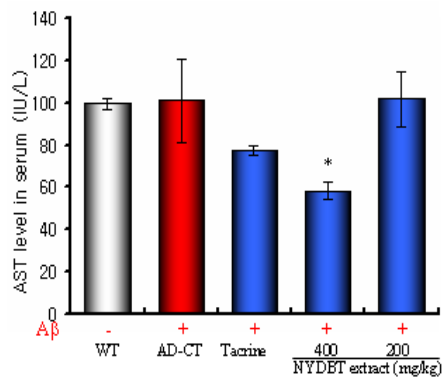


Fig.18. Effects of NYDBT extract on the serum Aspartate Aminotrans (AST) level in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Sera AST value measured by Biochemical analyzer, INTEGRA 400 and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Fig.19에서 보는 것처럼 혈청중 T-Cholesterol 수치는 정상군이 103.3 ± 4.9 (㎎/dℓ)이었고, Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 116±4.0 (㎎/dℓ)으로 측정되었다. 陽性對照群인 tacrine 投與群의 혈중 T.-Chole.는 98.1±4.9 (㎎/dℓ)로 나타났고, 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 111.0±3.4 (㎎/dℓ)이었고, 200 mg/kg 投與群은 101.6±10.8 (㎎/dℓ)로 측정되었다.

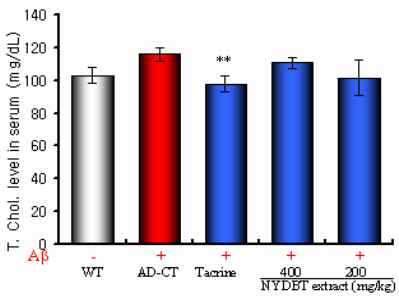


Fig.19. Effects of NYDBT extract on the serum total cholesterol level in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Sera T-cholesterol value measured by Biochemical analyzer, INTEGRA 400 and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Fig.20에서 보는 것처럼 혈청중 glucose 수치는 정상군이 136.7±7.8 (㎎/dℓ)이었고, Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 127.7±3.5 (㎎/dℓ)으로 측정되었다. 陽性對照群인 tacrine 投與群의 혈중 glucose는 146.0±6.1 (㎎/dℓ)로 나타났고, 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 146.4±5.8 (㎎/dℓ)이었고, 200 mg/kg 投與群은 143.4±4.4 (㎎/dℓ)로 측정되었다. Glucose 수치는 모든 실험군이 대조군의 수치에 비하여 약간 증가를 나타내었다.

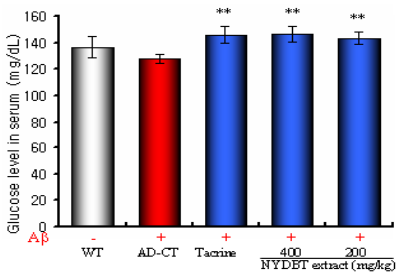


Fig.20. Effects of NYDBT extract on the serum glucose level in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Sera glucose value measured by Biochemical analyzer, INTEGRA 400 and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Fig.21에서 보는 것처럼 혈청중 HDL-Cholesterol 수치는 정상군이 82.5±4.7 (㎎/dℓ)이었고, Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 90.7±2.1 (㎎/dℓ)으로 측정되었다. 陽性對照群인 tacrine 投與群의 혈중 HDL-Chole.는 79.3±5.1 (㎎/dℓ)로 나타났고, 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 87.8±3.4 (㎎/dℓ)이었고, 200 mg/kg 投與群은 86.4±7.6 (㎎/dℓ)로 측정되었다. HDL-Cholesterol 수치는 모든 실험군이 대조군의 수치와 큰 차이가 없었다.

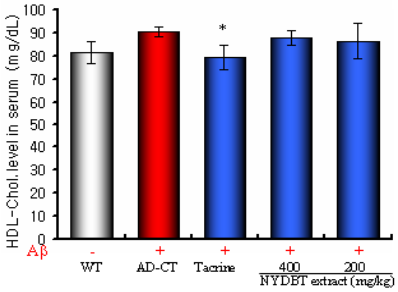


Fig.21. Effects of NYDBT extract on the serum HDL-Chole. level in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Sera HDL-Cholesterol value measured by Biochemical analyzer, INTEGRA 400 and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Fig.22에서 보는 것처럼 혈청중 AChE 활성도 수치는 정상군이 28.6±3.9 (U/ml)이었고, Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 58.5±6.3 (U/ml)으로 측정되었다. 陽性對照群인 tacrine 投與群의 혈중 AChE 활성도는 37.8±4.1 (U/ml)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈고 ($p<0.01$), 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 40.2±3.2 (U/ml)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다 ($p<0.01$), 그리고 200 mg/kg 投與群은 48.0±2.1 (U/ml)으로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다.

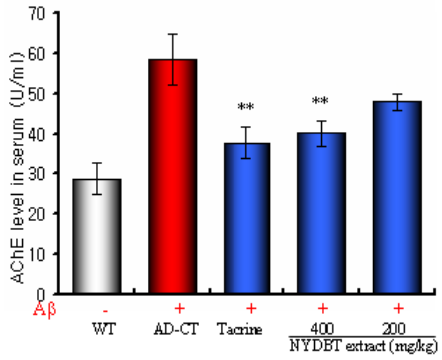


Fig.22. Effects of NYDBT extract on the serum AChE activity level in Aβ-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, and 200 mg/kg p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Sera AChE activity measured by cholinesterase kit and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

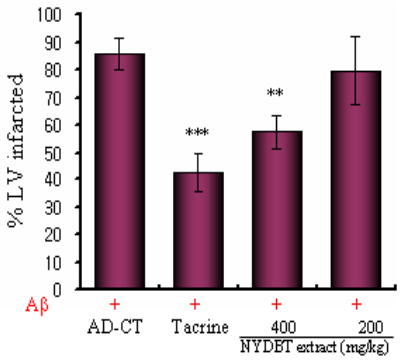


Fig.23. Effects of NYDBT extract on the infarct size of Aβ-induced alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400, 200 mg/kg, p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Control, Aβ-induced alzheimer's mice; Tacrine (10 mg/kg, p.o). Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium 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 Aβ -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

7. Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血 상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 病態 생쥐의 虛血상태에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과, Fig. 23과 Fig 24에서 보는 것처럼 Aβ를 뇌에 주입한 對照群에서 虛血의 크기가 85.7±5.5 (%)이었고, tacrine 투여군은 42.3±6.7 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고 ($p<0.001$), 녹용대보탕 400 mg/kg 投與群은 57.6±5.9 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다 ($p<0.01$), 그리고 200 mg/kg 投與群은 79.6±12.3 (%)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다.

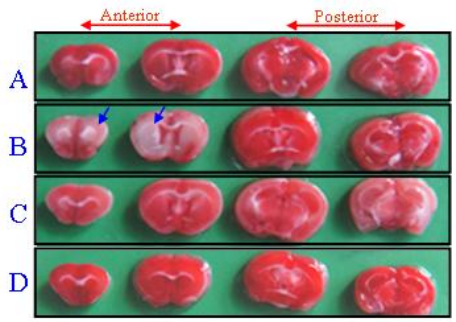


Fig.24. Effects of NYDBT extract on the coronal section of Aβ-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT (400 mg/kg, D p.o) and tacrine (10 mg/kg, p.o) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated (A). Aβ-induced alzheimer's mice (control, B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C). 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.

2) AD 病態 생쥐의 조직손상에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 正常群은 hippocampus와 entorhinal (EC) 그리고 fimbriaformix (FIFX)가 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증과 병변으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 tacrine과 녹용대보탕을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있다 (Fig. 24). 그리고 hippocampus의 neuronal line이 正常群은 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증세포와 병변등으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 tacrine을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 hippocampus의 neuronal line를 보이고 있다. 그리고 녹용대보탕 투여군에서는 희미하게 hippocampus의 neuronal line를 보이고 있다 (Fig. 25). hippocampus에 Fig. 26의 B pannel과 같은 조직에 astrocytes와 microglial 세포 (화살표)가 침투되어 neuronal line이 사라지고 병변이 심화된 것을 볼 수 있다.

그리고 tacrine과 녹용대보탕을 투여한 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 astrocytes와 microglial 세포가 hippocampus로 침투가 억제된 것을 알 수 있었다.

그리고 녹용대보탕 投與群인 D pannel은 對照群에서 뇌의 虛血상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes - like cells, astrocytes - like cell 등은 보였지만, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 26).

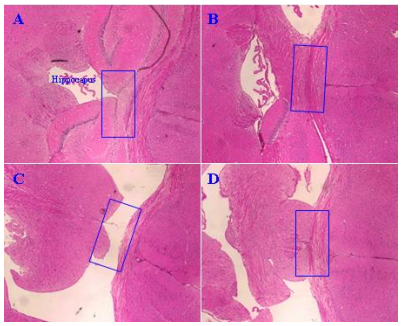


Fig.25. Histological analysis of hippocampal lesions of Aβ-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, Aβ-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), 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, x40).

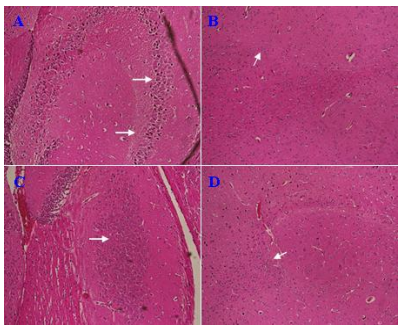


Fig.26. Histological analysis of the neuronal loss of hippocampus of Aβ-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, Aβ-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), 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).

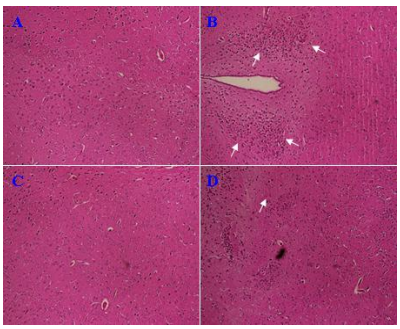


Fig.27. Histological analysis of the presence of macrophage/microglia in the hippocampus of Aβ-induced alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, Aβ-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), 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).

3) AD 病態 생쥐의 hippocampus에 대한 면역조직염색 분석

AD 병태에 따른 뇌의 현미경적 병리소견으로 특징적인 것은 노인성 반점(senile plaque)과 신경원섬유(neurofibrillary tangle)이다. 노인성 반점은 β-amyloid 물질이 대뇌의 세포외부에 국소적으로 집합된 것으로서 주변에 astrocyte와 microglia (GFAP)들이 모여 있다. 그리고 노인성 반점 안에 Tau 단백질과 neurite를 포함하는 neiritic plaque가 나타난다. Neurofibrillary tangle은 과인산화된 Tau 단백질의 fillament가 세포체내에 축적되어 있는 것으로서 Alzheimer씨 병에서는 그 정도가 질병의 경중과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다. Fig. 28에서 보듯이 AD 병태모델의 뇌조직에 anti-Tau Ab로 면역조직화학염색을 하여 나타난 결과로, pannel B인 대조군에서 Tau 단백질에 positive한 조직세포가 많이 보이고, tacrine (pannel C)과 녹용대보탕 (pannel D) 투여군에서는 Tau 단백질에 positive한 조직세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 그리고 Fig. 29는 GFAP(glial fibrillary acidic protein)로 성상교세포 특이 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 한 결과로, pannel B인 대조군에서 GFAP 단백질에 positive한 성상교세포가 많이 보이고, tacrine (pannel C)과 녹용대보탕 (pannel D) 투여군에서는 GFAP 단백질에 positive한 성상교세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다.

최근 알츠하이머의 원인 유전자인 프리시닐린(presenilin)이 스트레스에 의한 세포사멸과 관련이 있다는 것을 보고하고 있는데, 프리시닐린은 amyloid 펩타이드 전구단백질을 잘라 β-amyloid를 만드는 β-secretase를 구성하는 중요한 단백질로 알려져 있다.

또한 프리시닐린은 presenilin-1과 presenilin-2의 두가지 subtype을 가지고 있으며 신경세포 발달과 세포내 칼슘을 조절하기도 하는 것으로 알려져 있다. Fig.30은 presenilin-1과 presenilin-2 Ab를 면역조직화학 염색을 한 결과로, pannel B인 대조군에서 presenilin-1/presenilin-2 단백질에 positive한 뇌조직세포가 많이 보이고, tacrine (pannel C)과 녹용대보탕 (pannel D) 투여군에서는 presenilin-1/presenilin-2 단백질에 positive한 뇌조직세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다.

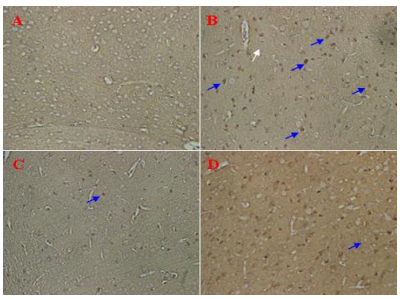


Fig.28. Immunohistochemistry analysis of Tau protein in the hippocampus of Aβ-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, Aβ-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, immunohistochemical staining for Tau protein was performed on brain tissue sections. The brain specimens were embedded in OCT compound (Miles, Elkhard, IN), snap frozen in liquid nitrogen and then stored at −80° C until use. Frozen sections cut in 6 ㎛ were fixed in cold acetone (−20° C) for 10 min. After pretreatment with a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide for 10 min to inhibit endogenous peroxidase, the preparations were treated with blocking medium (10% normal goat serum in PBS). The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, x100).

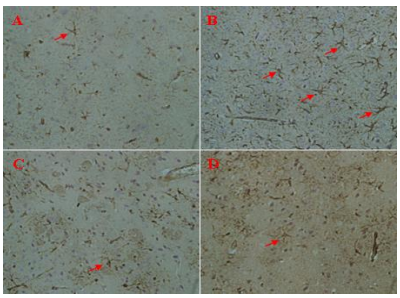


Fig.29. Immunohistochemistry analysis of GFAP protein in the hippocampus of Aβ-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, immunohistochemical staining for GFAP protein was performed on brain tissue sections. The brain specimens were embedded in OCT compound (Miles, Elkhard, IN), snap frozen in liquid nitrogen and then stored at −80° C until use. Frozen sections cut in 6 ㎛ were fixed in cold acetone (−20° C) for 10 min. After pretreatment with a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide for 10 min to inhibit endogenous peroxidase, the preparations were treated with blocking medium (10% normal goat serum in PBS). The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, x100).

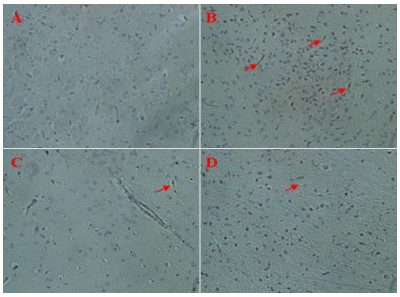


Fig.30. Immunohistochemistry analysis of presenilin 1/presenilin 2 protein in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were orally administered of NYDBT or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. Normal C57BL/6 mice (A) was not treated. Control, bA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); NYDBT (400 mg/kg, p.o, D), they were sacrificed, immunohistochemical staining for presenilin 1/preseilin 2 protein was performed on brain tissue sections. The brain specimens were embedded in OCT compound (Miles, Elkhard, IN), snap frozen in liquid nitrogen and then stored at −80° C until use. Frozen sections cut in 6 ㎛ were fixed in cold acetone (−20° C) for 10 min. After pretreatment with a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide for 10 min to inhibit endogenous peroxidase, the preparations were treated with blocking medium (10% normal goat serum in PBS). The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, x100).

Ⅳ. 考 察

알쯔하이머병은 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[3]. 실제로 이 병의 유병율은 65-74세 사이에는 3 %, 75-84세 사이에는 19 %, 85세 이상에서는 47 %로 나타나 있다. 현재 서구사회에서는 65세 이상 인구의 약 10 %, 80세 이상 인구의

약 40-50 %에서 알쯔하이머병이 발생되고 있으며, 이미 미국에서는 알쯔하이머병 환자가 400만명에 달하고 있고, 그 사망율이 심혈관 질환, 악성종양, 그리고 뇌졸중에 이어 4위를 점하고 있으며, 2000년대 중반까지는 1500만명의 환자가 발생될 것으로 예견하고 있다. 일본과 중국에서도 혈관성 치매에 비해 알쯔하이머병의 발병율이 해마다 증가하고 있어 커다란 사회문제를 야기하고 있다. 우리나라의 평균수명은 1990년 71.3세에서, 2000년 74.3세, 2020년 76.95세에 이를 것으로 예상되고, 65세 이상의 노인인구도 1990년 214.4만명에서 2000년 316.8만명, 2020년에는 633.3만명에 이르러 전체 인구의 약 12.5 %를 점할 것으로 예측되는 바, 이는 필연적으로 노령과 연관된 질환 발생의 증가를 가져올 것이며 치매 또한 증가할 것이다[3].

이런 痴呆에는 AD, VD, 중독성 치매등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로[2], 뇌의 全般的 萎縮과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[1-2,4], 發病은 서서히, 경과는 漸進的인 것이 특징이다[2]. 症狀으로는 주위에 대한 無關心, 自發性의 缺如, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緖不安, 騷亂 또는 憂鬱, 無言, 無反應, 大小便失禁 등을 보인다[1,3]. 生存率은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고되고 있고, 보편적으로 東洋보다 西洋에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 頻發하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 疾患에 罹患되는 것으로 疫學的 調査에 의해 報告되어 있다[23]. 그리고 혈관성치매는 20-30%정도이고 약물이나 알코올중독에 의한 중독성 치매는 10-20%정도이며, 사고에 의한 뇌의 손상도 痴呆의 원인이 될 수 있다[24].

치매와 관련되어 나타나는 병리학적 소견으로는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 신경반(neuritic plaque)이 있다[6]. 신경섬유 덩어리와 신경반은 아밀로이드 베타 펩티드(Aβ)의 침착에 의하여 생겨난다. Aβ는 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein: APP)의 일부가 잘라져서 생겨나는데 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다. APP는 21번 염색체에 위치하고 있으며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30대와 40대에 알쯔하이머병 환자의 뇌에서 발견되는 똑같은 신경섬유 덩어리와 신경반이 생긴다. 이러한 병변은 유전자수가 증가한 효과에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 생각하고 있다. 한편 알쯔하이머병 환자의 기저전뇌(basal forebrain)와 해마에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있다고 보고되고 있고, 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고와 Aβ를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화과정, 특히 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 생각되고 있다[13]. 최근에 가족성 알쯔하이머병을 일으키는 유전자 중의 하나인 presenilin 1 (PS1)과 presenilin 2 (PS2)는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하며, 이 유전자의 다양한 돌연변이가 조발성(early-onset) 가족성 알쯔하이머병의 70% 이상의 원인이 되는 것으로 보고되었다. 이들은 서로 아미노산의 67%가 동일하며 7개 전후의 transmembrane domain을 가지고 있는 45-50 kDa의 단백질로 생각되고 있다. 이들 유전자는 C. elegans의 SPE-4 유전자와 구조적으로 유사하며, spermatogenesis 과정에서 cytoplasmic partitioning 및 intra- cellular trafficking에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 역시 C. elegans의 분화 과정에서 세포내 신호전달에 관여하는 Notch형의 수용체인 lin-12의 기능 돌연변이율을 완화시켜 줄

수 있는 물질로 발견된 sel-12도 PS와 homology가 있는 것이 보고되었다[7]. 이 sel-12는 lin-12에 의한 신호전달의 coreceptor 또는 lin-12를 세포표면으로 운반하거나 recycling하는 역할을 담당하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 spe-4와 sel-12와 homology가 있는 PS-1과 PS-2도 역시 세포내 단백질 운반이나 세포내 신호전달에 관여할 가능성이 높음을 시사한다. 이상과 같은 사실에서 볼 때 이 유전자들의 돌연변이를 가지고 있는 가족성 AD 환자에서도 APP가 PS-1이나 PS-2에 의해 β-secretase가 많이 포함되어 있는 세포내 분획으로 더 많이 이동하여 결국 APP의 처리에 영향을 끼쳐 Aβ가 과량 만들어짐으로써 신경독성을 나타내고 그에 따라 인지기능 결손이 동반되는 것으로 생각되고 있다. 최근에는 APP와 presenilin 단백질이 서로 결합한다는 사실이 입증됨으로서 이 사실을 더욱 더 뒷받침해 주고 있다.

AD는 Aβ, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며[25], 최근에는 APP의 일부분인 CT-105가 Aβ보다 더 毒性이 있다는 보고와[26], Aβ를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[28], Aβ와 CT-105의 毒性機轉에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, Aβ의 과잉이 뇌 안에서의 抗酸化作用을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 老人癡을 형성하고 神經毒性을 나타내는 것으로 판단되고 있다[28].

한편, acetylcholine, dopamine, serotonine, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는 데, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonine, GABA 등의 수준이 病的으로 낮아지며[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[7-8]. 비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 藥物들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin[29], 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[30]과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[31]이 있는 데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 毒性이 있는 것으로 사용상에 여러가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[29-31].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 미세아교세포 등의 神經膠細胞에서 생성되는 염증반응 cytokine에 의해 신경세포의 死滅이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 BBB(Blood Brain Barrier)가 손상되면 免疫系 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 염증반응 cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 假說로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[32]. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 미세아교세포는 신경세포의 분화에 필요한 營養因子로서, cytokine들을 微量 분비함으로써 뇌의 生體 恒常性을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 病變부위에 나타나는 神經膠細胞는 미세아교세포로 astrocyte의 主要刺戟因子인 IL-1 및 TNF-

α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[33], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF(colony-stimulating factor), IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 活性酸素의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 死滅을 惹起하게 된다[34]. 또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 病變 부위에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 미세아교세포의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 염증반응 cytokine이 밀접한 관계가 있으리라는 假說에 관심이 집중되고 있다[34]. 특히 Aβ가 沈積된 老人痴 주변의 미세아교세포는 Aβ에 의해 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 염증반응 cytokine을 생성하므로써 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있다[35]. 뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를 들 수 있는 데, astrocyte는 神經膠細胞로서 미세아교세포 등과 함께 생성하는 염증반응 cytokine에 의해 신경세포의 死滅를 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이는데, 이는 神經膠細胞인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 老人痴 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다[35].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴呆'[10], '呆病'[36], '健忘'[37-38] 등의 範疇에 속하며, 明代 張의 ≪景岳全書・癲狂痴呆≫[10]에서 痴呆에 대한 最初의 記述이 登場하는 데, "痴呆症, ... 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常..."라 되어 있다. 痴呆의 症狀은 終日悠悠, 忽不言不語, 不食不飮, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 與之所饌則不受, 與之糞則大喜, 與之衣不服, 與之草木之葉大喜 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 使用되고 있다[27-31]. 原因에 대해서는 歷代 文獻에서 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 提示되고 있는데[10,37-38], 현재 中醫學[39-40]에서는 비록 일관된 治療는 아니지만, AD와 VD로 區分하고, AD를 다시 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 等의 治法을 應用하며, 實證으로는 痰飮과 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內低 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 等의 治法을 應用하고 있다.

본 실험에 사용된 녹용대보탕은 明代 李의 《醫學入門》[13]에 기재된 처방으로 虛勞로 少氣하며 얼굴에 핏기가 없고 정신상태가 우울하며 陽氣가 虛하여 피로를 빨리 느끼며 심신이 쇠약하고 빈혈·心悸・시력감퇴 등 일체의 虛損과 久病을 앓고 난 사람에게 쓰는 처방이다. 肉蓯蓉, 杜冲, 鹿茸은 補陽藥으로 補益肝腎 壯元陽하고, 白朮, 人蔘, 黃芪는 補脾益胃, 固脫生津하고, 白芍藥, 熟地黃, 當歸는 滋陰補血, 養血柔肝하고, 石斛은 益胃生津, 滋陰淸熱하고, 白茯苓, 半夏는 燥濕利水健脾하고, 五味子는 滋腎, 生津하고 기운을 수렴하며, 附子, 肉桂는 補元陽, 回陽補火하며 通血脈하는 효능이 있고, 甘草는 調和諸藥, 生薑과 大棗는 調和營衛하는 효능이 있어, 氣血陰陽이 虛한 것을 모두 補하고 元氣가 부족하여 기혈의 운행이 원활하지 못한 것을 치료하는 방제이다.

최근 학의학계에서 치매, 기억장애 등과 관련하여 정 등[14], 나 등[15]이 문헌적 고찰을 하였고, 이 등[16], 정 등[17]이 임상적 고찰을 하였으며, 황 등[18],강 등[19]의 실험적 연구가 보고 되었으나, 先天稟賦不足과 虛損에 다용되는 녹용대보탕이 치매에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 녹용대보탕이 AD에 미치는 영

향을 실험적으로 규명하고자 녹용대보탕의 細胞毒性을 mLFC 세포에서 관찰하고, LPS를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 cytokine의 유전자 발현을 관찰하였다. 또한 Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 cytokine과 CD68/GFAP의 발현, MDA의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 虛血상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 연구에서는 먼저 實驗藥物(녹용대보탕)의 적당한 농도를 정하기 위하여 細胞毒性을 測定하였는데, 정상생쥐의 mLFC 세포에 각각 다른 농도의 녹용대보탕을 처리한 후 細胞毒性을 측정한 결과, mLFC의 生存率은 對照群에 비해 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 녹용대보탕 投與群에서는 변화가 없었다(Fig. 1). 이러한 결과는 100㎍/㎖이하의 농도로 녹용대보탕을 처리하였을 때 정상세포인 mLFC 세포에서 細胞毒性이 나타나지 않아 生存率이 80% 이상을 나타낸 것으로 주로 100㎍/㎖이하의 녹용대보탕을 사용하기로 하였다.

본 실험에서 사용한 BV2 세포주는 생쥐의 소신경교세포(미세아교세포)로 primary 미세아교세포 모델을 제공하며[34], LPS를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, TNF-α의 생성이 증가된다고 보고가 있어[41], BV2 세포주에 LPS(0.1㎍/㎖)을 처리하여 염증반응 cytokine을 유발시킨 뒤 서로 다른 농도의 녹용대보탕(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)를 6시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, 녹용대보탕이 소신경교세포의 염증반응 cytokine 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하기로 하였다.

BV2 cell에서 발현된 염증반응 cytokine 중, IL-1β 유전자는 LPS만을 투여한 對照群에 비해 녹용대보탕을 투여한 實驗群 모두에서 발현이 현저히 억제되었고, IL-6 유전자는 LPS만을 투여한 實驗群에 비해 녹용대보탕을 투여한 實驗群 모두에서 IL-6 유전자 발현이 현저히 억제되었으며, TNF-α 유전자 역시 LPS만을 투여한 對照群보다 녹용대보탕을 투여한 實驗群의 발현이 현저히 억제되었다. 이것으로 녹용대보탕이 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 過剩발현을 顯著히 감소시켰음을 알 수 있는데, 이는 녹용대보탕이 AD의 원인 중 하나로 알려진 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 사료된다.

Morris water maze test는 동물의 空間學習과 記憶을 검사하기 위해 사용되며, 空間情報 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 空間準據記憶을 측정하는 것으로[42], 이 방법을 이용하여 Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐에 대한 녹용대보탕의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

본 실험에서 김 등[43], 채 등[44]의 논문에서와 같이 CT-105를 사용하지 않고 Aβ를 통해 AD 病態 생쥐모델을 만든 이유는, CT-105와 Aβ는 AD유발에 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 Aβ는 완전 정제 순수단백질로 정확하게 hippocampus 주위에 만들어지는 허혈과 plaque, tangle 등이 사람 AD 환자의 그것과 유사하게 만들어져 *in vivo*인 AD 病態 생쥐에서는 CT-105보다 Aβ사용이 적절하다고 사료되었으며, CT-105는 *in vitro*에서 rIL-1β와 함께 동시 사용하였다.

녹용대보탕 투여 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 녹용대보탕 投與群은 모두 對照群에 비해 유의성 있는 시간의 단축

을 보여, 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement- through latency는 반복학습된 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, 녹용대보탕 投與群은 8주 후 역시 對照群에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 현저한 운동성 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다.

결국 Morris water maze의 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 녹용대보탕 投與群이 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 녹용대보탕을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있었다.

인체 조직의 산화적 손상은 Nakaya 등[45]에 의해 세포막에서 지질의 과산화가 일어나면 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어난다고 하였다. 그러나 다행스럽게도, 미토콘드리아의 기질 및 각 조직에는 Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX), Glutathione Reductase (GRD) 등 산화스트레스 (Oxidative stress)에 대한 항산화효소들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 전자 전달계에서 생긴 산소 자유라디칼에 대해 어느 정도의 방어력을 유지하고 있고, 비정상적으로 증가하는 산소 자유라디칼이나 ROS의 제거를 위하여 그 생성이 증가하거나 활성도가 높아지는 기전을 통해 항상 손상을 입지는 않는다. 즉, 생체막에서 생성된 지질과산화(lipid peroxide)의 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격(지질, 단백질이나 효소 등)·변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 과산화의 최종 산물인 lipofuscin축적, 세포 구성에 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다[46]. 따라서 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. 따라서, 형성된 라디칼(peroxyl radical)은 그들이 다음 단계의 연쇄 반응으로 발전하여 산화적 손상을 증폭시킬 수 있기 때문에 특히 위험하다고 할 수 있다[47]. 자유라디칼 생성과 뒤이은 지질 과산화, 즉 막 PUFA의 과산화는 운동중 산소섭취의 상승에 비례하여 증가하고, 골격근 손상에 정적 상관관계가 있다고 한 연구[48]처럼 활동에 따른 지질 과산화 정도를 파악하거나, 항산화제 투여에 따른 변화정도를 규명하는 방향으로 연구가 진행되리라 생각하고, 본 연구에서 알츠하이머 생쥐의 병변 뇌에서 지질 과산화와 녹용대보탕 투여로 지질 과산화물질을 억제할 수 있는 지를 규명하고자 하였다. 그 결과 녹용대보탕 추출물을 투여로 알츠하이머 생쥐의 병변 뇌부위에 MDA의 양이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 그 원리는 과산화 지질의 분해에 생성되는 MDA의 2 분자와 thiobarbituric acid (TBA)가 결합하여 생성되는 적색물질의 흡광도를 측정하는 원리를 사용하였다.

Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 병변 뇌조직에서의 염증반응 cytokine, CD68/CD11b 발현을 관찰하였는데, 먼저 병변 뇌조직에서의 염증반응 cytokine의 일종인 IL-1β 생산량을 관찰한 결과, 正常群에 대해 Aβ를 뇌에 주입한 對照群에서는 증가되었으나 녹용대보탕 投與群에서는 그 발현이 현저히 감소했고, TNF-α 단백질 역시 正常群에 비해 Aβ를 뇌에 주입한 對照群은 증가하였으나 녹용대보탕 投與群은 발현이

현저히 감소했음을 볼 수 있다. 이는 녹용대보탕이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증反應과 관련된 cytokine의 활성화를 세포성 단백질 수준과 유전자 수준 모두 효과적으로 억제한 것으로, 녹용대보탕의 투여를 통해 과잉 생산된 염증반응 cytokine으로 초래되는 신경세포 死滅을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌 부분에는 뉴론, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglia 등이 많이 沈積된 특징을 나타낸다[49]. 이러한 병변 부위는 plaques과 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 MAP2 (microtubuleassociated protein 2), GFAP, CD11b, CD68, Aβ - protein 또는 Tau 단백질 등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuronal, astrocytic, macrophage 그리고 microglial differentiation 등의 세포들은 표지인자 (MAP2, GFAP, CD11b and CD68)를 사용하여 확인되었고 또한, 염증유발 cytokine (IL - 1β, TNF - α) 그리고 ROS도 높은 농도로 蓄積되어있다[45-46]. 이러한 배경으로 본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 biopsy하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포형광분석기로 병변부분의 astrocyte와 microglia 세포수를 측정하기 위하여 두세포의 표면 표지인자인 CD68/GFAP를 관찰하여 對照群에 비하여 녹용대보탕 投與群이 현저한 CD68/GFAP 세포수 감소 결과를 얻었다. 이는 녹용대보탕 성분이 BBB막을 통과하였는지 아니면 다른 활성인자로 기인된 것인지는 확인할 수 없었지만 AD 유발 동물의 뇌 병변부위를 이루고 있는 염증세포수가 크게 감소한 결과이고 또한 신경과 뇌세포사 정상으로 회복되었음을 의미하는 것이기도 하다.

Aβ가 沈積된 老人癡 주변에서는 활성화된 astrocyte와 미세아교세포가 많이 관찰되는데, 외부자극인자들에 의하여 활성화된 미세아교세포가 IL-1β 및 TNF-α 등의 염증반응 cytokine을 생산하며, 이들 염증반응 cytokine은 성상세포를 활성화시켜 일산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하고 있는 ROS의 일종인 peroxynitrite(ONOO)으로 유도되어 신경세포사를 惹起시킨다고 알려져 있어[50], Aβ와 염증반응 cytokine의 상관성이 주목되고 있다[34-51]. AD 病態 생쥐모델 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과 Aβ를 뇌에 주입한 對照群에 비해 녹용대보탕 投與群은 유의성 있게 虛血의 크기가 작아져, 녹용대보탕이 Aβ로 유발된 뇌조직의 虛血상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 正常群의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, Aβ로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 Hippocampus 주위에 正常群과 비교할 때 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus 등이 현저히 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes - like cells과 astrocytes - like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 녹용대보탕 投與群은 對照群에서 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 현저히 회복된 것을 볼 수 있는 데, 이는 녹용대보탕이 뇌 虛血로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 虛血과 관련된 AD의 예방할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다. 또한 Hippocampus 병변부위에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 대

조군에 비하여 녹용대보탕을 투여한 실험군에서 Tau 단백질, GFAP 단백질, presenilin 1/2 단백질의 발현량이 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 녹용대보탕은 LPS를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현을 억제하였고, Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐 모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 미세아교세포에서 염증반응 cytokine인 IL - 1β, TNF - α의 발현, 과산화지질도 (MDA)를 억제하였고, CD68 / CD11b의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며, 뇌조직의 虛血상태를 개선하고 虛血상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 녹용대보탕은 Aβ의 과다 생성, 미신경교세포의 염증반응 cytokine의 과잉 발현 등으로 인해 惹起될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 惹起되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 녹용대보탕의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

녹용대보탕이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, 녹용대보탕이 mLFC에 미치는 세포독성, LPS에 의한 BV2에서의 cytokine의 발현에 미치는 영향, Aβ로 유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화, 뇌세포에서의 cytokine의 발현, 뇌의 虛血상태, 뇌의 조직손상의 변화에 미치는 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 녹용대보탕은 BV2 세포주의 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II 염증유전자 발현을 억제하였다.
2. 녹용대보탕은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.
3. 녹용대보탕은 AD 병변 뇌조직에서의 세포내 IL-1β, TNF-α의 발현 측정에서 양성세포수를 억제하였다.
4. 녹용대보탕은 AD 병변 뇌조직에서의 MDA 측정과 CD68/GFAP의 세포수를 억제하였다.
5. 녹용대보탕은 AD 병변 뇌조직의 虛血 상태를 유의성 있게 개선하였고 虛血로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.
6. 녹용대보탕은 AD 병변 뇌조직의 면역조직화학염색법으로 Tau 단백질, GFAP 단백질, presenilin 1/2 단백질의 발현 억제를 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 보아, 녹용대보탕은 과량의 cytokine 또는 과량의 β-amyloid에 의한 Alzheimer disease의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

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. 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울. 고려의학. 1992:225-8, 230-2.
4. 李定均. 精神醫學. 서울. 一潮閣. 1995:87-8, 465-7, 514-8, 600.
5. Buxbaum JD, Greengard P. Regulation of APP processing by intra- and intercellular signals. Ann NY Acad Sci. 1996;17(777):327-31.
6. Lee MC, Kim DL, Woo YJ, Kim SU, McGeer PL, Tai T. Gangliosides expression in normal and alzheimer brain. 대한의학회. 2001;37(3):285-92.
7. Baddeley AD, Bressi S, Sala SD, Logie R, Soinnler H. The decline of working memeory in Alzheimer's disease. Brain. 1991;114:2521-42.
8. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
9. Dickson DW, Ksiezak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH. Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein: identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. Acta Neuropathol(Berl). 1992;84(6):596-605.
10. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울. 한성사. 1978:610-11.
11. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울. 서원당. 1984:102.
12. 전경호. 辨證奇聞全書. 太北. 감지출판사. 1990:222-5, 233-35.
13. 李梴. 國譯醫學入門. 서울. 남산당. 1974:96, 102, 880.
14. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):77-94.
15. 나창수, 김정상, 채우석, 박석천. 치매에 관한 최근의 연구 동향. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):291-317.
16. 이영욱, 조명래, 강화정, 진천식, 홍석, 김종석. 치매환자 32례에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):301-17.
17. 정인철, 이상용. 치매환자 20례에 대한 임상적 고찰. 지산 국제 동양의학 Symposium. 1998;4:169-91.
18. 황의완. 사향소합원이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
19. 강현근, 김종우, 황의완. 향부자팔물탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):79-94.
20. Suematsu T, Kamada T, Abe H, Kikuchi S, Yagi K. Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. Clin. Chim. Acta. 1977:79,267-770.
21. 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.
22. 金宇哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
23. 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. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):708-722.
24. Breakfield XO, Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1989;1:339-71.
25. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T,

Prada C, Kim Grace, Seekins S, Yagar D, Slunt HH, Wang , Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimers Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A 1-42/1-40 Ratio in Vitro and In Vivo. Neuron. 1996;17:1005-13.

26. 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.
27. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302-8.
28. Hung AY, haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdon JH, Selkoe D. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β-protein. J Biol Chem. 1993;268:22959-62.
29. 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.
30. Womer DE, Shannon HE. Reversal of pertussis toxin-induced thermal allodynia by muscarinic cholinergic agonists in mice. Neuropharmacology. 2000;39(12):2499-504.
31. Ventura M, Sternon J. Anticholinesterase agents in Alzheimer's disease. Rev Med Brux. 2001;22(4):387-93.
32. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral disease. Eur J Immunol. 1989;19(4):689-94.
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):3440-47.
34. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. J Neurochem. 2001;78(2):249-53.
35. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnam CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes: Differential induction by lipopolysaccharide and IL-beta. J Immunol. 1993;150(7):2659-67.
36. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울. 東洋醫學研究院. 1985:68, 217-8, 229, 342.
37. 孫思邈. 備急千金要方. 서울. 杏林出版社. 1982:129-35, 534, 545, 550.
38. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京. 人民衛生出版社. 1987:822-5.
39. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京. 學苑出版社. 1993:242-51, 784-91.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 김인재, 이상용. 加味歸脾聰明湯이 老化 白鼠의 血液變化 및 血淸과 腦組織의 抗酸化物 活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):53-70.
44. 채종걸, 이상용. 拱淸丸이 老化 白鼠의 血液變化 및 血淸과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):71-86.
45. Shioda S, Legradi G, Leung WC, Nakajo S, Nakaya K,Arimura A. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid inthe rat testis by light and electron microscopicimmunocytochemistry and in situ hybridization. Endocrinology. 1994;135:818-25.
46. Tappel AL, Reiss U. Fluorescent product formationand changes in structure of DNA reacted with peroxidizingarachidonic acid. Lipids. 1973;8:199-202.
47. Holley HS, Boike GM, Elfstrand EP, Delpriore G, Schumock D, LurainJR. Laparoscopically assisted vaginal hysterectomy in a university hospital: report of 82 cases and comparison with abdominal and vaginalhysterectomy.Am JObstet Gynecol. 1993; 168:1694.
48. Viguie C, Gohill K, Stanley WC, Brook GA, packer L. Blood glutathione oxidationduring human exersice. JAppe Physio. 1998;64(1):115-9.
49. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. Brain Res. 1998;785(2):195-206.
50. Ons SK, Kitamura M, Maekawa K, Hirata M, Ano W, Ukai T, Yamafuji, Narita H. Protective effects of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)2 -[2-(N,N-diethylamino) ethoxy]- ethanol hydrocholride (T-588), a novel cerebral activator, against experimental cerebral anoxia. Jap. Pharmacol. 1993;62:81-6.
51. Chong YH. Effect of a carboxy-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. Life Sciences. 1997;61(23):2323-33.