동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 2, 2008

紫河車 藥鍼이 βA로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

이병훈, 박선영, 최철홍, 이은경, 정대규
대구한의대학교 한의과대학 신경정신과 교실

The Effects of Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution on the Alzheimer's Disease Model Induced by βA

Byung-Hun Lee, Sun-Young Park, Cheol-Hong Choi, Eun-Kyung Lee, Dae-Kyoo Chung
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

Abstract

Objective: Hominis Placenta is used in many cure, mainly treats a weak, chronic disease, especially senile. This research investigates the effect of the Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution on Alzheimer's disease.

Method: The effects of the Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution on (1) IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, and CD68/CD11b (2) the behavior (3) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Results:

1. For the Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution group a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by β A in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency, and distance movement-through latency.
2. The Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution group suppressed the over-expression of IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, and CD68/CD11b, in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
3. The Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution group reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

투고일 : 6/5 수정일 : 7/7 채택일 : 7/14
* 교신저자 : 정대규 주소 : 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대 부속 대구한방병원
Tel : 053-770-2115 Fax : 053-770-2169 E-mail : chung@dhu.ac.kr

4. The Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution group reduced the Tau protein, GFAP protein, and presenilin1/2 protein, beta-secretase protein, (immunohistochemistry) of hippocampus in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

Conclusion: These results suggest that the Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution group may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words: Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution, Alzheimer's disease, IL-1β protein, TNF-α protein, MDA, CD68/CD11b

I. 緖 論

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 여러 가지 방면에서 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며[1], 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래한다[2].

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 혈관성치매(vascular dementia; VD), 중독성 치매중에서 50% 이상의 가장 많은 비율을 차지하고 있는 것으로서[3-4], 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[1,5-3], 발병은 서서히, 경과는 점진적인 것이 특징이다[5]. 증상으로는 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변 실금 등을 보인다[1,7-9].

AD는 β amyloid peptide (βA), estrogen, apolipoprotein E, presenilin (PS), oxidants (free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[10-12], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins (APP)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이며[13-15], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있어[16-17], acetylcholine를 측정하여 AD환자의 임상적 정황을 관찰하는 방법들이 연구되고 있다[18-24].

또한, 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 미세아교세포와 astrocyte들이 염증반응 cytokine을 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴됨으로써, 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다[25-26].

紫河車(*Hominis Placenta*)는 건강한 사람의 태반을 烘製하여 건조한 것으로, 性은 溫 無毒하고 味는 甘鹹하며 肺肝腎經에 들어가 補氣, 養血, 益精하여 虛損羸瘦, 勞熱骨蒸, 咳喘, 喀血, 盜汗, 遺精, 陽痿 등의 증상을 치료하는 효능이 있어 폐결핵, 신경쇠약, 빈혈, 기관지천식 등에 쓰이며 약침제제도 동일한 병증에 응용되고 있다[27-29].

藥鍼療法은 經絡學說의 원리를 바탕으로 有關한 藥物을 穴位壓痛點 혹은 體表의 觸診을 통해

陽性反應點에 주입함으로써 刺針과 藥物療法을 통해서 생체의 기능을 조절하고 病理狀態를 변화시켜 疾病을 치료하는 新鍼療法이다[30-31].

최근 치매에 대한 연구 동향을 살펴보면, 임상에서 활용되는 복합처방이 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향[32-38]과 AD병태 모델에 미치는 연구[39-43]들이 있다.

紫河車 藥鍼에 대한 연구로 이[44], 권 등[45], 윤 등[46]은 Bell's palsy에 대한 치험 보고를, 윤 등[47]은 수면장애에 미치는 효과를, 김 등[48]은 폐렴후유증 환자에 대한 치험례를 , 임[49]은 천식에 대한 효과를 보고하였고, 육 등[50]은 골다공증에 대한 영향을, 임 등[51]은 홍화인 자하거 약침의 골 재흡수와 골다공증에 대한 효과를, 최[52]는 골수부전 개선 효과를 보고하였다. 또한 이[53]의 자하거가 치매 병태 모델의 생화학적 변화와 행동에 미치는 영향에 대한 연구가 있었으나, 자하거 약침의 AD에 대한 영향을 관찰한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 자하거 약침이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 자하거 약침이 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 기억 행동변화와 생쥐의 뇌세포에 미치는 영향을 분석하여 염증반응 싸이토카인, 지질과산화도 (MDA)와 CD68/CD11b의 발현을 관찰하였고, 뇌조직의 虛血상태, 조직손상의 변화를 면역조직염색법으로 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride (TTC), Nonidet P - 40, Ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether), leupetin, N,N,N′,N′ - tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), DL-dithiothreitol (DTT), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride ($MgCl_2$)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRas사 (Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을, RNAzol^{B}는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을 그리고, Agarose는 FMC사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, β-amyloid peptide (Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14 (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead (Dynal, U.S.A.), anti-IL-1β와 anti-TNF-α (Pharmingen, U.S.A.), 그리고 anti-CD44 - PE (Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP - conjugated sceondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

機器는 spectrophotometer (shimazue, Japan), 원심분리기 (한일과학, Korea), Bio-freezer (sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT - 1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B - 480, Switzerland), 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540,

Japen), histidin affinity column을(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) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이라, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약침 약재

본 실험에 사용한 자하거 약침액은 대한약침학회에서 공급하는 자하거 2호를 사용하였다.

2. 방법

1). βA에 의한 AD 病態 생쥐 모델의 기억력과 미세아교세포의 분석

(1) AD 病態 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 βA 주입

βA(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 病態 생쥐 모델을만들기 위하여 βA(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.

② 자하거 약침투여

βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 陽性對照群인 tacrine 投與群(10㎎/kg,p.o), 자하거 2호 약침군(0.1ml/kg)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 매일 中脘(혈)에 0.1ml씩 주사하였다. 中脘(CV12)은 任脈의 前正中線上 臍上 4寸部位에 위치하여 調氣理氣, 化濕降逆하는 효능이 있어 後天의 氣를 생성하는 中心部의 개념을 지닌다[54].

③ AD 病態 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 病態 생쥐는 8주일간 자하거 2호를 주사하면서 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[55-56]. 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), 자하거 약침 투여군으로 분류하였고, 계속 8주간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

④ 행동 관찰

훈련과 자하거 약침 투여 8주 후에 AD 유발

생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다 (Fig. 1).

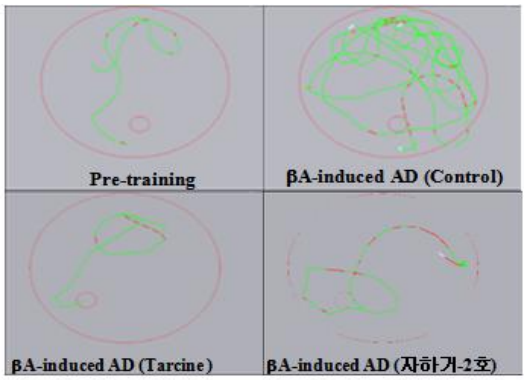


Fig.1 Photograph of water maze of bA-induced AD

(2) AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

① Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 미세아교세포 분리

8주간의 자하거 약침의 중완혈 주사가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. Brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 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 cytocine 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 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 미세아교세포내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

③ 지질과산화도(MDA) 측정

TBA측정은 Suematsu 등의 방법에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 가하고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5㎖을 가하고 그리고 75ul 증류수를 넣고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing하였다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 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 syringe rubber로 뇌조직을 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수하였다. 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 ACK 용액을 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) 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 첨가하였다. acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

(4) AD 病態 생쥐 뇌조직에서 虛血 및 조직손상 분석

① 뇌조직의 虛血 크기 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 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[57]으로 수행하였다. 虛血의 크기(AT)는,

$(AT)=[(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]$

A : 사진상에 나타난 虛血 면적

ST : 각각 section(2㎜)의 전체 면적

BH(brain Hipocampus) : 뇌의 hipocampus 부분의 면적

이며, 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 세척한 다음, 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

③ 면역화학조직염색 (immunohistochemical stainins)

분리된 AD 病態 생쥐의 뇌를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 조직절편을 4 μm 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 광학현미경으로 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 primary 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[58]을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. AD 病態 생쥐에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정

자하거 약침액을 중완(혈)에 주사 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, Fig. 2에서 보듯이 정상생쥐가 platform에 올라가는 시간은 3.908±0.51로 관찰 되었고, 대조군은 86.74±2.4이었고, tacrine 투여군은 14.2±1.8로 대조군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소를 나타내었다($p<0.001$). 자하거 약침액을 중완(혈)에 주사한 실험군은 29±5.5로 대조군에 비하여 유의성 있는 현저한 감소를 나타내었다($p<0.001$).

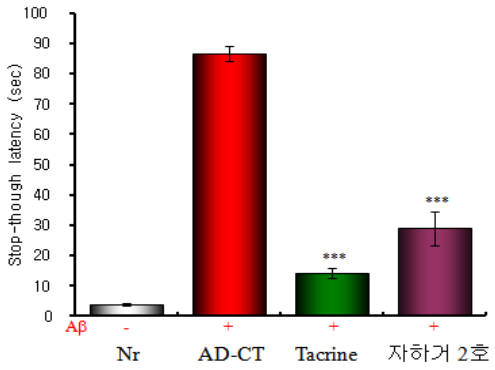


Fig.2. Effects of Hominis Placenta Herbal-Acupucture Solution(HPHAS) on the bA- induced alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS or orally administered Tacrine-HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 weeks after injected of□□HPHAS(0.1ml) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected ßA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, ßA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10mg/kg , p.o); HPHAS(0.1ml/kg, inj). 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 ßA -induced alzheimer's mice group (AD-CT) data by T test (***p<0.001).

2) Distance movement-through latency 측정

자하거 약침액을 중완(혈)에 주사하여 8주 후, distance movement- through latency를 관찰한 결과, Fig. 3에서 보듯이 정상생쥐가 platform에 올라가는데 걸린 거리는 146.07±13.7로 관찰 되었고, 대조군은 1826.8±223.3이었고, tacrine 투여군은 476.315±127.9로 대조군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소를 나타내었다($p<0.001$). 실험군은 239.6±120.5로 나타났다. 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 현저한 감소를 나타내었다($p<0.001$).

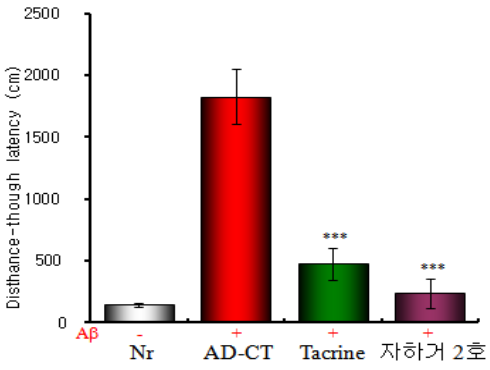


Fig.3. Effects of HPHAS on the bA-induced alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS or orally administered Tacrine-HCl and the acquisition training trial continued once a day for 8 weeks. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 weeks after were injected of□□HPHAS (0.1ml/kg) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training) and injected ßA-induced mice. Data represent means± S.E (N=10). Control, ßA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10mg/kg, p.o); □HPHAS(0.1ml/kg, inj). 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 ßA-induced alzheimer's mice group (AD-CT) data by T test (***p<0.001).

2. AD 病態 생쥐의 뇌세포 분석

1) AD 病態 생쥐의 microglial 세포에서 세포내면역형광염색

① 세포내 IL-1β 와 TNF-α발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 IL-1β와 TNF-α 발현을 관찰한 결과, Fig. 4에서 보는 것처럼 IL-1β의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 13.5±1.9이었고, 대조군이 71.7±5.8이었고, Tacrine을 투여한 양성대조군이 24.6±3.0으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.001). 실험군에서는 53.4±4.2로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(p<0.05). TNF-α의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 37.9±4.5이었고, 대조군이 116.5±8.9이었고, Tacrine을 투여한 양성대조군이 57.6±10.3로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고(p<0.001), 실험군은 81.3±3.4로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.01).

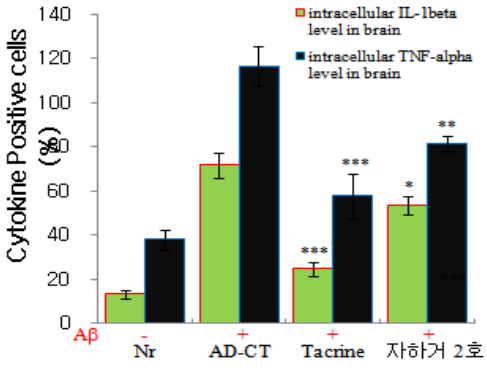


Fig.4. Intracellular staining of IL-1b activity on the brain CD14+cells in bA-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of HPHAS .

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10mg/kg) for 8 weeks. continued once a day for 8 weeks. IL-1b and TNF-α activity measured by FACS, Number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to ßA-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with ßA -induced alzheimer's mice group (AD-CT) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

② 지질과산화도(MDA) 측정

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, Fig.5에서 보는 것처럼 정상 생쥐의 뇌조직에서는 18.9±1.3이었고, 대조군이 177.9±10.5이었고, Tacrine을 투여한 양성대조군이 68.5±9.9로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (p<0.001). 실험군에서는 112.9±12.5 으로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(p<0.01).

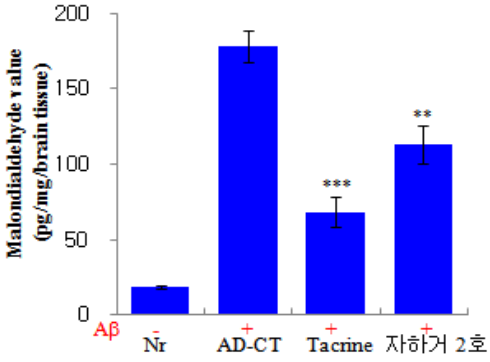


Fig.5. Effect of HPHAS on the malondialdehyde value in the brain tissue in bA-alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) for 8 weeks. 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 ßA-induced alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with ßA -induced alzheimer's mice group (AD-CT) data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

③ CD68/CD11b 발현 세포에 미치는 효과

알츠하이머 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서 astrocyte세포와 microglial세포의 활성표면 분자인 $CD68^+/CD11b^+$가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, Fig.6E에서 보듯이 정상 생쥐의 뇌조직중 $CD68^+/CD11b^+$의 세포수는 5.6±1.2(%)이었고, Fig.6B에서 보듯 대조군의 $CD68^+/CD11b^+$의 세포수는 49.0±1.3 (%)로 현저하게 증가를 나타내었고, 양성대조군인 tacrine 투여군 (Fig.6C)은 27.1±1.6(%)로 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다.

실험군은(Fig.6D)에서의 $CD68^+/CD11b^+$의 세포수는 33.7±2.1으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타내었다 ($p<0.001$). 이로 자하거 약침액 투여로 대조군에 비하여 현저히 발현되는 활성세포가 감소한 것으로 나타났다. 그러나 Fig.6E에서 보듯이 $CD68^+/CD11b^+$에 비하여 $CD68^-/CD11b^+$인 대식세포 비율은 실험군에서 대조군에 비하여 증가되는 결과를 나타냈다.

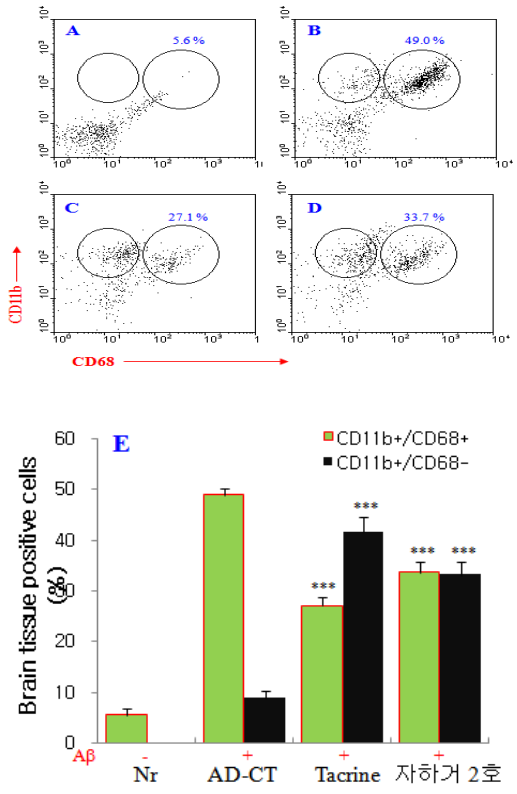


Fig.6. Effects of HPHAS on the percentage of CD68 and CD11b-gated cells in bA-alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) for 8 weeks. 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 ßA-induced alzheimer's disease model. At the end of the experiment, the mice brain CD14+ cells were removed and ßA-induced alzheimer's disease model control CD68+ and CD11b+ , tacrine (10mg/kg, p.o) treated, and HPHAS injection , CD68/CD11b cell population(%) were measured by analyzed by flow cytometer.

2) AChE 활성도에 미치는 영향

Fig.7에서 보는 것처럼 혈청중 AChE 활성도

수치는 정상군이 15.0±0.4 이었고, 대조군은 207.1±18.5으로 측정되었다. 양성대조군인 tacrine 투여군의 혈중 AChE 활성도는 58.3±9.7으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈고($p<0.001$), 실험군은 132.0±9.7로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다($p<0.01$).

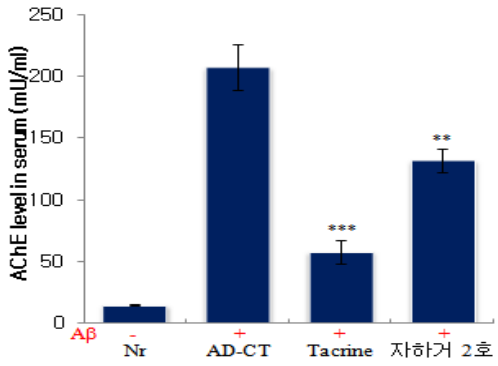


Fig.7. Effects of HPHAS on the serum AChE activity level in bA-alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12)of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) for 8 weeks. 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 ßA -induced alzheimer's mice group (Control) data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

3. AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血상태 및 조직 손상에 미치는 효과

1) 虛血상태에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과, Fig. 8과 Fig 9에서 보는 것처럼 대조군에서 虛血의 크기가 83.4±4.51 이었고, tacrine 투여군은 28.1±6.5로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고($p<0.001$), 실험군은 70.6±1.7로 대조군에 비하여 약간 감소를 나타내었다($p<0.05$).

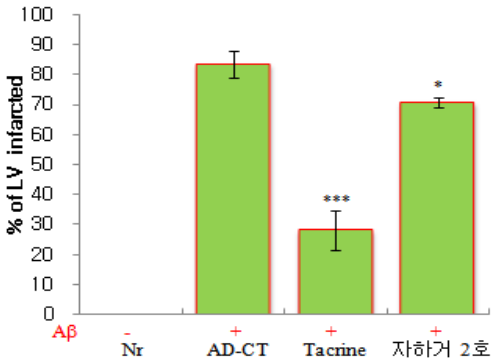


Fig.8. Effects of HPHAS on the infarct size of bA-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10mg/kg, p.o) for 8 weeks . Control, ßA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10mg/kg, p.o). Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as a percentage of the total area of the LV myocardium that was at risk (see Methods for details). Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with ßA-induced alzheimer's mice group (AD-CT) data by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

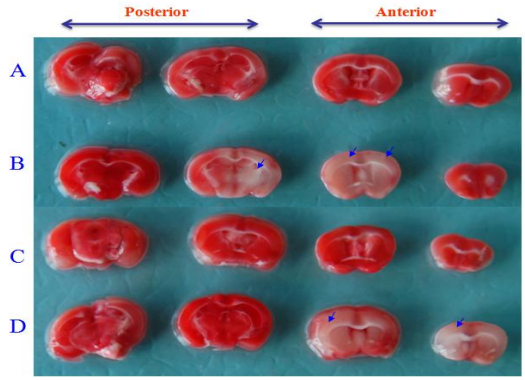


Fig.9. Effects of HPHAS on the coronal section of bA-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10mg/kg, p.o) for 8 weeks. Normal C57BL/6 mice was not treated (A). ßA-induced alzheimer's mice (control, B); Tacrine (10mg/kg, p.o, C); HAPAS(0.1ml/kg, inj). 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) 조직손상에 미치는 효과

AD 病態 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은 Hippocapus와 entorhinal (EC) 그리고 fimbriaformix (FIFX)가 뚜렷이 보이고 대조군은 뇌조직의 염증과 병변으로 그 형태가 뚜렷하지 않다. tacrine 양성대조군과 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있다 (Fig. 9). 그리고 hippocapus의 neuronal line이 정상군은 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증세포와 병변등으로 그 형태가 뚜렷하지 않다. tacrine을 투여한 양성대조군은 정상과 가깝께 뚜렷한 hippocapus의 neuronal line를 보이고 있다.

그리고 실험군에서는 희미하게 hippocapus의 neuronal line를 보이고 있다 (Fig. 10). Hippocapus에 Fig. 11의 B pannel과 같은 조직에 astrocytes와 microglial 세포 (화살표)(Fig. 12)가 침투되어 neuronal line이 사라지고 병변이 심화된 것을 볼 수 있다. 그리고 tacrine 양성대조군과 실험군은 정상과 가깝께 뚜렷한 astrocytes와 microglial 세포의 Hippocapus로 침투가 억제된 것을 알 수 있었다.

그리고 실험군의 D pannel은 대조군에서 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. 11).

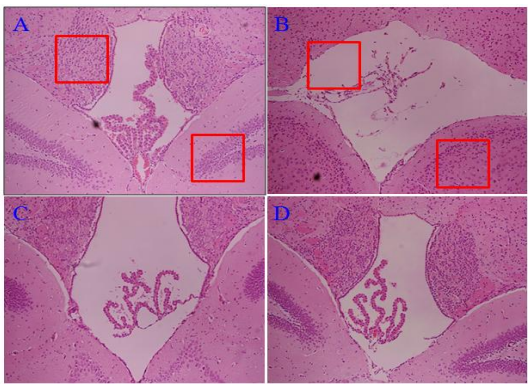


Fig.10. Histological analysis of hippocampal lesions of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS (0.1ml/kg, 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).

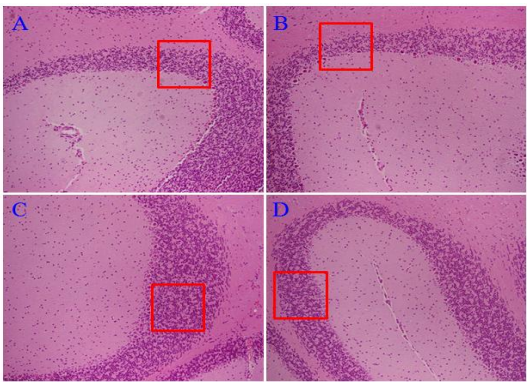


Fig.11. Histological analysis of the neuronal loss of hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS(0.1ml/kg, 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).

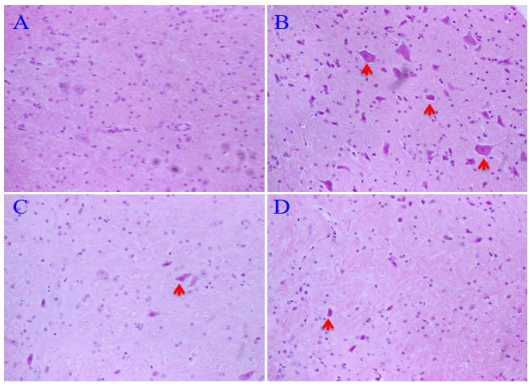


Fig.12. Histological analysis of the presence of macrophage/microglia in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice.

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS (0.1ml/kg, 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 Hippocapus에 대한 면역조직염색 분석

Fig. 13에서 보듯이 AD 병태모델의 뇌조직에 anti-Tau Ab로 면역조직화학염색을 하여 나타난 결과로, pannel B인 대조군에서 Tau 단백질에 positive한 조직세포가 많이 보이고, tacrine (pannel C)과 자하거 2호 (pannel D) 투여군에서는 Tau 단백질에 positive한 조직세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 그리고 Fig. 14는 GFAP(glial fibrillary acide protein, 성상교세포특이단백질)로 성상교세포 특이 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 한 결과로, pannel B인 대조군에서 GFAP 단백질에 positive한 성상교세포가 많이 보이고, tacrine (pannel C)과 자하거 2호 (pannel D) 투여군에서는 GFAP 단백질에 positive한 성상교세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다.

Fig. 15는 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 자하거 약침 (pannel D) 투여군에서는 presenilin-1/presenilin-2 단백질에 positive한 뇌조직세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다.

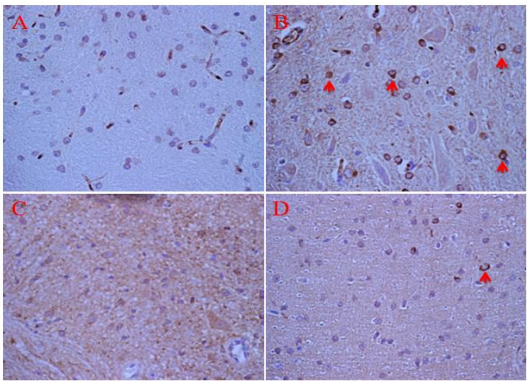


Fig.13. Immunohistochemistry analysis of Tau protein tissue in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .

C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml) and orally administered tacrine (10mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS (0.1ml, 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 mm 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).

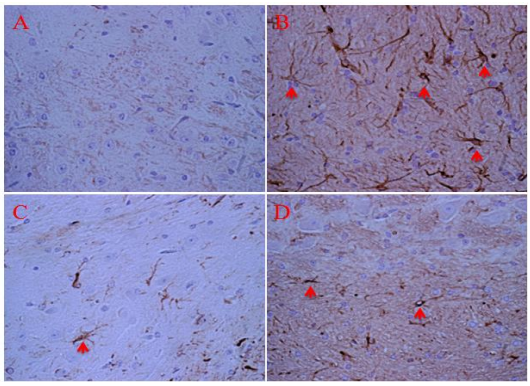


Fig.14. Immunohistochemistry analysis of GFAP protein tissue in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS (0.1ml/kg, 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 mm 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).

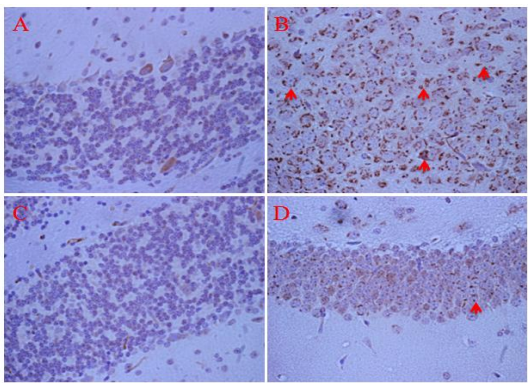


Fig.15. Immunohistochemistry analysis of presenilin 1/presenilin 2 protein tissue in the hippocampus of bA-induced alzheimer's mice .
C57BL/6 mice were injected into Chung-wan(CV12) of□□HPHAS(0.1ml/kg) and orally administered tacrine (10 mg/kg, p.o) and the acquisition taining trial continued once a day for 8 weeks. C57bl/6 normal (A), Control, ßA-induced alzheimer's mice (B); Tacrine (10 mg/kg, p.o, C); HPHAS (0.1ml/kg, 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 mm 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 50세 이전에 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[5-7]. 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 알쯔하이머 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[59].

현재까지의 연구보고에서 밝혀온 치매와 관련되어 나타나는 병리학적 소견으로는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 신경반(neuritic plaque)이 있다[14-17]. 신경섬유 덩어리

와 신경반은 아밀로이드 베타 펩티드(βA)의 침착에 의하여 생겨난다. βA는 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 유전자 수가 증가한 효과에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 생각하고 있다. 한편 알쯔하이머병 환자의 기저전뇌(basal forebrain)와 해마에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있다고 보고하고 있고, 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고와 βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화과정, 특히 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 생각되고 있다[18].

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 KD의 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[19]. 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. 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 βA가 과량 만들어짐으로써 신경독성을 나타내고 그에 따라 인지기능 결손이 동반되는 것으로 생각되고 있다. 최근에는 APP와 presenilin 단백질이 서로 결합한다는 사실이 입증됨으로서 이 사실을 더욱 더 뒷받침해주고 있다.

이런 癡呆에는 퇴행성 치매(AD), 혈관성 치매(VD), 중독성 치매등이 있으며, 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있는 것으로[20], 뇌의 全般的 萎縮과 특유의 조직학적 소견을 나타내며[5-6], 發病은 서서히, 경과는 漸進的인 것이 특징이다[5]. 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[8]. 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 역학적 조사에 의해 報告되어 있다[59]. 그리고 혈관성치매는 20-30%정도이고 약물이나 알코올 중독에 의한 중독성 치매는 10-20%정도이며, 사고에 의한 뇌의 손상도 癡呆의 원인이 될 수 있다[60].

AD는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 神經營養因子 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있고[24] 또한 최근에는 APP의 일부분인 CT-105가 βA보다 더 毒性이 있다는 보고와[61], βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고 등[11], βA와 CT-105의 毒性機轉에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌안에서의 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[62].

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, 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[63], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[64], 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[63].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 藥物들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등[65]과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등[66]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[66].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 미세아교세포 등의 神經膠細胞에서 생성되는 염증반응 싸이토카인에 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 싸이토카인들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 싸이토카인 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 假說로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[65,67-68].

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[67], 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[68].

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 싸이토카인이 밀접한 관계가 있으리라는 假說에 관심이 집중되고 있다. 특히 βA가 沈積된 老人癡 주변의 미세아교세포는 βA에 의해 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 염증반응 싸이토카인을 생성하므로써 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있다[68].

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 싸이토카인에 의해 신경세포의 死滅를 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이는 데, 이는 神經膠細胞인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 老人癡 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다[69].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴呆[70]', '呆病[71]', '健忘[72]' 등의 範疇에 속하며, 明代 張[70]의 ≪景岳全書・癲狂痴呆≫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.....", "凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴獃"라 되어 있다. 痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 使用되고 있다[70-71,73].

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[70-71,73], 현재 中醫學[73]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.

紫河車는 健康한 産婦의 신선한 胎盤을 수집하여 羊膜과 臍帶를 잘라 버리고 혈관을 割開하여 淸水에 반복적으로 씻어 血液을 제거한 후에 증 혹은 끓는 물 속에 잠깐 담갔다가 꺼내서 乾燥한 것이다. 人胞, 胞衣, 胎衣, 混元丹이라는 異名이 있다[74].

紫河車의 性은 溫하며 味는 甘, 鹹, 無毒하며, 歸經은 肺 肝 腎 三經이다. 主效能은 益氣養血, 補精하고, 主治는 血氣羸瘦, 虛損, 補氣養血, 五勞七傷, 骨蒸潮熱, 盜汗, 頭目眩暈, 耳鳴, 面萎黃, 倦怠無力, 肺虛咳嗽등으로 虛損과 有關한 病症을 治療한다[74].

紫河車 藥鍼液은 각종 세포 증식인자(간세포 증식인자, 상피세포증식인자, 신경세포 증식인자, 코로니 형성 자극인자, 각종 인터루킨, 각종 인터페론), 면역Gioblin, 혈액응고인자, 각종 호르몬 및 그 전구체(상선자극호르몬, 프로락틴, 갑상선 자극 호르몬, 스테로이드 호르몬), prostagladin, 각종효소, 에리스로포이에틴, 인지질, 각종 다당류로 구성되어 있다[75].

藥鍼療法은 經絡學說의 원리를 바탕으로 有關한 藥物을 穴位壓痛點 혹은 體表의 觸診을 통해 陽性反應點에 주입함으로써 刺針과 藥物療法을 통해서 생체의 기능을 조절하고 病理狀態를 변화시켜 疾病을 치료하는 新鍼療法이다[30-31].

최근 치매에 대한 연구 동향을 살펴보면, 임상에서 활용되는 복합처방이 노화과정과 항산화과정에 미치는 영향[32-38]과 AD병태 모델에 미치는 연구[39-43]들이 있다.

紫河車 藥鍼에 대한 연구로 이[44], 권 등[45], 윤 등[465]은 Bell′s palsy에 대한 치험 보고를, 윤 등[47]은 수면장애에 미치는 효과를, 김 등[48]은 폐렴후유증 환자에 대한 치험례를 , 임[49]은 천식에 대한 효과를 보고하였고, 육 등[50]은 골다공증에 대한 영향을, 임 등[51]은 홍화인 자하거 약침의 골재흡수와 골다공증에 대한 효과를, 최[52]는 골수부전 개선 효과를 보고하였다. 또한 이[53]의 자하거가 치매 병태 모델의 생화학적 변화와 행동에 미치는 영향에 대한 연구가 있었으나, 자하거 약침의 AD에 대한 영향을 관찰한

연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 자하거 약침액이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 싸이토카인과 CD68/CD11b의 발현, MDA의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 虛血상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서 CT-105를 사용하지 않고 βA를 통해 AD 病態 생쥐모델을 만든 이유는, CT-105와 βA는 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 βA는 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 βA 사용이 적절하다고 사료되었다.

Morris water maze 과제는 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[55-56], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 病態 생쥐에 대한 자하거 약침액의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

자하거 약침액 투여 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 자하거 약침액 投與群은 모두 對照群에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여, 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, distance movement- through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 자하거 약침액 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 자하거 약침액 投與群이 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 자하거 약침액을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있었다.

인체 조직의 산화적 손상은 Nakaya 등[76]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[76]. 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[77]. 생체막에서 생성된 지질 과산화(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[77]. 따라서 운동중에 에너지 요구량의 증가, 특히 유산소성 에너지의 증가는 활동 조직에 수십배의 산소공급을 요구한다. 증가된 산소 소비율은 미토콘드리아에서의 대사를 비례적으로 증가시켜, 산소 자유라디칼과 ROS의 생성 또한 증가시키게 된다. 증가된 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 자유라디칼 생성과 뒤이은 지질 과산화, 즉 막 PUFA의 과산화는 운동중 산소섭취의 상승에 비례하여 증가하고, 골격근 손상에 정적 상관관계가 있다고 한 연구처럼 활동에 따른 지질 과산화 정도를 파악하거나, 항산화제 투여에 따른 변화정도를 규명하는 방향으로 연구가 진행되어 졌다[78-80].

ßA로 유도된 AD 병태 생쥐의 병변 뇌에서 지질 과산화와 자하거 약침액 투여로 지질 과산화물질을 억제할 수 있는 지를 관찰한 결과 자하거 약침액 추출물을 투여로 알츠하이머 생쥐의 병변 뇌부위에 MDA의 양이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다.

βA로 유도된 AD 病態 생쥐의 병변 뇌조직에서의 염증반응 싸이토카인, CD68/CD11b 발현을 관찰하였는데, 먼저 병변 뇌조직에서의 염증반응 싸이토카인의 일종인 IL-1β 생산량을 관찰한 결과, 正常群에 대해 βA를 뇌에 주입한 對照群에서는 증가되었으나 자하거 약침액 投與群에서는 그 발현이 현저히 감소했고, TNF-α 단백질 역시 正常群에 비해 βA를 뇌에 주입한 對照群은 증가하였으나 자하거 약침액 投與群은 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있다.

이는 자하거 약침액이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증反應과 관련된 cytokine의 활성화를 세포성 단백질 수준과 유전자 수준 모두 효과적으로 억제한 것으로, 자하거 약침액의 투여를 통해 과잉 생산된 염증반응 싸이토카인으로 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[81-82]. 이러한 병변 부위는 plaques과 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 MAP2(microtubuleassociated protein 2), GFAP, CD11b, CD68, βA-protein 또는 tau 단백질등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuronal, astrocytic, macrophage 그리고 microglial differentiation 등의 세포들은 표지인자(MAP2, GFAP, CD11b and CD68)를 사용하여 확인되었고 또한, 염증유발 싸이토카인(IL-1β, TNF-α) 그리고 ROS도 높은 농도로 蓄積되어 있다[83-84]. 이러한 배경으로 본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 biopy하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포형광분석기로 병변부분의 astrocyte와 microglia 세포수를 측정하기 위하여 두세포의 표면 표지인자인 CD68/CD11b를 관찰하여 對照群에 비하여

자하거 약침액 投與群이 현저한 CD68/CD11b 세포수 감소 결과를 얻었다. 이는 자하거 약침액 성분이 BBB막을 통과하였는지 아니면 다른 활성인자로 기인된 것인지는 확인할 수 없었지만, AD 유발 동물의 뇌 병변부위를 이루고 있는 염증세포수가 크게 감소한 결과이다. 또한 신경과 뇌세포사 정상으로 회복되었음을 의미하는 것이기도 하다.

AD 病態 생쥐모델 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 對照群에 비해 자하거 약침액 投與群은 유의성 있게 虛血의 크기가 작아져, 자하거 약침액이 βA로 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 보였다. βA로 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 있었다. 자하거 약침액 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 있다. 이는 자하거 2호가 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 hippocapus 병변부위에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 대조군에 비하여 자하거 약침액을 투여한 실험군에서 Tau 단백질, GFAP 단백질, presenilin 1/2 단백질의 발현량이 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 βA로 유도된 AD 病態 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop - through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 미세아교세포에서 염증반응 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현, 과산화 지질도 (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 자하거 약침액은 βA의 과다 생성, 미신경교세포의 염증반응 싸이토카인의 과잉 발현 등으로 인해 惹起될 수 있는 AD의 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 자하거 약침액의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

자하거 약침이 βA로 유도된 AD 病態 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자하거 약침액은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

2. 자하거 약침액은 AD 병변 뇌조직에서의

세포내 IL-1β, TNF-α의 발현 측정에서 양성세포수를 억제하였다.

3. 자하거 약침액은 AD 병변 뇌조직에서의 MDA 측정과 CD68/CD11b의 세포수를 억제하였다.

4. 자하거 약침액은 AD 병변 뇌조직의 虛血상태를 유의성 있게 개선하였고 虛血로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

5. 자하거 약침액은 AD 병변 뇌조직의 면역조직화학염색법으로 Tau 단백질, GFAP 단백질, presenilin 1/2 단백질의 발현 억제를 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 자하거 약침은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 자하거 약침액의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

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. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994:114-32.
3. Altstiel LD and Sperber K., Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiat. 1991;15:481-95.
4. Alzheimer's Disease Collaboratory Group. The structure of the presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. Nature Genetics. 1995;11:219-222.35
5. 郭隆璨. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27-31.
6. 李定均. 精神醫學. 서울:一潮閣. 1995:87-8, 465-7, 514-8, 600.
7. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울.:하나의학사. 1988:138, 216-28.
8. 徐舜圭. 成人病 老人病學. 서울:고려의학. 1992:225-8, 230-2.
9. 이광우・정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
10. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C., Kim. Grace., Seekins, S., Yagar, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G. and Sisodia, S. S.. Familial Alzheimers Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A 1-42/1-40 Ratio in Vitro and In Vivo. Neuron. 1996;17:1005-13.
11. Breakfield XO and Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1989;1:339-71.
12. Breakfield XO and DeLuca NA. Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. New Biol.. 1991;3:203-18.
13. Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M., Principles of Neural Science 3rd edition. 1991.
14. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA., An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991;88:7247-51

15. Selkoe DJ., N. Engl. J. Med. 1989;320:1484-7.
16. Selkoe DJ., Scientific American. 1991;November:68-72.
17. Yankner BA, Dawes LR, Fischer S, Villa-Komaroff L, Oster- Granite ML and Neve RL., Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. 1989.
18. Yoo-Hun Suh, "An etiological role of amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the b-amyloid precursor protein in Alzhiemr's disease", J. Neurochem. in press.
19. Weinstein HC, Scheltens P, Hijdra A., et al., Neuroimaging in the diagnosis of Alzheimer's disease II. Positron and sigle photon emission tomography. clinical Neuro. Neurosurg. 1993;95:81-91.
20. Baddeley A.D, Bressi S, Sala S.D, Logie R, Soinnler H. The decline of working memeory in Alzheimer's disease. Brain. 1991;114:2521-42.
21. Borchelt DR, Thinakaren G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's diease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*. Neuron. 1996;17:1005-13.
22. 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):1237-39.
23. 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.
24. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
25. 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 abnormalities. Brain Res. 1992;593(2):299-303.
26. 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.
27. 장종범. 자하거에 대한 고찰. 대한한의학회지. 1965;3(5):36-8.
28. 全國韓醫科大學本草學敎授 공편. 本草學. 서울:永林社. 1991:567-8.
29. 이상길, 이재동, 고형균, 박동석, 이윤호, 강성길. 자하거 약침 제제에 대한 고찰. 대한침구학회지. 2000;17(1):67-74.
30. 이문호. 약침요법. 서울:일중사. 1999:17-24.
31. 천영실, 이재동, 최도영. 약침요법의 자침부위별 흡수에 관한 연구. 대한침구학회지. 1995;12(1):302-9.

32. 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.
33. 鄭仁哲, 李相龍. 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1997;8(2):51-62.
34. 徐元熙, 李相龍. 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(1):45-58.
35. 金保冏, 李相龍. 蔘茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(1):59-72.
36. 손정석, 류영수. 七福飮이 老化 생쥐 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1997;8(2):25-38.
37. 朴鍾雲, 李基商, 文炳淳. 四物湯이 老化 생쥐 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):185-201.
38. 崔龍埈, 成彊慶, 文炳淳. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 硏究. 대한한의학회지. 1998;19(1):392-409.
39. 김보경, 이상룡. 安神淸腦湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):708-22.
40. 정인철, 이상룡. 導痰益氣活血湯이 알츠하이머 질환 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(2):260-76.
41. 하수영, 정인철, 이상룡. 加減固本丸이 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(1):53-77.
42. 윤상학, 정인철, 이상룡. 香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):59-74.
43. 김현수, 정인철, 이상룡. 巴戟天이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):45-58.
44. 이채우. 紫河車 藥鍼의 구안와사에 대한 임상적 연구. 동의대학교 대학원 석사학위논문. 2005.
45. 권강, 정재호, 서형식. 紫河車 藥鍼치료를 이용한 양측 동시성 Bell's palsy 환자 1례에 대한 증례보고. 대한약침학회지. 2003;6(2):137-47.
46. 윤정훈, 육태환, 송범룡. 紫河車 藥鍼의 Bell's palsy에 대한 치험보고. 대한약침학회지. 2000;3(1):88-99.
47. 윤현민, 이채우, 김홍기. 紫河車 藥鍼이 수면장애에 미치는 효과. 대한약침학회지. 2005;8(1):5-12.
48. 김은곤, 박영엽, 이광호, 이한배, 장성익, 김성균, 심윤섭, 이정희. 자하거 약침 투여후 기침가래 증상이 호전된 폐렴 후유증 환자 2례. 대한약침학회지. 2003;6(3):65-73.
49. 임지택. 자하거 약침이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2005.
50. 육태환, 이창현, 이학인. 홍화자·녹용·자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(1):61-75.
51. Jae-Yeun Lim, Dong-IL Kim, Tae-Kyun Lee. A Study on Bone Resorption and Osteoporosis by Honghwain-Jahage extracts. 대한한방부인과학회지. 2003;16(1):101-17.
52. 최창우. 자하거 가수분해물이 5-Fluorouracil 매개성 골수부전 개선에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 박사학위논문. 2003.
53. 이은경. 자하거가 치매병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향. 대구한의대학교 대학원 석사학위논문. 2006.

54. 安榮基. 經穴學叢書. 서울:성보사. 2000:694.
55. Means LW, Edmonds SM. Glucose minimally attenuates scopolamine-but not morphine-induced deficits on a water maze alternation task. J Neural Transm. 1998;105(10-2):1171-85.
56. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, ohkubo Y, Yamaguchi I, FR121196, a potential antidemntia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. J Phamacol Exp Ther. 1995;272(1):256-63.
57. Michael LH, Entman ML, HArtely 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.
58. 金字哲 외. 統計學槪論. 서울:英志文化史. 1990:177-9.
59. Swash M, Oxbury J. Clinical Neurology. NewYork. 1991;1:120-9.
60. Refolo LM · Salton SR · Anderson JP · Mehta P · Robakis NK : Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzhiemer amyoid precursor form PC12 cell cultures. Biochem Biophys Res Commun. 1989;164:664-70.
61. Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. Brain Res. 1997;778(1):158-65.
62. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH. Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. FASEB J. 2000;14(11):1508-17.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
67. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartman A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRⅡ/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999;19(9):3440-7.
68. 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.

69. 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.

70. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.

71.. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.

72. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원. 1985:217-8, 229.

73. 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.

74. 辛民敎. 臨床本草學. 개정증보판. 서울:永林社. 1997:191-2.

75. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 서울:한성인쇄. 1992:182.

76. H. Nakaya, N. Tohse and M. Kanno. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue.*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1987;253:H1089-97.

77. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. Fed Proc. 1973;32(8):1870-4.

78. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. Proc Nutr Soc. 1998 Feb;57(1):9-13.

79. Maxwell MB. Cancer of the prostate. Semin Oncol Nurs. 1993 Nov;9(4):237-51.

80. Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L, Brooks GA. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. J Appl Physiol. 1993 Aug;75(2):566-72.

81. 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.

82. 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.

83. Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. Acta Neuropathol(Berl). 1995;89:35-41.

84. Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease, correlations with senile plaques and disease progression. J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55:1134-42.