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

天王補心丹 熱水抽出物, 超微細粉末劑形이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

최강욱, 정인철
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of ChenwhangBosindan(CBD) Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model

Kang-Wook Choi, In-Chul Jung
Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective :
This experiment was designed to investigate the effect of the CBD hot water extract & ultra-fine Powder on Alzheimer's Disease Model Induced by βA.

Method :
The effects of the CBD hot water extract on expression of interleukin-1 beta(IL-1β), TNF-α mRNA and production of IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS).

The effects of the CBD hot water extract & ultra-fine powder on (1) the behavior (2) expression of IL-1β, tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), (3) the infarction area of the hippocampus in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Result :
The CBD hot water extract suppressed the expression of IL-1β, TNF-α mRNA in BV2 microglia cell line treated with LPS.

The CBD hot water extract significantly suppressed the production of IL-1β, TNF-α in BV2 microglial cell line treated with LPS.

The CBD hot water extract & ultra-fine powder a significant inhibitory effect on the memory deficit was shown for the mice with Alzheimer's disease induced by βA in the Morris water maze experiment, which measured step-through latency and distance movement-through latency.

투고일 : 6/4 수정일 : 7/5 채택일 : 7/15
* 교신저자 : 정인철 주소 : 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 043-229-3727 E-mail : npjeong@dju.ac.kr

The CBD hot water extract & ultra-fine powder significantly suppressed the expression of IL-1β and TNF-α protein in the microglial cell of mice with Alzheimer's disease induced by βA.

The CBD hot water extract & ultra-fine powder suppressed the over-expression of AChE activity in the serum of the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

The CBD hot water extract & ultra-fine powder reduced infarction area of hippocampus, in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

Conclusions :

These results suggest that the CBD hot water extract & ultra-fine powder may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of the CBD hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words :

Alzheimer's disease, ChenwhangBosimDan(CBD), hot water extract & ultra-fine powder

I. 緖 論

치매는 기억, 언어, 시각공간능력, 판단력, 인격과 인지와 연관된 정신적인 능력의 후천적인 손상을 의미하는 것으로[1] 치매를 야기하는 원인으로는 뇌조직의 퇴행, 변성 또는 노화, 중추신경계 감염, 뇌손상, 독성 대사장애, 혈관성 장애, 신경계 질환 등[2]이 있으며 이중 퇴행성변화로 인한 Alzheimer's disease(AD)로 인한 것이 가장 많다[1]. AD의 경우 병리학적 진행과정을 되돌릴 수 있는 방법이 현재까지는 없기 때문에, 병의 진행을 늦추어 인지력을 보전하고 행동장애를 최소화하며 환자의 삶의 질을 유지하는 것이 치료의 현실적인 목표가 되는데[3] 이에 관한 다양한 연구[4~6]가 이루어지고 있다.

韓醫學的으로 '痴呆'라는 病名은 ≪景岳全書·雜病謨≫[7]에서 처음으로 기술된 이래 淸代의 陳[8]과 錢[9]이 痴呆의 類似槪念으로 '呆病' 등을 言及하였는데, ≪靈樞·天年≫[10]에서 "六十歲 心氣始衰 故憂悲, 八十歲 魄離 言善誤"라 하여 痴呆의 개념은 이미 內經時代부터 인식되었던 것으로 보인다.

天王補心丹은 ≪ 世醫得效方 ≫[11]의 처방으로 滋陰養血, 補心安神하는 효능이 있어 陰虧血少로 心神이 不寧하여 虛煩少寐, 心悸神疲, 夢遺健忘, 大便乾結, 口舌生瘡, 舌紅少苔, 脈細而數 등의 증상을 치료하는데 활용되는데[12], 특히 이 등[13]은 天王補心丹이 PC - 12 cell에서 amyloid precursor protein (APP), acetylcholinesterase (AChE) 등을 抑制하고 건망증 생쥐모델의 기억력저하를 억제하는 효과가 있다고 보고한 바 있다.

현재 가장 널리 사용되는 한약 제형인 湯劑는 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있다[14]. 초미세 분말은 약재를 수십 ㎛로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 최근의 연구에서 약물의 안정성, 편리성 등에서 우수한 효과를 보였다는 결과가 있으며[15] 한약의 제형으로 초미세분말을 응용한 연구가 활발히 진행되고 있다[16,17].

이에 저자는 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말이 in vitro 실험에서 proinflammatory cytokine의 생성과 mRNA 발현, in vivo 실험에서 기억력 감퇴 억제 효과, 뇌세포에 대한 영향, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과를 관찰한 결과, 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 cholinesterase kit, Tris - HCl, NaCl, lipopolysaccharide (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(USA) 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(USA) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(USA) 제품을, 그리고 agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, β-amyloid peptide(Calbiochem, USA), anti-mouse IgG-bead(Dynal, USA), anti-IL-1β와 anti-TNF-α(Pharmingen, USA), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(1:4000, Amersham, USA)와 ECL-hybond film(Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

β-amyloid peptide는 Calbiochem사(USA) 제품을, anti-mouse IgG-bead는 Dynal사(USA) 제품을, anti-CD14, anti-IL-1, anti-TNF-α는 Pharmingen사(USA) 제품을, anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(1:4000)와 ECL-hybond film은 Amersham(USA)사 제품을 사용하였고 상기 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT - 1800T, 대웅, Korea), rotary evaporator, (BÜCHI B-480, Switzerland), freeze dryer, (EYELA FDU - 540, Japan), histidin affinity column(Invitrogen, USA), Windows 1D main program(AAB, USA), stereotaxic frame(Adamec, USA), CELLection pan anti - mouse IgG - bead(Dynal, USA), brain matrix(ASI instruments, Warren, USA), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, USA), CO_2 incubator(Lepco, USA), cytometry(BD, USA), microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome(Serotec., USA), VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, USA) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐는 (주) 샘타코에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형

사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 天王補心丹(ChenwhangBosimDan, CBD)의 처방구성은 ≪ 世醫得效方 ≫[11]을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of ChenwhangBosimDan(CBD)

Herb	Galenical	Dose(g)
生乾地黃酒洗	Rehmanniae Radix	8.0
黃連酒洗	Coptidis Rhizoma	8.0
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	4.0
人 蔘	Ginseng Radix	2.0
當歸酒洗	Angelicae Gigantis Radix	2.0
五味子	Schizandrae Fructus	2.0
天門冬	Asparagi Radix	2.0
麥門冬	Liriopis Tuber	2.0
柏子仁	Biotae Semen	2.0
山棗仁炒	Zizyphi Spinosae Semen	2.0
玄 蔘	Scrophulariae Radix	2.0
白茯神	Poria	2.0
遠 志	Polygalae Radix	2.0
丹 蔘	Salviae Miltorrhizae Radix	2.0
桔 梗	Platycodi Radix	2.0
	Total amount	44.0

4) 검액의 조제

(1) 天王補心丹 열수추출물 분리 및 검액의 조제

天王補心丹 1첩 분량(44.0 g)에 증류수 1,300 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 天王補心丹 열수추출물(13.375 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 400 ㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 天王補心丹 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 生乾地黃, 黃連, 石菖蒲, 人蔘, 當歸, 五味子, 天門冬, 麥門冬, 柏子仁, 酸棗仁, 玄蔘, 白茯神, 遠志, 丹蔘, 桔梗을 세척 건조한 후, pin mill을 이용하여 직경 1 mm내외로 조분쇄한 다음, turbo mill에서 비터(beater) 회전속도 6,750 rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(air classifying wheel speed) 5,000~7,500 rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 400 ㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) BV2 microglial cell line에서의 cytokine mRNA 발현에 대한 real time quantitative PCR 분석

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 天王補心丹 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1 ㎍/㎖를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000 rpm에서 5분간 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 15분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2 - propanol 200 ㎕와 동량 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 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.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 DNase I(10 U/㎕) 2U/tube와 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가하고, 다시 1 ㎕의 M-MLV RT(200 U/㎕)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 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 PCR에 사용하였다.

③ Real time quantitative PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real - Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Proinflammatory cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre - denaturation은 2 min 50℃, 10 min 94℃, 그리고 40 cycles는 0.15 min 95℃, 1 min 60℃에서 수행하였다. 각 군의 quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

$y=x(1+e)n$

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

사용된 primers는 다음과 같다.

ⓐ mouse G3PDH

Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

ⓑ mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

ⓒ mouse IL-6

Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

ⓓ mouse TNF-α

Forward Primer: 5' CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer: 5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'

ⓔ mouse COX-2

Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'

ⓕ mouse NOS-Ⅱ

Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

2) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 IL-1β, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1×10^5 cells/㎖)하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight시켰다. 天王補心丹 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 다음, 새로운 배양액으로 48시간 동안 CO_2 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 즉, 각 well에 배양상층액을 100 ㎕씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조

① βA(1～40)

βA는 calbiochem 회사에서 공급받아 사용하였고 그 아미노산 배열은 다음과 같다 (Scheme. 1).

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

Scheme. 1. Sequence of βA(1～40).

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10 μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10 μM)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) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

Morris water maze에서 일주일간 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하고, 선별된 생쥐 4마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine 10 ㎎/㎏), 天王補心丹 열수추출물 실험군(400 ㎎/㎏)과 天王補心丹 초미세분말 실험군(400 ㎎/㎏)으로 분류하고, βA를 투여한 후 2주 간 안정시켰다. 그 후 7주간 1일 1회 약물 투여를 하였으며, 마지막 1주간 약물 투여와 함께 1주일간 3회 각 군의 생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다.

4) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 天王補心丹 열수추출물(400 ㎎/㎏)과 초미세분말(400 ㎎/㎏) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. Brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 rpmI1640을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간

계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 다시 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척하고 CELLection pan anti-mouse IgG-bead로 미세아교세포를 분리한 다음 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

(2) Microglial cell 내 proinflammatory cytokines 분석

포집한 미세아교세포를 ice - cold FACS 완충용액(0.05 % BSA, 0.02 % sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284 ㎕와 동량의 인산완충용액(2 % paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice - cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1 % saponin, 0.05 % sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC - anti - IL - 1β와 FITC - anti - TNF - α를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 Cellquest 프로그램으로 분석하였다.

5) AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 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 첨가했다. Acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

6) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에서의 허혈상태 분석

(1) 허혈면적 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2 ㎜의 두께로 자른 후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다.

허혈 크기의 측정은 Michael의 방법[18]으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진 상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2 ㎜)의 전체 면적, BH(brain hipocampus)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 %로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) × 100로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation으로 기록하였다. Morris water maze 이외의 실험에서 각 군의 유의성은 일원배치분산분석(ANOVA test)로 평가하였고 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's method로 사후 검정하였고, Morris water maze 실험의 유의성은 Kruskal-Wallis test로 평가하였고 역시 $p<0.05$ 수준에서 Mann-Whitney U test로 사후 검정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 天王補心丹에 대한 세포독성

天王補心丹의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 天王補心丹 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 104.9±6.1, 96.9±1.0, 95.1±1.3, 88.3±3.8, 83.0±1.0(%)로 나타나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

2. BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine mRNA 발현

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.22로 나타났으며, 天王補心丹 100, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.717, 0.954로 나타났으며, TNF-α mRNA 발현은 정상군이 0.031, 天王補心丹 100, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.646, 0.947로 나타났다.

3. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량

1) IL-1β

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군 34.5±18.8 pg/㎖, 대조군은 813±63.1 pg/㎖이었고 天王補心丹 100, 50 ㎍/㎖ 실험군은 각각 534.3±48.7, 701.6±20.0 pg/㎖로 天王補心丹 100 ㎍/㎖ 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

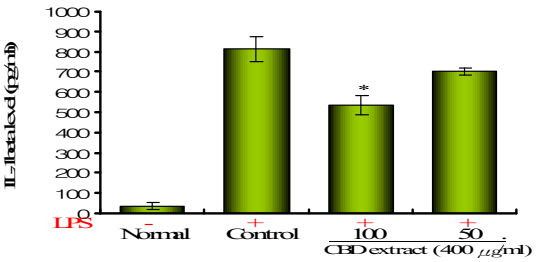


Fig. 1. Inhibitory effect of CBD hot water extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of CBD hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6hrs. Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data are represented as means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

3) TNF-α

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군이 508.0±94.8 pg/㎖, 대조군이 2274.0±321.0 pg/㎖이었으며, 天王補心丹 100, 50 ㎍/㎖ 실험군은 각각 1382±83.4, 1672±107.5 pg/㎖로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

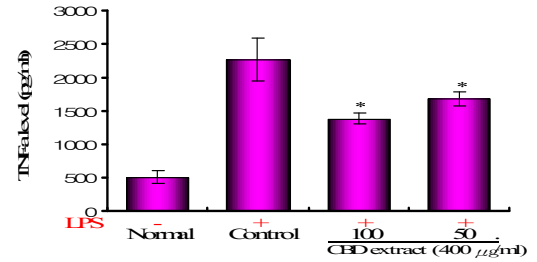


Fig. 2. Inhibitory effect of CBD hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were pretreated with various concentrations of CBD hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6hrs. Total TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data are represented as means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

4. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) step-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

step-through latency 측정에서 정상군이 3.9±1.3 sec, 대조군이 85.9±5.8 sec, tacrine 투여군이 14.3±4.0 sec, 天王補心丹 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 18.4±7.8, 17.0±4.7 sec로 tacrine 투여군과 天王補心丹 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 天王補心丹 초미세분말, 열수추출물 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

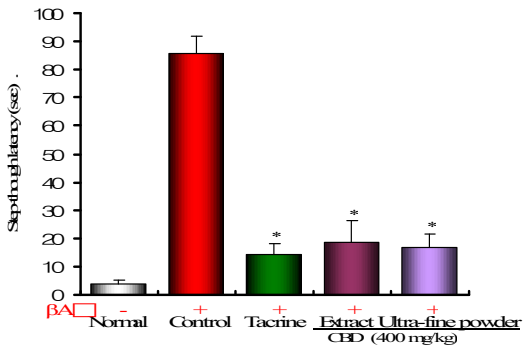


Fig. 3. Effects of CBD hot water extract & ultra-fine powder on the memory impairment of βA-induced Alzheimer's mice in the step-through type of Morris water maze test.
C57BL/6 mice were trained once a day for 1 wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of CBD hot water extract, CBD ultra-fine powder or tacrine for 8 wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week.
Control, βA-induced alzheimer's mice; tacrine(10 ㎎/㎏, p.o); CBD hot water extract, and CBDultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o).
Data represent means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U Test($p<0.05$). (N=4)

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency 측정에서 정상군이 145.33±35.3 ㎝, 대조군이 1976.7±427.2 ㎝, tacrine 실험군은 476.3±286.1 ㎝, 天王補心丹 열수추출물 실험군은 498.2±183.2 ㎝, 초미세분말 실험군은 211.8±107.3 ㎝로 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였고 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말 실험군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig 4).

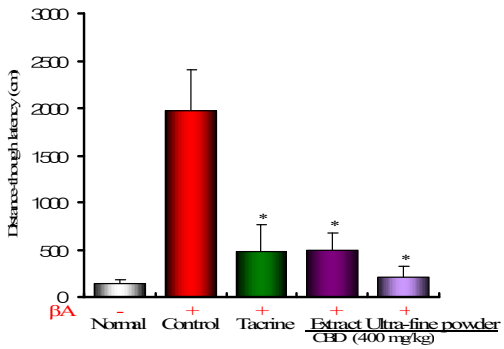


Fig. 4. Effects of CBD hot water extract & ultra-fine powder on the memory impairment of βA-induced Alzheimer's mice in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of CBD hot water extract, CBD ultra-fine powder or tacrine for 8wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week.
Control, βA-induced alzheimer's mice; Tacrinr(10 ㎎/㎏, p.o); CBD hot water extract, and CBDultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o).
Data represent means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U Test($p<0.05$). (N=4)

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 대한 영향

1) Microglial cell에서의 IL-1β 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 IL-1β의 발현을 관찰한 결과, IL-1β의 발현은 대조군에서 88.6±2.5%, tacrine 투여군에서 19.0±1.9%, 天王補心丹 열수추출물과 초미세분물 실험군에서 각각 23.1±6.4%와 44.8±12.2%로 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 억제효과를 보였고 실험군 사이에서는 열수추출물 실험군에서 초미세분말에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

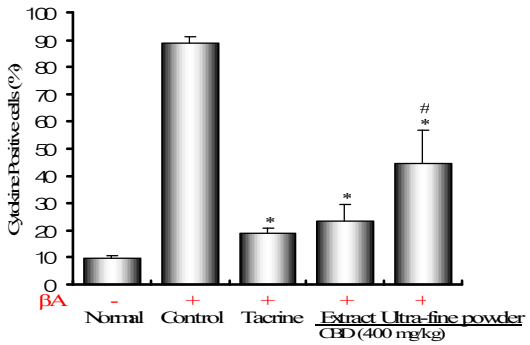


Fig. 5. Effects of CBD hot water extract & ultra-fine powder on IL-1β activity on the microglial cell in βA-induced Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of CBD hot water extract, and CBD ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks. IL-1b activity measured by FACScalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model.
Data represent means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).
# Statistically significant value compared with CBD extract group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

2) Microglial cell에서의 TNF-α 발현 억제 효과

Microglial 세포내에서의 TNF-α의 발현은 대조군은 94.9±2.3%이었고, tacrine 투여군은 21.1±4.6%, 天王補心丹 열수추출물 실험군은 63.0±5.7%였으며, 초미세분말 실험군은 44.1±7.8%으로 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 실험군 사이에서는 초미세분말 실험군에서 열수추출물에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

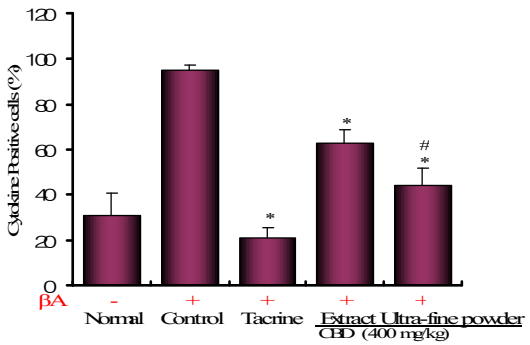


Fig. 6. Effects of CBD hot water extract & ultra-fine powder on TNF-α activity on the microglial cell in βA-induced Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of CBD hot water extract, and CBD ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks. TNF-α activity measured by FACScalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model.
Data represent means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).
# Statistically significant value compared with CBD extract group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 혈청의 AChE 활성도에 미치는 영향

생쥐 혈청내 AChE 활성도는 정상군이 15.0±3.7 U/㎖, 대조군은 214.0±24.9 U/㎖이었다. Tacrine 투여군은 33.0±17.9 U/㎖, 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말 실험군은 각각

117.7±55.2, 138.9±20.2 U/㎖로 tacrine 투여군과 天王補心丹열수추출물 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

7. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈상태에 미치는 효과

1) AD 병태 생쥐 모델의 허혈에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 86.7±2.8%이었고, tacrine 투여군, 天王補心丹 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 49.5±5.9%, 64.8±1.9%, 61.5±9.8%로 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말 실험군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 7).

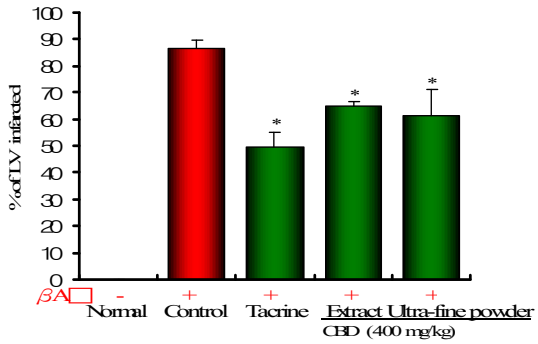


Fig. 7. Effects of CBD hot water extract and CBD ultra-fine powder on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice brain.
C57BL/6 mice were orally administered of CBD hot water extract and CBD ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as the LV that was at risk(a percentage of the total area).
Data represent means± S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

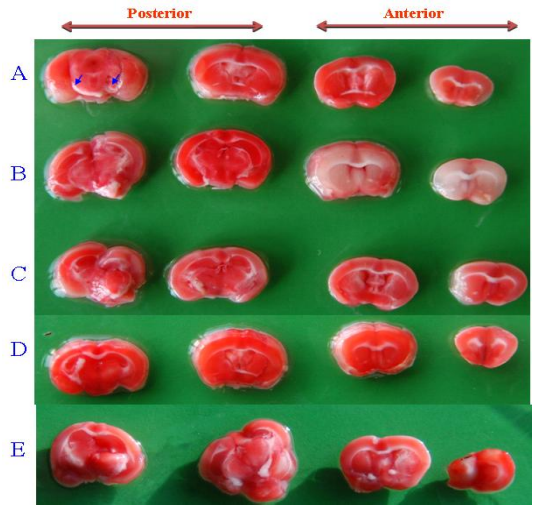


Fig. 8. Effects of CBD hot water extract and CBD ultra-fine powder on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice brain(coronal section).
C57BL/6 mice were orally administered of CBD hot water extract and CBD ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks. Cerebral infarction 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 6-12mm from frontal pole.
A; normal, B: control, C: tacrine, D: CBD extract, E: CDB ultra-fine powder.

Ⅳ. 考 察

2006년에 통계청에서 발표한 장래인구 추계에 따르면 현재 총 인구 중 65세 이상 고령인구 비율은 9.5%이며 2030년에 20%를 넘어설 것이라고 한다[19]. 치매는 주로 노년기에 생기므로[20] 노인인구의 증가는 치매인구의 증가로 이어지며 치매에 대한 관심 또한 증대되어 많은 연구가 이루어지고 있다[4~6].

AD의 원인에 대해서는 많은 가설이 있는데 유전적 결함, 바이러스 질환, 에너지 대사 결함, APP의 이상변화, 신경친화적인 요소의 결손,

글루탐산염 독성, 미토콘드리아의 결함, 극미량 원소의 독성, 자유기가 유도한 신경원의 노화 등이 제시되고 있다[21]. 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[22].

Amyloid beta(Aβ)는 40-42개의 잔기로 구성된 소수성 자기 응집 펩타이드로[23] Aβ는 AD에서 세포외 침착물의 주성분이며 Aβ는 신경돌기의 증식을 촉진하며 반응성 산소 중간물을 생성하고, 세포독성을 유도하고 microglial cell을 활성화한다. Aβ가 microglial cell로부터 proinflammatory cytokine의 발현증가를 야기하는 메커니즘은 확실히 밝혀지지 않았지만 Aβ가 세포표면의 수용체와 상호작용을 한다는 것은 알려져 있는데, 이러한 신호전달 통로를 통하여 microglial cell을 활성화시켜 TNF-α와 IL-1β를 포함한 신경독성물질의 분비를 유도하며 이것은 AD환자의 뇌에 신경독성을 증강시킨다[24]. Aβ 복합체는 AD환자의 뇌에 있는 senile plaque(SP)와 cerebral amyloid angiopathy(CAA)의 형태인 단백과 같은 섬유성 침착물을 구성하게 되며 치매에 발전에 중추적인 역할을 한다[23].

AD는 다수의 신경전달물질계의 영향을 받는데 그 중에서도 콜린계와 특히 많은 관계가 있다[25]. acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가[26,27]와 같은 콜린계의 기능장애는 기억력과 많은 연관이 있으며 tacrine과 같은 cholinesterase inhibitor에 의해 강화될 수 있다[27]. tacrine은 1940년에 정맥의 방부제로 합성되었고 1981년부터 AD에 효과가 있다는 연구결과가 나오기 시작했고 1993년에는 FDA에서 AD의 치료제로 승인을 받았다[28].

정상상태의 뇌에서 신경교세포인 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서[29], proinflammatory cytokine, 보체단백과 조절인자, 급성기 작용물질과 많은 단백분해효소, 단백분해효소억제제를 분비하여 CNS의 면역기전을 촉진하고 증폭시킨다[30]. 하지만 독성화합물인 LPS[24], 염증 또는 Aβ에 의한 자극은 microglial cell을 활성화하여 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[29], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고[31] 이와 같은 cytokine은 성숙 과립구와 대식세포를 CNS안의 염증병소로 유도할 수 있다[30]. 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 되며[31], astrocyte 또한 IL-6, TGF-β를 유도하는 IL-1과 TNF-α의 방출을 통해 상호 영향을 준다[30]. 생성된 IL-1과 TNF-α는 astrocyte와 상피세포로부터 CNS로 백혈구 침윤을 촉진시키는 부착분자와 화학역동현상을 유도하여 CNS 염증의 발전에 기여하는 것으로 보여진다[26]

韓醫學에서 痴呆는 '痴獃[8]', '呆病[9]', '健忘[10]'등의 범주에 속하며, 明代 張[8]의 ≪景岳全書≫에서는 "痴獃症, …… 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……"이라 하여 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있지만 이미 ≪素問·調經論≫[10]에서 "血幷於上 氣幷於下 心煩惋善怒 血幷於下 氣幷於上 亂而喜忘"라 하여 '善忘'이라는 기억력이 감퇴하는 증상을 서술하여 內經時代부터 痴呆와 관련된 인식이 있던 것으로 보인다. 痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不語, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며[8,10] 病機는 正氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱등으로 治法은 補益精氣,

補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다[2].

天王補心丹은 生地黃(酒洗), 人蔘, 丹蔘, 玄蔘, 白茯苓, 五味子, 遠志(去心), 桔梗, 當歸身, 天門冬, 柏子仁, 酸棗仁으로 구성된 處方으로 生地黃은 甘苦,寒하여 滋陰 淸熱하여 心神으로 하여금 虛火가 上擾하지 않게 하므로 君藥이 되고, 甘寒滋潤의 玄蔘, 麥門冬, 天門冬 등은 生地黃에 협조하여 滋陰淸熱의 효능을 증강하고 또한 丹蔘, 當歸는 補血養心하여 心血을 충족하게 하여 神을 스스로 안정하게 한다. 益氣寧心하는 人蔘, 茯苓은 心氣를 補益하여 神을 안정하게 만들고, 柏子仁 遠志는 寧心安神하고 또 五味子, 酸棗仁의 氣味로 心氣의 耗散을 收斂하며 아울러 安神케 하므로 이상의 諸藥은 모두 臣, 佐藥이 되며 桔梗은 諸藥을 끌고 上行하여 使藥이 되며 滋陰養血하여 補心安神하는 효능이 있어 陰虧血少로 心神이 不寧하여 虛煩少寐, 心悸神疲, 夢遺健忘, 大便乾結, 口舌生瘡하는 증상에 응용된다[12].

최근 연구 중 이 등[13]은 天王補心丹이 PC-12 cell에서 amyloid precursor protein, AChE 등을 억제하고 건망증 생쥐모델의 기억력저하를 억제하는 효과가 있다고 보고하였는데, 이를 근거로 天王補心丹이 痴呆의 치료, 예방에 응용할 수 있을 것으로 판단되어 본 연구를 시행하였다.

한의학에서 현재 가장 많이 응용되는 제형로는 탕제와 열수추출물제제가 있는데 탕제는 달이는 시간이 소요됨, 휴대가 불편함, 기미가 불쾌함 등이, 열수추출물 제제는 약효가 떨어지거나 효과가 느릴 것 같다는 선입견과 복용시에 물이 필요하다는 것이 단점으로 지적되고 있다[14].

잘 녹지 않는 약물의 생물학적 유용성을 개선하기 위한 방법이 연구되고 있는데 그중 약물을 분자크기로 축소하는 방법은 약물의 표면영역의 증가를 가져와 흡수성을 높이게 되므로[32] 우수한 효과를 보이며[15,33], 이미 세심탕, 목근피 총명탕과 같은 처방의 초미세분말제형이 유의한 효과를 보였다는 연구가 있다.

이에 저자는 天王補心丹의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 天王補心丹의 열수추출물을 시료로 mLFC (mouse lung fibrast cells)에서 세포독성을 관찰하고, LPS (lipopolysaccharide)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL - 1β, TNF - α의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL - 1β, TNF - α의 생성량을 관찰하였다. 또한 天王補心丹 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였고, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α 발현과 뇌조직의 허혈상태를 관찰하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 天王補心丹의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 天王補心丹 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 모두 감소하였으나, 모든 실험군에서 80% 이상으로 나타나 본 연구에서는 50, 100 ㎍/㎖의 농도로 실험에 임하였다.

BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 天王補心丹의 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 투여한 후, IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA발현이 억제되었다.

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비해 감소를 보였으나 IL-1β에서는 100 ㎍/㎖ 실험군과 TNF-α에서는 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖실험군에서 유의성이 있었다(Fig. 1, 2).

이상의 결과로 天王補心丹은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있으며, 최[17]의 연구에서 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 proinflammatory cytokine의 과잉발현을 억제한다는 결과와 유사하다.

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로[34], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 天王補心丹 열수추출물 및 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 step - through latency와 distance movement - through latency를 관찰하였는데, 두 실험모두에서 天王補心丹 열수추출물 및 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의한 시간의 단축을 보였으며 실험군간 차이는 없었다(Fig. 3, 4). 이는 김[16] 등의 AD 병태모델에 대한 洗心湯의 연구결과와 유사하며 天王補心丹 역시 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 활용할 수 있다는 것을 시사한다.

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine의 일종인 IL-1β, TNF-α 발현을 관찰한 결과 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 발현이 증가되었으나 tacrine 투여군, 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두에서 유의성 있게 감소했고 IL-1β는 열수추출물이, TNF-α는 초미세분말이 더욱 효과적 이었다(Fig. 5, 6). 이를 통해 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말 모두 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있다.

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성도는 tacrine을 투여한 양성대조군, 天王補心丹 열수추출물 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이로써 天王補心丹이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키는 효과가 있으리라 판단된다.

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 모든 군에서 대조군에 비하여 허혈의 크기가 유의성 있게 감소하였고 실험군간 차이는 없었다(Fig. 7, 8).

이상의 내용을 총괄해 보면 天王補心丹은 BV2 microglial cell line에서 IL - 1β, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하였고 BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1β, TNF-α의 생성량을 감소시켰으며, βA로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step - through latency, distance movement - through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈고, βA로 유도된 AD 병태 모델 생쥐의 microglial cell에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, TNF-α의 발현을 억제하였고, βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 혈청 중 AChE 활성도를 유의성 있게 억제하였고, 뇌조직의 허혈상태를 개선한 것으로 나타났다.

天王補心丹 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 이용한 행동실험에서의 기억력 감퇴 억제, 뇌조직의 허혈상태 개선에 있어서는 모두 효과적이었고 효과의 제형에 따른 차이는 없었으며, 혈청 중 AChE 활성도 억제에서는 열수추출물만이 효과적이었으며, microglial cell에서 IL-1β의 발현 억제에서는 열수추출물이, microglial cell에서 TNF-α의 발현 억제에서는 초미세분말이 통계적으로 유의하게 더 효과적이었다.

따라서 天王補心丹은 microglial cell의

proinflammatory cytokines의 과잉 발현, 산화적 스트레스 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대해 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

天王補心丹 열수추출물과 초미세분말이 in vitro 실험에서 proinflammatory cytokine의 생성과 mRNA 발현, in vivo 실험에서 기억력 감퇴 억제 효과, 뇌세포에 대한 영향, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 天王補心丹 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하고, BV2 microglial cell line 배양상층액의 IL-1β, TNF-α의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

2. 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 step-through latency측정과 distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

3. 天王補心丹 열수추출물과 초미세분말은 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α의 발현과 βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였고, AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 天王補心丹 열수추출물은 AD의 치료에 응용될 수 있으며 초미세분말제형 또한 열수추출물과 비슷한 효과를 보여 치매에 상기 제형의 응용을 고려할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Jiong Shi et al. Labeling of cerebral amyloid beta deposits in vivo using intranasal basic fibroblast growth factor and serum amyloid P component in mice. Journal of Nuclear Medicine. 2002;43(8):1044-51.
2. 민성길 외. 최신정신의학. 제4개정판. 서울: 일조각. 2004:189-91.
3. David S. Geldmacher. Treatment guidelines for Alzheimer's Disease: redefining perceptions in primary care. prim care companion J Clin psychiatry. 2007;9(2):113-21.
4. Spencer B, Rockenstein E, Crews L, Marr R, Masliah E. Novel strategies for Alzheimer's disease treatment. Expert Opinion on Biological Therapy. 2007;7(12):1853-67.
5. Seow D, Gauthier S. Pharmacotherapy of Alzheimer disease. Canadian journal of psychiatry. 2007;52(10):620-9.
6. Musiał A, Bajda M, Malawska B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. Current

Medicinal Chemistry. 2007;14(25):2654-79.
7. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
8. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
9. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:.222-5, 233-5.
10. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:.37, 124, 196, 229, 217-8, 229.
11. 危亦林. 世醫得效方. 서울:의성당. 1990:217.
12. 韓醫科大學 方劑學 敎授 共編著. 方劑學. 서울:영림사. 1999:329-30.
13. 이준영, 정인철, 이상룡. 天王補心丹이 痴呆病態모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2007;13(2):1-23.
14. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356-67.
15. Song LL, Du GJ, Zhang DL. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2002;27(6):436-9.
16. 김현수, 이상룡, 정인철. 세심탕(洗心湯) 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):.688-99.
17. 최강욱, 이상룡, 정인철. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(5):1200-10.
18. 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.
19. 김대유. 시도별장래인구추계(2005-2030). 대전;통계청2007:20.
20. Paula I Moreira et al. Compensatory reponses induced by oxidative stress in Alzheimer Disease. Biological research. 2006;39(1):7-13.
21. Ramazan O, Namik D. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. Clinical sciences. 2002;43(1):28-32.
22. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1-4.
23. Oid T, Kinoshita T, Arima K. Regression stage senile plaques in the natural course of Alzhheimer's disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006;32(5):539-56.
24. Yoon seong Kim. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. experimental and molecular medicine. 2006;38(4):333-47.
25. William K. summers. Tacrine(THA, cognex). journal of alzheimer. 2000;2(2):85-93.
26. 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.
27. Kasa P, Papp H, Torok I. Donepezil dose -dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinoceptive enzyme - positive structures in the human and rat brain. Neuroscience. 2000;101(1):89-100.
28. William K. Summers. Tacrine, and Alzheimer's treatments. Journal of Alzheimer's Disease. 2006;9(3):439-45.
29. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
30. Rommy von Bernhardi, Gigliola Rairez. Microglia-astrocyte interaction in Alzheimer's disease. Biological Research. 2001;34(2):123-8.
31. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
32. Moschwitzer J, Muller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. J Nanosci Nanotechnol. 2006;6(9-10):3145-53.
33. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. Effect of ultra-fine powder technique on dissolution rates of andrographolide and dehydroandrographolide in Andrographis paniculata. journal of chinese intergrative medicine. 2004;2(6):456-8.
34. 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.