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

八味合聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

임정화, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

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

Jung-Hwa Lim, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental Neuropsychiatry
College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

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

Method :
The effects of the PMCMT hot water extract on expression of proinflammatory cytokine mRNA in BV2 microglial cell cell line treated by lipopolysacchaide(LPS).
The effects of the PMCMT hot water extract & ultra-fine powder on (1) the behavior (2) AChE in serum (3) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with βA were investigated.

Result :
1. The PMCMT hot water extract suppressed the expression of proinflammatory cytokine mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS.
2. The PMCMT 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 stop-through latency and distance movement-through latency

투고일 : 6/5 수정일 : 7/7 채택일 : 7/14
* 교신저자 : 이상룡 주소 : 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
전화 : 042-229-6811 E-mail : 7575np@dju.co.kr

3. The PMCMT 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.
5. The PMCMT ultra-fine powder reduced infarction area of hippocampus significantly, and the PMCMT hot water extract & ultra-fine powder controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

Conclusions :
These results suggest that the PMCMT 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 PMCMT hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words :
Alzheimer's disease, PalMihapChongMungTang(PMCMT), hot water extract, ultra-fine powder

I. 緖 論

AD는 신경세포 소실에 따른 전반적인 뇌위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(nurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며[1], 증상은 초기에는 기억력 장애가 유일한 증상이나 경과가 진행되면 주의력, 판단력, 지남력, 이해력, 계산, 학습능력 등의 인지장애가 두드러지며 인격과 행동변화가 나타난다[2].

한의학에서 痴呆는《景岳全書》[3]에서 "癡獃"로,《石室秘錄》[4],《辨證奇門》[5]에 "呆病"으로 언급되었다. 뇌위축은 AD의 중요한 병리소견이며, 뇌위축의 한의학적 변증 유형으로 腎精不足, 腎陽虛衰, 肝腎陰虛, 痰濁雍盛, 氣血虧虛 등이 있다[6].

八味合聰明湯은 八味地黃湯과 聰明湯을 合方한 處方으로, 聰明湯은 《東醫寶鑑》[7]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며[8], 최근 한의학계에서 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[9~12]가 진행되었다. 八味地黃湯은 《金匱要略》[13]에 八味腎氣丸으로 처음 수록되었으며, 腎陽不足을 치료하는 대표적 처방이다[14].

초미세 분말은 약재를 수십㎛로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구[15]와 한약의 열수추출물과 초미세분말 제형이 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 연구[11,12]가 보고 된 바 있다.

이에 저자는 腎陽虛損한 뇌위축 및 痴呆에 八味合聰明湯이 효과가 있을 것으로 예상되어, 八味合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, in vitro 실험에서 열수추출물을 시료로

lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine의 mRNA 발현을 관찰하였다. 또한 in vivo 실험에서는 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억과 관련된 행동변화, 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화 등을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris - HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P - 40, Ethyleneglycol - bis(β-aminoethyl ether), leupetin, N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL - dithiothreitol (DTT), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI - 1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D - PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$), DNase type Ⅰ은 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 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 BM, Indianapoilis, IN(USA) 제품을, Agarose는 FMC사 (USA) 제품을 사용하였고, β - amyloid peptide(Calbiochem, USA)와 ECL - Hybond film(Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT - 1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B - 480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column을(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 6주령 암컷 C57BL/6생쥐는 (주)샘타코에서 분양받아 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 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 八味合聰明湯(PalMihapChongMungTang, PMCMT)의 처방구성은《 東醫寶鑑 》[7]을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of PalMihapChongMungTang(PMCMT)

한약명	생 약 명	용 량(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	16
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8
山茱萸	Corni Fructus	8
牧丹皮	Moutan cortex	6
白茯苓	Hoelen	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
肉桂	Cinnamomi Cortex	2
附子炮	Aconiti Lateralis Radix Preparata	2
白茯神	Hoelen	4
遠志	Polygalae Radix	4
石菖蒲	Acori Gramineri Rhizoma	4
	Total amount	66

4) 검액의 조제 및 투여

(1) 八味合聰明湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

八味合聰明湯 1첩 분량(66 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 八味合聰明湯 열수추출물(15.1 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 400 ㎎/㎏의 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

(2) 八味合聰明湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 白茯神,遠志 石菖蒲, 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 牧丹皮, 白茯苓, 澤瀉, 肉桂, 附子炮를 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(ACWS, 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 증류수에 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 평가

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5 ㎎/㎖), DNase type I (0.15 ㎎/㎖), antibiotics(penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5 cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[16]을 약

간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 八味合聰明湯 열수추출물(최종 농도 200 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였고 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA) 50 ㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) BV2 microglial cell line에서 Proinflammatory 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 DMEM에서 배양한 후 八味合聰明湯 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 방치한 후 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 DEPC를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

Reverse transcription(RT) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I (10 U/㎕) 2 U/tube를 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 가한 후, 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 Polymerase chain reaction(PCR)에 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 사용하였고, 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'

3) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조

① βA의 아미노산 배열

βA로 AD 병태 생쥐모델을 만들었고, 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 주입하는데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽) 방향으로 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), 八味合聰明湯 열수추출물 실험군(400 ㎎/㎏)과 八味合聰明湯 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 생쥐 모델의 혈청 내 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 첨가

하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

5) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에서의 허혈상태 및 조직손상 분석

(1) 허혈면적 측정

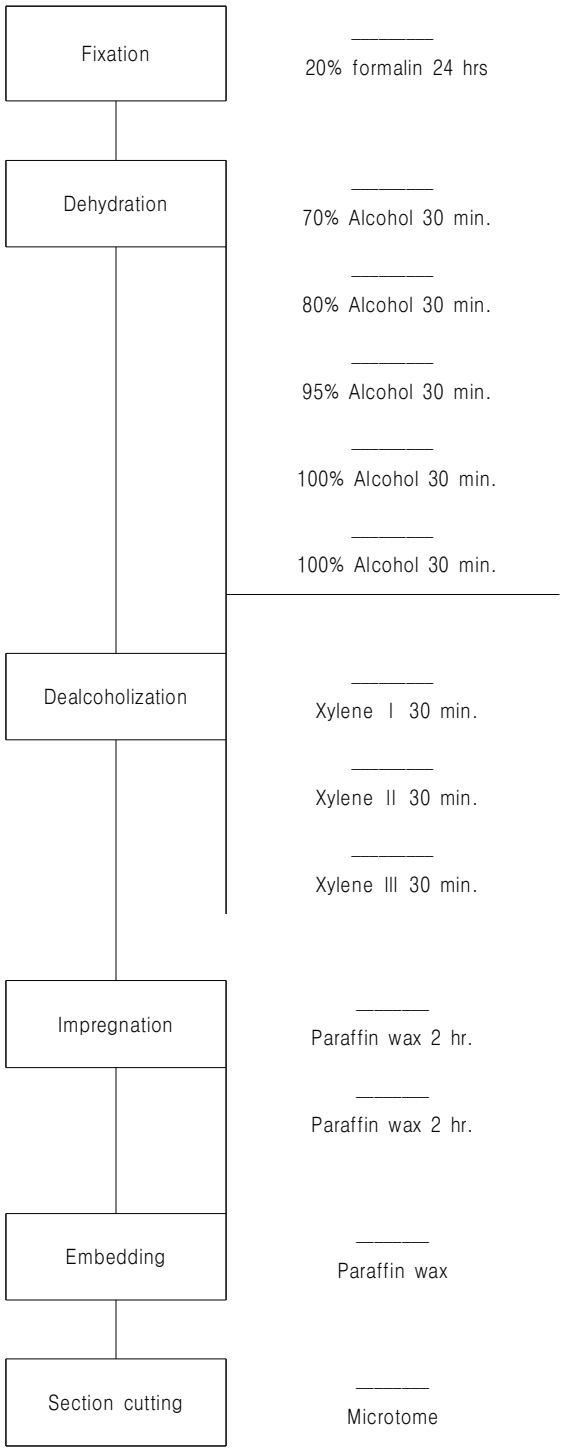
AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2 ㎜의 두께로 자른 후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법[17]으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]이고, A는 사진 상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2 ㎜)의 전체 면적. BH(brain hippocampus)는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 %로 표현하였다. 즉 BH 부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다.

(2) 뇌조직 손상 분석

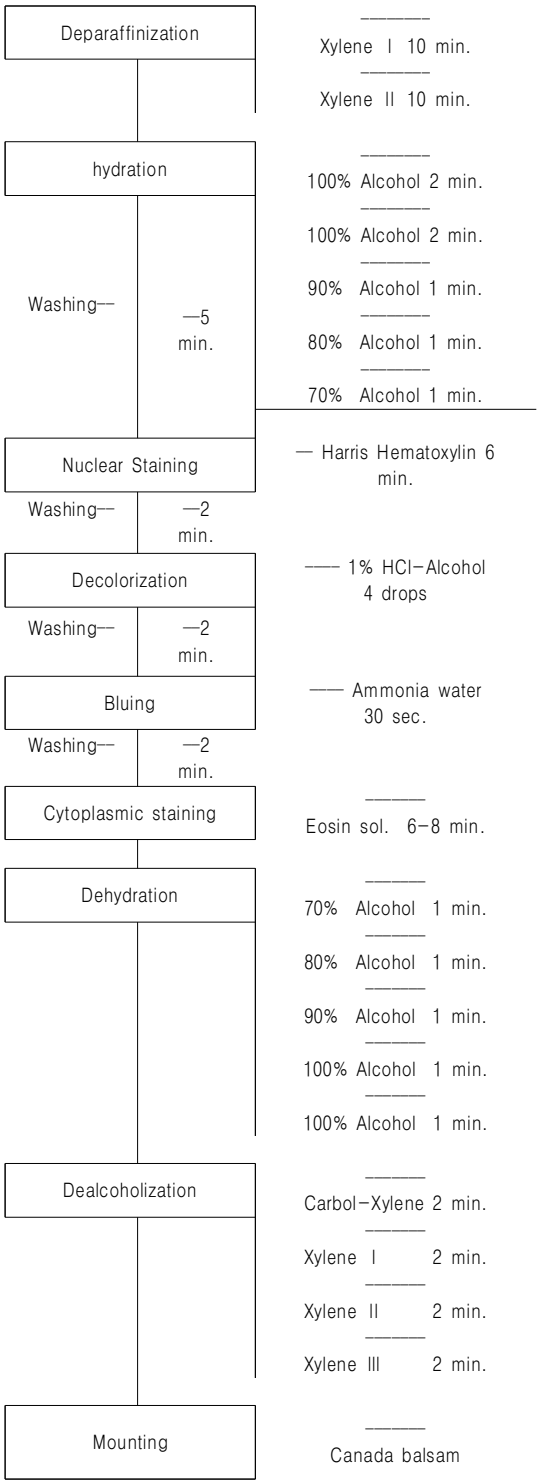
① 병리조직검사

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의 scheme 2과 같은 과정을 시행하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 3와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & eosin 염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

Scheme 2. Tissue processing



Scheme 3. Harris Hematoxylin & Eosin staining



3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation으로 기록하였다. Morris water maze이외의 실험은 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. 八味合聰明湯에 대한 세포독성

八味合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 1 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 96.6±2.2(%), 96.1±1.2(%), 91.8±1.3(%), 85.2±1.4(%), 80.7±2.1(%)로 감소하였다.

2. BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.220(RQ)로 나타났으며, 八味合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.648(RQ), 0.715(RQ)로 나타났다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.005(RQ), 八味合聰明湯 100

㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.340(RQ), 0.423(RQ)로 나타났다.

3. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency 측정에서, 정상군은 3.9±1.3(sec), 대조군은 85.9±5.8(sec)이었으며, tacrine 투여군, 八味合聰明湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 14.3±4.0(sec), 15.5±8.0(sec), 19.8±9.5(sec)로 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

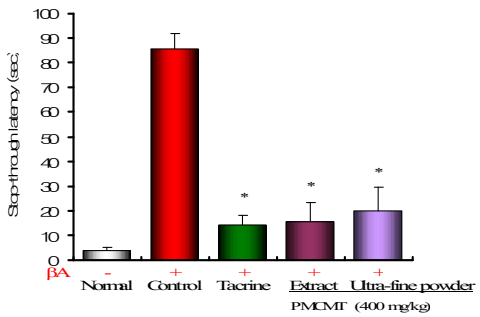


Fig. 1. Effects of PMCMT hot water extract & ultra-fine powder on the memory impairment of βA-induced Alzheimer's mice in the stop-through type of Morris water maze test.
C57BL/6 mice were trained once a day for 1 wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of PMCMT hot water extract, PMCMT 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); PMCMT hot water extract, and PMCMT ultra-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, 정상군은 145.3±35.3(㎝), 대조군은 1976.7±427.2(㎝)이었으며, tacrine 투여군, 八味合聰明湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 476.3 ± 286.1(㎝), 328.0 ± 220.8(㎝), 262.0 ±70.0(㎝)로 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다 (Fig. 2).

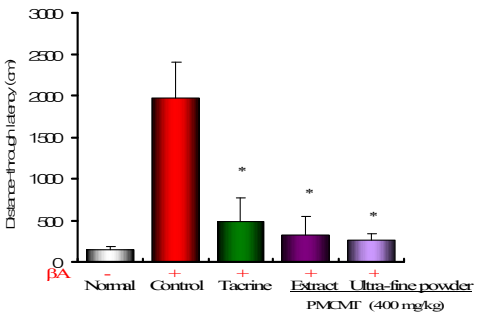


Fig.2. Effects of PMCMT hot water extract & ultra-fine powder on the memory impairment of βA-induced Alzheimer's mice in the distance movement-through type of Morris water maze test.
C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of PMCMT hot water extract, PMCMT 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; tacrine(10 ㎎/㎏, p.o); PMCMT hot water extract, and PMCMT ultra-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)

4. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 혈청 내 AChE에 미치는 영향

생쥐의 혈청 내 AChE 활성도는 정상군이 15.0±3.7(mU/㎖), 대조군은 214..0±24.9(mU/㎖)이었고, tacrine 투여군은 33.0±17.9(mU/㎖), 八味合聰明湯湯 열수추출물 실험군은 167.7±17.1(mU/㎖)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 八味合聰明湯 초미세분말 실험군은 178.2±14.5(mU/㎖)로 대조군에 비하여 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

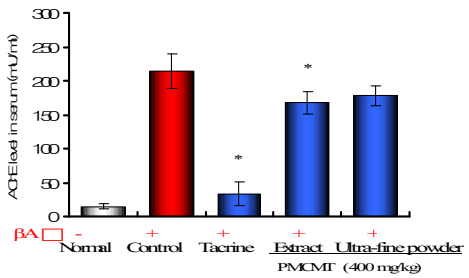


Fig. 3. Effects of PMCMT hot water extract & ultra-fine powder on the serum AChE activity level in βA-induced Alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of PMCMT hot water extract and PMCMT ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks. Serum AChE activity measured by cholinesterase kit and analyzed for serum level as described in Material and Methods.
Data represent means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 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(%), tacrine 투여군은 49.5±5.9(%), 八味合聰明湯 열수추출물은 76.6±1.4(%), 초미세분말 실험군은 64.5±12.3(%)로 tacrine 투여군과 초미세분말 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

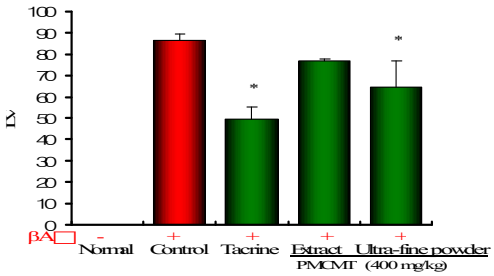


Fig. 4. Effects of PMCMT hot water extract and PMCMT ultra-fine powder on the infarct size of βA-induced Alzheimer's mice brain.
C57BL/6 mice were orally administered of PMCMT hot water extract and PMCMT ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8wks. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as the LV myocardium 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).

2) AD 병태 생쥐 모델 hippocampus의 조직 손상에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 대조군은 hippocampus와 entorhinal(EC), fimbriaformix(FIFX) 등의 형태가 뚜렷하지 않았으나, 반면 tacrine 투여군과 八味合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 투여한 실험군에서는 비교적 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있음을 볼 수 있었다(Fig. 5). 또한 대조군에서는 hippocampus의 neuronal line이 정상군에 비해 많이 위축된 소견을 보였으나, tacrine 투여군과 八味合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 투여한 실험군에서는 정상과 유사한 hippocampus의 neuronal line을 볼 수 있었다(Fig. 6).

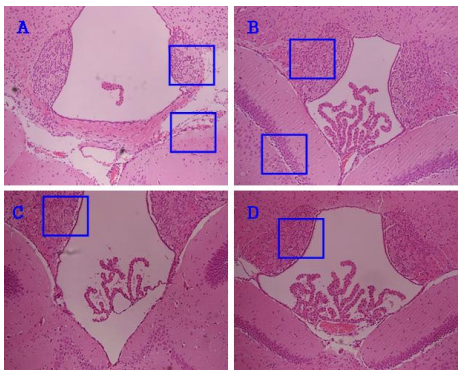


Fig. 5. Histological analysis of hippocampal lesions in the βA-induced Alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of PMCMT extract, PMCMT ultra-fine powder(400 mg/kg, p.o) and tacrine(10 mg/kg, p.o) for 8wks. Control(A); tacrine(B); PMCMT hot water extract(C) and PMCMT ultra-fine powder(D), 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, ×40).

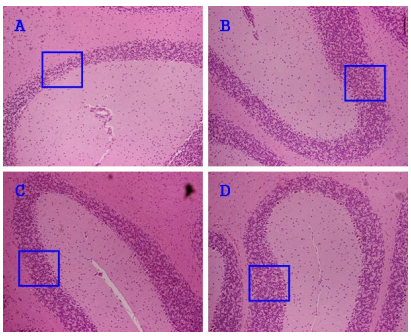


Fig. 6. Histological analysis of the neuronal loss in the βA-induced Alzheimer's mice hippocampus.
C57BL/6 mice were orally administered of PMCMT hot water extract and PMCMT ultra-fine powder(400 ㎎/㎏, p.o) and tacrine(10 ㎎/㎏, p.o) for 8 wks.
Control(A); Tacrine(B); PMCMT hot water extract(C) and PMCMT ultra-fine powder(D). 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, ×100).

Ⅳ. 考 察

AD는 뇌의 전반적인 위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(nurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며[1], 증상으로 기억, 언어, 시·공간 파악 능력, 실행 능력 및 판단력 등 인지능력의 퇴화와 망상, 의심증, 환각, 우울증 및 인격의 변화 등 행동장애가 나타난다[2].

AD의 기전에는 βA, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants (free radicals), proinflammatory cytokine의 과잉 및, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[18], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 아밀로이드전구단백질(APP)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[19].

βA는 β-secretase나 ɣ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP의 일부가 잘라져서 생성되며[20], βA의 축적은 직접적으로 세포표면의 구성 물질과 상호작용하여 세포사멸을 유발하며, 간접적으로는 astrocyte와 microglia를 활성화시켜 대량의 inflammatory cytokine을 분비하도록 하여 신경세포의 퇴행성 변화를 일으킨다[21].

최근에는 βA의 독성기전에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있는데, βA의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 reactive oxygen species(ROS)의 생산을 증가시키며 세포내 Ca^{++} 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다[22~24].

한편 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 제시되고 있고[25], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[26,27].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러 가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[28,29].

또 다른 AD의 원인으로 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 가설이 제기되고 있다[30]. 이

는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglial cell이 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되어 중추신경계에 염증반응이 일어나며, 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다[20,31].

韓醫學的으로 痴呆는 '痴獃[3]', '呆病[4,5]', '健忘[32]' 등의 범주에 속하며, 明代 張[3]의 ≪景岳全書・癲狂痴獃≫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 있으며 淸代의 陳[4] 등은 치매와 유사한 개념으로 '呆病'에 대해 상세히 서술하고 있다.

뇌위축은 AD의 중요한 병리소견이며, 뇌위축의 한의학적 변증 유형으로 腎精不足, 腎陽虛衰, 肝腎陰虛, 痰濁雍盛, 氣血虧虛 등이 있다[6]. 또한 痴呆에 대해 陳[33]은 腎陽虛損, 腎陰虧虛, 脾虛痰濕內阻, 氣血虧損, 瘀血阻滯 등으로 辨證하였다.

八味合聰明湯은 八味地黃湯과 聰明湯을 合方한 處方으로, 聰明湯은 《東醫寶鑑》[7]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며[8], 최근 한의학계에서 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[9~12]가 진행되었다. 八味地黃湯은 《金匱要略》[13]에 八味腎氣丸으로 처음 수록되었으며, 腎陽不足을 치료하는 대표적 처방이므로[14], 八味合聰明湯이 腎陽虛損한 뇌위축 및 痴呆에 효과가 있을 것으로 판단된다.

최근 초미세 분쇄 기술이 한약제형에 응용하여 활용되고 있으며 초미세 분말 제형이 약물 생체이용률, 약리 기작, 약의 경량화 등에서 우수하다는 연구결과가 있고[15,34], 한약의 열수추출물과 초미세분말 제형이 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 실험 결과[11,12]가 보고되었으나, 연구 성과는 부족한 실정이다.

이에 저자는 八味合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, in vitro 실험에서 열수추출물을 시료로 LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6의 mRNA 발현을 관찰하였다. 또한, in vivo 실험에서는 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억과 관련된 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화 등을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 八味合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 八味合聰明湯 1 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타났다. 이러한 결과로 八味合聰明湯 열수추출물은 상기 농도에서 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었으며, 본 실험에서는 100 ㎍/㎖이하의 八味合聰明湯을 사용하였다.

본 실험에서 BV2 microglial cell line에 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 八味合聰明湯의 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1β, IL-6 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서

proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6의 mRNA의 발현이 억제되었다.

이상의 결과로 八味合聰明湯은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 초래될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단된다.

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[35], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 八味合聰明湯 열수추출물 및 八味合聰明湯 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 stop - through latency와 distance movement - through latency를 관찰하였는데, stop - through latency와 distance movement - through latency 모두에서 八味合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 보였으나, 각 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 1, 2).

이상의 결과로 八味合聰明湯은 βA로 인한 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있어 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 활용할 수 있다고 판단된다.

AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성도는 cognex 투여군, 八味合聰明湯 열수추출물 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이로써 八味合聰明湯이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키는 효과가 있으리라 판단된다(Fig. 8).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과, 八味合聰明湯 초미세분말 실험군은 대조군에 비하여 허혈의 크기가 유의하게 감소하였다(Fig. 3, 4).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 대조군에서는 hippocampus의 neuronal line이 정상군에 비해 많이 위축된 소견을 보였으나, cognex 투여군과 八味合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서는 neuronal line이 정상군과 유사하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6), 이는 八味合聰明湯이 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 기전을 억제할 수 있으리라 판단된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 八味合聰明湯은 BV2 microglial cell line에서 IL - 1β, IL - 6의 mRNA 발현을 억제하였다. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop - t hrough latency, distance movement -through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈고, βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 혈청 중 AChE 활성도를 유의성 있게 억제하였고, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상을 개선하는 것으로 나타났다.

八味合聰明湯 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency 및 distance-through latency에서 기억력 감퇴개선효과에 있어 모두 유의한 효과를 나타냈으나 제형별 차이는 없었다. 다만, 혈청 내 AChE 활성도 억제에 있어서는 八味合聰明湯 열수추출물 실험군에서만 유의성을 보이고, 뇌조직의 허혈상태의 개선 효과는 초미세분말 실험군에서만 유의성을 보였다.

따라서 八味合聰明湯은 microglial cell의

proinflammatory cytokines의 과잉 발현과 βA 과잉으로 유발된 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 초미세분말 제형의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

八味合聰明湯이 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 八味合聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line의 IL-1β, IL-6 mRNA 발현을 억제하였다.

2. 八味合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

3. 八味合聰明湯 열수추출물은 AD 병태 생쥐의 혈청 내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다.

4. 八味合聰明湯 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고, 八味合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 八味合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 AD 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 제형에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 이광우. 임상신경학. 서울:고려의학. 2002:203-8.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2004:189-200.
3. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
4. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
5. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
6. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:793-5.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6, 98.
8. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
9. 박지운, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):37-57.
10. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):59-78.
11. 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.
12. 徐承浩, 鄭仁哲, 李相龍. 聰明湯和山查聰明湯熱水提取物, 超微細粉末劑型對microglia及記憶力減退病態模型的影響. 第5會天津國際中醫藥學術研討會議論文集. 2006;325-7.

13. 張仲景. 金匱要略. 서울:醫學硏究社. 1987:130-3, 148, 274, 275, 442, 443.
14. 金相贊 외. 方劑學. 서울:永林社. 1999:313-6.
15. Song LL, Du GJ, Fan BY, Zhang DL. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2002;27(6):436-9.
16. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. Journal of the National Cancer Institute. 1990;82(13):1107-12.
17. 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.
18. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
19. 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.
20. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. Glia. 1999;28(2):114-27.
21. Chiarini A, Dal Pra I, Whitfield JF, Armato U. The killing of neurons by beta-amyloid peptides, prions, and pro-inflammatory cytokines. Ital J Anat Embryol.. 2006;111(4):221-46.
22. Kontush A. Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med.. 2001;31(9):1120-31.
23. Kourie JI. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. Cell Mol Neurobiol.. 2001;21(3):173-213.
24. 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.
25. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther.. 2000;294(1):187-94.
26. 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.
27. Sramek JJ, Frackiewicz EJ, Cutler NR. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. Expert Opin Investig Drugs. 2000;9(10):2393-402.
28. Wu DC, Xiao XQ, Ng AK, Chen PM,

Chung W, Lee NT, Carlier PR, Pang YP, Yu AC, Han YF. Protection against ischemic injury in primary cultured mouse astrocytes by bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor. Neurosci Lett.. 2000;288(2):95-8.

29. Cheng DH, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. Pharmacol Biochem Behav.. 1998;60(2):377-86.

30. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem.. 1999;274(49):34584-9.

31. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci.. 1999;19(9):3440-7.

32. 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.

33. 陳昌和. 淺談討老年性疾患的認識和治療體會. 新中醫. 第2期. 1995:61.

34. Xu YH, Wang NS. Review and analysis of present status of the micronization of Chinese traditional medicine. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004;29(6):497-500.