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

加味補陽還五湯과 八味合聰明湯의 microglia 보호, 항산화 및 acetylcholinesterase 억제 효과

김현주, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of KakamBoyangHwanoh-Tang(KBHT) and PalMihapChongMung-Tang(PMCMT) on Protecting Microglia and Inhibiting Acetylcholinesterase and Oxidants

Hyun-Joo Kim, Sang-Ryong Lee
Department of Oriental Neuropsychiatry, Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : This experiment was designed to investigate the effect of the KBHT and PMCMT extract on protecting microglia and inhibiting acetylcholinesterase and oxidants.

Method : The effects of the KBHT and PMCMT extract on cell death of BV2 microglial cell line treated by IFN-ɣ ; expression of NO, ROS in BV2 microglial cell line treated by lipopolysaccharide(LPS) ; AChE activity in PC-12 cell treated by NGF were investigated, respectively.

Result : The KBHT and PMCMT extract significantly increased cell viability in BV2 microglial cell line treated with IFN-ɣ. The KBHT and PMCMT extract suppressed the NO and ROS production in BV2 microglial cell line treated by LPS. The KBHT and PMCMT extract groups also showed inhibition of AChE activity in PC-12 cell line.

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

Key Words : KakamBoyangHwanoh-Tang(KBHT), PalMihapChongMung-Tang(PMCMT), Microglia, acetylcholinesterase, ROS

투고일 : 6/8 수정일 : 7/6 채택일 : 7/13
* 교신저자 : 이상룡 주소 : 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 042-229-6811 E-mail : 7575np@dju.ac.kr,

Ⅰ. 서 론

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군으로, 원인 질환 중 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)이 가장 흔하여 전체 원인질환의 약 50~60%를 차지하고 있다[1,2].

AD는 신경세포 소실에 따른 전반적인 뇌위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(nurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며[3], 증상으로 기억, 언어, 시·공간 파악 능력, 실행능력 및 판단력 등 인지능력의 퇴화와 망상, 의심, 환각, 우울증 및 인격의 변화 등 행동장애가 나타난다[4].

한의학에서 痴呆는 ≪景岳全書≫[5]에서 "癡獃"로, 《石室秘錄》[6], 《辨證奇門》[7]에 "呆病"으로 언급되어 왔고 대표적인 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이다[1].

補陽還五湯은 ≪醫林改錯≫[8]에 처음 수록된 처방으로 문 등[9]은 補陽還五湯에 黃芪를 증량하고 遠志, 石菖蒲를 가미한 加味補陽還五湯이 기억력 감퇴의 효과를 나타냈다는 실험적 연구결과를 발표한 바 있다. 또한 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≫[10]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술되어 있고 임상에서 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며[11], 최근 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方의 痴呆 치료와 예방에 관한 연구[12-15]가 진행되어 왔다. 따라서 八味合聰明湯은 腎虛으로 인한 痴呆에 활용될 수 있으리라 판단된다.

이에 저자는 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯이 AD 병태 모델에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 규명하고자 각 처방 추출물을 시료로 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율, nitric oxide(NO), reactive oxygen species(ROS)의 생성을 관찰하고 PC12 cell line에서의 AChE의 생성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 AChE assay kit(EQM Research, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), penicillin, streptomycin, DNase type Ⅰ(이상 Sigma, USA), Taq. polymerase, Deoxynucleotide triphosphate(TaKaRa, Japan), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA), collagenase A(BM, USA), Agarose(FMC, USA) 등이고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 rotary vaccum evaporator(Büchi, B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, USA), bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker(Lab-Line, USA), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(molecular devices, USA), homogenizer(OMNI, USA), VIDEOTRACK(Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy(Nikon,

Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), 등이다.

2) 세포

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아 37℃, 5% CO_2 상태의 배양기에서 10% FBS DMEM으로 배양하여 사용하였고, PC-12 cell line은 rat의 adrenal pheochromocytoma로 DMEM에 10% horse serum과 5% FBS, penicillin(100 U/㎖), streptomycin (100 ㎍/㎖), 10 ㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액을 넣고 배양시켰다.

3) 약재

加味補陽還五湯(KakamBoyangHwanoh-Tang, KBHT)의 처방구성은 ≪韓醫神經精神科學≫[1]의 補陽還五湯을 기준으로 黃芪를 증량하고 그 외 약재를 감량하였으며 遠志, 石菖蒲를 加味하여 구성하였고, 八味合聰明湯(PalMihapChongMung-Tang, PMCMT)은 처방구성은 ≪東醫寶鑑≫[10]을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of akamBoyangHwanoh-Tang(KBHT)

Herb	Galenical	Dose(g)
黃芪	Radiz Astragali	80
當歸尾	Radix Angelicae Gigantis	4
赤芍藥	Radix paeoniae Rubra	3
川芎	Rhizoma Cnodii	2
地龍	Lumbricus	2
桃仁	Semen Persicae	2
紅花	Flos Carthami	2
遠志	Polygalae Radix	4
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	4
	Total amount	103

Prescription of PalMihapChongMung-Tang(PMCMT)

Herb	Galenical	Dose(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

加味補陽還五湯 1첩 분량(103 g), 八味合聰明湯 1첩 분량(66 g)에 각각 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 加味補陽還五湯 추출물(5.25 g), 八味合聰明湯 추출물(15.1 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 수세하였다. Tube에 DMEM를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양 후 PBS로 2 회 수세하고 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다.

(2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법[15]을 약간 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 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물(최종 농도 200, 100, 50, 10, 1 ㎍/㎖)을 각각 48시간 동안 처리하였다.

BV2 microglial cell (1×10^5 cells/24 wells plate)에 IFN-γ(20 U/㎖)과, 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물(100, 50, 10 ㎍/㎖)을 각각 처리하고 48 시간 동안 동시 배양하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2 회 세척하였다. 각 well에 50% TCA 50 ㎕를 가하고 1 시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

(3) BV2 microglial cell의 형태학적인 변화 측정

BV2 microglial cell 의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell (1×10^5cells/24 wells plate)에 IFN-γ(20U/㎖)과, 加味補陽還五湯, 八味合聰明湯 추출물 (100㎍/㎖, 50㎍/㎖)을 각각 처리하여, 48시간 동안 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

3) BV2 microglial cell 배양액 내 NO 생성량 측정

BV2 microglial cell을 96 wells plate에 2×10^4cells로 분주하였다. 여기에 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물(100, 50, 10 ㎍/㎖)을 처리하고 1 시간 후 LPS(0.1 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다. 배양종료 후 배양액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonylamide in 5% H3PO4)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 ㎕를 96 wells plate에 분주하고 혼합 용액 100 ㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) BV2 microglial cell 내 ROS의 분석

BV2 microglial cell 내 ROS를 측정하기 위하여 24 wells plate의 각 well에 5×10^5cells씩 첨가하고, 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물(100, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(1 ㎍/㎖)를 처리한 후 37℃에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 처리하고 5 분간 배양하고 2 회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다. 이 때 Cyclosporine A를 처리한 군을 만들어 양성대조군으로 사용하였다.

5) PC12 cell 에서 AChE activity 측정

PC-12 cell에 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물(100, 50, 10 ㎍/㎖)과 NGF를 처리하여 24 시간 배양한 후 50 ㎕의 cell lysate lysis buffer{Tris-HCl (200 mM; pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 ㎍/㎖ leupetin}을 혼합하여 얼음에서 30 분간 반응하였다. 그리고 5 분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. Cell lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2 ㎖과 혼합하였고 각 tube에 3.0 ㎖ water, nitrophenol solution 2 ㎖,

acetylcholine chloride solution 0.2 ㎖을 첨가하였다. 다시 5 분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ water bath에서 30 분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean ± standard deviation으로 기록하였다. 각 항목의 유의성은 일원배치분산분석 (ANOVA test)로 평가하였고, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's method로 사후 검정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물의 세포독성

mLFC의 생존율은 加味補陽還五湯 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 97.2±1.1, 93.8±1.7, 91.1±2.6, 83.0±1.0, 81.7±2.1, 八味合聰明湯 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 나타나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

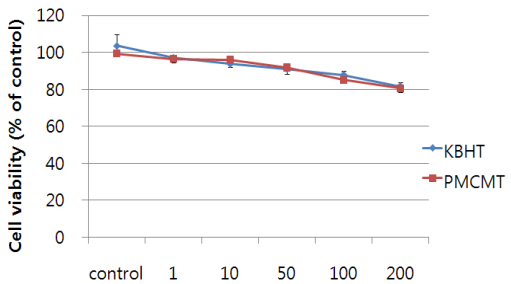


Fig. 1. Cytotoxicity of KBHT & PMCMT extract on mLFCs. mLFCs were treated with various concentrations of KBHT & PMCMT extract. The results are expressed the mean±S.D.

2. BV2 microglial cell line의 세포생존율과 형태학적 변화

BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군은 20.5±2.5, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 92.1±4.7, 73.5±4.2, 50.5±5.4이었고, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 97.8±2.8, 86.7±3.8, 70.9±2.8(%)로 나타나 대조군에 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 생존율의 상승을 보였고 같은 농도 처방간 생존율을 비교해 보면 加味補陽還五湯 실험군에서 유의하게 생존율이 상승되었다(Fig. 2).

BV2 microglial cell line에 IFN-γ를 처리하고 48 시간 경과 후 대조군은 정상군에 비하여 세포의 사멸과 형태의 변화를 나타낸 것에 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 양호하게 유지되었음을 볼 수 있다(Fig. 3).

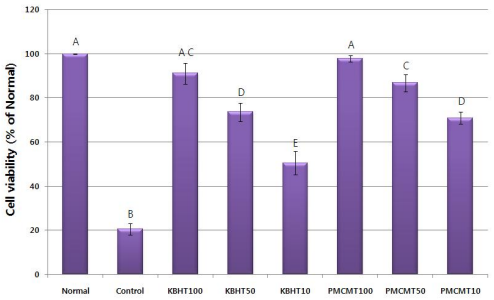


Fig. 2. The effect of KBHT & PMCMT extract on cell viability in IFN-γ-treated BV2 microglial cell line.
A,B,C,D,E : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

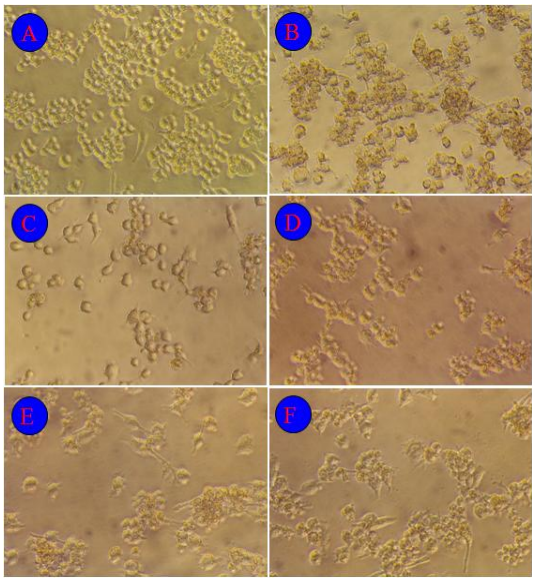


Fig. 3. The effect of KBHT & PMCMT extract on cell morphology in IFN-γ-treated BV2 microglial cell line.
A: Normal B: Control C: 100㎍/㎖ KBHT D: 500㎍/㎖ KBHT E: 100㎍/㎖ PMCMT F: 50㎍/㎖ PMCMT
Cell morphology was observed using phase contrast microscopy.

3. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO생성량은 정상군은 19.6±4.5, 대조군은 466.3±56.0, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 117.8 ± 36.0, 270.9 ± 73.9, 412.0 ± 108.0, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 154.0 ± 45.7, 259.1 ± 64.4, 353.9 ± 53.0(mM)로 나타나 加味補陽還五湯은 100, 50 ㎍/㎖에서, 八味合聰明湯은 100, 50, 10 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 차이는 없었다(Fig. 4).

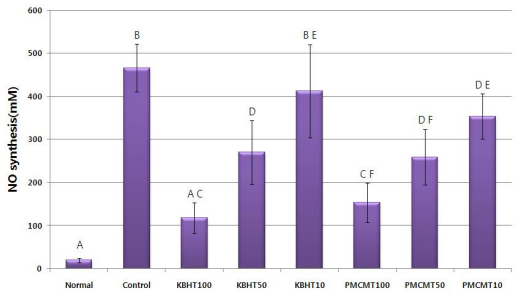


Fig. 4. Inhibitory effect of KBHT & PMCMT extract on the NO production BV2 microglial cell line.
A,B,C,D,E,F : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

5. BV2 microglial cell 배양 상층액에서 ROS 생성에 미치는 영향

BV2 microglial cell의 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군에서는 농도 의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다 (Fig. 5).

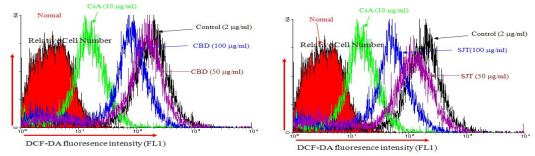


Fig. 5. Inhibitory effect of KBHT & PMCMT extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

6. PC-12 cell line에서 AChE activity 억제 효과

PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과, 정상군은 6.4±1.7, 대조군은 46.2±2.4, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 23.5±7.4, 28.5±6.6, 37.2±4.1, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 20.7±4.4, 24.5±9.3, 27.0±10.7(nM/mg/min)로 나타나 加味補陽還五湯은 100, 50 ㎍/㎖에서, 八味合聰明湯은

100, 50, 10 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 차이는 없었다(Fig. 6).

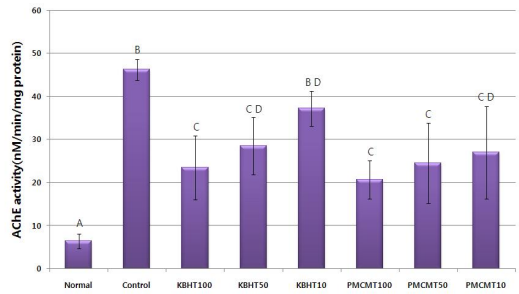


Fig. 6. Inhibitory effect of KBHT & PMCMT extract on AChE activity in PC12 cell line.
A,B,C,D : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

Ⅳ. 고 찰

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상도 동반된다. 치매의 임상유형 중 AD가 50% 이상을, VD가 20% 정도를 차지하고 있는데, 그 중 AD는 증상이 서서히 나타나고 경과는 점진적으로 진행되며, 초기부터 뚜렷한 기명장애, 기억장애, 방향상실을 보인다[1,2].

AD 유발에는 microglial cell과 astrocyte에서 분비되는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine[16], AChE[17], free radicals[18], Aβ[19] 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.

AD의 주증상인 기억력 저하는 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있는데[20], 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine 분해효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다고 한다[21]. 비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 galanthamine[22]과 같은 AChE의 억제제가 현재까지는 가장 효과적인 AD의 치료제로 사용되고 있다[23].

또한 신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이 되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질로 NO와 ROS가 있다. NO는 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다[24]. ROS는 세포막의 지질, 조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 이들 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다[25].

韓醫學的으로 痴呆는 '呆病[5,6]', '健忘[26,27]' 등의 범주와 유사하며, ≪景岳全書・癲狂痴獃≫[5]에는 痴呆와 유사한 개념으로 '痴獃'가 언급되었는데, "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 하였다.

痴呆의 病因은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이고 辨證類型은 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등이며, 補益精氣, 補腎健脾, 割痰化濁, 開竅醒神, 行氣活血, 通竅醒腦, 淸熱解毒, 益氣養血, 健腦益腎 등의 治法을 응용하고 있다[1].

補陽還五湯은 王[28]의 ≪醫林改錯≫에 처음 수록된 처방으로 黃芪, 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花, 地龍으로 구성되어 있으며 補氣升揚, 活血祛瘀, 通陽脉絡하는 효능을 가지고 있다[29,30]. 본 연구에서는 補陽還五湯에 祛痰開竅

安神益智하는 遠志, 石菖蒲를 가하고 黃芪를 80 g으로 증량한 加味補陽還五湯이 氣血虧虛型, 氣滯血瘀型 痴呆에 활용될 수 있을 것으로 사료되어 시료로 사용하였다. 또한 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≫[10]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 바 있고 健忘 및 痴呆 등의 병증에 다양하게 활용되고 있으며[11], 최근 한의학계에서 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[12-15]가 진행되어 왔다. 한편, 八味地黃湯은 ≪金匱要略≫[31]에 八味腎氣丸으로 처음 수록되었으며, 腎陽不足을 치료하는 대표적 처방이므로[32], 八味合聰明湯이 腎虛로 인한 뇌위축 및 痴呆에 효과가 있을 것으로 판단된다.

이에 저자는 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯이 BV2 microglial cell line에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 규명하고자 각 처방 추출물을 시료로 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율, ROS의 생성과 배양 상층액에서 NO를 관찰하고 PC12 cell line에서의 AChE의 생성을 측정하였다.

먼저, mLFC의 생존율은 加味補陽還五湯 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 97.2±1.1, 93.8±1.7, 91.1±2.6, 83.0±1.0, 81.7±2.1, 八味合聰明湯 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 나타나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

IFN-γ는 식세포작용의 활성화와 염증반응의 조절 cytokine으로 βA 축적에 관여하고 microglial cell에서 NO, iNOS을 유도한다고 알려져 있다[33,34].

IFN-γ를 처리한 BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군은 20.5±2.5, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 92.1±4.7, 73.5±4.2, 50.5±5.4이었고, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 97.8±2.8, 86.7±3.8, 70.9±2.8(%)로 나타나 대조군에 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 생존율의 상승을 보였고 같은 농도 처방간 생존율을 비교해 보면 加味補陽還五湯 실험군에서 유의하게 생존율이 상승되었다(Fig. 2).

BV2 microglial cell line에 IFN-γ를 처리하고 48 시간 경과 후 대조군은 세포의 사멸과 형태의 변화를 보인 반면 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 양호하게 유지되었음을 볼 수 있다(Fig. 3).

이러한 결과로 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 상기의 농도에서 IFN-γ로 인해 나타나는 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다고 할 수 있다.

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO 생성량을 관찰한 결과, 정상군은 19.6±4.5, 대조군은 466.3±56.0, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 132.0±11.0, 239.5±81.1, 357.9±60.7, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 91.5±48.7, 208.4±90.2, 393.3±94.4(mM)로 나타나 加味補陽還五湯은 100, 50 ㎍/㎖에서, 八味合聰明湯은 100, 50, 10 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 차이는 없었다(Fig. 4). 또한 BV2 microglial cell에서 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군에서는 농도 의존적으로 ROS의 생성이 억제되었다(Fig. 5).

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO생성량은 정상군은 19.6±4.5, 대조군은 466.3±56.0, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 117.8±36.0, 270.9±73.9, 412.0±108.0, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실

험군은 각각 154.0 ± 45.7, 259.1 ± 64.4, 353.9 ± 53.0(mM)로 나타나 두 처방 모두 대조군에 비해 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 차이는 없었다(Fig. 4). 또한 BV2 microglial cell의 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 실험군에서는 농도 의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다 (Fig. 5).

이 결과로 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 산화적 손상을 유발하는 NO, ROS의 생성을 억제함으로써 AD의 예방에 활용될 수 있음을 알 수 있다.

또한 PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과, 정상군은 6.4±1.7, 대조군은 46.2±2.4, 加味補陽還五湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 23.5±7.4, 28.5±6.6, 37.2±4.1, 八味合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 20.7±4.4, 24.5±9.3, 27.0±10.7(nM/mg/min)로 나타나 加味補陽還五湯은 100, 50 ㎍/㎖에서, 八味合聰明湯은 100, 50, 10 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 차이는 없었다(Fig. 6). 따라서 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯의 투여가 AChE activity를 억제함으로써 acetylcholine을 증가시켜 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 IFN - γ를 처리한 BV2 microglial cell line에서 세포생존율을 농도의존적으로 유의하게 상승시켰고 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO와 ROS의 생성을 억제하였으며 PC-12 cell line에서 AChE activity를 억제하였다. 단, BV2 microglial cell line 세포생존율에서는 加味補陽還五湯이 八味合聰明湯에 비해 더욱 양호한 효과를 나타냈고 BV2 microglial cell line 배양 상층액에서의 NO생성량과 PC-12 cell line에서의 AChE activity에 있어서는 八味合聰明湯이 加味補陽還五湯에 비해 다소 양호한 억제효과를 보였다.

결과적으로 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 산화적 스트레스와 choline성 신경세포의 퇴화에 의한 기억력 저하에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 본 처방의 기전탐구와 임상연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

加味補陽還五湯과 八味合聰明湯 추출물의 AD 병태 모델에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 IFN-γ를 처리한 BV2 microglial cell line에서 세포생존율을 유의하게 상승시켰고 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO와 ROS의 생성을 억제하였으며 PC-12 cell line에서 AChE activity를 억제하였다.

이상의 결과로 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯은 AD의 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울:집문당. 2005:.311-6.
2. 조추용, 최현자 역. 치매 예방과 케어. 서울: 창지사. 2002:49.

3. 이광우. 임상신경학. 서울:고려의학, 2002:203-8.
4. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2004:189-200.
5. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1, 1978.
6. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
7. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
8. 王淸任. 醫林改錯. 서울:일중사. 1992:85-86.
9. 문성수, 이상용. 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2000;11(1):19-35.
10. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6, 98.
11. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 徐承浩, 鄭仁哲, 李相龍. 聰明湯和山査聰明湯熱水提取物, 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硏討會議論文集. 3006:325-7, 2006.
16. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
17. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology. 1999;52(4):691-9.
18. Mhatre M, Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis : common links and potential therapeutic targets. Journal of Alzheimers disease. 2004;6(2):147-57.
19. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
20. 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. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2000;294(1):187-94.
21. 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.
22. Villarroya M, García AG, Marco - Contelles J, López MG. An update on the pharmacology of galantamine. Expert Opin

Investig Drugs. 2007;16(12):1987-98.
23. Winstein CJ, Bentzen KR, Boyd L, Schneider LS. Does the cholinesterase inhibitor, donepezil, benefit both declarative and non-declarative processes in mild to moderate Alzheimer's disease?. Curr Alzheimer Res. 2007;4(3):273-6.
24. Yen GC, et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Uraria crinita root. Food Chemistry. 2001;74:471-8.
25. Mates JM, et al. Antioxidant enzymes and human disease. Clinical Biochemistry. 1999;32:595.
26. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:217-8, 229.
27. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306-7.
28. 王淸任. 醫林改錯. 서울:일중사. 1992:85-6.
29. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:永林社. 1986:169-71, 221-3, 249-50, 300-1, 464-8, 662-3.
30. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역. 中藥大辭典. 서울:영림사. 1998:592-9, 1159-68, 1353-8, 4839-45, 5258-65, 6357-62, 6460-71.
31. 張仲景. 金匱要略. 서울:醫學研究社. 1987:130-3, 148, 274, 275, 442, 443.
32. 金相贊 외. 方劑學. 서울:永林社. 1999:313-6.
33. Masaru Yamamoto, Tomomi Kiyota, Masahide Horiba, James L. Buescher, Shannon M. Walsh, Howard E. Gendelman and Tsuneya Ikezu. Interferon-ɣ and Tumor Necrosis Factor-α Regulate Amyloid-ß Plaque Deposition and β-Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. American Journal of Pathology. 2007;170:680-92.
34. Kim YJ, Hwang SY, Hwang JS, Lee JW, Oh ES, Han IO. C6 gioma cell insoluble matrix components enhance IFN-gamma-stimulated INOS / no production in BV2 microglial cells. J Biol Chem. 2008;283(5):2526-33.