동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 3, 2008

五子地黃飮子 열수추출물과 초미세분말이 싸이토카인과 건망증 생쥐모델 기억력감퇴에 미치는 영향

김석환, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of OJaJiHwangEumJa(OJJHEJ) Hot water extract & Ultra-fine Powder on Proinflammatory Cytokine of Microglia and Memory Deficit Model

Seok-Hwan Kim, Sang-Ryong Lee
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Abstract

Background : Microglia produces a barrage of factors (IL-1, TNF-α, NO, superoxide) that are toxic to neurons and play a major role in the cellular immune response associated with the pathology of Alzheimer's disease(AD). OJaJiHwangEumJa(OJJHEJ) has been usually used for the treatment of senile disorders. For enhancing efficacy and convenience, the change of the drug delivery device of oriental herbal medicine is required.

Objective : This experiment was designed to investigate the effect of the OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder on proinflammatory cytokine of microglia and memory deficit model.

Method : The effects of the OJJHEJ hot water extract on production of IL-1β, IL-6, TNF-α, in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) were investigated.

The effects of the OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine and AChE in serum of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :

1. The OJJHEJ hot water extract suppressed the production of IL-1β, IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line and the production of IL-6 was suppressed significantly.
2. The OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder decreased AChE significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine.
3. The OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder groups showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze.

Conclusions : This experiment shows that the OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder might be effective for the prevention and treatment of memory impairment diseases. Investigation into the clinical use of the OJJHEJ hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words : Microglia, OJaJiHwangEumja(OJJHEJ), Hot water extract & Ultra-fine powder

---

투고일 : 10/10 수정일 : 11/8 채택일 : 11/9
* 교신저자 : 이상룡 주소 : 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
전화 : 042-229-6811 E-mail : 7575np@dju.kr

Ⅰ. 緖 論

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 치매의 가장 흔한 원인 중 하나이다[1]. AD는 뇌신경세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실을 초래함으로 인해 나타나며[2], 뇌내 microglia와 astrocyte에서 분비되는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine[3], acetylcholinesterase(AChE)[4], oxidants(free radicals)[5], amyloid β protein(Aβ)[6] 등이 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

韓醫學的으로 痴呆는 '痴獃[7]', '呆病[8]', '健忘[9]' 등의 범주에 속하며, 明代 張[7]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, 원인으로 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이 있다[10].

五子地黃飮子는 劉完素의 ≪宣明方論≫[11]에 記載된 地黃飮子에 覆盆子[12], 拘杞子, 免絲子[12], 車前子[12]를 가한 처방으로, 임상에서 腎陰 및 腎陽虛衰로 인한 老人性 痴呆에 활용하고 있는 處方[13]이다.

최근 한의학계에서 痴呆에 대한 실험적 연구[14~17]가 다수 진행되어 왔는데, 특히 서경석 등[18]은 五子地黃飮子가 cholinesterase의 활성을 증가시키고 활성산소의 생성과 노화물질의 축적을 억제하여 항노화 효과가 있다는 연구결과를 발표한 바 있다.

한편, 한약의 제형은 여러 가지가 있으나 현재 활용되는 제형은 주로 탕제로서 이에 대한 여러 가지 문제점이 있는 것이 사실이다[19]. 이를 해결하기 위해 약의 흡수율을 높일 수 있는 최신기술인 초미세분쇄[20]를 응용하여 새로운 한약제형을 만들어 사용한다면 질병치료에 더욱 효율적일 것으로 판단된다.

이에 저자는 五子地黃飮子의 microglia 염증반응 싸이토카인과 건망증 생쥐모델 기억력감퇴 억제 효과를 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교검토하고자 五子地黃飮子의 열수추출물을 시료로 mouse lung fibroblast cells(mLFC)에서 세포독성을 BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)에서 세포생존율을 관찰하였고, BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 관찰하였다. 또한 五子地黃飮子 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정한 바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit(420-MC), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluo ride(PMSF), $_{DL}$-dithiothreitol(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly acrylamide, magnesium

chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNAzol^{B}는 Tel-Test사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(USA) 제품을 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 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), 및 homogenizer(OMNI, USA), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning Co., USA), VIDEOTRACK(Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy(Nikon, Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), Pin mill(대성제약기제제작소, Korea), Turbo mill(air-flow type mill, ATM-100, 부성분체, Korea), 공기분급장치(air classification system, ATM-100, 부성분체, Korea), 자동생화학분석기(Biochemical analyzer, Express 550) 등이다.

2) 동물

평균체중 약 24g의 10주령 雌性 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명공학연구원에서 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 실온 22±2℃을 유지하고, 1일 중 12시간은 200~300Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(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 공급하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 五子地黃飮子(OJaJiHwangEumJa, OJJHEJ)의 처방구성은 ≪大田大學校 附屬韓方病院 處方集≫[13]에 준하였으며, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of OJAJIHWANGEUMJA (OJJHEJ)

Herbal Name	Galenical Term	Dose(g)
熟地黃	Rehmammiae Radix preparat	12
巴戟(去心酒)	Morindae Radix	12
肉從容(酒)	Boshniakiae Herba	12
山茱萸	Corni Fructus	6
石斛	Dendrobii Herba	4
遠志(甘草水去心)	Polygalae Radix	4
五味子	Maximowicziae Fructus	4
白茯苓	Poria	4
麥門冬(去心)	Liriopis Tuber	4
附子(炮)	Aconiti Tuber	2
肉桂	Ciniamomi Cortex	2
石菖蒲	Acori Rhizoma	2
拘杞子	Lycii Fructus	4
覆盆子	Rubi Fructus	8
菟絲子	Cuscutae Semen	4
車前子	Planteginis Semen	4
	Total amount	88g

4) 검액의 조제

(1) 五子地黃飮子 열수추출물 분리 및 검액의 조제

五子地黃飮子 3첩 분량(264g)에 증류수 2,000㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 五子地黃飮子 열수추출물 36.4g을 얻었으며, 얻어진 열수추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 五子地黃飮子 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 熟地黃, 巴戟, 肉從容, 石斛, 遠志, 五味子, 白茯笭, 麥門冬, 附子, 肉桂, 石菖蒲, 拘杞子, 覆盆子, 菟絲子, 車前子 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(ACWS, air classifying wheel speed) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 五子地黃飮子 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 418㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포독성 측정

(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㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, USA), DNase type Ⅰ(0.15 ㎎/㎖, Sigma, USA), antibiotics(penicillinm 104U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)는 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, NY, USA)으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법[21]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 五子地黃飮子 열수추출물(최종 농도 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24 wells plate)에 lipopolysaccharide(LPS)(0.1㎍/㎖), 五子地黃飮子 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하고 72시간 동안 동시 배양하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 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 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. BV2 microglial cell line의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell line(1×10^5cells/24 wells plate)에 LPS(0.1㎍/㎖), 五子地黃飮子 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하여 6시간과 72시간 동안 동시 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

2) BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine 분석

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 五子地黃飮子 열수추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 LPS(0.1㎍/㎖)를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1×10^5cells/㎖)하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 五子地黃飮子 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 五子地黃飮子 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하고 48시간 동안 CO_2 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100㎕(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈액분석

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

10주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, galanthamine(3㎎/㎏, *i.p*) 투여군, 五子地黃飮子 열수추출물(418㎎/㎏, *p.o.*), 초미세분말(418㎎/㎏, *p.o.*) 실험군으로 나누고, 4주간 약물을 투여하였다. 약물 투여 22일째부터 scopolamine(1㎎/㎏)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) 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 첨가한다. 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) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

선별된 ICR계 생쥐에 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습 시 ICR계 생쥐 중 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, galanthamine(3㎎/㎏, *i.p*) 투여군, 五子地黃飮子 열수추출물(415㎎/㎏ *p.o*) 실험군, 초미세분말(415㎎/㎏ *p.o*) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1㎎/㎏)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하고, 이를 videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

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

Ⅲ. 成　績

1. 五子地黃飮子의 세포독성

1) mLFC에 대한 세포독성

五子地黃飮子의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖ 실험군이 각각 95.9±0.8(%), 91.9±1.0(%), 84.5±1.1(%), 76.4±0.6(%)로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖ 실험군에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

2) BV2 microglial cell line의 형태학적 변화와 세포 생존율

BV2 microglial cell line에 LPS를 처리하여 6시간이 경과하면 대조군은 구형인 세포가 넓게 퍼지면서 활성화된 형태적 변화를 보였고 72시간 경과 시, 세포 중 절반 이상이 사멸됨을 관찰할 수 있다. 그에 비하여 五子地黃飮子 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 잘 유지됨을 볼 수 있다.

BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군 55.8±5.5(%), 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서 각각 90.6±3.0(%), 71.6±4.1(%), 62.4±4.0(%)로 나타나 대조군에 비해 五子地黃飮子의 50㎍/㎖, 100㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 높았다.

2. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

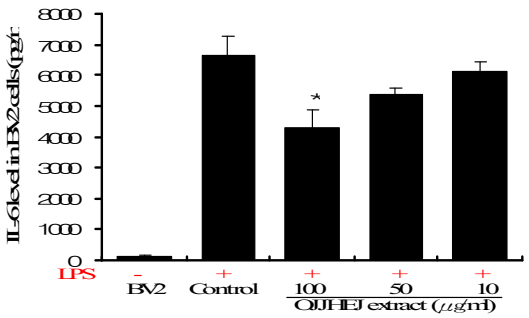
1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군은 37.0±12.0pg/㎖, 대조군은 675±72.5pg/㎖이었고, 五子地黃飮子 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서 각각 419±6.2pg/㎖, 504±137.5pg/㎖, 624±66.0pg/㎖로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-6 생성량은 정상군은 134±22.0pg/㎖, 대조군은 6628±614.6pg/㎖이었고, 五子地黃飮子 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서 각각 4312±563.6pg/㎖, 5400±184.0pg/㎖, 6144±299.5pg/㎖로 나타나 100㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 낮았다(Fig. 1).

Fig. 1. Inhibitory effect of OJJHEJ hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.



BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of OJJHEJ hot water extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of LPS(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and IL-6 concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.
Data are represented as means±S.E.
Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

3) TNF-α 생성량에 미치는 영향

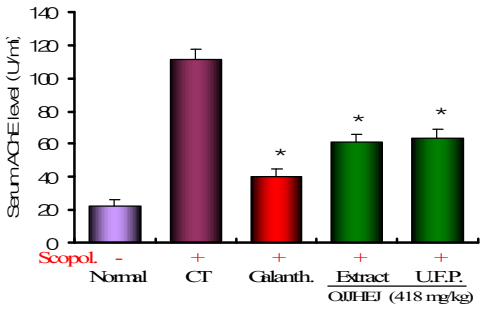
BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군은 515±109.5pg/㎖, 대조군은 2888±133.0pg/㎖이었고, 五子地黃飮子 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서 각각 2136±60.0pg/㎖, 3156±392.1pg/㎖, 2993±58.5pg/㎖로 대조군에 비해 유의성 있는 차이는 없었다.

4. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 AChE에 미치는 영향

1) AChE 활성도에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 22.8±3.4(U/㎖), 대조군이 111.1±6.3(U/㎖), galanthamine 투여군이 40.0±5.1(U/㎖), 五子地黃飮子 열수추출물 실험군이 61.1±4.7(U/㎖) 그리고 초미세분말 실험군이 63.2±5.7(U/㎖)로 나타나 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

Fig. 2. Effects of OJJHEJ on the serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice.



Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and OJJHEJ hot water extract(418㎎/㎏ p.o).
U.F.P.(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1

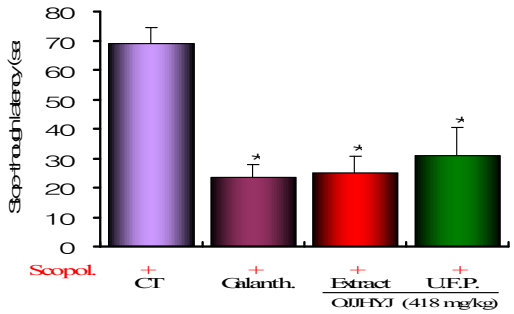
mg/kg i.p) and OJJHEJ ultra-fine powder(418mg/kg p.o).
After ICR mice were administered of OJJHEJ orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.E.
Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

5. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과, 대조군이 68.9±5.7(sec), galanthamine 투여군이 23.68±4.1(sec), 五子地黃飮子 열수추출물 실험군이 25.1±5.6(sec), 그리고 초미세분말 실험군은 31±9.5(sec)로 나타나 대조군에 비해 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 단축되었으며, 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

Fig. 3. Effects of OJJHEJ on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test.

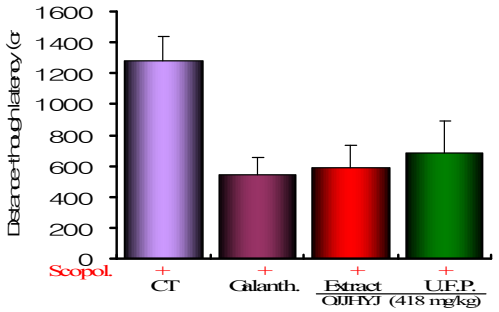


CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and galanthamine(3mg/kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and OJJHEJ hot water extract(418mg/kg p.o).
U.F.P.(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/kg i.p) and OJJHEJ ultra-fine powder(418mg/kg p.o).
After ICR mice were administered of OJJHEJ orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.E.
Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test(*p<0.05).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과 대조군이 1278.3±164.4(㎝)이었고, galanthamine 투여군이 545±108.9(㎝), 五子地黃飮子 열수추출물 실험군이 588.2±144.2(㎝) 그리고 초미세분말 실험군이 684.4±207.7(㎝)로 낮아졌으나 대조군에 비해 유의성은 없었다(Fig. 4).

Fig. 4. Effects of OJJHEJ on the scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.



CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and galanthamine(3mg/kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1mg/kg i.p) and OJJHEJ hot water extract(418mg/kg p.o).
U.F.P.(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/kg i.p) and OJJHEJ ultra-fine powder(418mg/kg p.o).
After ICR mice were administered of OJJHEJ orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.E.
Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test(*p<0.05).

Ⅳ. 考 察

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타낸다[1,21].

종류로는 AD, VD, 중독성 치매 등이 있으며 이 중 AD는 50% 이상을 차지하고 있고, VD는 20~30% 정도이며 여성이 남성에 비해서 2-3배정도 발병율이 높은 것으로 알려져 있다[23].

AD는 증상이 서서히 나타나며 경과는 일정하게 점진적으로 진행되는데, 초기에는 기억력 장애가 주증상이나 후기에는 주의력 결여, 지적 능력의 상실, 특히 기억력, 판단력, 추상적 사고, 기타 고유 피질기능의 장애와 인격 및 행동의 변화가 나타난다[1].

이러한 AD 유발에는 뇌의 전반적인 위축 이외에도 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine의 증가[3], acetylcholine의 감소 및 AChE의 증가[4], free radicals[5], Aβ[6] 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.

AD의 원인에 대한 대표적인 가설 중 하나는 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이다. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자이며 cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여한다. 그러나 일단 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증반응 등의 자극에 의해 손상된 뇌혈관장벽을 통해 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 astrocyte와 microglial cell 등이 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다[24].

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

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 AChE의 저해제로 잠복기의 AD에 효과가 있는 것으로 알려진 galanthamine[27]이 있는데, galanthamine은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 학습과 단기기억력을 개선시킨다고 한다[28].

AD의 발병기전과 관련하여 Aβ에 대한 연구가 많이 진행되었는데, Aβ는 β-secretase나 ɣ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되며[29], Aβ의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 Aβ가 신경세포를 손상시켜 결국 치매의 증상이 나타나게 된다[30].

韓醫學的으로 痴呆는 '呆病[31,32]', '健忘[33,34]' 등의 범주에 속하며, ≪景岳全書·癲狂痴獃≫[7]에는 痴呆와 유사한 개념으로 '痴獃'가 언급되어 있는데, "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.....", "凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴獃이라 하였다.

痴呆의 病因에은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이 있으며, 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱으로 辨證하여 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[10].

五子地黃飮子는 劉完素의 ≪宣明方論≫[11]에 記載된 地黃飮子에 益腎補肝한는 覆盆子[12], 滋肝益腎하는 拘杞子, 强陰益精하는 免絲子[12], 淸肺肝風熱하는 車前子[12]를 가한 처방으로, 大田大學校 附屬韓方病院에서 腎陰虛衰로 인한 老人性 痴呆나 중풍후유증에 다용하고 있는 처방이다[18].

五子地黃飮子를 구성하는 약물에 대한 각각의 효능을 살펴보면 다음과 같다.

熟地黃은 滋腎水 補益眞陰 하고, 巴戟은 强陰益精 補助 元陽 하며, 肉從容은 滋潤五臟 益髓强筋 하고, 山茱萸는 固精秘氣 補腎溫肝 하며, 石斛은 平胃氣 除虛熱 하고, 遠志는 强志益智 聰耳明目 하며, 五味子는 益氣生津 補虛明目 하고, 白茯苓은 開心益智 益腎强筋 하고, 麥門冬은 潤肺淸心 瀉熱除煩 하며, 附子는 補命門相火 通行十二經 하고, 肉桂는 溫中平肝益肺助陽 하며, 石菖蒲는 開心孔 利九竅[35] 하고, 覆盆子는 益腎補肝 하며, 拘杞子는 滋肝益腎하고, 菟絲子는 强陰益精 하며, 車前子는 淸肺肝風熱[12] 하는 효능이 있다. 그러므로 五子地黃飮子는 中風舌瘖, 腎陰虛衰[36]의 증상 등을 치료한다고 할 수 있다.

현재 가장 광범위하게 응용되는 한약 제형인 湯劑는 품질 균일성 확보가 어렵고 한약 고유의 맛과 향 등에 의해 복약순응도가 낮으며 보관 및 저장에 불편함이 많은 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 오늘날 탕제를 대신할 새로운 제형이 요구되고 있는데, 현재 처방에 따라 배합된 약재를 탕전의 조제과정과 동일한 공정을 거쳐 추출한 여액을 분무건조법이나 동결건조법 등을 이용하여 건조시킨 엑스분말을 원료로 하여 과립제, 정제, 캅셀제, 연고제 등을 개발하여 이용하고 있다[19].

이에 저자는 五子地黃飮子가 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 microglia의 proinflammatory cytokine 발현 및 건망증 생쥐모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교 검토하고자 五子地黃飮子 열수추출물을 시료로 하여 mLFC에서 세포독성을 관찰하고 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율을 관찰하였다. LPS를 처리한 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 관찰하였다. 또한 五子地黃飮子의 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 五子地黃飮子의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 五子地黃飮子 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 감소하였고 200㎍/㎖을 제외한 나머지 실험군에서 80% 이상으로 나타났다. 또한 LPS를 처리한 BV2 microglial cell line의 세포 생존율을 측정한 결과, 五子地黃飮子 실험군 모두 증가하였으며 50㎍/㎖, 100㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 증가하였다.

이러한 결과로 상기의 농도에서 五子地黃飮子 열수추출물은 정상세포에 대한 세포독성을 나타내지 않으며, AD 병태에서 나타나는 세포사멸을 억제하는 효과가 있다고 판단된다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌손상, 외부로부터 이물질 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형된다[37]. 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS는 microglial cell을 활성화시키는 가장

효과적인 물질로 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시킨다[38]. 활성화된 microglial cell은 IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine과 NO, ROS 등의 oxidants 그리고 IL-10, TGF-β1 등의 anti-inflammatory cytokine를 생산, 분비한다[39].

Microglial cell에서 분비된 IL-1β와 TNF-α는 대표적인 염증유발 cytokine으로 astrocyte를 활성화시키며 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apolipoprotein E를 분비하여 염증 및 βA에 의한 신경세포독성을 촉진시킨다[40]. IL-6 또한 염증유발 cytokine으로 AD의 병리기전 중 amyloid 침착과 노인반(senile plaque)형성에 관여한다[41].

Microglial cell의 활성화로 생성되는 anti-inflammatory cytokine 중 IL-10은 사람의 대식세포나 단핵세포에서 가장 많이 생성되며 T림프구에 작용하여 Th1 림프구의 세포면역을 억제하고, IL-1β와 TNF-α를 생성하는 대식세포의 생성을 억제한다.

이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 五子地黃飮子의 열수추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 투여한 후 6시간 배양하여, 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생산량을 측정한 결과, 거의 모든 실험군에서 생산량이 다소 감소하였으며 특히 IL-6 생산량은 五子地黃飮子 100㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 낮았다.

이는 五子地黃飮子이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 억제한 것으로, 五子地黃飮子의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokines으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

일반적으로 기억력 감퇴와 인지기능의 손상은 choline계 작용의 감소로 나타나는데, scopolamine은 절후 부교감신경이 분포된 표적장기에서의 acetylcholine의 작용, 무스카린성 수용체 흥분 효과를 봉쇄하는 항무스카린성 약물로, 다양한 인지기능 중 기억력 감퇴에만 관여하는 것으로 알려져 있다[42].

또한, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 감소되었으나 실험군 간의 유의한 차이는 없었다. 이로써 五子地黃飮子의 열수추출물 및 초미세분말이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키리라 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있게 단축되었으나, 五子地黃飮子 열수추출물과 초미세분말 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 거리의 단축을 보였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 4). 이상의 실험 결과를 살펴볼 때, 기억력감퇴에 대한 치료제로써 五子地黃飮子을 활용할 수 있다고 판단된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 五子地黃飮子 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 또한 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생산량을 억제하였고 특히 IL-6 생산량은 유의성 있게 억제되었다. 또한 五子地黃飮子의 열수추출물 및 초미세분말은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성을 억제하였다. Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

한편 열수추출물 및 초미세분말을 비교해 볼 때 뚜렷한 효과의 차이는 나타나지 않았다.

결과적으로 五子地黃飮子은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현과 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 치매에 대한 임상적 활용에 대한 연구, 새로운 제형의 개발 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

五子地黃飮子 열수추출물, 초미세분말제형이 싸이토카인과 기억력 감퇴 억제에 미치는 영향을 실험적으로 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五子地黃飮子 열수추출물은 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생산량을 감소시켰으며 특히 IL-6의 생산량을 유의성 있게 감소시켰다.

2. 五子地黃飮子 열수추출물과 초미세분말은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 AChE 활성을 유의성 있게 억제시켰다.

3. 五子地黃飮子의 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 五子地黃飮子의 열수추출물 및 초미세분말은 건망증 및 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 민성길 외. 최신정신의학. 서울:일조각. 2006:205.
2. 조추용, 최현자 역저. 치매 예방과 케어. 서울:창지사. 2002:49.
3. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529 ~ 534.
4. 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.
5. 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 ~ 157.
6. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001; 21(1):11 ~ 6.
7. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610 ~ 1.
8. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社.

1990:222~5, 233~5.
9. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:37, 124, 196, 229, 217~8, 229.
10. 대한한방신경정신과학회. 한방신경정신과학. 서울:집문당. 2005:311~320.
11. 유완소. 선명론방. 도서출판정담. 1990:150, 745.
12. 李尙仁. 본초학. 서울:학림사. 1981:117~9, 276.
13. 대전대학교 한방병원 처방집. 대전대학교 한방병원. 한국 출판사. 1992:120.
14. 정인철, 이상룡. 山査肉이 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279~88.
15. 박지운 정인철, 이상룡. 日黃連이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):87~100.
16. 최병만, 정인철, 이상룡. 木槿皮가 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2004;15(2):119~140.
17. 김명진, 정인철, 이상룡. 木瓜가 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2005;16(1):97~118.
18. 서경석, 이상룡. 오자지황음자가 노화백서의 혈액 변화와 혈청, 뇌조직의 항산화활성에 미치는 영향. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):79~93.
19. 최현정, 방나영 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356~367.
20. Shu ZH, Liu GF, Ma MH, Xu Y, Hu YF. Study on the superfine comminution of traditional Chinese medicine. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004;29(9):823~827.
21. 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):1107~1112.
22. 홍은경. 치매의 신경병리학. 한양의대학술지. 2001;21(1):1~9.
23. Bierer L. M, Haroutunian V, Gabriel S, Knott P. J, Carlin L. S, Purohit D. P, Perl D, Dchmeridler J, Kanof P, and Davis K. L. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. Journal of Neurochemistry. 1995;64:749~760.
24. 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. The Journal of Neuroscience. 1999;19(9):3440~3447.
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. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2000;294(1):187~194.
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. Geerts H. Indicators of neuroprotection with galantamine. Brain Research Bulletin. 2005;64(60):519 ~ 24.
28. Spassov A, Getova DP, Dimitrova DS. Study of ancholinesterase drugs galanthamine and donepezil on scopolamine-induced amnesia in rats. European Neuropsychopharmacology. 2004;14:333.
29. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutunian V, DeMarco L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains, Journal of Neurogenetics. 1998;12(1):55 ~ 65.
30. Mattson MP et al. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. Journal of Neurochemistry. 1999;73(2):532 ~ 537.
31. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
32. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222 ~ 5, 233 ~ 5.
33. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:217 ~ 8, 229.
34. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306 ~ 307.
35. 황도연. 증맥 방약합편. 남산당. 1989:121, 126-130, 175-201, 212-241.
36. 리정복, 장수학. 평양:과학백과사전출판사. 1989:41, 64-8, 89.
37. Lee SC, Liu W, Dickson DW et al. Cytokine production by human fetal microglia and astrocyte. Journal of Immunology. 1998;150:2659.
38. Nick J et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. Journal of Immunology. 1996;156:4457.
39. Woo MS et al. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. Molecular Brain Research. 2003;113(1 ~ 2):86 ~ 96.
40. Tuppo E, Arias H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry&Cell Biology. 2005;37(2):289 ~ 305.
41. Akama KT, Van Eldik LJ et al. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. Neurochemistry International. 2001;39(5 ~ 6):409 ~ 13.
42. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia ; electroencephalogram findings and cognitive performance. European Journal of Clinical Investigation. 1998;28(11):944 ~ 9.