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

加味補陽還五湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

서승호, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

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

Seung-Ho Seo, In-Chul Jung, 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 KBHT hot water extract & ultra-fine powder on Alzheimer's Disease Model Induced by βA.

Method : The effects of the KBHT hot water extract on expression of proinflammatory cytokine mRNA in BV2 microglial celll cell line treated by lipopolysacchaide(LPS).

The effects of the KBHT 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.

Results :

1. The KBHT hot water extract suppressed the expression of proinflammatory cytokine mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS.
2. The KBHT 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 movemet-through latency
3. The KBHT 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.
4. The KBHT hot water extract & ultra-fine powder suppressed the expression of TNF-α, IL-1β protein significantly in the microglial cell of mice with Alzheimer's disease induced by βA.
5. The KBHT ultra-fine powder reduced infarction area of hippocampus significantly in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.

투고일 : 10/6 수정일 : 11/5 채택일 : 11/9
* 교신저자 : 이상룡 주소 : 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
전화 : 042-229-6811 E-mail : 7575np@dju.kr

Conclusions : These results suggest that the KBHT 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, KakamBoyangHwanohTang(KBHT), hot water extract, ultra-fine powder

Ⅰ. 緖 論

Alzheimer's disease(AD)는 기억의 상실과 중등도의 인지기능 저하가 특징적인, 나이와 연관된 진행성의 신경퇴행성 장애이다. 뇌의 실질, 그중에서도 특히 hippocampus와 cerebral cortex에 amyloid plaque(AP)형태로 된 β-amyloid(βA)가 세포외에 응집되어 과도하게 축적된 형태학적인 소견을 보인다[1].

痴呆는 "其輕者可見神情談謨 寡言少語 善忘遲鈍等證 重者常表現爲終日不語 或閉戶獨處 或口中喃喃 或言辭顚倒 擧動不經 或忽笑忽哭 或不欲食 數日不之飢餓"의 증상을 보이며[2] 연관된 증후로 善忘[3], 痴獃[4], 呆病[5,6], 健忘[7] 등이 있다.

痴呆의 변증은 痰飮[5], 七情傷[4], 稟賦不足[2], 肝腎不足[6] 등으로, 治法은 消痰開鬱[5], 滋補肝腎[6], 建脾益胃, 活血行氣[2] 등으로 구분할 수 있다.

補陽還五湯은 ≪醫林改錯≫[8]에 처음 수록된 처방으로 王[9]은 中風 半身不隨, 癱腿偏枯, 抽搐筋攣 등이 元氣虧虛에 의한 瘀血에 있다고 주장하여 補陽還五湯을 立方하였다. 한편 문 등[10]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 건망증 생쥐모델에 대해 기억력 감퇴의 효과를 나타냈다고 발표한 바 있어 本方이 痴呆의 치료와 예방에 활용될 수 있다고 판단된다.

현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 탕제이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데[11], 초미세 분말은 약재를 수십㎛로 분쇄하여 분말로 만든 것으로[12], 최근 한약 제형에 초미세분말을 응용하는 것에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[13,14].

이에 저자는 加味補陽還五湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, 열수추출물을 시료로 in vitro 실험에서 lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine의 mRNA 발현을 관찰하였다. 또한 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였고, AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 혈청 내 acetylcholinesterase(AChE)의 변화 및 뇌조직의 허혈상태 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(MgCl2)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)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-α, anti-CD44-PE, anti-CD68-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-GFAP-FITC는 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), CO2 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 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이라, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 加味補陽還五湯(KakamBoyangHwanohTang, KBHT)은 《韓醫神經精神科學》[15]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, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of KakamBoyangHwanohTang(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

4) 검액의 조제 및 투여

(1) 열수추출물 분리 및 검액의 조제

加味補陽還五湯 1첩 분량(103g)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 加味補陽還五湯 열수추출물(5.25g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 400㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 黃芪, 當歸, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花, 地龍, 遠志, 石菖蒲 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(air classifying wheel speed) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 400㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척하고 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(penicillin 104U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간 계속 배양하였다. 이후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리하고 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[16]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 열수추출물(최종 농도 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였고 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건

조하였다. 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 line에서의 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 DMEM배지에서 배양한 후 加味補陽還五湯 열수추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1㎍/㎖를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000rpm에서 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 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다.

이를 다시 13,000rpm에서 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(10U/㎕) 2U/tube와 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가하고, 다시 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 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 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2min 50℃, 10min 94℃, 그리고 40 cycles는 0.15min 95℃, 1min 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 TNF-α

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

Scheme 1. Sequence of βA(1～40)

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

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA(10μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10μM)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), 補陽還五湯 열수추출물 실험군(400㎎/㎏)과 補陽還五湯 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 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.

5) βA에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에

서의 허혈상태 분석

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 [(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 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. 加味補陽還五湯에 대한 세포독성

加味補陽還五湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 **加味補陽還五湯** 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 97.2±1.1, 93.6±1.7, 91.1±2.6, 88.0±2.0, 81.7±2.1(%)로 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다

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

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.22로 나타났으며, 加味補陽還五湯 100, 50㎍/㎖의 실험군은 각각 0.688, 0.909로 나타났다.

2) TNF-α mRNA 발현

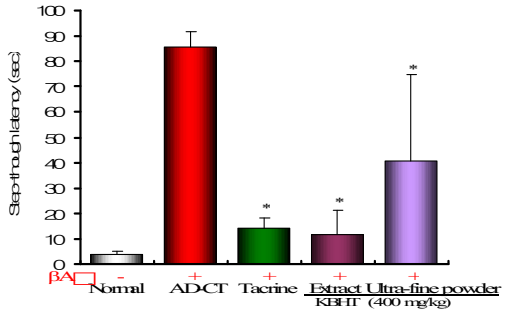
BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 정상군이 0.031, 加味補陽還五湯 100㎍/㎖, 50㎍/㎖의 실험군은 각각 0.081, 0.336로 나타났다

3. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

step-through latency 측정에서 정상군이 3.9±1.3sec, 대조군이 85.9±5.8sec, tacrine 투여군이 14.3±4.0, 加味補陽還五湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 11.9±9.1, 40.7±34.2sec로 tacrine 투여군과 加味補陽還五湯 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 加味補陽還五湯 초미세분말, 열수추출물 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

Fig. 1. Effects of KBHT 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.

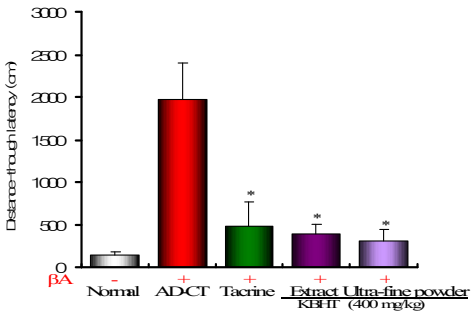


C57BL/6 mice were trained once a day for 1 wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of KBHT hot water extract, KBHT ultra-fine powder or tacrine for 8 wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week.
Control, βA-induced Alzheimer's mice; tacrine(10㎎/㎏, p.o); KBHT hot water extract, and KBHT 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 정상군이 145.3±35.3㎝, 대조군이 1976.7±427.2㎝, tacrine 투여군은 476.3±286.1㎝, 加味補陽還五湯 열수추출물 실험군은 386.48±122.9㎝, 초미세분말 실험군은 306.5±131.4㎝로 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였고 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

Fig. 2. Effects of KBHT 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.



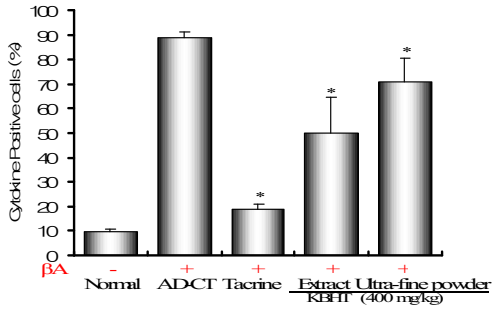
C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk., then they were divided into each group and treated by βA. And then they were orally administered of KBHT hot water extract, KBHT ultra-fine powder or tacrine for 8wks. When 7 wks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated three times a week during the last week.
Control, βA-induced alzheimer's mice; Tacrine (10㎎/㎏, p.o); KBHT extract, and KBHT 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 생쥐의 뇌세포에 대한 영향

1) Microglial cell에서의 IL-1β 발현

Microglial 세포내에서의 IL-1β의 발현을 관찰한 결과, IL-1β의 발현은 대조군에서 88.6±2.5%, tacrine 투여군에서 19.0±1.9%, 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 각각 50.0±14.6, 71.1±9.7%로 모든 실험군에서에서 유의성 있게 감소하였고 열수추출물과 초미세분말간 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

Fig. 3. Effects of KBHT hot water extract & ultra-fine powder on IL-1β activity on the microglial cell in βA-induced Alzheimer disease mouse model.

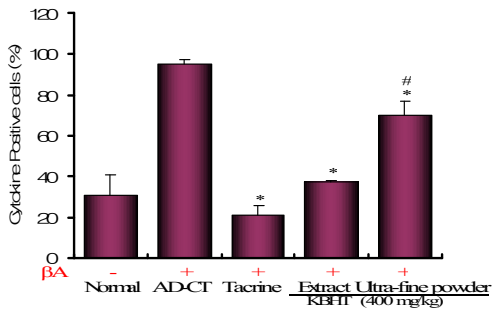


C57BL/6 mice were orally administered of KBHT hot water extract, and KBHT ultra-fine powder(400㎎/㎏, p.o) and tacrine(10㎎/㎏, p.o) for 8 wks. IL-1b activity measured by FACSCalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced Alzheimer's disease model.
Data represent means±S.D.

2) Microglial cell에서의 TNF-α 발현

Microglial 세포내에서의 TNF-α의 발현은 대조군은 94.9±2.3%이었고, tacrine 투여군은 21.1±4.6%, 加味補陽還五湯 열수추출물 실험군은 37.1±0.8%였으며, 초미세분말 실험군은 69.9±7.0%으로 tacrine 투여군, 加味補陽還五湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 실험군 사이에서는 열수추출물 실험군에서 초미세분말에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

Fig. 4. Effects of KBHT hot water extract & ultra-fine powder on TNF-α activity on the microglial cell in βA-induced Alzheimer disease mouse model.

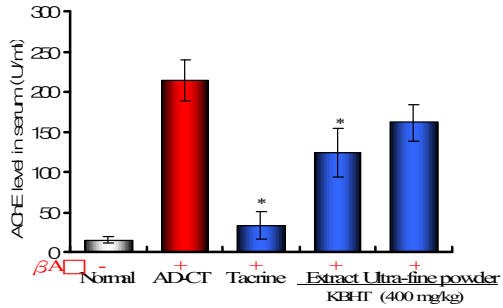


C57BL/6 mice were orally administered of KBHT hot water extract, and KBHT ultra-fine powder(400㎎/㎏, p.o) and tacrine(10㎎/㎏, p.o) for 8 wks. TNF-α activity measured by FACSCalibur., number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures 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 BHT ex group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 혈청의 AChE 활성도

생쥐 혈청내 AChE 활성도는 정상군이 15.0±3.7 U/㎖, 대조군은 214.0±24.9 U/㎖이었다. Tacrine 투여군은 33.0±17.9 U/㎖, 補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말 실험군은 각각 123.5±30.0, 161.3±22.6 U/㎖로 tacrine 투여군과 補陽還五湯 열수추출물 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

Fig. 5. Effects of KBHT hot water extract and ultra-fine powder on the serum AchE level in βA-induced Alzheimer disease mouse model.

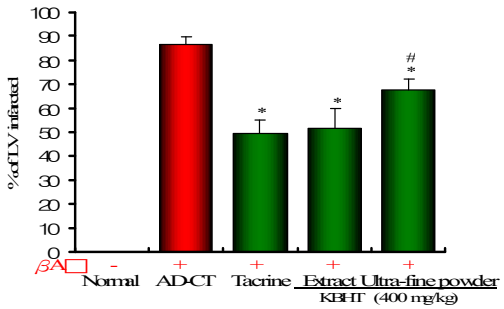


C57BL/6 mice were orally administered of KBHT hot water extract and ultra-fine powder(400㎎/㎏, p.o) and tacrine(10㎎/㎏, p.o) for 8wks. Serum AChE activity measured by cholinesterase kit and analyzed for serum level as described in Material and Methods.
Data represent means±S.D.
* Statistically significant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

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 상태에 미치는 효과

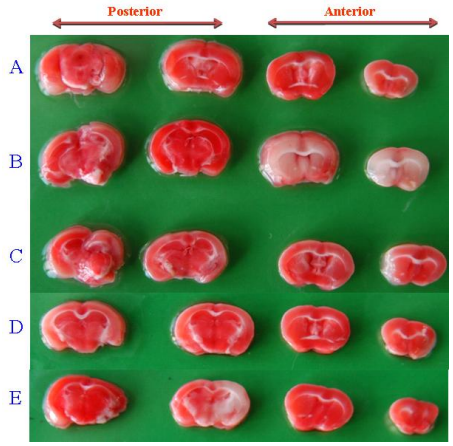
AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 86.7±2.8%이었고, tacrine 투여군은 49.5±5.9% 였고, 加味補陽還五湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 51.8±7.8%, 67.3±4.7%로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말 실험군간 유의한 차이가 있었다(Fig. 6).

Fig. 6. Effects of KBHT hot water extract and KBHT ultra-fine powder on the infarct size of β A-induced Alzheimer's mice brain.



C57BL/6 mice were orally administered of KBHT hot water extract and KBHT 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($p<0.05$).
# Statistically significant value compared with BHT ex group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

Fig. 7. Effects of KBHT hot water extract and KBHT ultra-fine powder on the infarct size of β A-induced Alzheimer's mice brain(coronal section).



C57BL/6 mice were orally administered of KBHT hot water extract and KBHT 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 6-12 mm from frontal pole.
A; normal, B: AD-CT, C: tacrine, D: KBHT extract, E: KBHT ultra-fine powder

Ⅳ. 考　察

AD는 신피질, 해마, 편도 등 여러 뇌 영역에서의 이상이 특징인 신경퇴행성 장애이다. AD가 진행됨에 따라 인지, 행동 등 여러 영역에서 환자는 황폐를 경험하며 환자와 시기에 따라 특정한 증상이 나타난다. Mini-Mental State Examination(MMSE)의 점수가 20점 이상인 경증 AD환자는 운전, 쇼핑, 취미생활에서의 어려움과 건망이 특징이며 우울증에 빠질 위험도 증가한다. MMSE가 10~19사이인 중등도의 AD환자는 현저한 기억력저하와 일상생활에서의 도움을 필요로 하게 된다. MMSE가 10미만인 중한 AD환자는 언어의 제한, 기본적인 일상생활능력의 소실, 초조, 대소변 실금이 특징적이다[18].

AD의 원인으로 유전적 결함, 바이러스 장애, 에너지 대사 결함, APP의 전환, 신경보호인자, 글루탐산염 독성, 미토콘드리아의 결함,

극미량 원소의 독성, 자유기가 유도한 신경원의 노화 등이 제시되고 있다[19].

AD의 신경병리학적 특징은 비정상적인 시냅스, 주로 중합되고 과인산화된 tau protein으로 구성된 neurofibrillary tangle(NFT), 주로 βA를 함유하고 있는 세포외의 AP의 침착 등이다[20]. Tau protein은 NFT의 주요성분이고 βA는 40-42개의 잔기로 구성된 소수성 자기 응집 펩타이드이며, βA 복합체는 AD환자의 뇌에 있는 senile plaque(SP)와 cerebral amyloid angiopathy(CAA)의 형태인 단백질과 같은 섬유성 침착물을 구성한다. Tau protein과 βA 둘 모두 AD 발병기전의 연쇄반응의 상위에 있으며 특히 βA는 치매의 발전에 중추적인 역할을 한다[21]. βA의 침착이후에 NFT가 형성되며 βA의 침착은 수초의 사멸과 시냅스의 소실을 유도하는 결과를 야기한다. βA는 신경원에 독성을 가진 것으로 알려져 있으며 세포사멸의 활성화를 일으킨다[22].

AD는 다수의 신경전달물질계의 영향을 받는데 그 중에서도 콜린계와 특별히 많은 관계가 있다[23]. Acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가[24,25]와 같은 콜린계의 기능장애는 기억력과 많은 연관이 있으며 tacrine과 같은 cholinesterase inhibitor에 의해 강화될 수 있다[23]. Tacrine은 1940년에 정맥의 방부제로 합성되었고 1981년부터 AD에 효과가 있다는 연구결과가 나오기 시작했으며, 1993년에는 FDA에서 AD의 치료제로 승인을 받았다[26].

정상상태의 뇌에서 신경교세포인 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 일단 뇌손상이 발생하면 먼저 병변 부위에서 microglial cell이 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[27], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다[28]. 특히 βA가 침적된 SP 주변의 microglial cell은 βA에 의해 더욱 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다[29].

IL-10은 TNF-α와 같은 proinflammatory와 반대로 염증 반응을 억제시켜 종결시킨다. IL-10은 AD와 잠재적으로 연관된 것으로 조사된 TNF-α, IL-1, IL-6의 효과적인 억제인자이다[30].

IL-1 시스템은 IL-1α와 IL-1β의 작용제, IL-1RA와 같은 내인성 수용체 길항제와 같은 3개의 주요 리간드로 구성된다. 세포내 반응은 IL-1α 또는 IL-1β가 1형 IL-1 신호 수용체에 결합하여 IL-1R accessory protein(IL-1RAcp)에 관계됨으로써 시작된다. IL-1ra는 선택적이고 경쟁적인 IL-1RAcp에 대한 길항제로서 IL-1RAcp가 IL-1receptor type I(IL-1RI)에 붙지 못하게 자신이 신호 IL-1RI에 결합하며 IL-1 신호를 조절하는 것으로 여겨진다[31].

痴呆와 관련된 韓醫學 記錄을 살펴보면 ≪內經≫[3]에서는 "血幷於上 氣幷於下 心煩惋善怒 血幷於下 氣幷於上 亂而善忘"라 하여 '善忘'이라는 기억력이 감퇴하는 증상을 서술하였고, 朱[7]는 "健忘者 爲事有始無終言 談不知首尾 此以爲病之名 非比生成之愚頑 不能人事也"라 하여 健忘이 언어, 사유장애까지 낼 수 있고 특히 '不能人事'라 하여 정상적인 사회생활에 지장을 초래할 수 있음을 언급하였다.

痴呆의 변증은 痰飮[5], 七情傷[4], 稟賦不足[2], 肝腎不足[6] 등으로, 治法은 消痰開鬱[5], 滋補肝腎[6], 健脾益胃, 活血行氣[2] 등으로 구분할 수 있다.

補陽還五湯은 王[8]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 각 약물의 효능과 약리작용을 살펴보면 다음과 같다. 黃芪는 補氣升陽, 固表止汗, 托毒排膿, 生肌, 利水退腫의 효능이 있으며 강심작용, 말초혈관확장, 혈압강하, 부종감소 및 이뇨작용 등이 있다. 當歸尾는 活血祛瘀의 효능이 있으며 자궁기능의 조절, 이뇨, 혈압강하, 항균작용 등이 있다. 赤芍藥은 淸血凉血, 活血祛瘀, 通順血脈, 散惡血의 효능이 있으며, 관상동맥확장, 중추신경억제, 위장평활근 억제작용 등이 있다. 川芎은 活血祛瘀, 祛風止痛, 行氣開鬱의 효능이 있으며 말초혈관확장, 진경진통작용 등이 있다. 桃仁은 破血祛瘀, 潤燥滑腸의 효능이 있으며 항혈액응고작용 등이 있다. 紅花는 破瘀活血, 通經, 消腫止痛의 효능이 있으며 항혈액응고, 평활근수축작용 등이 있다. 地龍은 通絡止痛, 熄風止痙, 淸熱平肝, 平喘, 利尿의 효능이 있으며 용혈, 진정작용이 있다[32~35]. 이상으로 보아 補陽還五湯은 補氣升揚, 活血祛瘀, 通陽脉絡하는 처방임을 알 수 있다. 이에 저자는 補陽還五湯에 祛痰開竅 安神益智하는 遠志, 石菖蒲[36]를 가하고 黃芪를 80g으로 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 본 실험을 시행하였다.

현재 약물의 제형에 있어서는 탕제와 열수추출물 제제를 주로 이용하고 있는데, 한 설문결과에서 탕제는 약을 달이는 것과 휴대하기 불편하다는 점, 탕제의 냄새, 맛이 불쾌할 수 있다는 점이 단점이고 열수추출물 제제는 약효가 떨어지거나 효과가 느릴 것 같다는 선입견과 복용 시에 물이 필요하다는 점이 단점으로 지적되고 있다[11]. 잘 녹지 않는 약물의 생물학적 유용성을 개선시키기 위하여 약물을 분자크기로 축소하는 것이 전반적인 접근이다. 약물의 축소된 입자크기는 표면영역의 증가를 가져오고 이에 따라 불용성의 비율이 감소되고 불용성이던 약물이 더욱 잘 흡수되게 된다[37]. 초미세분말제형의 우수성은 여러 연구를 통해 입증되고 있으며[12,38] 한약의 초미세분말제형의 효과에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[13,14].

이에 저자는 加味補陽還五湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 加味補陽還五湯의 열수추출물을 시료로 mLFC에서 세포독성을 관찰하고, LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 관찰하였다. 또한 加味補陽還五湯 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 加味補陽還五湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 加味補陽還五湯 1, 10, 50, 100, 200㎍/㎖ 실험군에서 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타나 본 연구에서는 50, 100㎍/㎖의 농도로 실험에 임하였다.

BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 加味補陽還五湯의 열수추출물을 투여한 후, IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA발현이 억제되었다.

이상의 결과로 加味補陽還五湯은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있다.

치매의 주증상인 기억력 저하와 관련된 실험인 Morris water maze 과제는 동물의 공간

학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로[39], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 加味補陽還五湯 열수추출물 및 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 step-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, 두 실험 모두에서 加味補陽還五湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의한 시간의 단축을 보였다(Fig. 1, 2). 이는 加味補陽還五湯 이 AD 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 IL-1β의 발현은 加味補陽還五湯 열수추출물 실험군에서 유의성 있게 억제되었다. TNF-α의 발현은 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두 유의성 있게 억제되었고 초미세분말 실험군에 비해 열수추출물 실험군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3, 4).

βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성도는 tacrine을 투여한 양성대조군, 加味補陽還五湯 열수추출물 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이로써 加味補陽還五湯이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키는 효과가 있으리라 판단된다(Fig. 5).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 加味補陽還五湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 대조군에 비하여 허혈의 크기가 유의성 있게 감소하였고 초미세분말 실험군보다 열수추출물 실험군에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 6, 7).

이상의 내용을 총괄해 보면 加味補陽還五湯은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하였고, βA로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈다. 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 억제하였으며, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상을 개선한 것으로 나타났다.

加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency에서 기억력 감퇴개선효과, 뇌조직의 허혈상태 개선효과에 있어 모두 효과가 있었고 제형에 따른 유의한 차이는 없었으며, microglial cell에서 TNF-α의 발현 측정에서 효과를 보였고 加味補陽還五湯 열수추출물의 효과가 상대적으로 더 유의하였다. Distance-through latency에서의 기억력 감퇴효과와 microglial cell에서 IL-1β의 발현, 혈청 중 AChE 활성도 억제 효과 측정에서는 加味補陽還五湯 열수추출물만이 유의한 효과를 나타냈다.

따라서 加味補陽還五湯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, 처방구성으로 볼 때 특히 氣虛, 血瘀型 痴呆에 응용할 수 있을

것으로 보며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

加味補陽還五湯이 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味補陽還五湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하였다.

2. 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 step-through latency 측정과 distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

3. 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말은 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

4. 加味補陽還五湯 열수추출물은 βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 혈청내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다.

5. 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 加味補陽還五湯 열수추출물과 초미세분말은 Alzheimer's disease의 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각되며 향후 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Oleg Butosky et al. Glatiramer acetate fight against Alzheimer's disease by inducing dendriticlike microglia expressing insulin-like growthfactor 1. Proc Acad Sci USA. 2006;103(31):11784-9.
2. 黃大東 外. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378-81.
3. 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.
4. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
5. 陳士鐸. 石室秘錄(下). 서울:書苑堂. 1984:316-7.
6. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
7. 朱震亨. 金匱鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:727.
8. 王淸任. 醫林改錯. 서울:일중사. 1992:85-6.
9. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37, 124, 196, 217-8, 229.
10. 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.
11. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356-67.
12. 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.
13. 김현수, 이상룡, 정인철. 세심탕(洗心湯) 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생

리병리학회지. 2007;21(3):688-99.
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. 전국한의과대학 신경정신과 교과서 편찬위원회 편. 한의신경정신과학. 서울:집문당. 2007:767.
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. 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.
19. Ramazan Ozcankaya. Namik Delibas. 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.
20. Paula I Moreira et al.. Compensatory reponses induced by oxidative stress in Alzheimer Disease. Biological research. 2006;39(1):7-13.
21. 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.
22. Mouser PE, Head E, Ha KH, Rohn TT. Caspase-mediated cleavage of glial fibrillary acidic protein within degenerating astrocytes of the Alzheimer's disease brain. An american journal of pathology. 2006;168(3):936-46.
23. William K. summers. Tacrine(THA. tacrine). Journal of alzheimer. 2000;2(2)85-93.
24. 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.
25. 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.
26. William K. Summers. Tacrine. and Alzheimer's treatments. Journal of Alzheimer's Disease. 2006;9(3):439-45.
27. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
28. Kim YS, Joh TH. 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.
29. Simmons ML,Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
30. Ramos EM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. Achives of neurology. 2006;63(8):1165-9.
31. Oprica M. Studies on brain volume. Alzheimer-related proteins and cytokines in mice with chronic overexpression of IL-1 receptor antagonist. J Cell Mol Med. 2007;11(4):810-25.
32. 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.
33. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1988:9-12, 80-4, 448-50, 521-2, 554-6, 562-4, 600-3.
34. 鄭普燮. 辛民敎. 圖解 鄕藥大事典. 서울:永林社. 1990:407-8, 418-9, 523-4, 632, 662-4, 1034-5.
35. 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.
36. 신봉교. 本草維新. 서울:경원출판사. 1979:133, 135.
37. Moschwitzer J, Muller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. J Nanosci Nanotechnol. 2006:6(9-10):3145-53.
38. 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.
39. 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.