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

加減腎氣丸 제형변화가 염증반응 사이토카인과 기억력감퇴에 미치는 영향

임현주, 정인철
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of kagamSinKiHwan(KSKH) Hot water extract & ultra-fine Powder on Proinflammatory cytokine of Microglia & Memory Deficit of Amnesia Mice Model

Hyeon-Ju Yim, In-Chul Jung
Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon Universithiy

Abstract

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

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

The effects of the KSKH hot water extract & ultra-fine-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 KSKH hot water extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in BV2 microglial cell line treated by LPS.
2. The KSKH hot water extract suppressed the production of IL-1β, IL-6, TNF-α in 100㎍/㎖ concentration of BV2 microglial cell line culture supernatant.
3. The KSKH hot water extract & ultra-fine powder decreased AChE activation significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine.
4. The KSKH hot water extract & ultra-fine powder showed significant effect on memory impairment in the stop-through latency type of Morris water maze test.

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

Key Words : Alzheimer's disease, Amnesia, Microglia, KagamSinKiHwan(KSKH), Hot water extract & ultra-fine powder.

투고일 : 10/9 수정일 : 11/5 채택일 : 11/9
* 교신저자 : 정인철 주소 : 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
전화 : 043-229-3726 E-mail : npjeong@dju.kr

Ⅰ. 緖 論

치매란 인간이 가진 여러 가지 인지기능인 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간능력과 판단력을 포함한 전두엽 집행기능 등의 장애가 발생하여 일상생활이나 사회생활을 하는데 어려움을 초래하는 상태를 말한다[1]. 치매의 임상유형으로는 Alzheimer형 치매가 50% 정도로 가장 많고 혈관성 치매가 20%정도를 차지하고 15~20%는 이 둘을 함께 가지고 있는 혼합형 치매이다[2].

Alzheimer's disease(AD)는 미만성 신경세포 소실, 과인산화된 타우 단백으로 이루어진 신경섬유 다발 또는 신경섬유농축제의 세포내 축적, 퇴행위축 신경돌기로 둘러싸인 amyloid β protein(Aβ)의 세포외 축적 등의 중요한 구조적 변화가 동반되는데[1], IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine의 과잉[3], acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase(AChE)의 증가[4], oxidants(free radicals)[5], amyloid β protein(Aβ)[6] 등이 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.

韓醫學的으로 痴呆는 '痴獃[7]', '呆病[8,9]', '健忘[10,11]' 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 있다. 痴呆의 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이며, 치법은 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다[12].

腎氣丸은 ≪東醫寶鑑·雜病篇≫[13]에 기술된 후 임상에서 腎水不足으로 인한 諸證에 응용되고 있는데, 본 실험의 加減腎氣丸은 ≪東醫寶鑑·內景篇≫[13]의 原方에서 澤瀉를 去하고 白茯神, 益智仁을 加味한 처방으로 老人治病 중 滋補肝腎에 부합되는 처방으로 肝腎陰虛로 인한 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 湯劑이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데[14], 특히 초미세 분말은 약재를 수십㎛로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구[15] 결과로 볼 때, 한약에서도 초미세 분말 제형에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이에 저자는 加減腎氣丸의 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 microglia의 proinflammatory cytokine 발현 및 기억력 감퇴 생쥐모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향을 비교 검토하고자 加減腎氣丸 열수추출물을 시료로 BV2 microglial cell line에서 세포생존율 및 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현과 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 관찰하였고, 加減腎氣丸 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 변화와 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정하여 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

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), Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA), 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.

3) **약물**

본 실험에 사용한 加減腎氣丸(KagamSinKiHwan, KSKH)의 처방구성은 《東醫寶鑑》[13]을 기준으로 하여 腎氣丸에서 澤瀉를 去하고, 白茯神과 益智仁을 加한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of KagamSinKiHwan (KSKH)

韓藥名	生 藥 名	KSKH 用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	16
山 藥	Dioscoreae Rhizoma	8
山茱萸	Corni Fructus	8
白茯苓	Poria	8
牧丹皮	Moutan Cortex	8
五味子	Schizandrae Fructus	8
白茯神	Hoelen	4
益智仁	Alpiniae Oxyphyllae Fructus	4
	Total amount	64.5

4) 검액의 조제 및 투여

(1) 加減腎氣丸 열수추출물 분리 및 검액의 조제

加減腎氣丸 1첩 분량(64.5g)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 加減腎氣丸 열수추출물 18.1g을 얻었으며, 얻어진 열수추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 加減腎氣丸 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말은 (주)만수제약에서 제작·협조하였으며, 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 白茯苓, 牧丹皮, 五味子, 白茯神, 益智仁 적당량을 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) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 입도분석은 GMP 인증업체인 한국콜마(주)에서 실시·협조하였다. 이와 같이 얻은 加減腎氣丸 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 915㎎/㎏의 농도로 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.

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

(2) 세포독성 측정

세포독성측정방법은 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 加減腎氣丸 열수추출물(최종 농도 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24wells plate)에 lipopolysaccharide(LPS)(0.1㎍/㎖), 加減腎氣丸 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하고 72시간 동안 동시 배양하였다. 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 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(1×10^5 cells/24wells plate)에 LPS(0.1㎍/㎖), 聰明湯과 加減腎氣丸 열수추출물(100㎍/㎖)을 처리하여, 6시간과 72시간 동안 동시 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

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

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 加減腎氣丸 열수추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)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 측정

하였다.

y=x(1+e)n

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

사용된 primers는 다음과 같다.

ⓐ mouse G3PDH

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

ⓑ mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

ⓒ mouse IL-6

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

ⓓ mouse TNF-α

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

3) 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 우태아 혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight시켰다. 加減腎氣丸(100㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 加減腎氣丸(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.

4) 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, 加減腎氣丸 열수추출물(400㎎/㎏, *p.o*) 실험군과 초미세분말(400㎎/㎏, *p.o*) 실험군으로 나누고, 4주간 상기 약물을 투여하였다. 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.

5) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 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, 加減腎氣丸 열수추출물(400㎎/㎏ *p.o*) 실험군 그리고 加減腎氣丸 초미세분말(400㎎/㎏ *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)으로 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. 加味腎氣丸에 대한 세포독성

加減腎氣丸의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖ 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 78.4±1.7, 85.4±1.1, 90.6±0.8, 95.6±0.4, 97.8±0.8(%)로 대조군에 비하여 감소하였고, 100㎍/㎖이하에서는 80% 이상의 생존율을 나타냈다.

2. BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 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 0.045(RQ)로 나타났으며, 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군은 각각 0.451(RQ), 0.515(RQ), 0.776(RQ)로 나타났다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.215(RQ), 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군은 각각 0.406(RQ), 0.687(RQ), 0.905(RQ)로 나타났다.

3) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

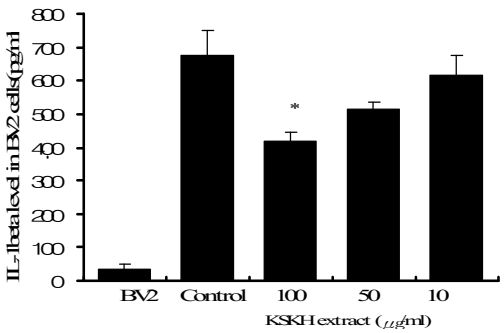
BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 정상군이 0.415(RQ), 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖의 실험군은 각각 0.486(RQ), 0.711(RQ), 0.896(RQ)으로 나타났다.

3. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군이 37.0±12.0pg/㎖, 대조군이 675±72.5pg/㎖이고, 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서는 각각 417±28.0, 516±18.5, 616±60.0pg/㎖으로 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소를 나타내었고, 100㎍/㎖ 처리군에서 유의한 차이를 보였다(Fig. 1).

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

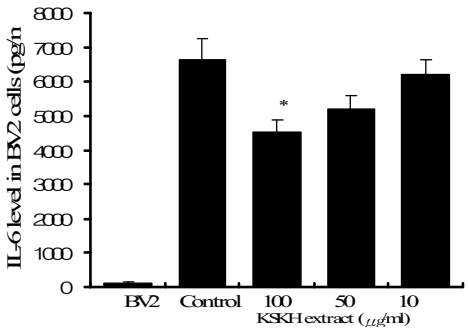


BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of KSKH hot water extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of LPS(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and IL-1β concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay 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).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 134±22.0pg/㎖, 대조군이 6628±614.6pg/㎖으로 나타났으며, 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서는 각각 4514±350.1, 5172±408.1, 6205±440.6 pg/㎖으로 나타나 실험군은 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소를 나타내었고, 100㎍/㎖ 처리군은 유의성을 보였다(Fig. 2).

Fig. 2. Inhibitory effect of KSKH hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.



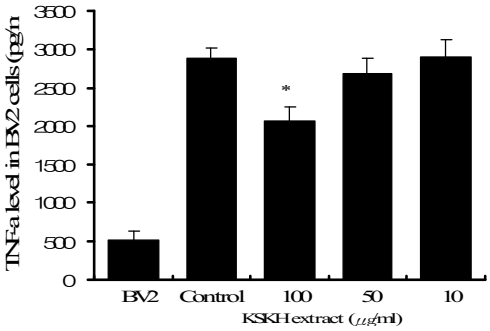
BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of KSKH hot water extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of LPS(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and IL-6 concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay 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 배양상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군이 515±109.5pg/㎖, 대조군이 2888±133.0pg/㎖으로 나타났으며, 加減腎氣丸 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖ 실험군에서는 각각 2058±193.5, 2688±198.5, 2900±225.5 pg/㎖으로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소를 나타내었고, 100㎍/㎖ 처리군에서

유의성을 보였다(Fig. 3).

Fig. 3. Inhibitory effect of KSKH hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.

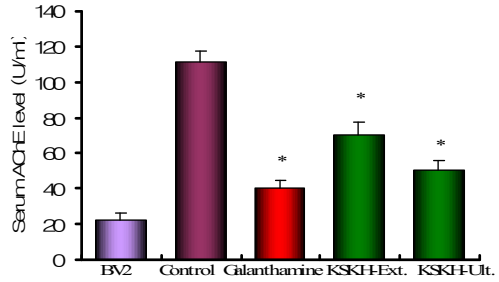


BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of KSKH hot water extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of LPS(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and TNF-α concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay 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).

4. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 AChE 활성도에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 22.8±3.4(U/㎖), 대조군은 111.1±6.3(U/㎖), galanthamine 투여군은 40.0±5.1(U/㎖), 加減腎氣丸 열수추출물, 초미세분말 실험군은 70.5±6.7(U/㎖)과 50.2±5.7(U/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 galanthamine 투여군, 실험군 모두 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

Fig. 4. Effects of KSKH on serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice.



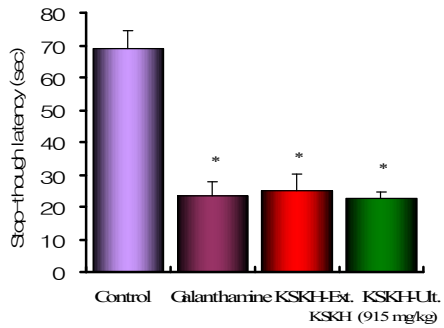
BV2 : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
KSKH-Ext. : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and KSKH hot water extract(400㎎/㎏ p.o).
KSKH-Ult. : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and KSKH ultra-fine powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of KSKH orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) 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 기억력 감퇴 생쥐 모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과 대조군이 68.9±5.7(sec), galanthamine 투여군은 23.6±4.1(sec.), 加減腎氣丸의 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 25.0±5.1(sec.)과 22.8±1.9(sec)로 나타나 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의한 시간 단축을 보였다(Fig. 5).

Fig. 5. Effects of KSKH on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test.



Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).

Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
KSKH-Ext. : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and KSKH hot water extract(400㎎/㎏ p.o).
KSKH-Ult. : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and KSKH ultra-fine powder(400㎎/㎏ p.o).
ICR mice were administered of KSKH orally or injected galanthamine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity.
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 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement latency를 관찰한 결과 대조군이 1278.3±164.4(cm), galanthamine 투여군은 545.0±108.9(cm)이었고, 加減腎氣丸의 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 625.3±134.7(cm)과 604.4±46.3(cm)로 나타나 대조군에 비하여 거리가 단축되었으나 유의성이 없었다.

Ⅳ. 考 察

치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이나 질병 등에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지 기능과 고등 정신 기능이 감퇴하는 복합적인 임상증후군으로[1,17], 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타낸다[2].

현재까지 치매를 일으키는 원인은 70여 가지 이상으로 알려져 있는데, 이들 중 가장 대표적인 것은 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)과 혈관성 치매(Vascular dementia, VD)로, 전체 치매의 약 70~80%를 차지하고 있으며[1], Alzheimer형 치매가 50% 정도로 가장 많다[18].

AD는 병리학적으로 뇌조직이 위축되고 아밀로이드반과 신경섬유매듭이 축적된다[1]. 증상은 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[2].

AD의 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 분자 병리 기전을 설명하기 위해 몇 가지 주요 가설이 제시되고 있는데, 콜린성 가설과 아밀로이드 가설이 중심을 이루고 있다[1]. 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 뇌혈관 장벽을 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[19].

또한 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고[20], 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[21].

콜린계의 기능을 강화시키는 방법들에는 무스카린(M1) 콜린수용체 작용제, micotine 수용체 작용제, acetylcholine 전구물질의 투여 등 여러 가지가 있으나 현재까지는 donepezil, rivastigmin, galanthamine 같은 cholinesterase inhibitor 들이 가장 좋은 효과를 나타내고 있는데[1], 이 중 galanthamine은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 학습과 단기기억력을 개선시킨다는 연구 결과가 있다[22].

韓醫學的으로 痴呆는 '呆病[8,9]', '健忘[10,11]'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 하여 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있다.

痴呆의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다. 원인은 주로 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다[15~16,23~26].

腎氣丸은 ≪東醫寶鑑・雜病篇≫[13]에 "治虛勞腎損, 六味地黃元一劑加五味子四兩, 乃滋肺之源, 以生腎水也水. 泛爲痰之聖藥, 血虛發熱之神劑, 又能補肝. 盖腎・肝之病, 同一治故也." 라 하여 기술되어 있다. 六味地黃元은 滋陰補腎하는 熟地黃과 健脾固精하는 山藥과 溫補肝腎하는 山茱萸로 三補하고, 淸瀉肝火하는 牧丹皮와 滲濕利水하는 白茯苓, 澤瀉로 三瀉하는 효능이 있어 相和相濟하는 처방이다[27]. 五味子는 溫酸甘하여 上으로 肺氣를 斂하고, 下로 腎陰을 滋하여 肺腎兩虛로 精氣가 耗損한 證에 응용한다[28]. 본 실험의 加減腎氣丸은 ≪東醫寶鑑・內景篇≫[13]의 "小便頻數者, 腎氣丸, 去澤瀉, 加茯神 益智."에서 근거한다. 澤瀉는 甘寒하여 利水滲濕, 泄熱의 효능이 있으나 腎經의 火를 瀉火하여 오직 그 효능이 瀉에만 있어 和平한 藥性을 위해 去한 것으로 볼 수 있고, 加味된 白茯神은 心脾 二經에 들어가 寧心, 安神利水의 효능이 있어 心虛로 인한 驚悸健忘과 不眠驚癎을 치료하며 開心益智하여 精神을 養하는데 응용하며, 益智仁은 溫辛하여 脾腎經에 들어가 脾胃를 온난케 하여 和中하고 腎陽을 暖하게 하고 固澁固氣의 효능이 있어 腎虛로 인한 遺精, 遺尿, 夜尿, 虛弱 등에 응용한다[28]. 또한 補肝腎陰 補腎陽 의 효과를 가진 지황탕 계열 약물의 항산화와 관련된 연구[29,30] 등에서도 그 근거를 찾을 수 있다. 위의 문헌들을 미루어 보면 加減腎氣丸은 老人治病 중 滋補肝腎하는 처방으로 肝腎陰虛로 인한 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

이에 著者는 加減腎氣丸의 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 microglia의 proinflammatory cytokine 발현 및 건망증 생쥐모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 加減腎氣丸 열수추출물을 시료로 mLFC에서 세포독성을, BV2 microglial cell line에서 세포생존율을 관찰하였고, BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 관찰하였으며, 또한 加減腎氣丸 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 uric acid, AChE의 변화를 관찰하였고, Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정, 관찰하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC에서 加減腎氣丸의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율에 있어서 대조군에 비해 200㎍/㎖ 이하의 실험군은 큰 변화가 없었다. 또한 LPS로 처리한 BV2 microglial cell의 생존율을 측정한 결과, 加減腎氣丸 실험군은 100㎍/㎖와 50㎍/㎖ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

이러한 결과로 加減腎氣丸 열수추출물은 100㎍/㎖ 이하의 농도에서 정상세포에 대한 세포독성을 나타내지 않으며, AD 병태에서 나타나는 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다고 판단된다. 100㎍/㎖ 이하의 농도로 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 BV2 microglial cell line에서 생존율이 80% 이상이 됨을 나타내는 것이므로, 이후 실험실에서는 100㎍/㎖ 이하의 加減腎氣丸의 실험군을 사용하였다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌손상, 외부로부터 이물질 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형된다[31]. 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS는 microglial cell을 활성화시키는 가장 효과적인 물질로 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시킨다[32]. 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[33].

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[25]. IL-6 또한 염증유발 cytokine으로 AD의 병리기전 중 amyloid 침착과 노인반(senile plaque)형성에 관여한다[34].

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. 최근 이들 anti-inflammatory cytokine이 AD의 병리기전을 저해한다는 연구가 보고되고 있다[35].

BV2 세포주는 생쥐의 미세아교세포로 LPS의 자극으로 활성화된 microglial 세포의 모델로 사용할 수 있고[34~37], 본 실험에서는 BV2를 LPS로 처리한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 관찰함으로써 加減腎氣丸이 microglial cell의 proinflammatory cytokine 발현에 미치는 억제효과를 측정한 결과 대조군에 비해 100㎍/㎖를 투여한 실험군에서 IL-1β, IL-6의 mRNA의 발현이 억제되었다.

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 100㎍/㎖를 투여한 실험군에서 생산량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1~3).

이는 加減腎氣丸이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 억제한 것으로, 加減腎氣丸의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokines으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

加減腎氣丸이 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 중 AChE에 미치는 효과를 분석한 결과, 대조군에 비하여 galanthamine 투여군과 加減腎氣丸 열수추출물, 초미세분말 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4). 이로써 加減腎氣丸 투여로 AChE의 활성을 억제함으로써 AChE의

과다로 인한 acetylcholine의 작용 저하를 개선하여 기억력감퇴에 대한 치료효과가 있을 것으로 보인다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, distance movement-through latency에서는 galanthamine 투여군, 加減腎氣丸 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두 거리의 단축은 있었으나 통계학적 유의성은 없었고, Stop-through latency는 대조군에 비해 galanthamine 투여군, 加減腎氣丸 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 모두 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 5). 이것으로 加減腎氣丸 투여 후 기억력감퇴가 억제될 가능성이 있음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 加減腎氣丸는 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 proinflammatory cytokine의 발현을 억제하였고, scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청내 AChE를 증가시켰으며 Morris water maze 실험 중 stop-through latency에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 운동시간을 단축시켰다. 한편 加減腎氣丸 열수추출물과 초미세분말 실험군간 효과의 차이는 뚜렷하지 않았다.

이러한 결과를 종합해 봤을 때 加減腎氣丸는 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현과 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 새로운 제형의 개발 및 치매의 치료에 적용할 수 있는 임상적 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

加減腎氣丸의 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 모델에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減腎氣丸 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA의 발현을 억제하였다.
2. 加減腎氣丸 열수추출물은 100㎍/㎖농도에서 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 加減腎氣丸 열수추출물과 초미세분말 모두 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 AChE 활성을 유의성 있게 억제시켰고 제형에 따른 차이는 없었다.
4. 加減腎氣丸 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 distance movement-through latency에서 거리의 단축을 보였으나 유의성은 없었고, stop-through latency 측정에서는 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 加減腎氣丸의 열수추출물과 초미세분말은 건망증 및 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전과 치매에 대한 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 대한치매학회. 치매 임상적 접근. 서울:아카데미아. 2006:201, 23-4, 233-6.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2004:189-200, 611-2.
3. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
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):147-57.
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. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社.1991:125.
10. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37, 124, 196, 229, 217-8, 229.
11. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306-7.
12. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기도:집문당. 2007:324-33.
13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:140. 1183.
14. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356-67.
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. 홍은경. 치매의 신경병리학. 한양의대학술지. 2001;21(1):1-9.
18. 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;64:749-60.
19. 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):3440-7.

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. Spassov A, Getova DP, Dimitrova DS. P4.025 Study of ancholinesterase drugs galanthamine and donepezil on scopolamine-induced amnesia in rats. European Neuropsychopharmacology. 2004;14:333.
23. 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. 박사학위논문. 2006;17(1):37-58.
24. Simmons ML. Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
25. Tuppo E, Arias H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 37(2):289-305. 2005.
26. Zhiming Suo, Jun Tan, Andon Placzek, Fiona Crawford, Chunhong Fang and Michael Mullan. Alzheimer's β-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40. Brain Research. 1998;807(1-2):110-7.
27. 裵鐘局. 六味地黃湯이 난소를 절제한 白鼠의 성호르몬에 미치는 영향. 서울. 경산대학교 대학원. 1995.
28. 강병수, 고운채, 김규열 등. 본초학. 서울: 도서출판 영림사. 2000:302-3, 305-6, 561-2, 622-4.
29. 김보경, 이상룡. 蔘茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 영향. 동의신경정신과 학회지. 1998;9(1):59-71.
30. 윤철호, 정지천, 박선동. 左歸飮과 右歸飮이 老化 Rat의 腦 過酸化 脂質生成 및 活性酸素 生成系 酵素活性에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1995;16(2):349-64.
31. Lee SC, Liu W, Dickson DW et al.. Cytokine production by human fetal microglia and astrocyte. Journal of Immunology. 1998;150:2659.
32. Nick J et al.. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. Journal of Immunology. 1996;156:4457.
33. 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.
34. 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.

35. Yen GC , Lai HH et al.. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Uraria crinita root. Food Chemistry. 2001;74:471-8.
36. Pasinatti GM, Alsen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. Neuroscience. 1998;87(2):319-24.
37. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia ; electroencephalogram findings and cognitive performance. European Journal of Clinical Investigation. 1998;28(11):944-949.