동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 1, 2009

還少丹이 microglia 염증반응 cytokine과 건망증 생쥐모델에 미치는 영향

윤종천, 이상룡, 정인철
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of *Hwanso-dan(Huanshaodan)* Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on Cytokine and Memory Deficit Model

Jong-Cheon Yoon, Sang-Ryong Lee, In-Chul Jung
Dept. of Oriental Neuropsychiatry
College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

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

Methods :
The effects of the *Hwanso-dan* 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 were investigated.
The effects of the *Hwanso-dan* hot water extract & ultra-fine powder on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine and uric acid & AChE in serum of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :
1. The *Hwanso-dan* hot water extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide.
2. The *Hwanso-dan* hot water extract suppressed the production of IL-1β, IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line.
3. The *Hwanso-dan* hot water extract & ultra-fine powder decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine.

투고일 : 2/6 수정일 : 3/4 채택일 : 3/7
교신저자 : 정인철, 대전광역시 서구 둔산 2동 1136번지 대전대학교 둔산한방병원
Tel : 042-470-9000, E-mail : npjeong@hanmail.net

4. The *Hwanso-dan* 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 *Hwanso-dan* hot water extract & ultra-fine powder might be effective for the prevention and treatment of Memory deficit disease. Investigation into the clinical use of the *Hwanso-dan* hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words :
Memory deficit, Alzheimer's disease, *Hwanso-dan(Huanshaodan)*, Hot water extract, Ultra-fine powder

I. 서 론

치매란 정상적으로 성숙한 뇌가 손상되어 인지기능과 고도정신기능이 감퇴하는 증후군으로 주로 노년기에 많이 생기며 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되는 질환으로 알츠하이머병(Alzheimer's disease ; AD)에 의한 치매와 혈관성 치매가 대부분을 차지한다[1-3].

AD는 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실을 초래함으로 인해 나타나며[4], 뇌 내 microglia와 astrocyte에서 분비되는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine[5], acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase (AChE)의 증가[6], oxidants(free radicals)[7], amyloid β protein(Aβ)[8] 등이 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

한의학에서 痴呆는 '痴獃[9]', '呆病[10]', '健忘[11]' 등의 범주에 속하며, 痴呆의 원인은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷 등으로, 治法은 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[1].

還少丹은 『洪氏集驗方』[12]에 처음 수록된 것으로 溫補脾腎, 養心安神의 효능을 가지며 『實用中醫腦病學』[13]에서는 精氣兩虛로 인한 痴呆의 증상인 "年老表情呆滯 行動遲緩 記憶力減退 …" 에 사용되었으며 中國에서는 노년성 황반변성에 관한 임상사례[14]가 보고되고 있다.

한편 최근 서 등[15]은 還少丹이 흰쥐 뇌조직에 대해 항산화작용을 나타냈다는 실험적 연구결과를 발표한 바 있어 건망증 및 치매에 활용해 볼 수 있다고 판단된다.

이에 저자는 還少丹의 microglia 염증반응 cytokine과 건망증 생쥐모델 기억력감퇴 억제 효과를 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교 검토하고자 mLFC(mouse lung fibroblast cells)에서 세포독성을, BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)에서 세포생존율을 관찰하였고, BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현과

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 관찰하였다.

또한 還少丹 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 uric acid와 AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

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 24 g의 10주령 암컷 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 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 還少丹의 처방구성은 『醫方集解』[16]을 기준으로 한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선

하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table.I. Priscription of *Hwanso-dan(Huanshaodan)*

Herb name	Pharmaceutical Name	Dose(g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	4
山 藥	*Dioscoreae Rhizoma*	2
牛 膝	*Radix Achyranthis*	2
枸杞子	*Fructus Lycii*	2
山茱萸	*Corni Fructus*	2
茯 苓	*Poria*	2
杜 冲	*Cortex Eucommiae*	2
遠 志	*Radix Polygalae*	2
五味子	*Schizandrae Fructus*	2
楮 實	*Fructus Broussonetiae*	2
小茴香	*Fructus Foeniculi*	2
巴戟天	*Radix Morindae*	2
肉蓯蓉	*Caulis Cistanchis*	2
石菖蒲	*Rhizoma Acori Graminei*	1
大 棗	*Fructus Zizyphi jujubae*	2
	Total amount	31

4) 검액의 조제 및 투여

(1) 還少丹 열수추출물 분리 및 검액의 조제

還少丹 1첩 분량(31 g)에 증류수 1,300 ml 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 還少丹 열수추출물 11.6 g을 얻었으며, 얻어진 열수추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 還少丹 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말은 (주)만수제약에서 제작·협조하였으며, 熟地黃, 山藥, 牛膝, 枸杞子, 山茱萸, 茯苓, 杜冲, 遠志, 五味子, 楮實, 小茴香, 巴戟天, 肉蓯蓉, 石菖蒲, 大棗 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) 5,000-7,500 rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 입도분석은 GMP 인증업체인 한국콜마(주)에서 실시·협조하였다. 이와 같이 얻은 還少丹 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 580 mg/Kg의 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 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapoilis, IN, USA), DNase type Ⅰ(0.15 mg/ml, Sigma, USA), antibiotics(penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 mg/ml)}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 1,500 rpm에서 원심분리하고 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/ml 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[17]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 還少丹 열수추출물(최종 농도 200 ㎍/ml, 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 1 ㎍/ml)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24 wells plate)에 lipopolysaccharide(LPS)(0.1 ㎍/ml), 還少丹 열수추출물(100 ㎍/ml)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 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. BV2 microglial cell line의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24 wells plate)에 LPS(0.1 ㎍/ml), 還少丹 열수추출물(100 ㎍/ml)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 還少丹 열수추출물(100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1 ㎍/ml를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol[B] 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I(10 U/㎕) 2 U/tube와 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎕ 100mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가하고, 다시 1 ㎕의 M-MLV RT(200 U/㎕)를 가한 다음 DEPC 처

리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 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 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min 50℃, 10 min 94℃, 그리고 40 cycles는 0.15 min 95℃, 1 min 60℃에서 수행하였다. 각 군의 quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

y=x(1+e)n

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

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/ml) 하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아 혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight시켰다. 還少丹(100 ㎍/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 ㎍/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 還少丹(100 ㎍/ml)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 450 nm에서 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 mg/Kg, *i.p*) 투여군, 還少丹 열수추출물(400 mg/Kg, *p.o*) 실험군과 초미세 분말(400 mg/Kg, *p.o*) 실험군으로 나누고, 4주간 상기 약물을 투여하였다. 투여 22일째부터 scopolamine(1 mg/Kg)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 ml와 serum 0.2 ml를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에 3.0 ml water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2 ml, acetylcholine chloride solution 0.2 ml을 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 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 Cm이고 높이가 약 30 Cm인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10Cm인 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 mg/Kg, *i.p*) 투여군, 還少丹 열수추출물(400 mg/Kg *p.o*) 실험군 그리고 還少丹 초미세분말(400 mg/Kg *p.o*) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1 mg/Kg)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. 성 적

1. 還少丹에 대한 세포독성

還少丹의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 1 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml, 200 ㎍/ml 실험군이 각각 99.8±1.4(%), 94.9±1.5(%), 93.0±0.8(%), 88.0±1.2(%) 81.4±2.7(%) 로 모든 실험군에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

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, 정상군 0.045(RQ), 還少丹 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군은 각각 0.274(RQ), 0.548(RQ), 0.997(RQ)로 나타났다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군 0.215(RQ), 還少丹 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군은 각각 0.457(RQ), 0.689(RQ), 0.874(RQ)로 나타났다

3) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 정상군 0.415(RQ), 還少丹 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군은 각각 0.562(RQ), 0.748(RQ), 0.938(RQ)로 나타났다.

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

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군은 37.0±12.0 pg/ml, 대조군은 675±72.5 pg/ml이었고, 還少丹 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군에서 각각 459±6.5 pg/ml, 549±137.5 pg/ml, 625±66.0 pg/ml로 대조군에 비해 감소하였으며 100 ㎍/ml 실험군에서 유의성 있게 나타났다(Fig. 1).

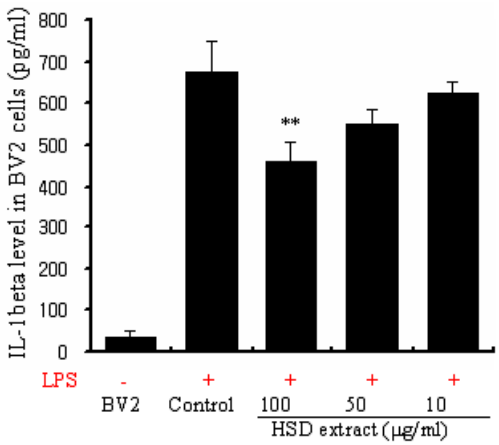


Fig. 1. Inhibitory effect of HSD hot water extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of HSD hot water extract(100 ㎍/ml) in the presence or absence of LPS(0.1 ㎍/ml) 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.

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-6 생성량은 정상군은 134±22.0 pg/ml, 대조군은 6628±614.6 pg/ml이었고, 還少丹 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군에서 각각 4386±563.6 pg/ml, 5079±184.0 pg/ml, 6424±299.5 pg/ml로 나타나 100 ㎍/ml 실험군에서 유의성 있게 낮았다(Fig. 2).

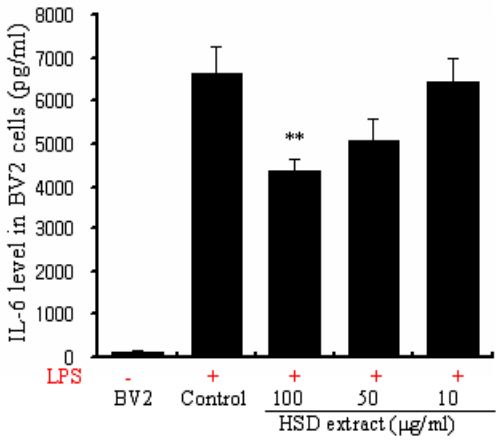


Fig. 2. Inhibitory effect of HSD hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of HSD hot water extract(100 ㎍/ml) in the presence or absence of LPS(0.1 ㎍/ml) 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±109.5 pg/ml, 대조군은 2888±133.0 pg/ml이었고, 還少丹

100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml 실험군에서 각각 2063±60.0 pg/ml, 2320±392.1 pg/ml, 2706±58.5 pg/ml로 대조군에 비해 100 ㎍/ml 50 ㎍/ml 실험군에서 유의성 있게 나타났다 (Fig. 3).

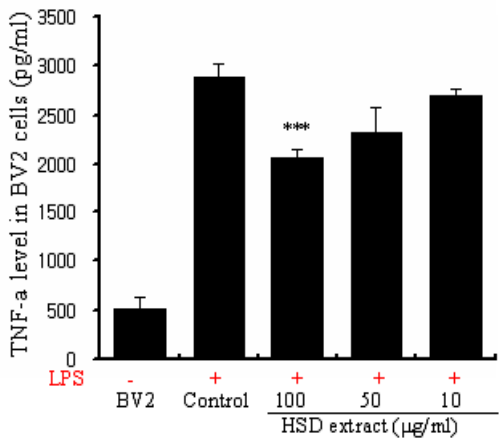


Fig. 3. Inhibitory effect of HSD hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentration of HSD hot water extract(100 ㎍/ml) in the presence or absence of LPS(0.1 ㎍/ml) 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.

4. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청에 미치는 영향

1) Uric acid에 미치는 영향

혈청 내 uric acid는 정상군이 2.9±0.4 mg/dl, 대조군이 8.3±0.3 mg/dl, galanthamine 투여군이 2.8±0.2 mg/dl, 還少丹 열수추출물 실험군이 4.1±0.7 mg/dl 그리고 초미세분말 실험군이 4.8±0.3 mg/dl로 나타나 대조군에 비해 galanthamine 투여군, 還少丹 열수추출물 및 초미세분말 실험군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

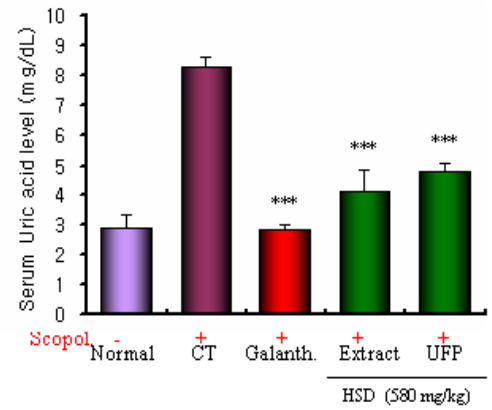


Fig. 4. Effects of HSD on the serum uric acid level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and galanthamine(3 mg/Kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD hot water extract(580 mg/Kg p.o).
UFP(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD ultra-fine powder(580 mg/Kg p.o).
After ICR mice were administered of HSD orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/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).

2) AChE에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 22.8±3.4 U/ml, 대조군이 111.1±6.3 U/ml, galanthamine 투여군이 40.0±5.1 U/ml, 還少丹 열수추출물 실험군이 59.6±7.5 U/ml, 그리고 초미세분말 실험군이 58.9±6.2 U/ml로 나타나 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

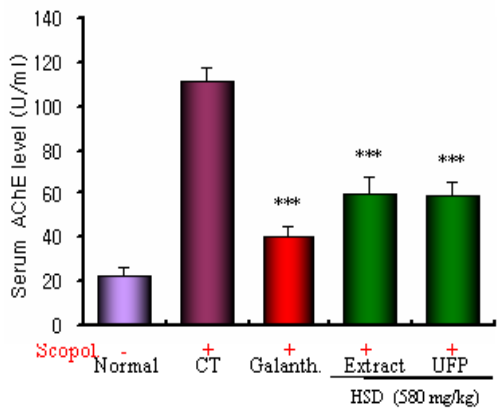


Fig. 5. Effects of HSD on the serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and galanthamine(3 mg/Kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD hot water extract(580 mg/Kg p.o).
UFP(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD ultra-fine powder(580 mg/Kg p.o).
After ICR mice were administered of HSD orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/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).

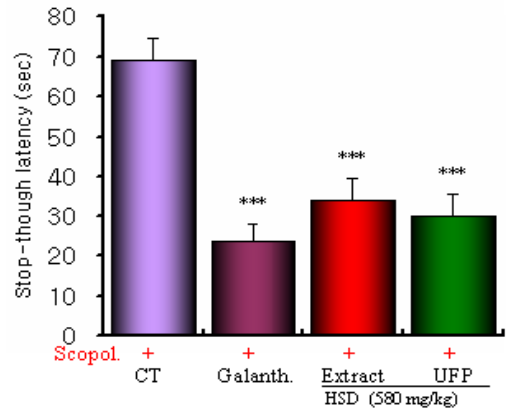


Fig. 6. Effects of HSD on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test.

Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1mg/Kg i.p) and galanthamine(3 mg/Kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD hot water extract(580 mg/Kg p.o).
UFP(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSDultra-fine powder(580 mg/Kg p.o).
After ICR mice were administered of HSD orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/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).

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 투여군이 23.6±4.1 sec, 還少丹 열수추출물 실험군이 33.7±5.4 sec, 그리고 초미세분말 실험군은 29.8±5.6 sec로 나타나 대조군에 비해 galanthamine 투여군과 모든 실험군에서 유의하게 단축되었으며, 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과 대조군이 1278.3±164.4 Cm이었고, galanthamine 투여군이 545±108.9 Cm, 還少丹 열수추출물 실험군이 788.8±153.3 Cm 그리고 초미세분말 실험군이 759.3±136.0 Cm로 낮아졌으며 galanthamine과 초미세 분말에서 유의성이 있게 나타났다(Fig. 7).

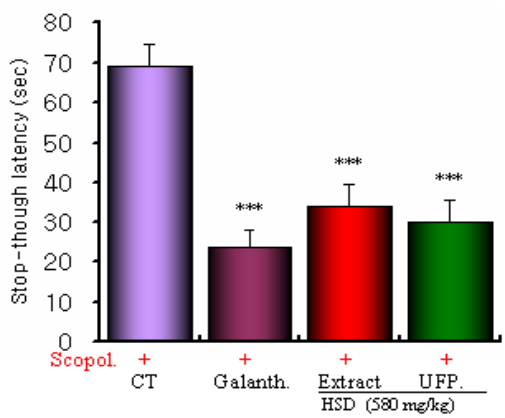


Fig. 7. Effects of HSD on the scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.

Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p).
Galanth. : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and galanthamine(3 mg/Kg i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD hot water extract(580 mg/Kg p.o).
UFP(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/Kg i.p) and HSD ultra-fine powder(580 mg/Kg p.o).
After ICR mice were administered of HSD orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/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. 고 찰

의학의 발달과 함께 인간의 수명이 점차 증가함에 따라 노인인구가 차지하는 비율이 갈수록 증가하고 있으며 이는 필연적으로 노령과 연관된 질환 발생의 증가를 가져올 것이며 이 중 가장 심각한 질병 중의 하나가 치매로, 주요한 사회적 문제로 떠오르게 될 것이다. 치매 원인 질환의 많은 수를 차지하는 것이 바로 AD로[18], 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[2].

AD의 원인은 Aβ의 침적으로 생기는 노인반(senile plaque)의 신경독성으로 신경세포사가 일으키는 것과 과인산화 타우 단백질(hyperphosphorylation tau protein)의 침적에 의한 Neurofibrillary tangles(NFTs)의 작용으로 신경퇴행을 일으키는 것이 대표적이다[19].

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 계속 연구가 이루어지고 있다[20].

Microglial cell에 의해 분비된 TNF-α와 IL-1β는 astrocyte를 활성화시키며 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apoliprotein E를 분비하여 염증 및 Aβ에 의한 신경세포독성을 촉진시킨다[21]. IL-1β는 Aβ에 의하여 분비가 증가되며 인간 혈관계에서의 실험에서 CD40의 표현을 촉진시켜 Aβ가 AD에 영향을 미치는데 중요한 과정 물질이 된다[22]. AD에서 IL-6은 amyloid 침착과 노인반 형성과 관련이 깊다[23].

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다[24]. 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과

acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[25,11].

한의학에서 痴呆는 '呆病[10,26], '健忘[11,27] 등의 범주에 속하며, 『景岳全書·癲狂痴獃』[9] 는 痴呆와 유사한 개념으로 '痴獃'가 언급되어 있다. 痴呆의 병인에은 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 치법을 응용하고 있다[28].

還少丹은 宋代 『洪氏集驗方』[12]에 처음으로 기재된 것으로서 溫補脾腎, 養心安神하여 虛損勞傷, 脾腎虛寒, 心血不足 등에 사용하였다. 본 실험에 사용된 것은 『醫方集解』[16]에 수록된 처방으로 『洪氏集驗方』[12]의 처방에 大棗를 가한 것이며 方中의 肉蓯蓉과 巴戟은 腎經血分으로 入하고 茴香은 腎經氣分으로 들어가 命門相火의 부족을 補하니 火旺則土强하여 脾能健運하게 되고 熟地黃과 枸杞子는 補水之藥으로 水足則有以濟火하여 不亢不害하게 되고 杜冲과 牛膝은 補腰膝하고 助腎하며 茯苓과 山藥은 滲滋熱以助脾하고 山茱萸와 五味子는 生肺液而固精하고 遠志와 石菖蒲는 通心氣而交腎하고 大棗는 補氣益血하여 潤肺强脾하고 楮實은 助陽補虛하여[28-31] 脾腎交補之劑라 할 수 있고 脾腎虛寒, 血氣虧泛, 不思飮食, 發熱盜汗, 遺精白濁, 陰痿不起, 肌體瘦弱 등[12,18,32]에 사용되었으며 특히 『實用中醫腦病學』[13]에서는 精氣兩虛로 인한 痴呆에서 나타나는 "年老表情呆滯 行動遲緩 記憶力減退 言語遲鈍… 悲視失望 忽哭忽笑…"에 응용할 수 있다고 한다.

한편, 최근 서 등[15]이, 還少丹이 흰쥐 뇌조직에 대해 항산화작용을 나타냈다는 실험적 연구결과를 발표한 바 있어 건망증 및 치매에 활용해 볼 수 있다고 판단된다.

제형부분 삭제

Microglial cell에서 분비된 IL-1β와 TNF-α는 대표적인 염증유발 cytokine으로 astrocyte를 활성화한다. 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apolipoprotein E를 분비하여 염증 및 Aβ에 의한 신경세포독성을 촉진한다[33]. IL-6 또한 염증유발 cytokine으로 AD의 병리기전 중 amyloid 침착과 노인반형성에 관여한다[34]. 이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 還少丹의 열수추출물을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA의 발현이 억제되었다. 또한 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β와 IL-6는 100 ㎍/ml에서, TNF-α는 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml에서 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 1-3). 이는 還少丹이 AD의 원인 중 하나로 알려져 있는 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 억제한 것으로, 還少丹의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokines으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

치매에서의 uric acid의 작용은 뚜렷이 밝혀지지 않았지만, AD와 뇌혈관성 치매에서 증가되는 것으로 알려져 있다[35]. 본 실험에서 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 uric acid의 변화를 측정한 결과, 혈청 내 uric acid는 대조군에 비해 還少丹 열수추출물과 초미세분말 실험군에서 유의성 있게 감소하였으나 이들 실험군 간의 유의한 차

이는 없었다(Fig. 4). 또한, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 감소되었으나 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 5). 이로써 還少丹의 열수추출물 및 초미세분말은 AChE을 유의성 있게 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시킬 가능성이 있을 것으로 생각된다.

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, 還少丹 열수추출물과 초미세분말 실험군 간의 유의한 차이는 없었다. Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 초미세분말에서 다소 거리의 단축을 보여 유의성 있게 나타났다(Fig. 6, 7). 이상의 실험 결과를 살펴볼 때, 기억력감퇴에 대한 치료제로써 還少丹을 활용할 수 있다고 생각되어진다.

이상의 내용을 총괄해 보면 還少丹 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 발현을 억제하였다. 또한 還少丹의 열수추출물 및 초미세분말은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 uric acid를 감소시켰으며, AChE의 활성을 억제하였다. Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다. 한편 열수추출물 및 초미세분말을 비교해 볼 때 뚜렷한 효과의 차이는 나타나지 않았다.

따라서 還少丹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. 결 론

還少丹 열수추출물, 초미세분말제형의 microglia 염증반응 cytokine 및 건망증 생쥐 모델의 기억력감퇴 억제 효과에 대해 실험적으로 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 還少丹 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하였다.

2. 還少丹 열수추출물은 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생산량을 감소시켰다.

3. 還少丹 열수추출물과 초미세분말은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 uric acid를 유의성 있게 감소시켰고, AChE 활성을 유의성 있게 억제시켰다.

4. 還少丹의 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency 측정에서 유의한 시간의 단축을 보였고 Distance movement-through latency에서는 유의한 거리의 단축을 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 還少丹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. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울:집문당. 2005:311-6.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2004:189-200, 611-2.
3. 홍은경. 치매의 신경병리학. 한양의대학술지. 2001;21(1):1-9.
4. 조추용, 최현자 역저. 치매 예방과 케어. 서울:창지사. 2002:49.
5. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
6. 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.
7. 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.
8. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
9. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
10. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
11. 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.
12. 宗全和. 中醫方劑通釋, 河北:河北科學技術出版社. 1995:151-2.
13. 陳輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:237-45, 784-91, 794.
14. 王錫夫 외. 明目還少丹治療老年性黃斑變性的臨床研究. 山東中醫雜誌. 1996;15(5):214-5.
15. 서원희, 이상룡. 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(1):45-57.
16. 王認庵. 醫方集解. 台北:文光圖書有限公司. 1975:6-7.
17. 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.
18. Small GW, Rabins PV, Barry PP et al. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. JAMA. 1997;278(16):1363-71.
19. Diez M, Koistinaho J, Kahn K, Games D, Hokfelt T. Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein-initial observations. Neuroscience. 2000;100(2):259-86.
20. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRⅡ/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999;19(9):3440-7.

21. Tuppo E, Arias H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005;37(2):289-305.
22. 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.
23. Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. Neurochemistry International. 2001;39(5-6):409-13.
24. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(1):187-94.
25. 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.
26. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
27. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306-7.
28. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:永林社. 1986:171-2, 174-5, 190-4, 219, 241-5, 257-8, 370-1, 374-5, 468-70.
29. 楊東喜. 本草備要解析. 서울:一中社. 1991:43-7, 49-51, 134-5, 238-9, 259-60, 303-5, 316-7, 319-21, 323-6, 250, 407-8, 491-6.
30. 上海中醫學院. 中草藥學. 上海:常務印書館. 1983:161-2, 307-8, 313-4, 325-6, 388-9, 521-2, 524-5, 537-8, 541-2, 555-7, 561-2, 580-2, 589-92.
31. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1988:36-8, 40-1, 55-8, 77-9, 92-5, 101-6, 110-2, 134-5, 183-8, 357-62, 514-6, 527-9, 719-20.
32. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1992:496-7.
33. Tuppo E, Arias H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry&Cell Biology. 2005;37(2):289-305.
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. Apelt J, Schliebs R. β-Amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. Brain Research. 2001;894(1):21-30.