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

# 溫膽湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말이 cytokine과 건망증 생쥐모델 기억력감퇴에 미치는 영향

장영주, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## The Effects of *Ondam-tanghapChongmyung-tang(Wendantanghecongmingtang)* Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on Proinflammatory Cytokine of Microglia and Memory Deficit Model

Young-Joo Jang, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

**Abstract**

**Objectives** :
This experiment was designed to investigate the effect of the ODTCMT hot water extract & ultra-fine Powder on Alzheimer's Disease Model Induced by βA.

**Methods** :
The effects of the ODTCMT hot water extract on expression of IL-1β, IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) were investigated.
The effects of the ODTCMT hot water extract & ultra-fine powder on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

**Results** :
1. The ODTCMT hot water extract significantly suppressed the production of TNF-α, IL-6 and IL-1β in BV2 microglial cell line treated with LPS.
2. The ODTCMT 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.

투고일 : 2/9 수정일 : 2월 28일 채택일 : 3/5
교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 042-229-6811, E-mail : 7575np@dju.kr

**Conclusions** :
These results suggest that the ODTCMT 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 ODTCMT hot water extract & ultra-fine powder for Alzheimer's disease is suggested for future research.

**Key Words** :
Alzheimer's disease, *Ondam-tanghap Chongmyung-tang(Wendantanghecongmingtang)*, Hot Water Extract, Ultra-fine Powder

## Ⅰ. 서 론

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실을 초래함으로 인해 나타나며[1], 뇌내 microglia와 astrocyte에서 분비되는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine[2], acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase(AChE)의 증가[3], oxidants(free radicals)[4], amyloid β protein(Aβ)[5] 등이 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

한의학에서는 痴呆를 '呆病', '健忘', '癲狂' 등을 근거로 하여 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등으로 分類하여 辨證施治하고 있다[6]. 聰明湯은 『東醫寶鑑』[7]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다[8].

溫膽湯은 孫[9]의 『千金要方』에 처음으로 收錄된 處方으로, 二陳湯에 行氣消積하는 枳實[10]과, 淸熱, 化痰, 止嘔하는 竹茹[10]를 加味한 것으로[11], 心膽虛怯으로 인해 痰熱이 上搖하여 發生[12]하는 觸事而驚[11-13], 夢寐不祥[11,14], 虛煩不得眠[9,12,14] 등의 증상에 사용된다. 『實用中醫腦病學』[15]에서는 痰濁壅盛 阻蔽腦竅型의 腦萎縮에서 나타나는 "神精淡漠呆滯, ..... 健忘, ..... 善怒無常, ..... 甚至完全痴呆 ....." 에 溫膽湯을 활용하고 있다.

최근 한의학계에서 痴呆에 대한 실험적 연구[16-19]가 다수 진행되어 왔다. 특히 聰明湯에 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯[17], 山査를 加한 山査聰明湯[19] 등 聰明湯을 이용한 연구가 있다. 또한 溫膽湯이 뇌 조직에서 항산화작용을 보였다는 연구[20]가 있지만, 聰明湯과 溫膽湯을 合方한 溫膽湯合聰明湯을 이용한 연구는 아직 접하지 못하였다.

한약의 제형은 여러 가지가 있으나 현재 활용되는 제형은 주로 탕제[21]로서 이에 대한 여러 가지 문제점이 있는 것이 사실이다. 이를 해결하기 위해 약의 흡수율을 높일 수 있는 최신기술인 초미세분쇄[22]를 응용하여 새로운 한약제형을 만들어 사용한다면 질병치료에 더욱 효과적일 것으로 판단된다.

이에 저자는 溫膽湯合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 microglia의 proinflammatory cytokine 발현 및 건망증 생

쥐모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향을 비교 검토하고자 溫膽湯合聰明湯의 열수추출물을 시료로 mouse lung fibrast cells(mLFC)에서 세포독성을 관찰하고, BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 관찰하였다. 또한 acetylcholine의 작용을 봉쇄[23]하는 scopolamine으로 유도된 건망증 생쥐모델을 치매의 기억력감퇴 개선 치료제 개발에 응용해 볼 수 있다고 판단되어 溫膽湯合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정한 바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 재료

1) 시약 및 기기

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), anti-CD14(Pharmingen, USA), anti-mouse IgG-bead(Dynal, USA), anti-IL-1β와 anti-TNF-α (Pharmingen, USA), 그리고 anti-CD44-PE (Pharmingen, USA), anti-CD68-FITC (Pharmingen, USA), anti-CD11b-FITC (Pharmingen, USA), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, USA), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(1:4000, Amersham, USA)와 ECL-Hybond film(Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column을(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

평균체중 약 24 g의 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 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 溫膽湯合聰明湯의 처방구성은 『方藥合編』[28]을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table I. Prescription of *Ondam-tanghapChongmyung-tang(ODTCMT)*

| Herbal Name | Galenical Name | Dose(g) |
|---|---|---|
| 半 夏 | *Pinelliae Rhizoma* | 8 |
| 陳 皮 | *Citri Pericarpium* | 8 |
| 白茯苓 | *Holen Alba* | 8 |
| 枳 實 | *Aurantii Immaturus Fructus* | 8 |
| 竹 茹 | *Bambusae Caulis In Taeniam* | 4 |
| 白茯神 | *Poria* | 4 |
| 遠 志 | *Polygalae Radix* | 4 |
| 石菖蒲 | *Acori Graminei Rhizoma* | 2 |
| 甘 草 | *Glycyrrhizae Radix* | 2 |
| Total amount | | 48 |

4) 검액의 조제

(1) 溫膽湯合聰明湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

溫膽湯合聰明湯 1첩 분량(48 g)에 증류수 1,300 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 溫膽湯合聰明湯 열수추출물(7.25 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 400 mg/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 溫膽湯合聰明湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 半夏, 陳皮, 白茯苓, 枳實, 竹茹, 白茯神, 遠志, 石菖蒲, 甘草를 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1 mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750 rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급 휠 속도(air classifying wheel speed) 5,000~7,500 rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 400 mg/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

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 ㎍/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 $10^5$ cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[25]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, $2.0\times10^4$개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% $CO_2$)에서 2시간 배양한 후 溫膽湯合聰明湯 열수추출물(최종 농도 200 ㎍/ml, 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 1 ㎍/ml)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 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 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine 분석

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

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture($1\times10^5$ cells/ml)하여 96 wells plate에 $2\times10^5$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아 혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight시켰다. 溫膽湯合聰明湯 열수추출물(100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 ㎍/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 다음, 새로운 배양액으로 48시간 동안 $CO_2$ 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 즉, 각 well에 배양상층액을 100 ㎕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.

3) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

선별된 ICR계 생쥐에 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90 cm이고 높이

가 약 30 cm인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 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/㎏, *i.p*) 투여군, 溫膽湯合聰明湯 열수추출물(400 mg/㎏ *p.o*) 실험군, 초미세분말(400 mg/㎏ *p.o*) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1 mg/㎏)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 deviation으로 기록하였다. Morris water maze이외의 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. 성 적

### 1. 溫膽湯合聰明湯의 세포독성

1) mLFC에 대한 세포독성

溫膽湯合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 溫膽湯合聰明湯 1 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml, 200 ㎍/ml 실험군에서 각각 103.2±4.8%, 98.0±1.2%, 96.1±1.3%, 89.6±0.5%, 86.9±1.6%로 나타나 실험군 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다

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

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군 34.5±18.8 pg/ml, 대조군은 813±63.1 pg/ml이었고 溫膽湯合聰明湯 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml 실험군은 각각 262.5±48.2 pg/ml, 488.5±42.3 pg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

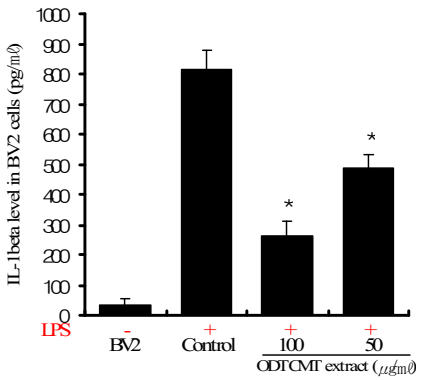



Fig. 1. Inhibitory effect of ODTCMT hot water extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were treated with various concentrations of ODTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1 ㎍/ml) for 6hrs. Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.

Data are represented as means±S.D.

* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 447.0±96.7 pg/ml, 대조군은 7291.0±794.8 pg/ml, 溫膽湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/ml 실험군은 각각 4065.0±1497.7 pg/ml, 5199.5±874.7 pg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

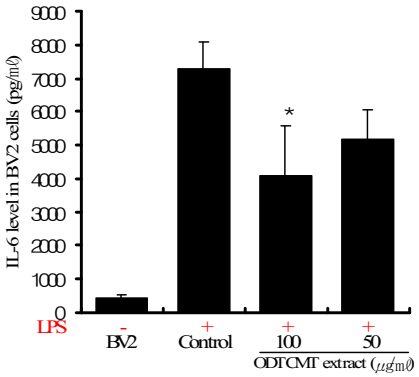



**Fig. 2. Inhibitory effect of ODTCMT hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.**

BV2 microglial cell line were treated with various concentrations of ODTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1 ㎍/ml) for 6hrs. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data are represented as means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

3) TNF-α 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군이 548.0±94.8 pg/ml, 대조군이 2274.0±321.0 pg/ml이었으며, 溫膽湯合聰明湯 100 ㎍/ml, 50 ㎍/ml 실험군은 각각 1327±108.9 pg/ml, 1728.0±168.3 pg/ml로 100 ㎍/ml 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

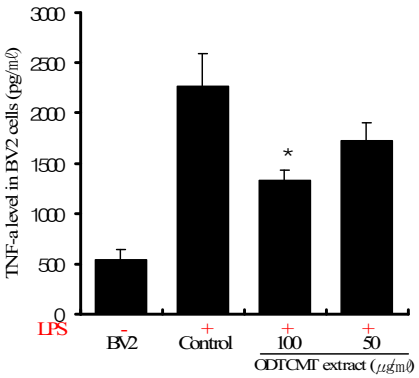



**Fig. 3. Inhibitory effect of ODTCMT hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.**

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of ODTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1 ㎍/ml) for 6hrs. Total TNF-$\alpha$ levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data are represented as means±S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p<0.05$).

## 3. Scopolamine으로 유도된 생쥐 모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향

### 1) Step-through latency

Step-through latency 측정에서 정상군이 10.2±4.1 sec, 대조군이 74.5±18.4 sec, Galanthamine 투여군이 18.6±5.5 sec, 溫膽湯合聰明湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 41.0±25.5 sec, 20.3±9.4 sec로 Galanthamine 투여군과 溫膽湯合聰明湯 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 溫膽湯合聰明湯 초미세분말, 열수추출물 실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

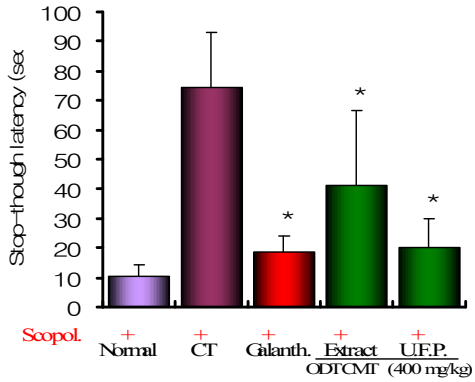



Fig. 4. Effects of ODTCMT on scopolamine-induced memory deficit mice in the step-through type Morris water maze test.
Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and galanthamine(3 mg/㎏ i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and OJJHEJ hot water extract(400 mg/㎏ p.o).
U.F.P.(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and OJJHEJ ultra-fine powder(400 mg/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of OJJHEJ orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/㎏) 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).
Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

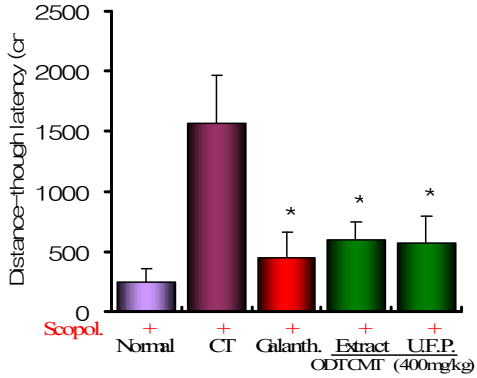



Fig. 5. Effects of ODTCMT on scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.
Normal : Non-treatment group.
CT : Control, Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and galanthamine(3 mg/㎏ i.p).
Extract : Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and OJJHEJ hot water extract(400 mg/㎏ p.o).
U.F.P.(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1 mg/㎏ i.p) and OJJHEJ ultra-fine powder(400 mg/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of OJJHEJ orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 mg/㎏) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.E.
Statistically significant value compared with control group by Kruskal-Wallis test(*p<0.05).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency 측정에서 정상군이 247.0±114.9 ㎝, 대조군이 1572.2±396.8 ㎝, 溫膽湯合聰明湯 열수추출물 실험군은 594.0±155.2 ㎝, 초미세분말 실험군은 573.0±217.0 ㎝로 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였고 溫膽湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말 실험군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

## Ⅳ. 고 찰

치매 원인 질환의 많은 수를 차지하는 것이 바로 AD로, 1906년에 Alois Alzheimer에 의해 처음 기술된 병으로 뇌세포가 점점 파괴되면서 악화일로를 밟는 전형적인 퇴행성 뇌질환으로 심장병, 암, 뇌졸중과 더불어 주요 사망원인 중 하나이다[26].

AD의 원인에 대한 대표적인 가설 중 하나는 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에

의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이다. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자이며 cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여한다. 그러나 일단 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증반응 등의 자극에 의해 손상된 뇌혈관장벽을 통해 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 astrocyte와 microglial cell 등이 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다[27].

AD는 다수의 신경전달물질계의 영향을 받는데 그 중에서도 콜린계와 특히 많은 관계가 있다[28]. acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가[29,30]와 같은 콜린계의 기능장애는 기억력과 많은 연관이 있다[28].

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 AChE의 저해제로 잠복기의 AD에 효과가 있는 것으로 알려진 galanthamine[29]이 있는데, galanthamine은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 학습과 단기기억력을 개선시킨다고 한다[30].

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[31], 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[32].

IL-1 시스템은 IL-1α와 IL-1β의 작용제, IL-1 receptor antagonist(IL-1ra)와 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-1RI에 붙지 못하게 자신이 신호 IL-1RI에 결합하며 IL-1 신호를 조절하는 것으로 여겨진다[33].

Microglial cell의 가장 특징적인 소견은 CNS의 병적인 변화에 반응하는 급속한 활성화이다. Microglial cell은 뇌실질의 전반적인 변화뿐만 아니라 선행적인 병적 변화인 이온 항상성의 불균형과 같은 미세 환경의 아주 작은 변화에도 반응한다. microglial cell은 침입한 미생물과 종양세포를 제거하거나 신경영향인자를 분비함으로써 숙주방어에 중요한 역할을 하지만 염증의 효과를 악화시키거나 신경변성을 유발할 수도 있다. 염증부위의 활성화된 microglial cell은 모양을 바꾸어 증가된 수준의 MHC 항원을 발현하고 식세포화되며 다른 세포를 활성화시키고 뇌 영역으로 동원하여 염증반응을 증식시키는 inflammatory cytokine을 분비한다. 게다가 microglial cell은 신경학적인 손상을 유발할 수 있는 TNF-α와 그 외의 잠재적인 신경독소를 분비할 수 있다[34].

IL-1, TNF-α는 CNS 염증 시 microglial cell에서 생산되는 주요 proinflammatory cytokine이다. 배양된 microglial cell이나 LPS 주사된 쥐에서 LPS와 같은 독소나 독성화합물은 즉각 IL-1,과 TNF-α를 유도할 수 있다. IL-1과 TNF-α는 BBB의 붕괴로 astrocyte와 상피세포로부터 CNS로 백혈구 침윤을 촉진시키는 부착분자와 화학역동현상을 유도하여 CNS 염증의 발전과

연관된 것으로 보여진다[35]. IL-1 receptor antagonist( IL-1ra)는 유발 신호전달 없이 IL-1 receptor에 붙음으로써 IL-1의 생물학적인 영향에 길항작용을 한다. TGF-β와 IL-10은 항원전달과 proinflammatory를 억제하는 그들의 능력을 통해서 microglial cell의 활성화를 억제한다[34].

Astrocyte와 microglial cell 염증 사이토카인, 보체 단백과 조절인자, 급성기 작용물질과 많은 단백분해효소, 단백분해효소억제제를 분비하여 아교세포는 CNS 지역의 면역기전을 촉진하고 증폭시킨다[34]. 하지만 염증 또는 Aβ에 의한 자극은 microglial cell을 활성화하여 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[31], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-colony-stimulating factor, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고[32] 이와 같은 cytokine은 성숙 과립구와 대식세포를 CNS안의 염증 병소로 유도할수 있다[34]. 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 되며[32]. astrocyte 또한 IL-6, CSFs, TGF-β를 유도하는 IL-1과 TNF-α의 방출을 통해 상호 영향을 준다[34].

한의학에서 痴呆는 '痴獃[35]', '呆病[36]', '健忘[37]' 등의 범주에 속하며, 明代 張[35]의 『景岳全書』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 있지만 이미 內經[38]에서"血幷於上 氣幷於下 心煩悗善怒 血幷於下 氣幷於上 亂而喜忘"라 하여 '善忘'이라는 기억력이 감퇴하는 증상을 서술하여 증상에 대한 인식이 있던 것으로 보인다. 치매의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不語, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며[35,37] 病機는 正氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱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[6].

聰明湯은 『東醫寶鑑』[7]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다[6]. AD의 가장 중요한 위험인자는 고령이며[6], 한의학에서는 노화의 중요한 원인이 腎精이 부족이므로[6], 노화로 인한 치매는 腎虛와 밀접한 관련이 있다[38]. 최근에는 聰明湯이 치매에 효과적인 치료제로 활용 될 수 있다는 연구 및 聰明湯에 木槿皮, 山査, 巴戟天 등을 加味한 방제가 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[17,19,39-41]가 진행되었다.

溫膽湯은 孫[9]의 『千金要方』에 처음으로 收錄된 處方으로 "治大病後 虛煩不得眠, 此膽寒故也. 宜服溫膽湯方"이라 하여 和胃, 消積, 淸熱, 安神하는 효능[15]으로 心膽虛怯[9,12-14], 觸事而驚[11-13], 夢寐不祥[11,13], 虛煩不得眠[9,12,13] 등의 증상에 使用하며, 燥濕化痰, 利氣和中하는 효능이 있어 惡心嘔吐, 頭眩心悸, 舌苔白潤, 脈滑한 증상을 치료하는 二陳湯[12]에 行氣消積하는 枳實[10]과, 淸熱, 化痰, 止嘔하는 竹茹[10]를 加味한 처방이다[11,12].

溫膽湯을 構成하는 藥物의 효능을 살펴보면 다음과 같다.

半夏[10]는 化胃止嘔, 燥濕去痰, 散結消腫하고, 陳皮[10]는 理氣建脾, 燥濕化痰하며, 白茯苓[10]은 利水滲濕, 建脾和中, 寧心安神하고, 枳實[10]은 破氣散痞, 行氣消積하며, 竹茹[10]는 淸熱化痰, 除煩止嘔하고, 甘草[10]는 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하며 生薑[10]은 解表散寒, 溫中止嘔하고 大棗[10]는 補脾和胃, 益氣生津, 調榮衛, 解藥毒하는 효능이 있다. 그러므로 溫膽湯은 肝胃不和[42,43], 痰熱上搖[12,42]의 증상, 즉 眩暈, 虛煩不眠, 驚悸, 胸痞痰多, 嘔吐痰涎[11,14,39-44] 등을 치료한다고 할 수 있다.

특히『實用中醫腦病學』[15]에서는 痰濁壅盛阻蔽腦竅型의 腦萎縮에서 나타나는 "神精淡漠呆滯, ..... 不言不語, ..... 健忘, ..... 善怒無常, 欲哭欲笑, 妄聞妄見, ..... 漸至理解, 判斷, 記憶, 計算, 定向等知能全面減退, ..... 出現失語 甚至完全痴呆 ..... 舌苔白膩, 脈滑." 에 開鬱除痰, 化濁醒神의 治法으로 溫膽湯을 活用하고 있다. 따라서 痴呆의 대표증상인 善忘에 溫膽湯이 응용될 수 있을 것으로 사료되어 溫膽湯과 聰明湯을 합방하여 본 실험약물로 선택하였다.

한의학에서 현재 가장 많이 응용되는 제형으로는 탕제와 열수추출물제제가 있는데 탕제는 달이는 시간이 소요됨, 휴대가 불편함, 기미가 불쾌함 등이, 열수추출물 제제는 약효가 떨어지거나 효과가 느릴 것 같다는 선입견과 복용 시에 물이 필요하다는 것이 단점으로 지적되고 있다[21].

잘 녹지 않는 약물의 생물학적 유용성을 개선하기 위한 방법이 연구되고 있는데 그중 약물을 분자크기로 축소하는 방법은 약물의 표면영역의 증가를 가져와 흡수성을 높이게 되므로[45] 우수한 효과를 보인다[45,46].이러한 장점 때문에 한약제형에 초미세분말을 응용한 연구도 활발히 진행되고 있다[40,48].

이에 저자는 溫膽湯合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 microglia의 proinflammatory cytokine 발현 및 건망증 생쥐모델의 기억력 감퇴에 미치는 영향을 비교검토하고자 溫膽湯合聰明湯의 열수추출물을 시료로 mLFC(mouse lung fibrast cells)에서 세포독성을 관찰하고, LPS(lipopolysacchride)를 처리한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 관찰하였다. 또한 溫膽湯合聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze에서 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 溫膽湯合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 溫膽湯合聰明湯 1 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml, 200 ㎍/ml 실험군에서 감소하였으나, 실험군 모두에서 80% 이상으로 나타났다.

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비해 감소를 보였으며 IL-1β에서는 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml 실험군이 유의성이 있었고, TNF-α와 IL-6에서는 100 ㎍/ml 실험군에서만 유의성이 있었다(Fig. 1-3).

이상의 결과로 溫膽湯合聰明湯은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단할 수 있다. 한편, 기존의 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯[17], 山査를 加한 山査聰明湯[19]과 연구결과를 비교해 보면 溫膽湯合聰明湯이 보다 우세한 cytokine 발현 억제 효과를 보였다고 할 수 있다.

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로[50], 이 방법을 이용하여 scopolamine으로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 溫膽湯合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 step-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, 두 실험 모두에서 溫膽湯合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 시간의 단축을 보였으며 溫膽湯合聰明湯

열수추출물과 초미세분말 실험군간 차이는 없었다(Fig. 4, 5). 이는 溫膽湯合聰明湯이 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 활용할 수 있다는 것을 시사한다.

이상의 내용을 총괄해 보면 溫膽湯合聰明湯은 BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 감소시켰으며, Scopolamine으로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈다.

溫膽湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, Scopolamine으로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency와 distance movement-through latency에서 기억력 감퇴개선효과에 있어 모두 효과가 있었으나 제형에 따른 유의한 차이는 없었다.

따라서 溫膽湯合聰明湯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, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

溫膽湯合聰明湯이 microglia 염증반응 싸이토카인과 건망증 생쥐모델에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 溫膽湯合聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line 배양상층액에서 100 ㎍/ml 농도에서 IL-6, TNF-α의 생성을 유의하게 감소시켰고, 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml 의 농도에서 IL-1β의 생성을 유의하게 감소시켰다.

2. 溫膽湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 step-through latency측정과 distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 溫膽湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 AD와 건망증의 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. 조추용, 최현자 역저. 치매 예방과 케어. 서울:창지사. 2002:49.
2. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
3. 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):69-9.
4. 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

Alzheimer's disease. 2004;6(2):147-57.
5. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
6. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울:집문당. 2005:311-6, 432-5, 451.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:55-6, 98.
8. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
9. 孫思邈. 千金要方. 서울:大星文化社. 1984:217.
10. 李尙仁 외. 本草學. 서울:영림사. 1990:137, 303, 348, 351, 448, 467, 541-2.
11. 康舜洙. 바른 方劑學. 서울:大星文化社. 1996:128.
12. 李尙仁 외 編. 方劑學. 서울:永林社. 1990:528, 531-2.
13. 李載熙. 圖說 韓方診療要方. 光州:醫學硏究社. 1987:538.
14. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:明寶出版社. 1987:106.
15. 陳輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242-3, 791-7.
16. 채종걸, 정인철, 이상룡. 山査肉이 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279-88.
17. 박지운, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):37-57.
18. 김명진, 정인철, 이상룡. 木瓜가 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2005;16(1):97-118.
19. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):59-78.
20. 정인철. 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 대전대학교한의학연구소 논문집. 2005;14(1):129-40.
21. 최현정, 방나영 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356-67.
22. Shu ZH, Liu GF, Ma MH, Xu Y, Hu YF. Study on the superfine comminution of traditional Chinese medicine. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004;29(9):823-7.
23. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia ; electroencephalogram findings and cognitive performance. European Journal of Clinical Investigation. 1998;28(11):944-9.
24. 黃度淵. 證脈・方藥合編. 서울:南山堂. 1990:423-4.
25. 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.
26. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD, McRae TD, Morris JC, Oakley F, Schneider LS, Streim JE, Sunderland T, Teri LA, Tune LE. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. JAMA. 1997;278(16):1363-71.
27. 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):3440-47.

28. William K. summers. Tacrine(THA, Cognex®). Journal of Alzheimer's Disease. 2000;2(2):85-93.
29. 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.
30. 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.
31. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
32. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
33. M. Oprica, E. Hjorth, S. Spulber, BO Popescu, M. Ankarcrona, B. Winblad, and M. Schultzberg. 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.
34. Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. Exp Mol Med. 2006;38(4):333-47.
35. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
36. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
37. 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.
38. 崔用德, 李光撰, 姜亨沅, 柳泳秀. 痴呆의 病理에 대한 東西醫學的 考察. 대한동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.
39. 임정화, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 巴戟天聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):997-1008.
40. 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.
41. 서승호, 정인철, 이상룡. 聰明湯和山査聰明湯熱水提取物, 超微細粉末劑型對microglia及記憶力減退病態模型的影響. 第5會天津國際中醫藥學術研討會議論文集, 2006:325-7.
42. 中山醫學院『中醫方劑選講』編寫組 主編. 中醫方劑選講. 廣東:廣東科技出版社. 1983:236-7.
43. 上海中醫學院 編. 方劑學. 上海:商務印書館香港分館. 1975:205.
44. 金在吉. 臨床漢方藥物療法. 서울:南山堂. 1987:474.
45. Moschwitzer J, Muller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. J Nanosci Nanotechnol.

2006;6(9-10):3145-53.

46. 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.
47. Song LL, Du GJ, Zhang DL. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound *Rehmannia*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2002;27(6):436-9.
48. 김현수, 이상룡, 정인철. 세심탕 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):688-99.
50. 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.