동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 2, 2009

Alzheimer's Disease 병태모델에서 鹿茸大補湯의 신경세포 보호효과

정명희, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The neuroprotective effects of *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* treatment in pathological Alzheimer's disease model of neural tissues

Myong-Hee Cheong, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee
Dept. of Oriental NeuropsychiatryCollege of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objectives :
Alzheimer's disease(AD) is the most common form of dementia, which is characterized by progressive deterioration of memory and higher cortical functions that ultimately results in total degradation of intellectual and mental activities. *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* has been usually used for the treatment for the deficiency syndrome dementia and amnesia. This experiment was designed to investigate the effect of the *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* hot water extract on pathological AD model.

Methods :
The effects of the *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* hot water extract on cultured spinal cord cells induced by β-amyloid were investigated.
The effects of the *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* hot water extract on the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :
1. β-amyloid treatment on cultured spinal cord cells increased both GFAP-staining intensity of astrocytes and caspase 3 immunoreactivity on cultured cells.
Then, *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* treatment reduced the labeling intensity for both GFAP and caspase 3 proteins in culture cells.

투고일 : 5/13 수정일 : 5/29 채택일 : 6/10
교신저자 : 정인철, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 042-470-9129, E-mail : npjeong@dju.kr

2. Scopolamine treatment into mice increased levels of GFAP-positive astrocytes and caspase 3-labeled cells of the hippocampal subfields dentate hilar region, CA3 and CA1 area. In vivo administration of *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* attenuated labeling intensity for those two proteins in the same hippocampal areas. Similar effects were observed by the treatment of galanthamine, an inhibitor of acetylcholinesterase.

Conclusions :
This experiment shows that the *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* may play a protective role in damaged neural tissues. Since neuronal damage seen in degenerative brains such as AD are largely unknown, the current data may provide possible insight into therapeutic strategies for AD treatments. *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)* might be effective for the prevention and treatment of AD.

Key Words :
Alzheimer's disease(AD), *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)*, β-amyloid, Scopolamine, Neuroprotective effects

I. 서 론

알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)은 퇴행성 치매의 대표적인 원인 질환으로, 서서히 진행하는 기억력 장애로 시작하여 언어 장애, 시공간 기능 장애, 전두엽 기능 장애 등 여러 인지 기능의 장애를 초래한다. AD는 이러한 전형적인 임상양상과 함께 노인반 (amyloid plaques)과 신경섬유다발 (neurofibrillary tangles)와 같은 특징적인 신경병리학적 소견으로 정의된다[1].

AD를 비롯한 인간의 신경계질환은 신경계 자체의 구조적 복잡성과 아직 알려지지 않은 많은 생리, 병리학적 현상에 의하여 실험동물을 통한 연구가 필수적인 연구 분야이다. 지난 수십 년간의 연구를 통하여 AD 발생과 직접 혹은 간접적으로 관련될 것으로 사료되는 생체물질들이 규명되었으며 이들을 결핍시키거나 과다생성을 유도하는 설치류 동물모델이 제시되었다[2-9].

한의학적으로 痴呆의 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이며, 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[10].

鹿茸大補湯(NYDBT)은 『醫學入門』[11]에 기재된 방제로 虛勞로 얼굴에 핏기가 없으며 정신상태가 우울하고 허리가 시큰시큰하며 손발이 차고 식은땀이 나며 추위를 타고 遺精이 있으며 몸이 허약한데 쓰는 처방이다[12]. 최근 한의학계에서 痴呆에 대한 실험적 연구[13-15]가 다수 진행되어 왔으며, 서[13]는 鹿茸大補湯을 시료로 AD 병태 생쥐의 기억 행동변화, 뇌세포에서의 염증반응 cytokine 등을 관찰하여 유의한 결과를 보고한 바 있다. 따라서 鹿茸大補湯이 先天稟賦不足과 虛損 등으로 인한 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

이에 저자는 鹿茸大補湯의 AD 병태모델의 세포보호 효과를 검토하고자 β-amyloid를 처리한 흰쥐의 배양 척수조직세포와 scopolamine을 주입한 생쥐의 신경조직의 손상을 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 鹿茸大補湯의 처방 구성은 『醫學入門』[11]을 기준으로 하였고 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table 1. Prescription of *Nokyongdaebo-tang(Lurongdabutang)*

Herb name	Scientific name	Dose(g)
肉蓯蓉	*Caulis Cistanchis*	4.0
杜冲	*Cortex Eucommiae*	4.0
白芍藥	*Radix paeoniae Alba*	4.0
白朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	4.0
附子炮	*Aconiti Lateralis Radix Preparata*	4.0
人參	*Ginseng Radix*	4.0
肉桂	*Cinnsmomi Cortex*	4.0
半夏	*Pinelliae Rhizoma*	4.0
石斛	*Dendrobii Herba*	3.2
五味子	*Schizandrae Fructus*	3.2
鹿茸	*Cornus cervi parvum*	2.0
黃芪	*Radiz Astragali*	2.0
當歸	*Angelicae Gigantis Radix*	2.0
白茯苓	*Poria*	2.0
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	2.0
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	1.0
生薑	*Zingiber Officinale Roscoe*	3.0
大棗	*Fructus Zizyphi jujubae*	2.0
	Total amount	54.4

2) 검액의 조제

건조 상태의 鹿茸大補湯 1첩 분량 (54.4 g)에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물 7.55 g을 얻었다 (수율; 13.88%). 이를 냉동 (-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

3) 동물

척수신경세포 배양 실험을 위하여 생후 1-2일의 신생 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 (Samtago Co. Korea)를 실험대상으로 하였다. 치매 모델에 사용한 생쥐는 수컷 albino ICR 계열로서 고형 사료와 물을 어떠한 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24℃, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮 주기 (12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

4) 주요 시약

β-amyloid peptide는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였으며, 10 mm의 농도로 증류수에 녹여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다. 또한 Scopolamine methyl nitrate와 galanthamine triethiodide는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였으며, 각각 0.1 mg/ml와 0.3 mg/ml이 되도록 증류수에 녹여, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2. 실험 방법

1) 척수 아교세포 배양

신경조직세포 배양에 대한 일반적 방법 및 원리는 Banker와 Goslin[16]의 실험서를 참조하였다. 유리 coverslip에 poly-L-ornithine (0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin (0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA)을 혼합하여 실온에서 precoating하였다. 출생 후 1일째 되는 새끼 rat에서 척수 (spinal cord)를 분리하여 ice-cold

DMEM medium (Gibco, USA)에 넣었다. 분리한 척수는 type XI collagenase (2,500 U/ml, Sigma)를 포함한 DMEM으로 37℃에서 90분 동안 처리하였다. 조직을 DMEM으로 세척한 후 상층액을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 다시 한 번 세척 후 세포를 DMEM에 녹여서 화염 멸균한 Pasteur pipette을 16-20번 통과하여 분리시키고 상층액을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. Cell은 type SII trypsin (0.5 mg/ml)을 포함한 DMEM을 15분간 처리 후 trypsin inhibitor (100 mg/ml), EDTA (1 mm)과 DNase Ⅰ(80 mg/ml)을 포함한 DMEM으로 5분간 처리하였다.

배양배지 (5% heat-inactivated FBS (GIBCO), 5% horse serum, 2 mm glutamine과 1% penicillin- streptomycin을 포함한 DMEM)로 세척한 1 x 105 개의 성상교세포를 12 mm round coverslip 위에 plating하고 37℃, 5% CO2 incubator에서 12시간 동안 배양한 뒤 새로운 배지로 갈아주었다. 성상교세포는 鹿茸大補湯 (50 mg/ml or 100 mg/ml) 또는 식염수 용액으로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. Coverslip 위에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose solution으로 상온에서 45분 동안 고정시킨 후 면역형광염색에 사용하였다. 면역염색된 세포들은 형광현미경에 연결된 디지털 카메라로 찍고 그 image를 Photoshop 프로그램에서 분석하였다.

2) Alzheimer's disease 동물 모델의 제작

10주령 ICR계 생쥐에 대해 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군, (ii) scopolamine (1 mg/Kg)만 투여한 대조군, (iii) scopolamine (1 mg/Kg) + galanthamine (3 mg/Kg)을 투여한 양성대조군, (iv) scopolamine (1 mg/Kg) +鹿茸大補湯 열수추출물 (400 mg/Kg, p.o)을 투여한 실험군으로 나누었다. 실험군에만 7일간 鹿茸大補湯 열수추출물을 구강 투여하였고, 8일째부터 대조군과 실험군은 scopolamine (1 mg/Kg)을 3일간 1일 1회 복강 주사하였으며 양성대조군은 투여 8일째부터 scopolamine (1 mg/Kg)과 galanthamine (3 mg/Kg)을 3일간 1일 1회 복강 주사하였다. 처리가 끝난 후 각 군 생쥐의 뇌를 분리하였다.

3) Hemotoxylin & Eosin (H & E) 염색

뇌조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 ㎛의 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후, H & E 염색을 실시하기 위하여 슬라이드를 Hematoxylin에 1분 동안 담가둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척하였다. 그 다음 Eosin에 30초간 담그고 흐르는 증류수에 여러 번 세척하고 에탄올 50%, 70%, 95%의 순으로 여러 번 씻으며 염색을 적당히 제거하였다. 이러한 과정을 마친 후 xylene에 1분간 담가 놓고, 마지막으로 gelatine mount medium을 이용하여 coverslide를 부착하였다. 이러한 샘플들은 광학현미경 (Light microscope, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

4) 면역형광염색

면역형광염색법 (double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액 (phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 뇌조직 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차 항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:500에 비율로 혼합하여 처리한 후 실온에서 4시간 동안 반응하였다. 일차 항체 반응이 끝난 후 PBST (PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직

을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse (green; Molecular probes)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody (red; Molecular probes)를 1:100으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하고 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst33258 핵 염색을 수행할 때는 2회 세척 후 0.25% Hoechst33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 모든 조직시료는 형광현미경 (Nikon fluorescent microscope)을 통해 관찰하였고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop (version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 증폭시켜 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 확인하였다. 본 실험에 사용한 일차 항체는 caspase-3 (1:500로 희석, Cell Signaling)와 Glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1,000로 희석, Dako) 이었다.

5) Western blot 분석

뇌조직을 137 mm NaCl, 2.7 mm KCl, 10 mm Na2PO4, 2 mm KH2PO4(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 ㎕의 triton lysis buffer (20 mm Tris, pH 7.4, 137 mm NaCl, 25 mm β-glycerophosphate, pH 7.14, 2 mm sodium pyrophosphate, 2 mm EDTA, 1 mm Na3VO4, 1% Triron X-100, 10% glycerol, 5 ㎍/ml leupeptin, 5 ㎍/ml aprotinin, 3 ㎜ benzamidine, 0.5 mm DTT, 1 mm PMSF) 용액하에서 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 15 ㎍의 단백질을 western analysis에 사용하였다. 뇌조직 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1.5 m Trisma base, 10% Sodium Dodecyl Sulfate, 30% Acrylamide, 10% Ammonium Sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)를 수행하였다. 항체와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovine serum albumin(BSA), 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4℃에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 1차 항체를 blocking buffer (1X TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 1:1,000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응 시켰다. 이후 membrane을 씻어내고 anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:1,000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리 하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak scientific imaging film (Eastman Kodak Co., USA)에 감광하였다.

6) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직 및 H & E 염색조직은 Nikon 형광현미경을 이용하여 200배 혹은 400배 배율에서 분석하였다. 분석이미지는 현미경에 부착된 디지털 카메라로 포착하여 ACT-1 software와 Adobe photoshop 프로그램을 이용하여 분석하였다. 면역형광염색에 의하여 확인된 GFAP 양성세포와 caspase 양성세포의 counting은 아래와 같이 수행하였다. 단일 coverslip에서 배양한 세포를 200배 배율 상에 얻은 대표적 형광이미지의 면적 (290 ㎛ × 180 ㎛) 상에 존재하는 Hoechst33258 염색 양성세포나 GFAP 혹은 caspase 3 면역형광 양성세포를

모두 counting 하였다. 또한 동일 실험에 대하여 다른 coverslip에서 배양한 세포에 대해 동일한 방법의 counting을 통하여 세포수치를 구하고 이들에 대한 통계분석을 실시하였다.

7) 통계분석

실험 집단 간 수치 데이터는 Student t-test를 이용하여 비교분석하였다. p 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001 보다 작은 경우를 구분하여 분석하였으며 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. β-amyloid 처리 배양아교세포에서의 성상교세포에 대한 영향

1) 세포독성

성상교세포는 정상군과 鹿茸大補湯 실험군 간에 다소 형태적 차이는 있었지만 세포질 표면이 전형적인 돌기구조 모양의 성상교세포를 보였다. Hoechst33258에 의하여 염색된 전체 세포수는 정상군과 鹿茸大補湯 실험군 간에 유사한 분포를 나타냈다.

2) 세포수

GFAP 염색 성상교세포는 대조군의 경우 세포질 부위가 다소 위축된 형태가 많이 관찰된 반면, 鹿茸大補湯 실험군에서는 정상군과 유사한 세포형태를 관찰할 수 있었다.

Hoechst33258에 의하여 염색 후 붉은색으로 관찰되는 전체세포 집단의 세포수는 鹿茸大補湯 실험군에서 대조군에 비해 많았다(Fig. 1).

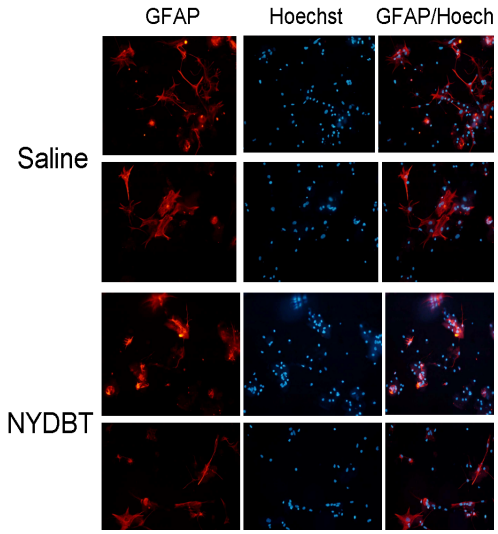


Fig. 1. Effects of NYDBT on morphological characteristics of cultured glial cells treated with β-amyloid peptide.

Glial cells were prepared from the dissociated spinal cord tissue. Cells were first treated with 10 ㎛ β-amyloid peptide and further treated with 50 ㎍/ml of NYDBT or an equivalent volume of saline (5 ㎕) for 48 hrs. Harvested cells were fixed and used for immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody (red) to identify astrocytes and Hoechst nuclear staining (blue). Representative images from two different fields were taken for saline and NYDBT-treated groups.

3) 세포 형태

β-amyloid를 처리하지 않은 경우, 정상군과 鹿茸大補湯 실험군에서 관찰되는 성상교세포는 세포질 표면의 별모양이 잘 발달되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2의 화살표). 반면 β-amyloid를 처리한 경우, 대조군에서 세포질 표면구조가 위축되거나 뾰족하고 가는 바늘 모양의 세포가 빈번하게 관찰되었으나 鹿茸大補湯 실험군에서는 상대적으로 이런 세포가 적었다(Fig. 2).

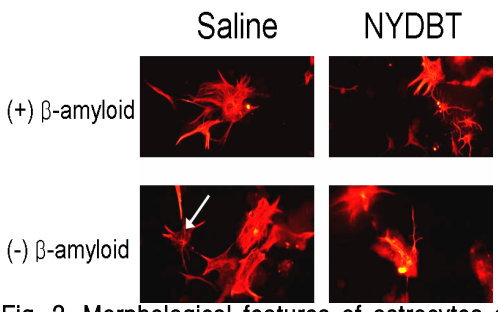


Fig. 2. Morphological features of astrocytes after different treatments.

GFAP-positive astrocytes were identified under the fluorescence microscope, and representative cells from different treatments were shown in two set of images in the figure.

4) 정량적 분석

Hoechst33258에 의하여 염색 관찰되는 전체 세포수는 분석 4개 집단 간에서 전체적으로 유사하게 나타났다(Fig. 3A). GFAP 양성 성상교세포는 정상군에 비하여 대조군에서 높은 수치를 나타내었으나 鹿茸大補湯 실험군은 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 3B).

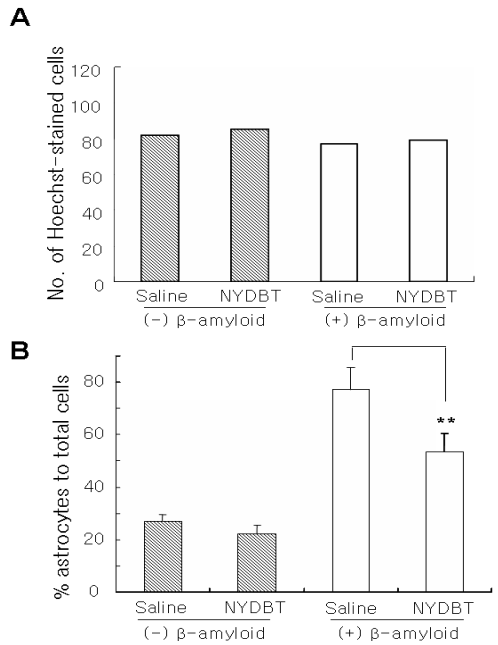


Fig. 3. Comparison of cell counts in culture among different treatments.

A. Total cell number in culture. All the glial cells in the culture were identified by Hoechst nuclear staining, and GFAP-positive astrocytes were counted separately. (A) Comparison of the total cells among different treatments as indicated in the figure did not show any statistical difference. Mean ± SEM, N = 4. (B) Percentage of GFAP-positive astrocytes among total cells. Comparison among different treatments were made by the ratio of GFAP-positive cells counts to the number of Hoechst-positive nuclei in the image field. * $p < 0.01$ (mean + SEM, N = 4, Student's t-test)

2. β-amyloid 처리 배양아교세포에서 세포 자멸에 미치는 영향

1) 세포독성

β-amyloid를 처리하지 않은 경우, 鹿茸大補湯 실험군이나 정상군에서 모두 극소수의 세포만이 caspase 3 양성 형광염색 반응을 나타내었으며 두 집단 간의 생성세포의 수나 형태적으로 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았다.

2) Caspase 3 양성세포 형태

β-amyloid를 처리한 대조군은 정상군에 비하여 전체적으로 caspase 3 양성반응을 나타내는 세포가 빈번하게 관찰되었다.

그러나 鹿茸大補湯 실험군에서는 대조군에 비하여 현저하게 caspase 3 양성 세포가 감소된 것이 관찰되었다(Fig. 4).

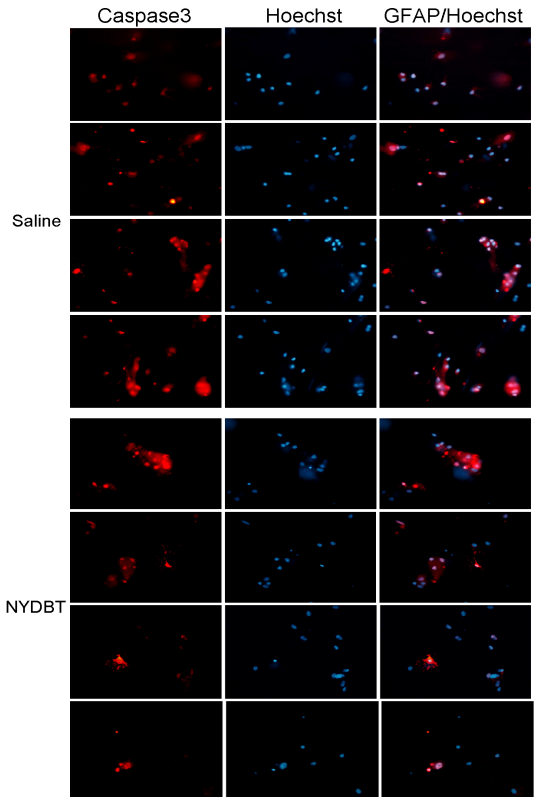


Fig. 4. Comparison of caspase 3-positive cell counts in culture treated with saline or NYDBT in the presence of β-amyloid peptide.

Spinal cord glial cells were exposed to 10 ㎛ β-amyloid peptide treated with saline or NYDBT for 48 hrs, and fixed for immunofluorescence staining with anti-caspase 3 antibody. Individual cells were identified by Hoechst nuclear staining. Caspase 3 positive cells were seen in red, Hoechst-stained nuclei in blue. The merged images identify correct localization of caspase 3 protein signals within the cell. Representative four different images for saline or NYDBT group each respectively are shown in the figure.

3) Caspase 3 양성세포의 정량적 분석

β-amyloid를 처리하지 않은 경우의 caspase 3 양성 세포수를 정량적으로 분석한 결과, 鹿茸大補湯의 투여와 상관없이 전체 세포수의 약 25%로 유사한 값을 나타냈다.

그러나 β-amyloid를 처리한 대조군의 caspase 3 양성 세포수는 약 77%로 큰 증가를 나타냈고 鹿茸大補湯 실험군은 약 50%로 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 5).

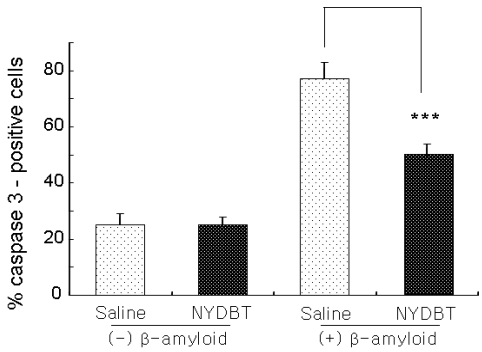


Fig. 5. Comparison of caspase 3-positive glial cells among groups with different treatments.

Caspase 3-positive cells among total cells identified in each microscopic field were counted and used for comparison among different treatments. Data are represented by mean ± SEM (N = 4, † $p < 0.001$, Student's t-test).

3. Scopolamine 처리 AD 생쥐의 해마조직에 대한 영향

1) Dentate gyrus의 성상교세포

정상군의 경우, Hoechst33258에 의하여 염색된 dentate gyrus의 과립세포(granule cell)들은 둥근 입자 모양의 일정한 염색 핵모양을 잘 나타내었으며 적은 수의 GFAP-양성 성상교세포가 관찰되었다.

대조군에서는 정상군에 비하여 많은 수의 GFAP-양성 성상교세포가 확인되었으며, 양성대조군과 鹿茸大補湯 실험군에서는 정상군에 비해 많은 수의 성상교세포를 나타내었으나 대조군에 비하여 다소 감소한 것을 확인할 수 있었다.

Granule cell의 경우 형광현미경적 관찰 소견에서 군 간의 뚜렷한 형태적 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

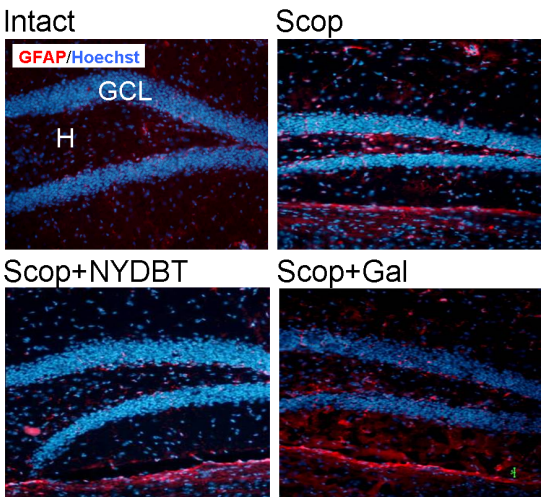


Fig. 6. Micrographic images of hippocampal granule cells.

Cells in the granule cell layer (GCL) were identified by Hoechst nuclear staining (in blue), and the astrocytes were detected by immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody (in red). GFAP-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (Intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus NYDBT (Scop+NYDBT), and scopolamine plus galanthamine (Scop+Gal). H; hilus region, GCL; granule cell layer.

2) CA3 pyramidal 세포층의 성상교세포

정상군에 비하여 대조군에서 GFAP-양성 성상교세포의 신호가 세포층 및 주변부에 더 많이 관찰되었으며 양성대조군과 실험군에서는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다.

Hoechst33258 염색 CA3 pyramidal cell의 핵에 있어서는 다소 응집된 형태의 세포핵이 정상군에 비하여 다른 군에서 다소 높게 관찰되었으며 기타 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

3) CA1 pyramidal 세포층의 성상교세포

정상군에서는 적은 수의 GFAP 양성 성상교세포가 관찰되었고 대조군의 경우는 GFAP 양성 성상교세포의 염색이 세포층 상하 부위에서 증가하였으며, 양성대조군과 실험군에서는 대조군에 비해서 상대적으로 낮은 수준의 GFAP-양성 성상교세포가 관찰되었다.

Hoechst33258 염색에서는 군 간 유사한 형태의 세포핵 형태를 나타내었다(Fig. 7).

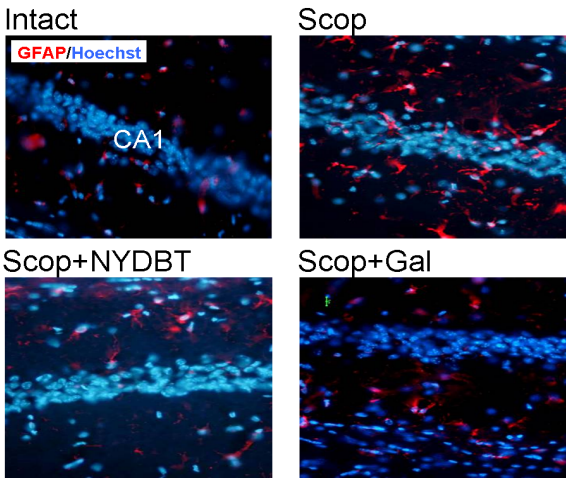


Fig. 7. Micrographic images of hippocampal CA1 pyramidal cells.

Cells in CA1 pyramidal cell layer (CA1) were identified by Hoechst nuclear staining (in blue), and the astrocytes were detected by immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody (in red). GFAP-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (Intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus NYDBT (Scop+NYDBT), and scopolamine plus galanthamine (Scop+Gal).

4) Dentate gyrus의 caspase 3

정상군의 경우 caspase 3 양성신호가 관찰되지 않았으나 대조군의 caspase 3 양성신호는 granule 세포층과 hilus 부위에서 증가한 수준으로 관찰되었다.

양성대조군의 경우 caspase 3 양성신호는 현저하게 감소하였으며 鹿茸大補湯 실험군은 caspase 3 신호가 granule 세포층에서는 거의 관찰되지 않았고 hilus 부위에서 약간 관찰되었다(Fig. 8).

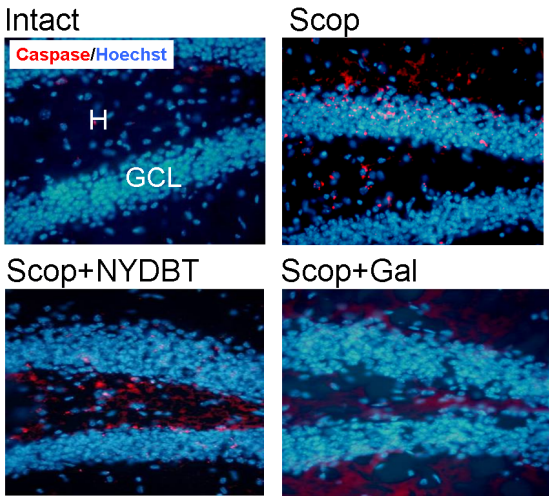


Fig. 8. Micrographic images of caspase 3-labeled cells in hippocampal dentate gyrus region.
Caspase 3-positive cells in dentate gyrus region were identified by red-color staining, and Hoechst nuclear staining (in blue) visualizes granule cell layer (blue). Caspase 3-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (Intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus NYDBT (Scop+NYDBT), and scopolamine plus galanthamine (Scop+Gal). H; hilus region, GCL; granule cell layer.

5) CA3 pyramidal 세포층의 caspase 3

정상군의 경우 CA3 부위에서 caspase 3 양성 신호는 거의 검출되지 않았고 대조군은 CA3 pyramidal 세포층 내부에서 높은 수준으로 검출되었으며 galanthamine의 처리에 의하여 대부분 제거되는 양상을 나타내었다.

鹿茸大補湯 실험군 역시 양성대조군보다는 높았으나 현저하게 감소하는 양상을 나타냈다 (Fig. 9A).

Caspase 3 단백질 신호의 조직상에서의 위치를 조사하기 위하여 scopolamine 처리 해마조직을 고배율에서 관찰한 결과, 대부분의 caspase 신호 (적색)는 핵부위와 일치하지 않는 주변부위에 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 9B).

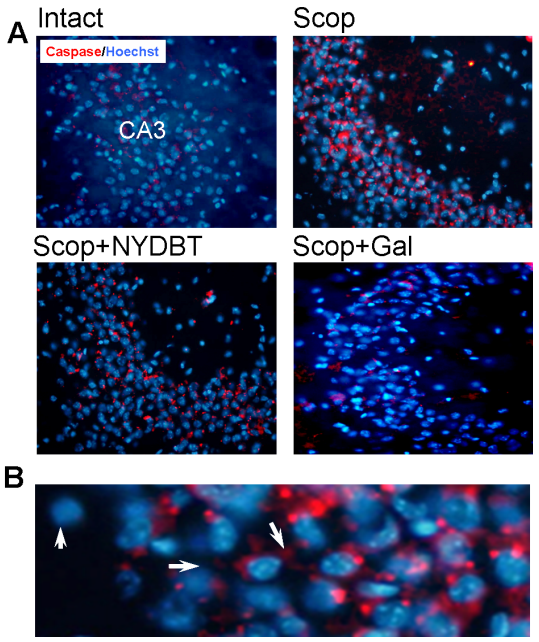


Fig. 9. Micrographic images of caspase 3-labeled cells in hippocampal CA3 region.
Caspase 3-positive cells in CA3 region were identified by red-color staining, and Hoechst nuclear staining (in blue) visualizes CA3 pyramidal cell layer (CA3; blue). (A) Caspase 3-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (Intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus NYDBT (Scop+NYDBT), and scopolamine plus galanthamine (Scop+Gal). (B) Enlarged image in CA3 pyramidal cell layer shows subcellular localization of caspase 3 protein signals and nucleus which does not coincide each other.

6) CA1 pyramidal 세포층의 caspase 3

정상군에는 caspase 3 신호가 전혀 나타나지 않은 반면, 대조군의 caspase 3 신호는 CA1 세포층 뿐 아니라 CA1 수상돌기층에서 강하게 나타났다. 鹿茸大補湯 실험군과 양성대조군의 caspase 3 신호는 대조군에 비하여 다소 감소한 수준으로 나타났다(Fig. 10).

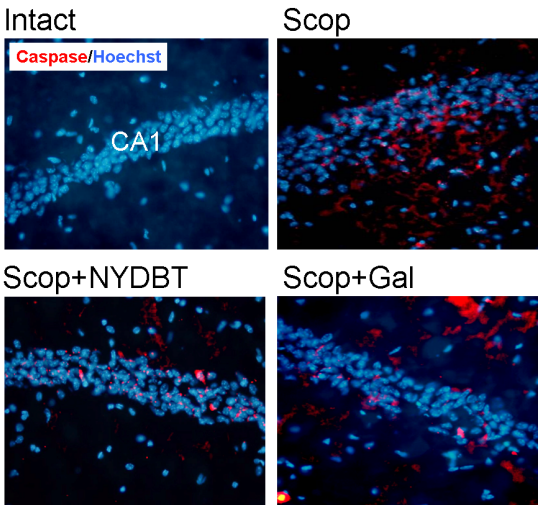


Fig. 10. Micrographic images of caspase 3-labeled cells in hippocampal CA1 region.
Caspase 3-positive cells in CA1 region were identified by red-color staining, and Hoechst nuclear staining (in blue) visualizes CA1 pyramidal cell layer (CA1; blue). Caspase 3-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments such as normal (Intact), scopolamine (Scop), scopolamine plus NYDBT (Scop+NYDBT), and scopolamine plus galanthamine (Scop+Gal).

Ⅳ. 고 찰

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)는 고령자의 두뇌활동의 비정상성을 특징으로 나타내는 퇴행성 질환으로서 지난 수십 년간의 수많은 연구보고에도 불구하고 정확한 원인과 치료방법이 제시되지 못하고 있다. AD의 조직 병리학적 특성으로서 노인반 (amyloid plaque)와 신경섬유다발 (neurofibrillary tangle)을 나타내며, 이러한 특성이 병인 (pathogenesis) 자체를 이해하기 위한 근거로 많은 연구가 진행되고 있다[17-19]. 대표적으로 amyloid precursor protein (APP)을 과발현시킨 유전자 전이 생쥐모델이 개발되었고[2-4], 이후 변이 형태의 APP나 presenilin (PS)을 APP와 동시발현 시키는 생쥐 모델이 개발되어 AD 뇌에서 관찰되는 병리학적 조직 변화에 대한 연구 결과가 보고된 바 있다[5,6]. APP/PS 단백질의 생성조절 뿐 아니라 cholinergic neurons의 활성도 조절에 관한 동물 모델도 제시되었다. Acetylcholine 신경전달물질 수용기의 한 종류인 muscarinic receptor의 차단제인 scopolamine을 흰쥐에 주입할 경우 인지기능의 감소나 기억능력의 감소 등 AD 환자에서 나타나는 행동학적 결과를 초래하는 것으로 보고되었다[7-9].

AD의 발생에 proinflammatory cytokine의 과잉[20], acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase(AChE)의 증가[21], oxidants (free radicals)[20], β-amyloid[21] 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉 amyloid peptide의 축적은 본 peptide의 전구체인 amyloid precursor protein (APP)의 절단에 의하여 생성되는데 이와 관련된 secretase와 생체 단백질, 예를 들어 presinilin 등의 활성화 기전에 대한 연구가 진행되고 있다[17-19].

韓醫學的으로 痴呆는 明代 張[22]의 『景岳全書·癲狂痴獸』에서는 "痴獸症, …… 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 痴獸에 대해 최초로 언급된 이후 淸代의 『辨證奇聞』[23], 『石室秘錄』[24] 등에 呆病의 병인병기와 증상에 관해 기술되었다. 痴呆의 症狀은 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, 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 있으며, 대개 허증은 先天稟賦不足과 기혈이 허약한 것이 많다[24,25].

鹿茸大補湯은 明代 李梴의 『醫學入門』[11]에

기재된 肉蓯蓉, 杜冲, 白芍藥, 白朮, 附子炮, 人參, 肉桂, 半夏, 石斛, 五味子, 鹿茸, 黃芪, 當歸, 白茯苓, 熟地黃, 甘草, 生薑, 大棗로 구성된 처방이다. "治男子 一切虛損 婦人 亡血等證"라 하여 虛勞로 얼굴에 핏기가 없으며 정신상태가 우울하고 허리가 시큰시큰하며 손발이 차고 식은땀이 나며 추위를 타고 遺精이 있으며 몸이 허약한데 쓰는 처방으로 중년기 이후의 허약한 사람, 久病을 앓고 난 후, 빈혈, 불임증, 음위증 등에 쓸 수 있다[12]. 肉蓯蓉, 杜冲, 鹿茸은 補益肝腎, 壯元陽하고, 白朮, 人蔘, 黃芪는 補脾益胃, 固脫生津하고, 白芍藥, 熟地黃, 當歸는 滋陰補血, 養血柔肝하고, 石斛은 益胃生津, 滋陰淸熱하고, 白茯苓, 半夏는 燥濕利水健脾하고, 五味子는 滋腎, 生津하고 氣運을 收斂하며, 附子, 肉桂는 補元陽, 回陽補火하며 通血脈하는 효능이 있고, 甘草는 調和諸藥, 生薑과 大棗는 調和榮衛하는 효능이 있어, 氣血陰陽이 虛한 것을 모두 補하고 元氣가 부족하여 氣血의 운행이 원활하지 못한 것을 치료하는 방제이다.

최근 한의학계에서 痴呆에 대한 실험적 연구[13-15]가 다수 진행되어 왔으며, 최근 서[13]는 鹿茸大補湯이 β-amyloid로 유도된 Alzheimer's 병태 모델에서의 뇌조직 손상에 미치는 영향을 조사한 실험적 연구에서, Lipopolysacchride (LPS)를 처리한 BV2 세포주에서 염증반응 cytokine의 유전자 발현을 관찰하였고, β-amyloid로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억 행동변화를 관찰하였으며, β-amyloid로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 cytokine, 지질과산화도 (MDA)와 CD68/CD11b의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 보고한 바 있다. 이에 저자는 鹿茸大補湯이 先天稟賦不足과 虛損 등으로 인한 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단하여 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 AD 환자에서 관찰되는 퇴행성 뇌 조직의 반응성에 대한 鹿茸大補湯의 세포생물학적 역할을 조사하기 위하여 흰쥐의 배양 척수 조직세포와 뇌의 해마조직세포에서 鹿茸大補湯의 처리에 의한 세포 반응성의 변화를 조사하였다. 첫 번째 실험에서 배양세포를 이용하는 접근방식은 β-amyloid peptide의 처리에 의한 비신경세포의 활성화가 세포사멸과 관련이 있을 것이라는 가설에서 출발하였다. 신경계 조직이 외부적 혹은 내부적 유해성 손상 자극이 주어질 경우 뇌와 척수의 비신경세포 집단에서 가장 많은 숫자로 존재하는 성상교세포의 활성화가 발생하는 것으로 알려져 있다[26-28]. 이러한 활성화 성상교세포 (reactive astrocyte)는 신경조직의 보호 기능을 수행하기 위하여 형태적 변화와 더불어 chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG)와 같은 당단백질의 생성 분비를 통하여 일종의 아교상흔(glial scar)을 형성하여 손상 염증 부위 영역을 최소화하는 역할을 수행한다[29].

조직손상이 계속 진행될 경우 상기 제시한 성상교세포나 손상 자극에 민감한 신경세포 등은 세포 자체의 손상을 통하여 사멸 경로를 취하게 된다. 성상교세포는 신경세포의 기능 수행에 있어서 중요한 보조역할을 수행하기 때문에 성상교세포의 손상은 신경세포의 손상을 초래할 수 있을 것이다. 성상교세포는 신경세포에서 분비한 대사 부산물들을 제거하거나 신경세포에 영양인자를 제공하는 중요한 보조적 역할을 수행하여 동시에 인접한 혈관구조를 감싸고 있어 혈관과 신경조직간의 물질 교환의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[30]. 따라서 비신경세포의 기능적 변화를 이해하는 것은 신경세포의 외부 유해 자극에 대한 반응성의 변화를 이해하는데 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 갓 태어난 생쥐의 척수조직에서 분리 배양한 비신경세포, 즉 아교세포에 β-amyloid의 처리 후 성상교세포의 변화를 먼저 관찰하였다. β-amyloid peptide는 많은 종류의 신경계 조직세포에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있는데,

이러한 독성이 AD 환자의 신경세포의 퇴행과 연관되어 있을 것으로 생각되고 있다. 본 실험에서 10 ㎛로 배양 아교세포에 처리한 후 성상세포의 형태적 변화를 관찰하였을 경우, 성상교세포의 내부 부피가 팽창하는 형태로 변하였는데 이러한 변화는 신경계조직 손상 시 관찰되는 활성화 성상세포의 구조이다. 이러한 세포에 鹿茸大補湯을 처리하였을 경우 세포의 형태가 상당 수준 원래의 정상세포 형태로 변화하는 것을 관찰하였다(Fig. 1-3).

이러한 변화가 세포자체의 생존성의 변화와 어떠한 연관성을 나타내는지 알아보기 위하여 배양세포에 대해 caspase 3 항체를 이용한 면역형광염색 실험을 실시하였다. Caspase 3는 세포자멸(apoptosis) 경로를 통하여 활성화하는 protease 계열의 효소이다. 세포가 외부의 유해적 자극에 노출될 경우 proapoptotic 계열의 Bcl 단백질이 활성화하며 특히 이들이 mitochondria로부터 cytochrome c를 배출시켜 apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1)라고 하는 단백질을 활성화시키며, caspase 3를 비롯한 일련의 신호전달 경로를 통하여 핵부위로 전달된 신호는 DNA의 분해를 초래하고 세포질 부위 특히 세포막 부위로 전달된 신호는 세포골격 단백질들의 분해를 야기하게 된다[31]. 이러한 apoptosis 과정은 급성 유해성 손상자극에 의한 괴사와 구분되는 소위 프로그램화된 자멸경로에 의하여 진행된다. 최근 AD를 비롯한 퇴행성 질환이나 허혈성 손상 등 신경계 질환에서도 세포 자멸이 관여한다는 연구 결과가 보고되고 있다[32-36]. 본 실험의 경우 β-amyloid를 처리한 세포에서 관찰되는 세포의 활성화와 더불어 caspase 3에 대한 면역 형광염색을 수행한 결과 상당수의 아교세포가 caspase 3 양성반응을 나타내었다. 따라서 β-amyloid는 성상교세포의 활성화와 더불어 세포의 자멸 경로를 활성화하는 것으로 추측된다. 이러한 세포들에 대하여 鹿茸大補湯을 처리한 결과 세포의 활성도 감소와 더불어 caspase 3 양성세포의 숫자가 상당히 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 4, 5). Caspase 3는 apoptosis 경로상에서 자멸경로에 들어선 세포에서 비가역적 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서 鹿茸大補湯은 caspase 3의 활성화를 감소하기보다는 apoptosis 초기 유도단계를 제한함으로서 세포의 보호에 관여할 수 있었을 것으로 사료된다.

상기 배양세포를 통한 연구를 통하여 β-amyloid의 처리에 의한 세포손상이 鹿茸大補湯에 의하여 억제될 수 있음을 확인하였다. 따라서 이러한 보호효과가 생체 신경계 조직에서도 진행될 수 있는지 조사하기 위하여 AD의 동물 모델인 scopolamine을 처리한 생쥐에서 鹿茸大補湯의 투여 효과를 조사하였다.

Scopolamine은 acetylcholine 신경전달 물질의 수용기의 한 종류인 muscarinic receptor의 차단제로서 cholienergic neurons의 신경전달을 차단하게 된다[37]. 기존의 연구에 의하면 AD 뇌의 cholinergic neuron의 활성도는 정상인에 비하여 감퇴하여 acethylcholine의 활성도를 증가시키는 방법이 AD 치료의 한 방법으로서 제시된 바 있다. 또한 scopolamine을 실험동물의 신경계에 투여 시 기억을 비롯한 인지기능의 손실을 초래한다는 근거 하에 scopolamine의 처리가 AD의 동물모델의 제작방법으로 제시된 바 있다[9,38]. 본 실험에서 scopolamine을 생쥐에 투여한 결과, 대뇌 해마의 dentate gyrus 부위의 hilus 부위나 CA3 및 CA1 pyramidal cell 층 부위에서 활성화 성상교세포가 정상군 쥐의 동일부위의 활성화 성상교세포에 비하여 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 6-10). 또한 유사한 해마 부위에서 caspase 3 단백질에 대한 형광염색 강도가 증가하는 것을 관찰하였는데, 이는 배양세포에서 관찰한 바와 같이 세포 자멸의 신호전

달경로가 활성화된 것으로 해석된다. 즉 scopolamine의 처리에 의하여 해마 부위에 신경전달물질의 신호를 전달할 것으로 사료되는 acetylcholine의 신경전달이 차단됨으로서 비신경세포인 성상교세포의 활성화와 신경세포인 해마의 신경세포가 사멸경로의 활성화가 초래될 것으로 해석된다.

본 실험결과에 따르면 dentate gyrus 부위의 hilus 부위와 CA3 pyramidal cell 층 부위에서 caspase 3의 단백질 신호가 가장 강하게 관찰되었다(Fig. 8-10). Hilus 부위는 dentate gyrus의 granule cell과 CA3 pyramidal cell이 synapse 신호가 전달되는데 있어 CA3 부위로부터 되먹임 신경신호(feedback signal)를 처리하는 것으로 알려져 있다. 또한 CA3 pyramidal cell은 흥분성 신호에 의하여 탈분극될 때 낮은 역치 값을 나타내어 간질이나 허혈성 손상 자극에 민감하게 반응하는 신경세포이다. 본 실험에서 scopolamine의 자극은 외부자극에 대하여 상대적으로 반응민감도가 큰 신경세포가 손상의 일차적 표적이 된 것으로 사료된다.

이러한 손상반응성을 나타낸 해마조직 세포에 鹿茸大補湯 추출물을 처리한 결과 GFAP 단백질에 의하여 확인된 성상교세포 및 caspase 3 양성 세포의 숫자가 감소하는 것을 관찰하였다. 이는 배양세포에서 유사하게 관찰한 결과로서 AD 연계성 신경조직의 퇴행성 반응에 있어 鹿茸大補湯의 보호효과를 나타내는 결과이다. 鹿茸大補湯이 어떠한 신호전달 경로를 활성화함으로서 이러한 신경보호 효과를 유도할 수 있는가에 대해서는 아직 알려진 바 없다.

본 연구 결과를 요약하면 흰쥐의 배양 척수조직세포와 생쥐의 생체 해마 조직세포에 가해진 손상반응에 대하여 鹿茸大補湯은 해당 세포의 보호효과를 나타내었다. 따라서 鹿茸大補湯은 신경조직 손상으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대해 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 鹿茸大補湯의 작용기전에 대한 연구와 임상 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

鹿茸大補湯이 β-amyloid를 처리한 흰쥐의 배양 척수조직세포와 scopolamine을 주입한 생쥐 신경조직의 손상에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 鹿茸大補湯은 β-amyloid를 처리한 흰쥐 척수조직에서 분리 배양한 성상교세포의 형태를 원래의 정상세포와 유사한 형태로 변화시켰고 성상교세포의 활성도 및 caspase 3 양성 세포의 수를 감소시켰다.

2. 鹿茸大補湯은 scopolamine을 투여한 생쥐의 대뇌 해마의 dentate gyrus 부위의 hilus 부위나 CA3 및 CA1 pyramidal cell 층 부위에서 활성화 성상교세포 및 caspase 3 양성 세포의 수를 감소시켰다.

이상의 결과로 鹿茸大補湯은 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전과 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, 30-4.
2. Gandy SE, Buxbaum JD, Suzuki T,

Ramabhadran TV, Caporaso GL, Nairn AC, Greengard P. The nature and metabolism of potentially amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the Alzheimer β/A4-amyloid precursor protein: some technical notes. Neurobiol Aging. 1992;13(5):601-3.

3. Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. Nature. 1991;352(6332):239-41.
4. Downey D. Pharmacologic management of Alzheimer disease. J Neurosci Nurs. 2008;40(1):55-9.
5. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. Nature. 1995;373(6514):523-7.
6. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, Xu S, Eckman C, Younkin S, Price D, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. Neuron. 1995;15(5):1203-18.
7. Alreja Meenakshi, Min Wu, Weimin Liu, Joshua B. Atkins, Csaba Leranth, and Marya Shanabrough Muscarinic Tone Sustains Impulse Flow in the Septohippocampal GABA But Not Cholinergic Pathway: Implications for Learning and Memory. J. Neurosci. 2000;20:8103-10.
8. Winters Boyer D, Lisa M. Saksida, Timothy J. Bussey. Paradoxical Facilitation of Object Recognition Memory after Infusion of Scopolamine into Perirhinal Cortex: Implications for Cholinergic System Function. J. Neurosci. 2006;26:9520-9.
9. Bellucci A, Luccarini I, Scali C, Prosperi C, Giovannini MG, Pepeu G, Casamenti F. Cholinergic dysfunction, neuronal damage and axonal loss in TgCRND8 mice. Neurobiol Dis. 2006;23(2):260-72.
10. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기도:집문당. 2007:324-33.
11. 李梴. 국역의학입문. 서울:남산당. 1974:96, 102, 880.
12. 동의학사전 편찬위원회. 東醫學辭典. 서울: 동방의학사. 2001:215.
13. 서규태. 鹿茸大補湯이 β-amyloid로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 대구한의대학교 대학원. 2007.
14. 김현수, 이상룡, 정인철. 洗心湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):688-99.
15. 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.
16. Banker G, Goslin, K. Culturing nerve cells. 2nd edition. Cambridge, USA:MIT Press. 2002.
17. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. J Alzheimers Dis. 2008;13(4):359-69.

18. Hua X, Lei M, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M. Pathological and biochemical alterations of astrocytes in ovariectomized rats injected with D-galactose: a potential contribution to Alzheimer's disease processes. Exp Neurol. 2008;210(2):709-18.
19. Dodart JC, May P. Overview on rodent models of Alzheimer's disease. Curr Protoc Neurosci. 2005;Chapter 9:Unit 9.22.
20. 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.
21. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
22. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
23. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
24. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
25. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:洋醫學硏究院. 1985:37, 124, 196, 217-8, 229.
26. Abu-Absi NR, Zamamiri A, Kacmar J, Balogh SJ, Srienc F. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. Cytometry. 2003;51A(2):87-96.
27. Unger JW. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. Microsc Res Tech. 1998;43(1):24-8.
28. Kobayashi K, Hayashi M, Nakano H, Shimazaki M, Sugimori K, Koshino Y. Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease. J Alzheimer's Dis. 2004;6(6):623-32, 673-81.
29. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nat Rev Neurosci. 2006;7(8):617-27.
30. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. Science. 2002;298(5593):556-62.
31. Vassar R. Caspase-3 cleavage of GGA3 stabilizes BACE: implications for Alzheimer's disease. Neuron. 2007;54(5):671-3.
32. Carreiras MC, Marco JL. Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy. Curr Pharm Des. 2004;10(25):3167-75.
33. Simić G, Kostović I, Winblad B, Bogdanović N. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. J Comp Neurol. 1997;379(4):482-94.
34. Marco L, do Carmo Carreiras M. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. Recent Patents CNS Drug Discov. 2006;1(1):105-11.
35. Eckert A, Marques CA, Keil U, Schüssel K, Müller WE. Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci. 2003;1010:604-9.
36. Standridge JB. Vicious cycles within the neuropathophysiologic mechanisms of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2006;3(2):95-108.
37. Litvan I, Sirigu A, Toothman J, Grafman J. What can preservation of autobiographic memory after muscarinic blockade tell us

about the scopolamine model of dementia? Neurology. 1995;45(2):387-9.

38. Raschetti R, Albanese E, Vanacore N, Maggini M. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. PLoS Med. 2007;4(11):338.