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

固眞飮子가 Alzheimer Disease 병태모델의 신경세포 손상에 미치는 영향

김현주, 정인철, 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effect of *Gojineumja(Guzhenyinzi)* on Neural Tissue Degeneration in Mouse Model of Alzheimer Disease

Hyun-Joo Kim, 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 *Gojineumja(Guzhenyinzi, GJEJ)* on damaged neural tissue in cultured glial cells and in the mouse brain tissue.

Methods :
The effects of the GJEJ on activation of astrocytes and caspase 3-positive cell counts in cultured glial cells administered with β-amyloid peptide were investigated.
The effects of the GJEJ on levels of glial fibrillary acidic protein(GFAP)-positive reactive astrocyets and caspase 3-positive cells in the hippocampal subfields in the rats administered with scopolamine were investigated.

Results :
1. GJEJ reduced levels of activated astrocytes and caspase 3-positive cell counts in cultured glial cells administered with β-amyloid peptide.
2. GJEJ reduced levels of GFAP-positive reactive astrocyets and caspase 3-positive cells in the hippocampal subfields in the rats administered with scopolamine.

투고일 : 5/11 수정일 : 5/30 채택일 : 6/13
교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 042-229-6811, E-mail : 7575np@dju.kr

Conclusions :
The present data suggest that GJEJ may have a protective function of neuronal and non-neuronal cells in damaged neural tissue caused by AD-like stimulations. Further studies on identification of effective molecular components of GJEJ and their interactions with damaged neural cells would be important for understanding molecular mechanism and may be further applicable for the development of therapeutic strategies.

Key Words :
Alzheimer's disease(AD), *Gojineumja*(GJEJ), GFAP, Caspase 3

Ⅰ. 서 론

알츠하이머 치매(Alzheimer's disease; AD)는 파킨슨씨병이나 헌팅턴 질병 등과 함께 대표적 신경계 퇴행성질환으로, 인지의 점진적 손상에 따른 정신이상을 시작으로 하여 궁극적으로 사망을 초래하게 된다[1]. AD는 뇌의 전반적인 위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보인다[2].

세포외부에서 amyloid의 축적은 주변 신경조직에 손상을 주게 되는데 특히 amyloid precursor protein(APP)의 분해산물인 β-amyloid peptide는 39-43개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 in vitro 배양세포와 in vivo 투여 시 세포 및 조직에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[3].

AD를 비롯한 신경계질환은 다른 생체질환에 비하여 인간의 생체조직을 이용한 연구를 수행하는데 있어 많은 어려움을 갖고 있기 때문에 실험동물을 이용한 연구가 상대적으로 활발하게 진행되고 있다[4,5].

그 중 생쥐를 이용한 실험동물 모델은 유전자 변형 동물의 개발이 핵심적 연구라고 할 수 있는데, AD의 병인과 가장 관련성이 높은 것으로 확인된 단백질 중 APP와 presenilin(PS) 1, 2 등을 표적으로 한 유전자 전이생쥐(transgenic mouse)의 개발 및 이들을 이용한 AD 뇌조직의 변화 및 AD 기전에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[6].

또한 AD 유사성 뇌조직 퇴행동물모델을 이용한 연구로서 scopolamine을 흰쥐에 주입한 후 뇌의 조직학적 변화 및 행동 변화에 대한 관찰이 수행되고 있다[7].

Scopolamine은 AD 연구 이외에 뇌졸중이나 간질 등 다른 신경계 손상과 연관된 질환연구에도 이용되고 있으나 표적신경세포 및 신경학적 행동특성에 의하여 AD 모델에 적용되고 있다[8].

Scopolamine은 acetylcholine 신경전달의 muscarinic receptor의 억제제로서 cholinergic neuron의 기능을 제어하는 효과를 갖게 된다[7]. 대뇌의 cholinergic neuron 기능의 손실은 AD의 진행과 양성적 관계를 나타내는 것으로 알려져 있다[9].

한의학적으로 痴呆는 '痴獃[10]', '呆病[11,12]', '健忘[13,14]'등의 범주에 속하며, 痴呆의 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이며, 치법은 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다[15].

固眞飮子는 『醫學入門』[16]과 『東醫寶鑑』[17]에는 중년이상의 노인성 질환이나 虛勞와 관련된 질환에 활용되는 처방으로 기록되어있다. 최근 한의학에서 치매에 대한 실험적 연구[18,19]가 진행되어 왔으며 固眞飮子에 대하여 강[20] 은 면역기능에 유효함을 보고한 바 있으나 치매에 관한 연구는 부족한 실정이다 .

이에 저자는 固眞飮子가 精氣不足으로 유발된 노인성 치매의 치료와 예방에도 활용될 수 있을 것으로 판단되어 固眞飮子 열수추출물을 시료로 신생 흰쥐의 척수조직으로부터 분리한 아교세포 상 성상교세포 대한 세포독성을 관찰하고, β-amyloid 처리 배양 아교세포에서 성상교세포의 숫자, 형태와 glial fibrillary acidic protein(GFAP) 양성 세포와 caspase 3-양성 세포 변화를 관찰하였다.

또한 固眞飮子 열수추출물을 시료로 scopolamine으로 유도된 AD 생쥐 모델 해마조직의 dentate gyrus, CA3 pyramidal, CA1 pyramidal 세포층에서 GFAP 양성세포, caspase 3 양성세포를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 固眞飮子(*Gojineumja*, GJEJ)의 처방구성은 『東醫寶鑑』[17]에 준하였으며, 사용한 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table I. Prescription of *Gojineumja(Guzhenyinzi)*

Herbal Name	Galenical Term	Dose(g)
熟地黃	*Rehmammiae Radix preparat*	6.0
山藥	*Dioscoreae Radix*	4.0
人蔘	*Ginseng Radix*	4.0
當歸	*Angelicae gigantis Radix*	4.0
黃芪	*Astragali Radix*	4.0
黃柏	*Phellodendre Cortex*	4.0
陳皮	*Auratii nobilis Pericarpium*	3.0
白茯苓	*Hoelen*	3.2
杜沖	*Eucommiae Cortex*	2.8
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	2.8
白朮	*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*	2.0
澤瀉	*Alismatis Rhizhoma*	2.0
山茱萸	*Corni Fructus*	2.0
破古紙	*Psoraliae Semen*	2.0
五味子	*Masimowicziae Fructus*	2.0
	Total amount	47.8

2) 검액의 조제

대전대 대전한방병원에서 얻은 건조 상태의 固眞飮子(47.8 g)를 증류수 2,000 ㎖를 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 9.41 g을 얻었다(수율; 18.2%). 이를 냉동(-80oC) 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. 치매모델에 사용한 수컷 생쥐는 albino ICR 계열로서 고형사료와 물을 어떠한 제약 없이 섭취하도록 하였

으며, 온도는 22-24oC, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

4) 주요 시약

본 실험에 사용한 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 ㎎/㎖와 0.3 ㎎/㎖이 되도록 증류수에 녹여, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2. 실험방법

1) 척수 비신경세포 배양

본 신경조직세포 배양에 대한 일반적 방법 및 원리는 Banker 와 Goslin [21]의 실험서를 참조하였다. 유리 coverslip을 poly-L-ornithine(0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin(0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA)을 혼합하여 실온에서 precoating 하였다. 출생 후 1일째 되는 새끼 흰쥐에서 척수를 분리하여 ice-cold DMEM medium(Gibco, USA)에 넣었다. 분리한 척수는 type XI collagenase(2500 U/ml, Sigma) 를 포함한 DMEM을 처리하여 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 제거하기위해 3,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. Cell은 type SII trypsin(0.5 mg/ml)을 포함한 DMEM 을 15분간 처리 후 trypsin inhibitor(100 mg/ml), EDTA(1 mM) and DNase I(80 mg/ml) 을 포함한 DMEM으로 5분간 처리하였다. 배양배지(5% heat-inactivated FBS(GIBCO), 5% horse serum, 2 mM glutamine and 1 % penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM) 으로 세척한 1 × 105 개의 성상교세포를 12 mm round coverslip 위에 plating 하고 37℃, 5 % CO2 incubator에서 12시간동안 배양한 뒤 새로운 배지로 갈아주었다. 성상교세포는 固眞飮子(50 mg/ml or 100 mg/ml) 또는 식염수 용액으로 처리하고 48시간동안 배양하였다. Coverslip 위에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose solution 으로 상온에서 45분 동안 고정시킨 후 면역형광염색에 사용하였다. 면역 염색된 세포들은 형광현미경에 연결된 디지털 카메라로 찍고, 그 image를 Photoshop 프로그램에서 분석하였다.

2) Alzheimer's Disease 동물모델의 설립

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

3) Hemotoxylin & Eosin 염색

뇌조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후, H & E 염색을 실시하기 위하여 슬라이드를 Hematoxylin에 1분 동안 담가 둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척하였다. 그 다음 Eosin

에 30초간 담그고 흐르는 증류수에 여러 번 세척하고 에탄올 50%, 70%, 95% 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

생쥐 뇌조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다.

비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:500에 비율로 혼합하여 처리한 후 실온에서 4시간 동안 반응하였다.

일차항체 반응이 끝난 후 PBST(PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 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. Hoechst 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다.

모든 조직시료는 형광현미경 (Nikon fluorescent microscope)을 통해 관찰되어지고, 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 관찰함으로서 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 일차항체는 caspase-3(1:500로 희석, Cell Signaling)와 GFAP(1:1000로 희석, Dako) 이었다.

5) 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 배율상에 얻은 대표적 형광이미지의 면적(290 ㎛ × 180 ㎛) 상에 존재하는 Hoechst33258 염색 양성세포나 GFAP 혹은 caspase3 면역형광 양성세포를 모두 counting 하였다. 또한 동일 실험에 대하여 다른 coverslip에서 배양한 세포에 대해 동일한 방법의 counting을 통하여 세포수치를 구하고 이들에 대한 통계분석을 실시하였다. 중첩이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

6) 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 배양 아교세포에서 성상교세포에 미치는 영향

1) 세포독성

정상군과 固眞飮子 투여군 간의 성상교세포는 다소 형태적 차이는 있었지만 세포질 표면이 돌기구조 모양인 전형적 성상교세포를 보였다. Hoechst33258에 의하여 염색된 전체 세포수는 정상군과 固眞飮子 투여군 간에 전체적으로 유사한 분포를 나타냈다.

2) 세포수

Hoechst33258에 의하여 염색 후 붉은색으로 관찰되는 전체세포 집단의 세포수는 固眞飮子 투여군과 대조군에서 정상군에 비해 많았다. GFAP 양성 성상교세포는 固眞飮子 투여군에서 대조군에 비해 감소하였다. 또한 固眞飮子 투여군의 GFAP 양성 성상교세포는 다소 위축된 세포형태를 보였다.

3) 세포형태

β-amyloid를 처리하지 않은 경우, 정상군과 固眞飮子 투여군에서 관찰되는 성상교세포는 세포질 표면의 별모양이 잘 발달되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 반면 β-amyloid를 처리한 경우, 대조군에서 세포의 비만 형태 관찰되었으나 固眞飮子 투여군에서는 정상군과 유사한 형태를 보였다(Fig. 1).

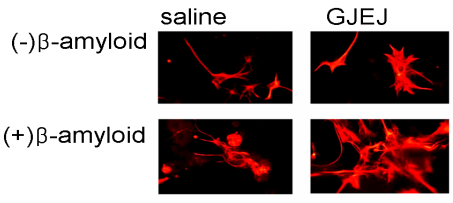


Fig. 3. Comparison of the morphology in GFAP-labeled astrocytes among different experimental groups.
GFAP-positive astrocytes were identified under the fluorescence microscope(red), and enlarged view of the representative cells from different treatments were shown in two set of images in the Figure.

4) 정량적 분석

Hoechst33258에 의하여 염색 관찰되는 전체 세포수는 4개 집단 간에서 전체적으로 유사하게 나타났다(Fig. 2A). GFAP 양성 성상교세포는 정상군에 비하여 대조군에서 높은 수치를 나타내었으나 固眞飮子 투여군은 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2B).

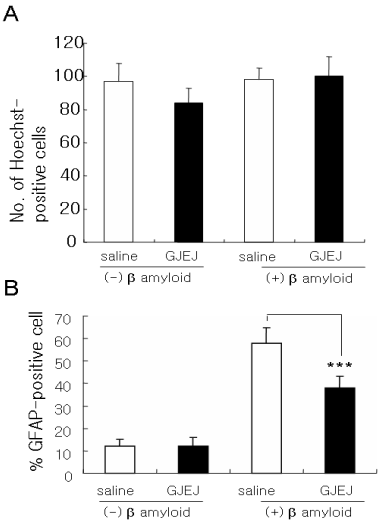


Fig. 2. Comparison of cell counts in culture among different treatments. A. Total cell number in culture.
All of the glial cells in the culture were identified by Hoechst nuclear staining, and GFAP-positive astrocytes were counted in the same field. (A) Comparison of the total cells among different treatments as indicated in the figure did not show any statistical difference. Mean ± SEM, N = 4. (B) Percentage of GFAP-positive astrocytes to 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. *** $p < 0.001$(mean ± SEM, N = 4, Student's t-test)

2. β-amyloid 처리 배양 아교세포에서 세포 자멸에 미치는 영향

1) 세포독성

β-amyloid를 처리하지 않은 경우, 固眞飮子 투여군이나 정상군에서 모두 극소수의 세포만이 caspase 3 양성 형광염색 반응을 나타내었으며 두 집단 간의 생성세포의 수나 형태에서 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았다.

2) Caspase 3 양성 세포 형태

β-amyloid를 처리한 대조군은 전체적으로 caspase 3 양성반응을 나타내는 세포가 빈번하게 관찰되었다. 그러나 固眞飮子 투여군에서는 대조군에 비하여 caspase 3 양성 세포가 감소된 것이 관찰되었다(Fig. 3A). Caspase 3 양성반응을 나타내는 세포들은 Hoeschst33258로 확인된 세포 위치에 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 3B).

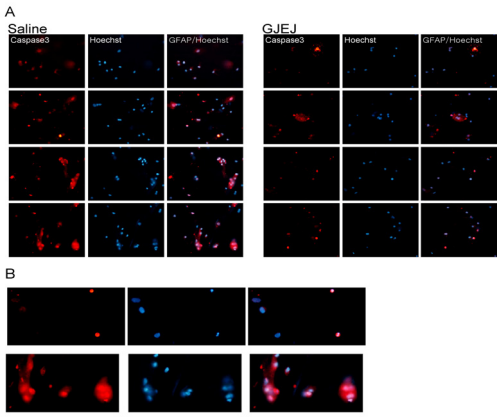


Fig. 3. Comparison of caspase 3-positive cells in culture groups treated with saline or GJEJ in the presence of β-amyloid peptide.

Spinal cord glial cells were exposed to 10 μM β-amyloid peptide treated with saline or GJEJ for 2 days, and fixed for immunofluorescence staining with anti-caspase 3 antibody. (A)Individual cells were identified by Hoechst nuclear staining. Caspase 3 positive cells were seen in red, and Hoechst-stained nuclei in blue. The merged images identify close localization of caspase 3 protein signals with the individual nuclei. Representative four different images for saline or GJEJ group are shown in the Figure. (B) Enlarged views of colonialized images of the signals for caspase 3 protein and Hoechst33258 stained nuclei.

3) Caspase 3 양성세포의 정량적 분석

β-amyloid를 처리하지 않은 경우의 caspase 3 양성 세포수를 정량적으로 분석한 결과, 固眞飮子의 투여로 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4A). 그러나 β-amyloid를 처리한 대조군의 caspase 3 양성 세포수는 약 3배의 증가를 나타냈고 固眞飮子 투여군은 약 65%로 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 4B).

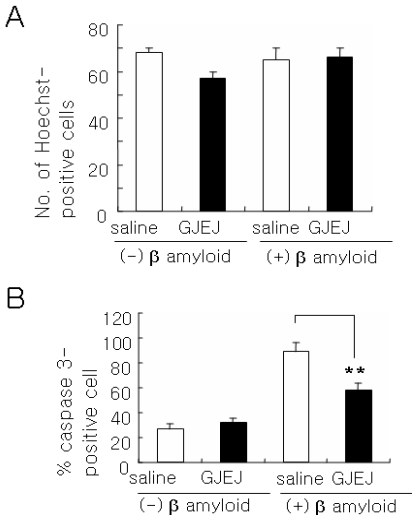


Fig. 4. Comparison of caspase 3-positive glial cell counts among groups given different treatments.

(A) Comparison in nuclear counts after Hoechst33258 staining among different treatments. No statistically significant difference were observed by saline and GJEJ-treated groups in cells with or without β-amyloid peptide treatments. (B) 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 < 0.01, Student's t-test).

3. Scopolamine 처리 AD 생쥐의 해마조직에 대한 영향

1) Dentate gyrus의 성상교세포

정상군의 경우, Hoechst33258에 의하여 염색된 dentate gyrus의 granule cell들은 둥근 입자 모양의 일정한 염색 핵모양을 잘 나타내었으며 적은 수의 GFAP-양성 성상교세포가 관찰되었다. 대조군에서는 정상군에 비하여 많은 수의 GFAP-양성 성상교세포가 확인되었으며, 固眞飮子 투여군의 경우 GFAP 양성세포 수치는 감소하였으며 양성대조군에서 감소된 것과 유사한 결과가 관찰되었다(Fig. 5).

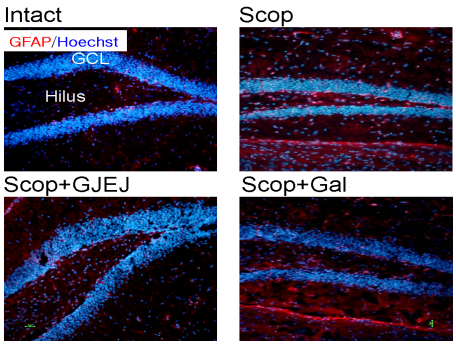


Fig. 5. Micrographic images of hippocampal granule cells and hilus region.
Cells in the granule cell layer(GCL) were identified by Hoechst nuclear staining(in blue), and the astrocytes were detected by immunofluorescence staining with anti-GFAP antibody(in red). Distribution of GFAP-positive astrocytes in the hippocampal sections were compared among different treatments such as normal intact, scopolamine(Scop), scopolamine plus GJEJ(Scop + GJEJ), and scopolamine plus galanthamine(SCOP + Gal).

2) CA3 pyramidal 세포층의 성상교세포

정상군에 비하여 대조군에서 GFAP-양성 성상교세포의 신호가 CA3 세포층과 해마내부영역에서 많이 관찰되었으며 양성대조군과 固眞飮子 투여군에서는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다.

3) CA1 pyramidal 세포층의 성상교세포

정상군에서는 적은 수의 GFAP 양성 성상교세포가 관찰되었고 대조군의 경우는 GFAP 양성 성상교세포의 염색이 CA1 세포층과 인근 비신경세포층에서 증가하였으며, 양성대조군과 固眞飮子 투여군에서는 대조군에 비해서 상대적으로 낮은 수준의 GFAP-양성 성상교세포가 관찰되었다.

4) Dentate gyrus에서 Caspase 3에 미치는 영향

정상군의 경우 caspase 3 양성신호가 관찰되지 않았으나 대조군의 caspase 3 양성신호는 hilus 부위에서 증가한 수준으로 관찰되었다(Fig. 6A). 이러한 caspase 3 단백질 신호는 granule cell layer의 내부의 hilus 영역과 접하는 부위에서 특히 강하게 관찰되었으며 Hoechst33258의 염색에 의하여 확인된 핵 부위에서는 관찰되지 않았다(Fig. 6B). 반면, 固眞飮子 투여군과 양성대조군 모두에서 caspase 3 양성신호는 비슷한 수준으로 현저하게 감소하였다(Fig. 6A).

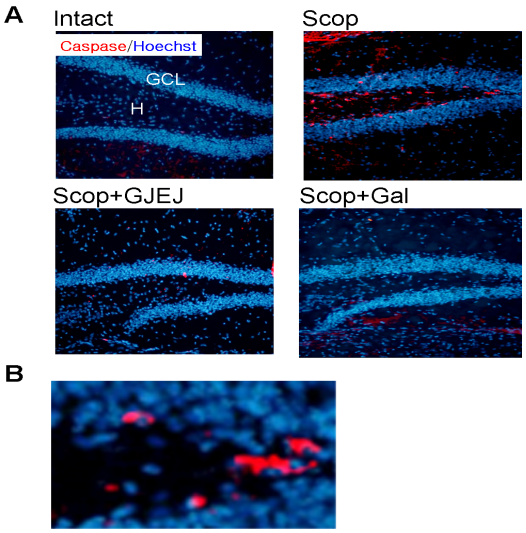


Fig. 6. Tissue distribution of caspase 3-labeled cells in hippocampal dentate gyrus region.
Hoechst nuclear staining(in blue) visualizes densely packed granule cells in the layer(granule cell layer, GCL; blue), and caspase 3-positive cells in dentate gyrus region were identified by red-color staining. (A) Caspase 3-positive cells were illustrated in brain sections given different treatments

such as normal(intact), scopolamine(Scop), scopolamine plus GJEJ(Scop + GJEJ), and scopolamine plus galanthamine(Scop + Gal). (B) Enlarged image in the border between granule cell layer and hilus region shows subcellular localization of caspase 3 protein signals and nucleus which is adjacent but does not coincide each other. H; hilus region.

5) CA3 pyramidal 세포층의 caspase 3

정상군의 경우 CA3 부위에서 caspase 3 양성 신호는 거의 검출되지 않았고 대조군은 CA3 pyramidal 세포층과 인근 부위에서 높은 수준으로 검출되었으며 galanthamine의 처리에 의하여 대부분 제거되는 양상을 나타내었다. 固眞飮子 투여군 역시 양성대조군보다는 높았으나 감소하는 양상을 나타냈다.

6) CA1 pyramidal 세포층에서 caspase 3에 미치는 영향

정상군에는 caspase 3 신호가 전혀 나타나지 않았다. 대조군의 caspase 3 신호는 CA1 세포층에서는 반응을 나타내지 않았으며 인근 비신경세포층 부위에서 강하게 나타났다. 양성대조군의 caspase 3 신호는 대조군에 비하여 감소하였으나 固眞飮子 투여군에는 유의한 변화가 없었다.

Ⅳ. 고 찰

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군으로 65세 이상의 노년 인구에서 2.2~8.8%가 치매환자이며, Alzheimer's disease(AD)의 경우는 유병률이 1.6~15.3%로 보고되고 있다. 치매는 대부분이 만성적이고 비가역적인 질환으로, 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되며 가족과 치매 환자와의 갈등 혹은 적절한 관리의 부재로 인하여 여러 가지 사회적 문제를 초래하는 질환이다[15].

AD는 뇌의 전반적인 위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(nurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며[2], 증상으로 기억, 언어, 시·공간 파악 능력, 실행 능력 및 판단력 등 인지능력의 퇴화와 망상, 의심증, 환각, 우울증 및 인격의 변화 등 행동장애가 나타난다[22].

AD의 기전에는 βA, estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), proinflammatory cytokine의 과잉 및, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데[23-26], 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 아밀로이드 전구단백질(APP)의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다[26].

한편 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데[27,28], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 제시되고 있다[29].

한의학적으로 痴呆는 '呆病[11,12]', '健忘[13,14]'등의 범주에 속하며, 『景岳全書·癲狂痴獃』[10]에는 痴呆와 유사한 개념으로 '痴獃'가 언급되어 있는데, "痴獃症, ... 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....", "凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴獃이라 하여 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있다.

痴呆의 病因에은 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 治法을 응용하고 있다[15].

固眞飮子는 주로 補精시키면서 陰과 陽이 동시에 虛한 것을 補해 주는데 자주 사용하였다. 李[14]의 『醫學入門』에서 固眞飮子를 "이 처방은 五味를 갖추고 氣의 沖和한 것을 含하며 血을 기르고 脾胃를 다스리며 五臟을 補하면서 寒熱의 偏倂과 過不及의 부작용이 없으며 중년이상의 사람이 常服하면 좋은 藥이다"라고 설명하고 있고, 許[17]의 『東醫寶鑑』의 虛勞門에서 "固眞飮子는 陰陽이 다 虛하고, 氣血이 不足하여 飮食 생각이 적고 五心이 煩熱하며 潮熱하고 自汗하여 精氣가 滑脫하고 行步가 無力하며 或 泄瀉하고 脈度가 沈弱 하며 咳嗽 痰多하고 장차 勞瘵가 되려는 症을 다스린다"고 설명되어 있다. 固眞飮子의 처방구성은 熟地黃, 人蔘, 山藥, 當歸, 黃芪, 黃柏, 陳皮, 白茯苓, 杜冲, 甘草, 白朮, 澤瀉, 山茱萸, 破古紙, 五味子[30-32] 등으로 대부분이 補肝腎, 補血藥과 補氣藥으로서 이들 각각의 효능을 살펴보면, 熟地黃은 補血, 滋陰하며 人蔘은 補肺, 益氣하고 山藥은 補脾胃, 益肺腎하며 當歸는 補血和血, 調經止痛하며 黃芪는 補氣, 固表하고 黃柏은 淸熱除濕, 瀉膀胱相火하고 陳皮는 理氣調中하고 白茯苓은 利水滲濕, 建脾和中하고 杜冲은 補肝腎, 壯筋骨하며 甘草는 補脾胃하고 白朮은 補脾益胃, 燥濕利尿하고 澤瀉는 利水, 滲濕하고 山茱萸는 補益肝腎, 澁精하며 破古紙는 補腎, 益脾하고 五味子는 斂肺滋腎, 生津斂汗하는 효능이 있다[30-32].

최근 한의학에서 痴呆에 대한 실험적 연구[18,19]가 진행되어 왔으며, 강[20] 등은 固眞飮子를 시료로 methotrexate을 처리한 생쥐의 면역기능에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 보고한 바 있다. 따라서 固眞飮子는 補肝腎, 補氣血하는 작용으로 精氣不足과 氣血虛弱에서 오는 노인성 치매의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 AD 연계성 신경조직 손상을 유발한 in vitro 배양 아교세포와 in vivo 해마조직에서 固眞飮子의 세포 보호 효과에 대하여 조사하였다. 배양세포를 이용한 연구에서는 신생 흰쥐의 척수조직에서 분리배양한 아교세포를 이용하였으며 β-amyloid peptide의 처리에 의한 변화를 관찰하였다. β-amyloid peptide는 APP 단백질의 비정상적 절단에 의하여 생성되어 노인반 형성에 핵심적 역할을 하며 그 자체가 신경계 조직세포에서 Ca^{2+} 항상성의 교란을 초래함으로서 세포독성을 유도하는 것으로 알려져 있다[33-35].

본 실험에서는 배양 아교세포에 β-amyloid를 처리한 경우 성상교세포의 활성도와 caspase 3 활성도의 증가가 주로 관찰되었다. 성상교세포는 중추신경계의 전체세포수의 90%를 차지하는 아교세포 집단에서 70% 이상을 차지하는 대표적 중추신경계 비신경세포이다. 성상교세포는 신경계 조직상의 염증반응 등 손상자극에 의하여 그 숫자는 더욱 증가함과 동시에 활성화 되는데, 이렇게 활성화 성상교세포(reactive astrocyte)는 외부손상 자극에 대한 보호반응으로서 아교상흔(glial scar)을 형성하여 염증반응을 최소화하는데 관여한다[36].

중추신경계 조직이 손상자극을 받으면 손상부위에서 희소돌기 세포나 세포 사멸경로를 통하여 제거된다. 본 실험에서 β-amyloid를 처리한 배양 아교세포 집단에서 성상교세포의 표지단백질인 GFAP에 의하여 염색된 성상교세포의 숫자가 증가하는 것이 관찰됐으며 이들 세포들의 형태는 내부면역이 증가함으로서 활성화 세포의 형태를 나타내었다. 동시에 caspase 3에 의하여 염색된 세포 수는 β-amyloid 처리에 의하여 증가하였다. Caspase 3은 세포의 자멸(apoptosis) 경로상에서 비가역적 자멸경로를 활성화하는 단백질분해효소(protease)이다[37]. 세포외부의 stress 등의 유해성 자극에 의하여 유도된 proapoptotic 단백질인 Bad나 Bax 등으로

부터 유도된 신호가, 미토콘드리아의 cytochrome c 배출을 유도하여 apoptosis activating factor(APAF)를 활성화시키고 이는 procaspase 3를 caspase 3로 전화시킴으로서 세포사멸을 수행하게 된다. Caspase 3는 DNA 분해효소의 활성화나 세포골격단백질의 분해를 유도하여 DNA 응축 및 세포구조의 위축을 초래하여 주변의 탐식세포에 의한 제거를 유도한다[38].

본 실험 결과에 따르면 固眞飮子의 투여로 β-amyloid 처리에 의하여 증가한 성상교세포나 caspase 3 양성 세포 수가 정상군과 유사한 수준으로 감소하는 것이 관찰되었다. 이러한 실험결과는 固眞飮子가 β-amyloid의 처리에 의하여 야기된 성상교세포의 활성화 및 세포자멸경로의 활성화를 억제하였을 것으로 추정된다. β-amyloid peptide는 표적세포에 반응시 세포내 Ca^{2+} 농도를 장기적으로 증가시킴으로서 Ca^{2+} 의존성 단백질 분해효소의 활성화를 통하여 세포기능의 핵심적인 단백질의 분해를 통하여 세포의 사멸을 초래한다. 이러한 작용기전이 본 실험결과에 적용된다면 固眞飮子가 항산화 작용에 의한 세포보호 기전의 활성화에 기여할 수 있다는 가능성을 가정할 수 있다.

또한 固眞飮子의 신경조직세포에 대한 효과를 in vivo 신경조직에서 조사하기 위하여 생쥐에 scopolamine을 투여한 해마조직에서 固眞飮子 처리효과를 조사하였다. 해마조직은 장기기억 형성과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 기타 허혈손상(예- 뇌졸중), 간질 등의 신경세포의 흥분성 조절의 교란에 의하여 발생하는 신경손상 과정에 민감한 조직이다[8]. 해마는 기본적으로 dentate gyrus와 CA1 - CA4 pyramidal cell 층으로 구성되며 해마를 통하여 세 개의 주요신경경로(trisynaptic circuit)에 의하여 연결되어 있으며, 외부로부터 cholinergic, adrenergic 또는 dopaminergic neuron의 자극에 의하여 신경경로의 활성도가 조절되는 것으로 알려져 있다[39-44]. 특히 해마의 postsynaptic 말단부위에 존재하는 NMDA 수용기의 활성화는 신경회로 가소성의 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 해마조직은 또한 인간 치매 환자의 대뇌 피질부위와 함께 구조적 위축이 발생하는 것으로 보고된 바 있다.

본 연구에서는 scopolamine을 주입한 생쥐의 해마조직에서 성상교세포 및 caspase 3 양성세포의 변화를 관찰하였다.

Scopolamine은 muscarinic receptor의 억제제로서 신경세포간의 전기적 신호전달에 교란을 유발하는 것으로 알려져 있다[7,45-47]. Acetylcholine 수용기중의 하나인 muscarinic receptor는 metabotrophic receptor 계열에 속하며 억제성 및 흥분성 신호전달에 관여한다. AD 환자의 경우 cholinergic neuron의 퇴화는 이미 1950-1960년대에 제시된 바 있으며 이러한 cholinergic neuron의 활성화를 조절하려는 약리학적 방법이 치료의 한 방법으로 제시된 바 있다[48].

대표적 약물로서 galanthamine을 들 수 있는데 이는 acetylcholinesterase로서 작용하기 때문에 presynaptic 말단에서 분비된 acetylcholine이 postsynaptic 말단의 수용기에 작용 후 synaptic cleft에서 분해되는 것을 억제함으로서 신경신호의 전달강도를 계속적으로 유지시키는 역할을 수행한다[49-51]. 최근 연구보고에 따르면 galanthamine은 AD 환자의 인지기능 개선이나 뇌 기능 향상에 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[52-55]. 본 연구에서는 scopolamine의 처리에 의하여 유도된 해마의 성상교세포의 활성화와 caspase 3 양성세포 수의 증가가 galanthamine 처리를 통해 억제되어 scopolamine의 신경세포 및 성상교세포에 대한 잠재적 손상작용을 감소시키는 것으로 확인하였다. 이러한 결과는 scopolamine 유도성 성상세포 및 세포 자멸 경로의 활성화가 AD 병태

동물모델로서 적합하다는 것을 지지한다고 할 수 있다.

Scopolamine 처리 생쥐에 固眞飮子를 투여한 결과, galanthamine 처리에 의하여 유도된 것과 유사하게 성상교세포의 활성화와 caspase 3 양성세포 증가를 억제하는 결과가 관찰되었다. 固眞飮子 처리효과는 해마조직 중 dentate gyrus 부위의 hilus 부위와 CA1 그리고 CA3 부위에서 손상반응에 대한 억제양상으로 주로 관찰되었다. Dentate gyrus 부위의 hilus 부분은 CA3 pyramidal cell로부터 feedback 신호를 받아 해마의 신경회로상의 신호전달의 조절역할을 하는 것으로 알려져 있다[56-58]. 이곳에 존재하는 신경세포는 흥분성 및 억제성 신경세포가 공존하여 신호전달의 해상도를 높이는 역할을 수행하는 것으로 생각되고 있다. 이 부위의 세포는 외부의 cholinergic neuron의 신호에 반응하기 때문에 scopolamine 처리에 의한 생리적 기능변화가 유도되었을 것으로 생각되며 아마도 固眞飮子는 galanthamine과 마찬가지로 cholinergic neuron의 신호전달을 안정화하면서 해마기능의 회복에 관여하였을 것으로 해석된다. 유사하게 CA3 및 CA1 부위의 신경세포 및 비신경 성상교세포의 활성화 회복도 cholinergic neuron의 활성도 회복과 연관되어 있을 것으로 추측된다.

이상의 결과로 固眞飮子가 AD 연계성 신경조직 손상을 유발한 배양 아교세포와 해마조직에서 세포보호 효과가 있다는 것을 알 수 있고 향후 固眞飮子의 분자수준의 약효규명에 대한 연구와 임상적 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

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

固眞飮子 처리에 의한 Alzheimer disease 병태모델의 신경세포 손상에 미치는 영향을 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 固眞飮子는 β-amyloid를 처리한 배양 아교세포 상에서 GFAP 양성반응 성상교세포와 caspase 3 양성 세포의 활성 수준을 감소시켰다.

2. 固眞飮子는 scopolamine을 처리한 생쥐의 해마조직 상에서 GFAP 양성반응 성상교세포와 caspase 3 양성 세포의 수를 감소시켰다.

이상의 결과로 固眞飮子은 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 작용기전과 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006;368(9533):387-403.
2. 이광우. 임상신경학. 서울:고려의학. 2002:203-8.
3. Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid β-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. J Clin Invest.

2002;110(10):1375-81.
4. Dodart JC, May P. Overview on rodent models of Alzheimer's disease. Curr Protoc Neurosci. 2005;9(9):22.
5. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Nat Rev Neurosci. 2008:9(7):532-44.
6. Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003:43:545-84.
7. Winters Boyer D, Lisa M. Saksida, and 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.
8. During MJ, Symes CW, Lawlor PA, Lin J, Dunning J, Fitzsimons HL, Poulsen D, Leone P, Xu R, Dicker BL, Lipski J, Young D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. Science. 2000:287(5457):1453-60.
9. Elliott J Mufson, Scott E Counts, Sylvia E Perez and Stephen D Ginsberg. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease; therapeutic implications. Expert Review of Neurotherapeutics. 2008:8(11):1703-18.
10. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
11. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
12. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
13. 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.
14. 朱震亨. 金櫃鉤玄. 서울:鼎談出版社. 1992:306-7.
15. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울:집문당. 2007:311-20, 324-33.
16. 李梴. 編註醫學入門. 서울:南山堂. 1988:419-20.
17. 許浚. 東醫寶鑑, 重版. 서울:南山堂. 1966:447.
18. 김현수, 이상룡, 정인철. 洗心湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):688-99.
19. 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.
20. 강대원, 강석봉. 固眞飮子가 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2004;25(4):117-28.
21. Banker G, Goslin, K. Culturing nerve cells, second edition. Cambridge:MIT Press. 2002.
22. National Institute on Aging. National Institute on Health, Progress Report on Alzheimer's Disease. 1999.
23. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
24. 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.
25. 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.

26. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
27. 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):691-99.
28. de Vente J, Markerink-van Ittersum M, van Abeelen J, Emson PC, Axer H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain ; effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. Eur J Neurosci. 2000;12(2):507-519.
29. 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):187～194.
30. 李尙仁. 本草學, 改訂 增補版. 서울:修書院. 1981:51-60, 70-1, 85-6, 101-3, 106-7, 114-6, 172-3, 281-2, 285-6, 348-9, 507-9.
31. 辛民敎. 原色 臨床本草學, 改訂4版. 서울:永林社. 1994:166-7, 169-73, 175-7, 198-9, 207-8, 219, 221-2, 241-4, 250-3, 312-3, 380-1.
32. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港:商務印書館. 1983:200-2, 226-30, 350-2, 511-5, 517-20, 520-2, 525-7, 538-40, 555-7, 561-2, 564-6, 589-92.
33. 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.
34. Standridge JB. Vicious cycles within the neuropathophysiologic mechanisms of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2006;3(2):95-108.
35. Unger JW. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. Microsc Res Tech. 1998;43(1):24-8.
36. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. Nat Med. 2006;12(7):829-34.
37. Rich T, Watson CJ, Wyllie A. Apoptosis: the germs of death. Nat Cell Biol. 1999;1(3):E69-71.
38. Vassar R. Caspase-3 cleavage of GGA3 stabilizes BACE: implications for Alzheimer's disease. Neuron. 2007;54(5):671-3.
39. Yee AS, Longacher JM, Staley KJ. Convulsant and anticonvulsant effects on spontaneous CA3 population bursts. J Neurophysiol. 2003;89(1):427-41.
40. Wallenstein GV, Hasselmo ME. Functional transitions between epileptiform-like activity and associative memory in hippocampal region CA3. Brain Res Bull. 1997;43(5):485-93.
41. Weiss C, Preston AR, Matthew M. Oh, Roy D. Schwarz, Devin Welty, and John F.

Disterhoft. The M1 Muscarinic Agonist CI-1017 Facilitates Trace Eyeblink Conditioning in Aging Rabbits and Increases the Excitability of CA1 Pyramidal Neurons. J. Neurosci, 2000;20:783-90.

42. Nobili L, Sannita WG. Cholinergic modulation, visual function and Alzheimer's dementia, Vision Res. 1997;37(24):3559-71.
43. Saber AJ, Cain DP. Combined β -adrenergic and cholinergic antagonism produces behavioral and cognitive impairments in the water maze: implications for Alzheimer disease and pharmacotherapy with β-adrenergic antagonists. Neuropsychopharmacology. 2003;28(7):1247-56.
44. Hartmann J, Erb C, Ebert U, Baumann KH, Popp A, König G, Klein J. Central cholinergic functions in human amyloid precursor protein knock-in/presenilin-1 transgenic mice. Neuroscience. 2004;125(4):1009-17.
45. 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.
46. Liskowsky W, Schliebs R. Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. Int J Dev Neurosci. 2006;24(2-3):149-56.
47. 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.
48. 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 Alzheimers Dis. 2004;6(6):623-32, 673-81.
49. 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.
50. Kertesz A, Morlog D, Light M, Blair M, Davidson W, Jesso S, Brashear R. Galantamine in frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. Dement Geriatr Cogn Disord. 2008;25(2):178-85.
51. Villarroya M, García AG, Marco-Contelles J, López MG. An update on the pharmacology of galantamine. Expert Opin Investig Drugs. 2007;16(12):1987-98.
52. Razay G, Wilcock GK. Galantamine in Alzheimer's disease. Expert Rev Neurother. 2008;8(1):9-17.
53. 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.
54. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis, Clin Interv Aging. 2008;3(2):211-25.

55. Winblad B, Gauthier S, Scinto L, Feldman H, Wilcock GK, Truyen L, Mayorga AJ, Wang D, Brashear HR, Nye JS; GAL-INT-11/18 Study Group, Safety and efficacy of galantamine in subjects with mild cognitive impairment, Neurology. 2008;70(22):2024-35.
56. Leung LW, Yim CY. Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. Brain Res. 1991;553(2):261-74.
57. Leung LS, Shen B, Nagalingam N, and Ma J. Cholinergic Activity Enhances Hippocampal Long-Term Potentiation in CA1 during Walking in Rats. J. Neurosci. 2003;23:9297-304.
58. Houser CR. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. Prog Brain Res. 2007;163:217-32.