동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):71-88

獨活地黃湯이 βA로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

전미연, 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of Dokhwaljihwang-tang(*Duhuodihuangtang*) on the Alzheimer's Disease Model Induced by βA

Mi-Yean Jeon, Sang-Ryong Lee

Dept. of Oriental Neuropsychiatry College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Abstract

Objectives :

This research investigates the effect of the DHJHT extract on Alzheimer's disease. Specifically, the effects of the DHJHT extract on (1) the behavior (2) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in AD mice induced with βA were investigated.

Methods :

The effects of the DHJHT extract on the proinflammation cytokines mRNA expression and production of BACE, APP and βA in in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) plus βA were investigated. The effects of the DHJHT extract on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :

1. The DHJHT extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and NOS-II, BACE and APP mRNA in BV2 microglial cell line treated by LPS plus βA.
2. The DHJHT extract suppressed the expression of βA production in BV2 microglial cell line treated with LPS plus βA.
3. The DHJHT extract showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze.
4. The DHJHT group suppressed the expression of IL-1β, TNF-α, MDA, and CD68+/CD11b+ in the brain tissue of the mice with AD induced by βA.
5. The DHJHT group reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of the brain tissue in the mice with AD induced by βA.
6. The DHJHT group reduced tau protein, and GFAP in the brain tissue of the mice with AD induced by βA.

Conclusions :

These results suggest that the DHJHT group may be effective for the treatment of AD. Thus, DHJHT could be considered among the future therapeutic drugs indicated for the treatment of AD.

Key Words :

Alzheimer's disease, Dokhwaljihwang-tang(*Duhuodihuangtang*), Memory deficit, Proinflammatory cytokines

투고 : 2010. 2. 6. 수정 : 2010. 3. 10. 채택 : 2010. 3. 11.
교신저자 : 이상룡, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel) 043-229-3726, E-mail) 7575np@dju.kr
이 논문은 2010년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

치매는 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 생기고, 기억사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위 대뇌기능 장애로 이루어진 증후군으로 정의하고 있다. 치매의 원인 및 발병기전이 확실히 밝혀지지 않았지만, 대뇌피질을 침범하는 신경계 퇴행성 질환인 Alzheimer's disease (AD)가 대표적이다[1].

AD는 β amyloid peptide(βA), estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), oxidants(free radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[2]. 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 βA가 과량으로 만들어지게 되고, 이 βA의 침적으로 생긴 노인반(senile plaques)의 신경독성으로 인해 신경세포가 파괴된다는 것이다[3,4].

한의학에서 치매는 痴獃, 呆病, 健忘 등의 범주에 속하며, 病因은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷, 他病 등이고 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[5].

獨活地黃湯은 『東醫壽世保元』에 처음 기재된 처방으로 少陽人 胃受熱裏熱病論에서 少陽人의 中風, 吐血 등에 사용된 처방이다. 『東醫壽世保元』에서 이 처방의 의도는 단지 補腎水하는 의미에 국한되지 않고 陰陽이 모두 약해 淸陽이 상승하지 못하여 발생한 병증에 補함으로써 淸陽을 상승하도록 하는데 그 목적이 있다[6]. 선행연구로는 위장과 중추신경에 미치는 효능에 관한 실험연구[7]와 노화에 따른 생체기능 저하를 개선하는 효과를 보여주는 연구가 발표된바 있다[8]. 또한 퇴행적이고 소모적인 상태에 응용할 수 있다[9]는 주장도 제기되었다. 따라서 獨活地黃湯이 노화로 인하여 腎水가 고갈되었거나 淸陽이 상승되지 못하여 나타난 치매에 유의한 효과를 나타날 것으로 판단하여 이와 같은 연구를 진행하였다.

이에 저자는 lipopolysacchride(LPS)와 βA를 처리한 BV2 microglial cell line에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II mRNA 발현을 관찰하였으며, BACE와 APP mRNA 발현, 그리고 βA 생산량 및 Nitric Oxide(NO) 분비량을 관찰하였다. 또한 APP 발현량을 western blot으로 관찰하였다. 한편 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억 행동변화를 측정하였고, 생쥐의 뇌세포를 분석하여 pro-inflammatory cytokine, 지질과산화도(MDA), CD68+/CD11b+와 acetylcholinesterase(AChE)의 발현을 관찰하였으며, 뇌조직의 허혈상태, 조직손상의 변화를 면역화학조직염색법으로 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$, percoll, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), 2-isopropanol, aricept, antibiotics는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, 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, RNAzol[B]는 Tel-Test사(USA) 제품을, 그리고, Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, βA(Calbiochem, 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), anti-mouse GFAP mAb와 anti-mouse Tau mAb는 Santa-Cruz 사(California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사(Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japen), 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, MI., USA), Quantitative Real-Time RT-PCR(Applied Biosystems, USA), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA leader(Molecular devise, USA), CO_2 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

암컷 8 주령의 SPF(specific pathogen-free) C57bl/6(18~20 g)는 오리엔트바이오(Korea)사에서 공급받아 그룹 당 8마리씩 총 40마리를 대상으로 하였다. 동물은 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사, Kr)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간(light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 대전대학교 동물실험윤리위원회(IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 (승인번호:DJUARB-200941)을 받았다.

3) 약물

본 실험에 사용한 獨活地黃湯(DokHwalJiHwangTang, DHJHT)의 구성은 『東醫壽世保元』[10]에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 구성은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Composition of Dokhwaljihwang-tang (DHJHT)

Herb name	Scientific name	Dose(g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	16 g
山茱萸	*Corni Fructus*	6 g
茯苓	*Poria*	6 g
澤瀉	*Alismatis Rhizoma*	6 g
牧丹皮	*Moutan Cortex*	4 g
防風	*LEdebouriellae Radix*	4 g
獨活	*Angelicae Pubescentis Radix*	4 g
	Total amount	46 g

4) DHJHT 추출물 분리

DHJHT 3첩 분량 (138 g)에 증류수 2,000 ㎖를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과한 뒤 이를 감압 증류장치(rotary vaccum evaporator)로 농축하여, 다시 동결 건조기(freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 DHJHT 추출물 24.2 g을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) BV2 microglaial cell 배양 및 염증억제 측정

(1) 세포배양

본 실험에서 사용된 BV2 microglial cell line은 primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogene을 감염시켜 만들어진 cell line이며 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary cell과 같다[14]. 동결된 BV2 microglial cell line을 해동하여 10% FBS-DMEM(Cellgro, USA) 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS-DMEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV2 microglial cell 의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS-DMEM 배지에서 안정화시킨 BV2 microglial cell을 *in vitro* 모델로 사용하였다[11].

(2) 배양 조건 및 DHJHT 처리

DHJHT를 처리하기 전 BV2 microglial cell을 24시간 동안 serum-free DMEM으로 배양한 후 10 ㎍/㎖ LPS(Sigma, USA)와 25 μM synthetic βA fragment, residues βA 25-35, LPS와 βA 25 μM에 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 μM, MDL 28170)을 처리하고, 6시간 또는 40시간을 배양하였다[12].

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

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 DHJHT 추출물을 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고 1시간 후 LPS 10 ㎍/㎖와 βA 25 μM를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하여 pro-inflammatory cytokine 의 유전자 발현을 관찰하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

먼저 BV2 microglial cell line은 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 DHJHT 추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(10 ㎍/㎖)와 βA 25 μM를 각각의 well에 첨가한 후 6 시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 μM, MDL 28170)를 처리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^B 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 세척하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating

block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I(10 U/㎕) 2 U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1 ㎕의 M-MLV RT (200 U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 121℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다[13].

③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다.

pro-inflammatory cytokine 및 anti-proinflammatory cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 mins at 50℃, 10 mins 94℃, 그리고 40 cycles을 0.15 mins at 121℃, 1 min at 60℃에서 수행하였다. 각 군의 quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

y=x(1+e)n

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

사용된 primer는 다음과 같다.

mouse G3PDH
Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
mouse TNF-alpha
Forward Primer:5' CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer: 5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
mouse IL-6
Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
mouse IL-1beta
Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
mouse COX-2
Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
mouse NOS-II
Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

3) BV2 microglial cell line 배양상층액내 βA 생성량 측정

BV2 microglial cell line를 실험 3일전에 subculture(1×10^5 cells/㎖) 하여 96 well plate에 $2x10^5$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시킨다. DHJHT (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (10 ㎍/ml)와 βA 25 μM, 그리고 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 μM, MDL 28170)을 처리한다. 24시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 DHJHT(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 40 시간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 βA 생성량을 ELISA

(Code No. 27720, Mouse/Rat βA(1-40) High Specific Assay Kit으로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 ㎕(1/100 dilution)씩 분주하한 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 leader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다[14].

4) APP activity 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1×10^5 cells/㎖) 하여 96 well plate에 $2x10^5$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시킨다. DHJHT (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (10 μM)와 βA(25-35) 25 μM, 그리고 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 μM, MDL 28170)을 처리한다. 24시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 DHJHT(50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖)을 처리하고 40 시간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 APP activity를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50 ㎕의 lysis 완충용액 {Tris-HCl (200 mM; pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 ㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법[15]으로 단백질을 정량하여 50 ㎍으로 조정하였다.

(2) APP의 immunoblotting 분석

세포성 lysate(50 ㎍)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후 anti-mouse APP N-terminal antibody를 처리하여 4℃에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

6) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

(1) DHJHT 및 aricept 투여

DHJHT 484 mg/kg (mpk)과 121 mpk를 AD 병태 생쥐에 매일 1회 8주 동안 경구투여 하였다. 그리고 양성대조군으로 AD에 사용되는 acethylcholinesterase inhibitor인 aricept를 3 mpk로 주 3회 투여하였다[16].

(2) C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 ㅿA 주입

βA(10μM)를 준비하고 C57bl/6생쥐에 10% chloral hydrate(0.1 ㎖)를 복강주사하여 마취하여 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐뇌의 피부를 박리하였다. AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10 μM)를 hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma에서 caudal방향으로 1.2 ㎜, midline에서 right로 0.7 ㎜, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1 ㎜로 microinjector의 injection speed 0.1 ㎕/min와 total volume 0.5 ㎕의 조건으로 수행하였다. βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 양성대조군인 Aricept 투여군(3 mpk), DHJHT 투여군(484 mpk와 121 mpk)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

(3) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주일간 DHJHT을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90 cm이고 높이가 약 30 cm인 수조에 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(aricept투여군), DHJHT 추출물투여군(484 mpk와 121 mpk)로 분류하였고, 계속 8주 동안 1일 1회 약물 투여와 1주 1회 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(4) 행동 관찰

훈련과 DHJHT 투여 종료 후 9주째에 AD 병태 생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, video track으로 행동을 측정하였고 video track software로 분석하였다.

7) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 DHJHT 추출물 484 mpk와 121 mpk 경구투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. 뇌를 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 cellection Pan anti-mouse IgG-bead로 microglial cell을 분리한 후 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

(2) microglial cell내 pro-inflammatory cytokine 염색법

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 세척하고, FACS 완충용액 284 ㎕와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 세척하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1β와 FITC-anti-TNF-α를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization완충용액으로 3회 세척하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 Cell Quest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[17]에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200 ul를 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 ul를 가하고 5초 동안 vortex mixer로 mixing한다. 20% acetic acid 1.5 ㎖을 가하고 그리고 75 ul 증류수를 넣고 5초 동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% thiobarbituric acid solu.을 각각의 1 ㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) AD 병태 생쥐의 뇌세포 형광 유세포 분석

AD 유발 생쥐에서 허혈이 일어난 뇌조직을 잘게 chopping한 후 cell strainer(BD, Falcon)에 넣고 3 ml syringe rubber로 뇌조직을 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수한다. 회수된 부유액을 0/50/70% percoll gradient(Sigma) 3 ml과 뇌세포 부유액 1 ml을 gradient를 만든 다음 2400 rpm에서 30분간 원심분리를 한 후 microglia 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD68, 그리고 FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD68 세포수를 분석하였다.

8) AChE 활성도 측정

AChE 활성도는 cholinesterase kit로 측정하였다. 혈청 중 AChE 활성도를 측정하기 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2 ㎖와 serum 0.2 ㎖를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에 3.0 ㎖ water, nitrophenol solution (cat. No. 420-2) 2 ㎖, acetylcholine chloride solution 0.2 ㎖을 첨가한다. acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 △A = ABLANK - ATEST 공식에 의하여 활성도를 측정하였다[18].

9) AD 병태 생쥐 뇌조직에서 허혈 및 조직 손상에 미치는 영향

(1) 뇌조직의 허혈 크기 측정

AD 병태 생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2 ㎜의 두께로 자른 후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Brian의 방법[19]으로 수행하였다. 허혈의 크기(*AT*)는 [(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]이고, *A*는 사진 상에 나타난 허혈 면적, *ST*는 각각 section(2 ㎜)의 전체 면적. brain hipocampus (BH)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (*AT* of area at risk/*ST* of BH) × 100로 분석하였다[20].

(2) 병리조직검사

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 세척한 후 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

(3) 면역화학조직염색

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 조직절편을 4 μm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다.

① Tau protein

Primary mouse tau Ab를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, PBST로 2회 세척하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20용액으로 3회 세척하였고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 세척하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색 후 2회 세척하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 세척하여 permount를 수행하여 광학현미경으로 관찰하였다[21].

② GFAT

Primary mouse GFAT Ab를 1:400으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, PBST로 2회 세척하였다. 다시 mouse post prymary Ab를 8분간 염색 후 PBST로 3회 세척한 후 polymer-HRP로 8분간 염색 후 다시 2회 세척하였다. 그리고 DAB로 5분간 염색 후 2회 세척하고 hematoxylen로 5분 염색 후 2회 세척하여 permount를 수행하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluoroseince microscope)을 사용하여 ×100 배율로 관찰하였다[22].

10) 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 SPSS v12.0을 이용하여 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. DHJHT의 염증유전자 발현 억제 효과

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군의 IL-1β mRNA 발현은 0.038±0.004 (RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170) 에서는 0.473±0.201 (RQ)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.686±0.038 과 0.797±0.057 (RQ)로 나타났다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군의 IL-6 mRNA 발현은 0.011±0.003 (RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170)에서는 0.330±0.086 (RQ)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖와 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.692±0.095 과 0.864±0.123 (RQ)로 나타났다.

3) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군의 TNF-α mRNA 발현은 0.059±0.047 (RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170)에서는 0.274±0.024 (RQ)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.469±0.105와 0.658±0.032 (RQ)로 나타났다.

4) COX-2와 NOS-II mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준할 때, 정상군의 COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 각각 0.020±0.016와 0.015±0.010 (RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170) 에서는 각각 0.332±0.038과 0.390±0.006 (RQ)로 나타났다. COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 DHJHT 100 ㎍/㎖ 처리군에서는 0.534±0.103과 0.536±0.096 (RQ)로 나타

났고, DHJHT 추출물 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 0.625±0.107과 0.842±0.001 (RQ)로 나타났다.

2. DHJHT의 AD 유전자 발현 억제 효과

1) BACE mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 BACE mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000을 기준할 때, 정상군의 BACE mRNA 발현은 0.191±0.088 (RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170)에서는 0.341±0.143 (RQ)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.695±0.163과 0.889±0.047 (RQ)로 나타났다.

2) APP mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 APP mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준할 때, 정상군의 APP mRNA 발현은 0.574±0.225 (RQ)로 나타났고, 양성대조군 (MDL28170)에서는 0.773±0.032 (RQ)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.791±0.049 (RQ)와 0.877±0.097 (RQ)로 나타났다.

3. βA 생성량에 미치는 영향

배양 상층액에서 βA 생성량을 측정한 결과, 정상군은 0.926±0.230 (pg/㎖)이었고, 양성대조군 (MDL28170)에서는 6.9±3.9 (pg/㎖)로 나타났다. DHJHT 추출물 투여군은 100 ㎍/ml에서 12.2±5.6 (pg/㎖)으로, 50 ㎍/ml에서는 15.2±5.9 (pg/㎖)로 나타났다.

4. NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line 정상군의 NO 생성량은 8.8±2.5 (μM)이었고, LPS+βA를 처리한 대조군의 NO 생성량은 302.9±18.4 (μM)로 나타났다. 양성대조군(MDL28170)에서는 39.8±9.5 (㎍/㎖)로 나타났다. DHJHT 100 ㎍/㎖와 50 ㎍/㎖ 처리군에서 NO 생성량은 각각 138.4±25.3, 그리고 234.9±28.0 (μM)로 나타났다.

5. βAPP의 immunoblotting 분석

BV-2 microglial cell line에서의 βAPP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 대조군에 비해 50 ㎍/㎖와 100 ㎍/㎖의 DHJHT 실험군에서 βAPP 발현이 억제되었다(Fig. 1).

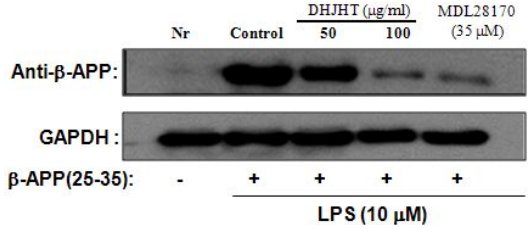


Fig. 1. Suppression effect of DHJHT extract on APP in BV-2 stimulated LPS plus βA co-treatment by Western blot analysis.
BV2 microglial cells were pretreated with various concentrations of DHJHT extract (100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of LPS (10 μM) plus APP(25-35) fragment (25 μM), or 35 μM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus APP (25-35) for 40 hrs. Cell lysate (50 ㎍/lane) were separated by SDS-polyacryamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. internal control (GAPDH).

6. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억력 측정 및 행동관찰

1) Step-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

정상생쥐가 platform에 올라가는 시간은 7.2±1.05 (sec)로 관찰 되었고, AD 병태 생쥐 대조군은 83.7±2.59 (sec)이었고, 양성대조군(aricept 투여)은 7.3±1.60 (sec)로 나타났다. DHJHT 484

mpk, 121 mpk 투여군은 각각 17.2±3.91 (sec)와 25.5±4.14 (sec)로 나타났다(Fig. 2).

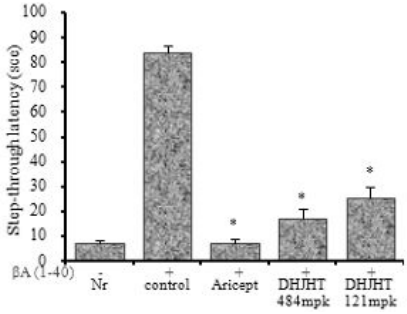


Fig. 2. Effects of DHJHT on the βA-induced AD mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT or aricept. and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial and injected βA-induced mice. Data represent means±S.E (N=10). Control, βA-induced AD mice; Aricept (2 mpk, *p.o*); DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk p.o). Step -though latency each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with βA-induced AD mice group (control) data by T test (*p<0.001).

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 운동성 감퇴 억제 효과

정상생쥐가 platform에 올라가는데 걸린 거리는 117.7±26.1 (cm)로 관찰 되었고, AD 병태 생쥐 대조군은 901.9±199 (cm)이었고, 양성대조군(aricept 투여)은 127.5±34.1 (cm)로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군은 각각 231.1 ±30.3 (cm)($p<0.01$)와 459.0±81.5 (cm)로 나타났다(Fig. 3).

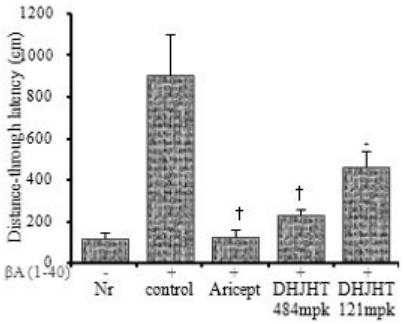


Fig. 3. Effects of DHJHT on the βA-induced AD mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.

C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT or aricept. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) the retention trial was carried out for 7 days after the acquisition training trial and injected βA-induced mice. Data represent means±S.E (N=10). Control, βA-induced AD mice; Aricept (2 mpk, *p.o*); DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk p.o). Lardist this is the total distance (in cm) covered by the animal in large movement, and Smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data (Lardist plus Smldist) represent means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with βA-induced AD mice group (control) data by T test (*p<0.05, †p <0.01).

7. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

1) AD 병태 생쥐의 microglial cell에서 세포내 면역형광염색

(1) 세포내 IL-1β 와 TNF-α 발현 억제 효과

IL-1β의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 4.8±0.5(%)이었고, AD 병태 생쥐 대조군에서 72.8±6.5(%)로, 양성대조군에서는 32.0±5.3(%)로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군은 각각 36.3±10.0(%)와 54.0±9.7(%)로 나타났다. TNF-α의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 35.0 ±6.4(%)이었고, AD 병태 생쥐 대조군에서 87.3±3.0(%)로, 양성대조군에서는 41.2±4.5(%)로 나타났다.

DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군은 48.8±6.3(%)와 64.6±6.8(%)로 나타났다.

(2) 지질과산화도(MDA) 억제 효과

정상 생쥐의 뇌조직에서는 24.4±12.1 (pg/mg brain tissue)로 나타났고, AD 병태 생쥐 대조군에서는 180.3±24.0 (pg/mg brain tissue), 양성대조군에서는 67.7±8.8 (pg/mg brain tissue)로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군은 각각 98.8±23.2와 129.5±18.2 (pg/mg brain tissue)로 나타났다.

(3) $CD68^+/CD11b^+$ 발현 세포수 억제 효과

정상 생쥐의 뇌조직 중 $CD68^+/CD11b^+$의 세포수는 5.2±2.4%이었고, AD 병태 생쥐 대조군에서는 48.2±1.9%, 양성대조군에서는 20.8±1.9%로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군에서는 28.4±2.0과 47.4±4.2%로 나타났다(Fig. 4).

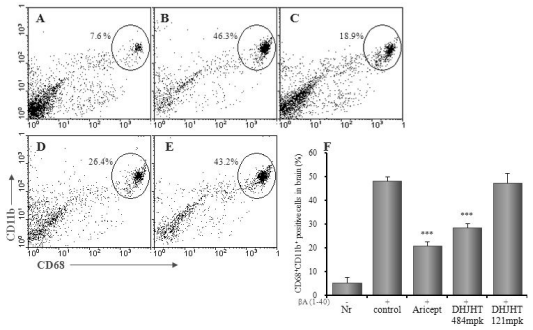


Fig. 4. Effects of DHJHT on the percentage of $CD68^+/CD11b^+$ gated cells in βA-induced AD model.

C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT (484 mpk and 121 mpk *p.o*) and aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days. After 8 weeks, mice brain cells ($5x10^5$ cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, number of CD14 positive cells in the mice brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to βA-induced AD model. At the end of the experiment, the mice brain $CD14^+$ cells were removed and βA-induced AD model. C57bl/6 normal (A), control $CD68^+/CD11b^+$ (B), aricept (2 mpk, *p.o* C) treated, and DHJHT extract 484 mpk (D) and 121 mpk (E), $CD68^+/CD11b^+$ cell population (%) were measured by analyzed by flow cytometer (F).

2) AChE 활성도에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도 수치는 정상군에서 12.7±1.7 (mU/ml)이었고 AD 병태 생쥐 대조군에서는 318.0±38.6 (mU/ml)로, 양성대조군에서는 37.4±15.0 (mU/ml)로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군에서는 각각 95.2±7.2 (mU/ml)과 163.2±26.8 (mU/ml)로 나타났다.

8. βA로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈 크기는 72.9±3.5(%)이었고, 양성대조군에서는 27.0±6.5(%)로 나타났다. DHJHT 484 mpk, 121 mpk 투여군에서는 각각 46.2±4.6(%)와 56.5±10.2(%)로 나타났다(Fig. 5).

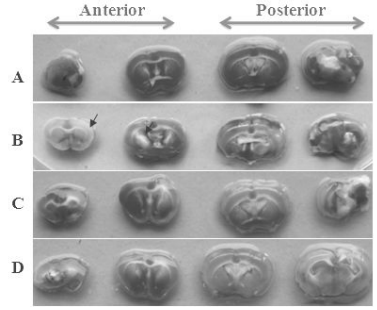


Fig. 5. Effects of DHJHT on the coronal section of βA-induced AD mice.

C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) (484 mpk, *p.o*, D) and aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated (A). βA-induced AD mice (control, B); aricept (2 mpk, *p.o*, C). Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride. Normal tissues are stained as strong red color. Infarcted area is not stained as white color which localizes at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6-12 mm from frontal pole.

2) 조직손상에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은 hippocampus와 entorhinal(EC) 그리고 fimbriaformix(FIFX)가 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증과 병변으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 양성대조군과 DHJHT 484 (mpk)를 처리한 실험군은 정상과 가깝게 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있다(Fig. 6). 그리고 hippocampus의 neuronal line이 정상군에서는 뚜렷이 보이지만 대조군은 뇌조직의 염증세포와 병변 등으로 그 형태가 뚜렷하지 않았으나, 양성대조군은 정상과 가깝게 뚜렷한 hippocapus의 neuronal line를 보이고 있으며, DHJHT 484 (mpk) 투여군에서는 희미하게 hippocapus의 neuronal line를 보이고 있다(Fig. 7). DHJHT 투여군에서 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등은 보였으나, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 회복된 것을 볼 수 있다(Fig. 8)

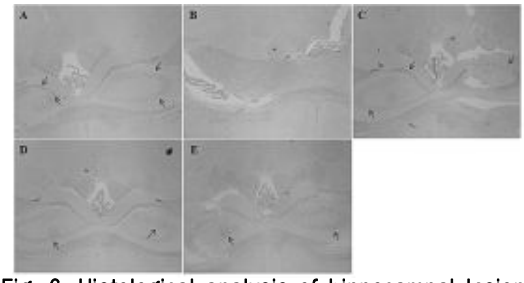


Fig. 6. Histological analysis of hippocampal lesions of βA-induced AD mice.
C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) or aricept. HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. C57bl/6 normal (A), Control, βA -induced AD mice (B); aricept (2 mpk, *p.o*, C); DHJHT (484 mpk, D and 121 mpk, E), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ↑ at bright microscope (Nikon, ×100).

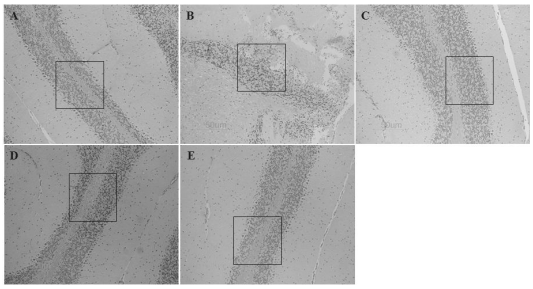


Fig. 7. Histological analysis of the neuronal loss of hippocampus of βA-induced AD mice.
C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) or aricept. HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. C57bl/6 normal (A), Control, βA -induced AD mice (B); aricept (2 mpk, *p.o*, C); DHJHT (484 mpk, D and 121 mpk, E),they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk □ at bright microscope (Nikon, ×100).

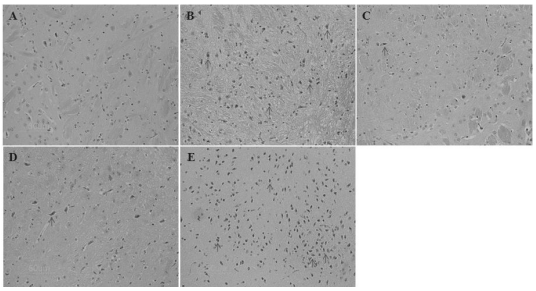


Fig. 8. Histological analysis of the presence of macrophage/microglia in the hippocampus of βA-induced AD mice.
C57BL/6 mice were orally administered of DHJHT extract (484 mpk and 121 mpk *p.o*) or aricept. HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. C57bl/6 normal (A), Control, βA -induced AD mice (B); aricept (2 mpk, *p.o*, C); DHJHT (484 mpk, D and 121 mpk, E), they were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk ↑ at bright microscope (Nikon, ×100).

3) 면역화학조직염색 분석

AD 병태 생쥐의 hippocapus에 anti-tau Ab로

면역조직화학염색을 하여 나타난 결과로, pannel B인 대조군에서 tau 단백질에 positive한 조직세포가 많이 보이고, 양성대조군(pannel C)와 484 mpk DHJHT(pannel D) 투여군에서는 tau 단백질에 positive한 조직세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 성상교세포 특이 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)에 대한 면역조직화학 염색을 한 결과로, pannel B인 대조군에서 GFAP에 positive한 성상교세포가 많이 보이고, 양성대조군(pannel C)와 484 mpk DHJHT (pannel D) 투여군에서는 GFAP에 positive한 성상교세포가 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 그러나 121 mpk DHJHT 투여군에 약간 감소되는 것으로 분석되었다.

Ⅳ. 고 찰

AD는 50세 이전에 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[23]. 한의학적으로 痴呆는 '痴獃'[5], '呆病'[24], '健忘'[25] 등의 범주에 속하며, 치매의 병기는 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁沮窺, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등이고, 治法은 補益精氣, 補腎健脾, 轄痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다[9].

獨活地黃湯은 『東醫壽世保元』에 처음 기재된 처방으로, 소양인 胃受熱而熱病論에서 소양인의 中風, 吐血 등의 증세를 치료할 목적으로 사용된 처방이다. 獨活地黃湯은 熟地黃, 山茱萸, 茯笭, 澤瀉, 牧丹皮, 防風, 獨活로 구성되어 있으며, 熟地黃은 君藥으로 味甘하고 微溫하며, 滋陰補血, 益精鎭隨 시키는 요약이 되어 腎陰不足과 心肝血虛諸症에 상용된다. 山茱萸는 味酸, 性微溫하며, 補益肝腎, 澁精固脫하는 효능이 있고 補陽시키면서 滋陰시켜 肝腎을 두루 補하는 약물이 되어 陽虛나 陰虛를 막론하고 고루 배합하여 응용할 수 있다. 茯笭은 味淡하고, 利水滲濕하고 健脾寧心하여 脾虛濕勝의 증에 적당하며, 脾虛하게 되어 心神을 영양함을 잃게 되어 나타날 수 있는 병증에 寧心安神의 목적으로 다용하기도 한다. 澤瀉는 味甘 性溫하며 利水滲濕하며 泄熱하는 효능이 있어 腎經에 火가 盛한 증상에 다용된다. 牧丹皮는 味苦辛 性寒하며 淸熱凉血하고 活血散瘀하는 효능이 있어 熱을 退하여 生陰을 유리하게 도와주며, 心經에 들어가 血脈의 瘀滯를 通行하게 한다. 防風은 味辛甘, 性溫하며, 解表去風, 承濕, 止痛하는 효능으로 頭痛, 目眩, 項强 등의 증상에 사용된다. 獨活은 味辛苦하고 性溫하며 去風除濕, 解表止痛한다[26].

따라서 저자는 獨活地黃湯이 노화로 인하여 腎水枯竭하고 淸陽不升으로 인한 치매에 효과적일 것으로 사료되어 본 실험을 진행하였다.

BV2 microglial cell line에 LPS와 βA를 처리하여 pro-inflammatory cytokine을 유발시켜 뒤 서로 다른 농도의 DHJHT(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)를 6시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, DHJHT이 소신경교세포의 pro-inflammatory cytokine mRNA 발현에 미치는 억제효과를 평가하기로 하였다. 실험 결과 DHJHT이 BV2 microglial cell line에서 발현된 pro-inflammatory cytokine 중 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 과잉발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 DHJHT이 AD의 원인 중 하나로 알려진 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했다 판단할 수 있다.

이 실험에서 COX-2와 NOS-II mRNA 발현도

DHJHT 처리군에서 현저하게 억제되어 나타났다. 특히 DHJHT 100 μg/㎖에서 가장 효과적인 억제가 관찰되었는데, 결과적으로 COX-2 및 NOS-II mRNA 유전자 발현이 DHJHT에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서는 BV2 microglial cell line에서 LPS와 βA의 자극으로 유도된 BACE와 APP mRNA 발현을 관찰한 바 DHJHT 처리군에서 BACE와 APP mRNA 발현이 억제되었고 βAPP의 발현량을 조절하는지를 Western blot으로 분석한 결과 대조군에 비하여 βAPP 발현량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 BV2 microglial cell line에 LPS와 βA를 처리하고, DHJHT 또는 MDL28170 처리한 배양상층액에서 βA생산량이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타낸 ELISA reader 결과와 일치하였다[27].

In vivo 실험은 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화와 뇌세포를 분석하여 pro-inflammatory cytokine과 $CD68^+$/$CD11b^+$의 발현, MDA의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰하였다. 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[28], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 DHJHT의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다. Step-through latency를 관찰한 결과[29], DHJHT 투여군은 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였고, distance movement-through latency에서도 DHJHT 투여군은 8주 후 역시 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 DHJHT 투여로 AD 병태 생쥐의 뇌에서 MDA를 억제할 수 있는지를 규명하고자 하였다. 그 결과는 DHJHT 추출물을 투여로 AD 병태 생쥐의 병변 뇌부위에 MDA의 양이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 병변 뇌조직에서의 pro-inflammatory cytokine의 일종인 IL-1β 생산량을 관찰한 결과, DHJHT 투여군에서는 그 발현이 현저히 감소했고, TNF-α 단백질 역시 DHJHT 투여군에서는 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있었다.

AD는 많은 원인에 의해서 유발되지만 βA의 침적(deposition)으로 생기는 SPs의 신경독성(neurotoxic)으로 신경세포사(neuronal cell death)를 일으키는 것과 과인산화 tau 단백질(hyperphosphorylation tau protein)의 침적에 의한 NFTs의 작용으로 신경퇴행(neurodegeneration)을 일으키는 것이 대표적이다. 이러한 배경으로 본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 biopsy하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포형광분석기로 병변부분의 astrocyte와 microglia 세포수를 측정하기 위하여 두세포의 표면 표지인자인 CD68/GFAP를 관찰하여 대조군에 비하여 DHJHT 투여군이 현저한 CD68/GFAP 세포수 감소 결과를 얻었다.

AD 병태 생쥐 모델의 혈청 내 AChE 활성도를 관찰한 바 DHJHT 투여군에서 AChE 활성이 유의하게 억제함을 확인하여 DHJHT가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키는 효과가 있으리라 판단된다.

본 실험 연구에서는 AD 병태 생쥐모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰하였다. 그 결과 βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 DHJHT 투여군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져, DHJHT이 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났다. 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate

gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 정상군과 비교할 때 hippocampus 주위에 pyramidal cell layer, nurons 그리고 dentate gyrus 등이 현저히 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes-like cells과 astrocytes -like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, DHJHT 투여군은 대조군에서 뇌의 hippocampus 주위에 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 현저히 회복된 것을 볼 수 있었다. 이는 DHJHT가 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 예방과 치료를 할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다. 또한 hippocapus 병변부위에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 대조군에 비하여 DHJHT을 투여군에서 tau 단백질과 GFAP의 발현량이 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

따라서 DHJHT은 βA의 과다 생성, 미신경교세포의 pro-inflammatory cytokine의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 DHJHT의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

DHJHT이 βA로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

In vitro

1. DHJHT 추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II 염증유전자 발현을 억제하였다.
2. DHJHT 추출물은 BV2 microglial cell line에서 BACE와 APP 염증유전자 발현을 억제하였다.
3. DHJHT 추출물은 BV2 microglial cell line에서 βAPP 발현을 억제하였다.

In vivo

1. DHJHT 추출물은 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.
2. DHJHT 추출물은 AD 병태 생쥐 뇌 조직에서의 세포내 IL-1β, TNF-α의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
3. DHJHT 추출물은 AD 병태 생쥐 뇌 조직에서의 MDA 양을 감소시켰고, $CD68^{+}/CD11b^{+}$의 발현세포수를 유의성 있게 억제하였다.
4. DHJHT 추출물은 AD 병태 생쥐의 혈청 내 AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다.
5. DHJHT 추출물은 AD 병태 생쥐 뇌 조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌 조직 손상을 억제하였다.
6. DHJHT 추출물은 AD 병태 생쥐 뇌 조직에서 tau 단백질과 GFAP 생성을 유의성 있게 억제하였다.

참고문헌

1. 오영선, 김성훈. 치매의 병리, 연구동향과 향후 연구전략에 대한 고찰. 대전대학교한의학연구소논문집. 1999;8(1):793-822.
2. Araga S, Kagimoto H, Funamoto K, Takahashi K. Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. Acta Neurologica Scandinavica. 1991; 84(3):259-63.
3. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T,Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res. 1992;593(2):299-303.
4. Dickson DW, Ksiezak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH. Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein ; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. Acta Neuropathol(Berl). 1992;84(6):596-605.
5. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기도:집문당. 2007:236-8, 324-33.
6. 전국한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 서울:집문당. 1997:512.
7. 진현철. 독활지황탕의 위장관 및 중추신경에 미치는 효능에 관한 실험적 연구. 사상의학회지. 1997;9(2):187-201.
8. 이수영, 안택원. Wistar rat의 노화에 따른 체중, 혈액학적 및 혈청생화학적 변화에 미치는 독활지황탕에 대한 실험적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2004;13(2):332-4.
9. 이정찬. 신 사상의학론2. 서울:목과토. 2003: 178-80, 241-9.
10. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol. 1990;27(2-3):229-37.
11. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H: An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. J Neurosci Res. 1992;31(4) :616-21.
12. Louise B, Asha N, Barbara C, Greer M, Murphy J. β-Amyloid Peptide Secretion by a Microglial Cell Line Is Induced by β -Amyloid (25-35) and Lipopolysaccharide. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1996;271(27):16084-9.
13. Gertsch J, Güttinger M, Sticher O, Heilmann J. Relative quantification of mRNA levels in Jurkat T cells with RT-real time-PCR (RT-rt-PCR): new possibilities for the screening of anti-inflammatory and cytotoxic compounds. Pharm Res. 2002;19(8):1236-43.
14. Suzuki N, Cheung T, Cai X, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde T, Younkin S. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (βAPP717) mutants. Science, 1994;264(5163):1336-40.
15. Bradford MA. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein -Dye Binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
16. Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I; Memantine Study Group. Memantine Treatment in Patients With Moderate to Severe Alzheimer

Disease Already Receiving Donepezil: A Randomized Controlled Trial. Journal of the American Medical Association. 2004;291(3) :317-24.
17. Suematsu T, Matsumura T, Sato N. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in humans. Alcohol Clin Exp Res. 1981;5(3) :427-30.
18. Magnottl RA. Measurement of Acetylcholinesterase in Erythrocytes in the Field. Clin. Chem. 1987;33(10):1731-5.
19. Perri BR, Smith DH, Murai H, Sinson G, Saatman KE, Raghupathi R, Bartus RT, McIntosh TK. Metabolic Quantification of Lesion Volume following Experimental Traumatic Brain Injury in the Rat. Journal of Neurotrauma. 1997;14(1):15-22.
20. Vosselera MN, Abegunewardenea N, Hoffmannb SE, Petersene D, Beckera D, Cleppienb P, Kunzc KF, Kreitnerc M, Lauterbacha B, Bierbachd C, Düberc T, Goria T, Münzela LM, Schreiberb GH. Area at Risk and Viability after Myocardial Ischemia and Reperfusion Can Be Determined by Contrast -Enhanced Cardiac Magnetic Resonance Imaging. Eur Surg Res. 2009;43(1):13-23.
21. Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. Cereb. Cortex. 1994;4(2):138-50.
22. Brockmann K, Hanefeld F. A novel GFAP mutation and disseminated white matter lesions: adult Alexander disease?. Eur Neurol. 2003;50(2):100-5.
23. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
24. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991 :125.
25. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990: 222-5, 233-5.
26. 전국한의과대학본초학교실. 본초학. 서울:성보사. 1994:131-2, 193-4, 260-1, 302-6, 580-1, 626-7.
27. Yankner B, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. Science. 1990;250(4978):279-82.
28. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβ 42 deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med. 1996;2(10) :1146-50.
29. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. Int J Neurosci. 1989; 48(1-2):29-69.