동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):109-124

人蔘養榮湯이 Aβ를 처리한 PC12 세포와 생쥐의 손상 뇌신경조직에 미치는 영향

장영주, 정인철, 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Neuroprotective Effects of *InSamYangYoung-tang* (*Renshenyangrongtang*) on Aβ-induced Damages in Mice

Young-Joo Jang, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee

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

Abstract

Objectives :

This experiment was designed to investigate the effect of the *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) extract on Aβ-induced AD model.

Methods :

The effects of the *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) extract on neural damages of cultured PC12 cells induced by Aβ were investigated.
The effects of the *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) extract on neural damages of hippocampal and cortical neurons in the mouse induced by β-amyloid were investigated.

Results :

1. Aβ treatment into neuronal cells activated cell death pathway when analyzed by MTT assay and by histological analysis. Then *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) treatment improved cell survival to a similar level as in normal group.
2. Aβ treatment increased caspase 3 protein levels but decreased phospho-Erk1/2 in neuronal cells. *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) treatment reversed the production levels of two proteins close to those in normal group.
3. Aβ treatment induced the atrophy of neuronal cells in terms of neuronal processes and cell body shrinkage, but *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) greatly improved their morphology.
4. Neuroprotective activity, as observed in *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*)-treated groups, was similarly observed in cells treated with galantamine which was used as a positive control. Moreover, overall recovery pattern by *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) was similar between cultured PC12 cells and in vivo hippocampal and cerebral cortical neurons in the mouse brain.

Conclusions :

This experiment shows that the *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) may play a protective role in neural tissues damaged by cytotoxic substances. 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. *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) might be effective for the treatment of AD. Investigation into the clinical use of the *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*) for AD is suggested for future research.

Key Words :

Alzheimer's disease(AD), *InSamYangYoung-tang*(*Renshenyangrongtang*), β-amyloid(Aβ), PC12 cell, Hippocampal neuron, Cerebral cortical neuron, Neuroprotective effect

투고 : 2010. 2. 5. 수정 : 2010. 3. 10. 채택 : 2010. 3. 10.
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

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 인지기능의 장애를 초래한다. AD는 미만성 신경세포 소실, 과인산화된 타우 단백으로 이루어진 신경섬유 다발 또는 신경섬유농축제의 세포내 축적, 퇴행위축 신경돌기로 둘러싸인 amyloid β protein (Aβ)의 세포외 축적 등의 중요한 구조적 변화가 동반된다[1]. 지난 수십 년간의 연구를 통해 Aβ가 조직에 독성을 부여함으로서 신경세포에 독성을 주는 것이 확인되면서, Aβ의 형성을 차단하는 것이 인간의 뇌에서 치매의 진행을 조절할 수 있을 것이라는 가정 하에 Aβ 생성과 관련된 대표적인 물질인 secretase에 대한 다양한 연구가 진행 중이다[2-5].

한의학에서 痴呆는 역대 의서[6-9]의 健忘, 癲狂, 虛勞 등에서 유사한 증상이 언급되었고, 痴呆의 病因은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷, 他病 등이고, 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]. 痴呆에 대한 한의학계의 연구로는 다수의 문헌고찰[11-13]과 실험적 연구[14-17]가 있었는데, 최[18]는 2000년 이후 30례의 단미제와 48가지 복합처방이 실험 연구되었다고 보고하였다.

人蔘養榮湯은 宋代의 『太平惠民和劑局方』[19]에 처음 수록된 이후 『萬病回春』[20]에서 變方하여 기재된 방제로 積勞虛損, 四肢倦怠, 肌肉消瘦而少顔色, 吸呼氣短, 飮食無味에 사용하는 처방이다. 『韓醫神經精神科學』[10]에서는 人蔘養榮湯을 精竭神衰型 健忘에서 養營固本, 補精益腦의 治法에 활용되는 대표적인 治方으로 제시하였다.

人蔘養榮湯에 대한 선행연구로는 항암 및 면역조절에 관한 실험적 연구[21-23], 구성 약물들의 뇌세포보호효과에 대한 실험적 연구[24], 뇌세포 보호효과에 대한 실험적 연구[25], 人蔘養榮湯 加鹿茸의 면역력에 대한 실험적 연구[29], 갱년기 장애에 대한 임상연구[27] 등이 보고되어 人蔘養榮湯이 기억력 감퇴 등과 관련된 효능이 기대되나, AD와 관련된 병태기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 人蔘養榮湯이 AD연계성 손상조직에 미치는 영향을 검토하고자 Aβ를 처리하여 세포독성을 부여한 배양 PC12 세포와 생쥐의 해마조직 세포 및 대뇌피질의 신경세포의 세포조직학적 및 생화학적 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 人蔘養榮湯의 처방 구성은 『東醫寶鑑』[28]을 기준으로 하였고 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Priscription of *InSamYangYoung-tang* (*Renshenyangrongtang*)

Herb	Galenical name	Dose(g)
白芍藥	*Paeoniae Radix Alba*	7.50
當歸	*Angelicae Gigantis Radix*	3.75
人蔘	*Ginseng Radix*	3.75
白朮	*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*	3.75
黃芪(蜜炒)	*Astragali Radix*	3.75
肉桂	*Cinnamomi Cortex Spissus*	3.75
陳皮	*Citri Pericarpium*	3.75
甘草(炙)	*Glycyrrhizae Radix*	3.75
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	2.81
五味子	*Schizandrae Fructus*	2.81
防風	*Saposhnikovia Radix*	2.81
遠志	*Polygalae Radix*	1.87
生薑	*Zingiberis Rhizoma Recens*	3.75
大棗	*Zizyphi Fructus*	3.75
	Total amount	51.55

2) 검액의 조제

건조 상태의 人蔘養榮湯(51.55 g)에 증류수 1,000 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 10.95 g을 얻었다(수율; 16.9%). 추출물을 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

3) 동물

본 실험의 치매 모델에 사용한 생쥐는 평균 체중 25 g의 10 주령 albino ICR 계열 총 12 마리로 고형 사료와 물을 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24°C, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮 주기 (12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

4) 주요 시약

본 실험에 사용한 β-amyloid peptide는 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였으며, 1 mM의 농도로 증류수에 녹여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다. 양성대조군으로 이용된 galantamine triethiodide는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며 0.9 mg/ml이 되도록 증류수에 녹여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2. 실험 방법

1) PC12 세포의 실험

(1) 세포 배양

PC12 cell은 한국생명공학연구원 장수연구센터로부터 분양 받아 예비배양을 거쳐 활성화 후 본 실험에 사용하였다. 37℃, 5% CO_2 조건에서 5% FBS, 5% horse serum, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM(GIBCO, USA) 배지 하에서 배양하였다. 세포는 75 cm^2 flask(SPL, Korea)에서 충분히 증식한 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 trypsin-Versene(Lonza, USA) 용액을 넣고 37℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 5% FBS와 5% horse serum이 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양 flask에 옮겨 1:4의 split ratio로 CO_2 incubator(37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다. 신경돌기 성장을 비롯한 PC12 세포의 분화를 유도하기 위하여 신경성장인자(nerve growth factor; NGF)를 50 ng/ml 농도로 1 주일 이상 처리한 후 본 실험에 이용하였다.

(2) MTT 분석

MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 환원법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96 well plate에 1×10^5개의 PC12 cell

을 plating하고, 人蔘養榮湯 열수추출물을 각각 0.3, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, 식염수만 처리한 군과 Aβ peptide 10 μM를 처리한 군으로 나누어, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 MTT solution을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

(3) 면역형광염색

면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 유리 coverslip을 poly-L-ornithine(0.1 mg/ml, sigma, USA)과 laminin (0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA)을 혼합하여 실온에서 precoating하였다. 1×10^5개의 PC12 cell을 precoating된 coverslip에 plating하고, (i) 식염수만 처리한 정상군, (ii) Aβ peptide 10 μM을 처리한 대조군, (iii) 0.3 mg/ml 또는 0.5 mg/ml의 人蔘養榮湯 열수추출물과 Aβ peptide 10 μM을 처리한 실험군으로 구분하였으며, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Coverslip 위에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)으로 상온에서 40분 동안 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 정해진 비율로 혼합하여 처리한 후, 실온에서 4시간 동안 반응하였다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST(PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% bovine serum albumin(BSA), 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 fluorescein-goat anti-mouse(green)나 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody(red)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하였고, 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척하였다. Hoechst33258 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 2차 항체는 빛에 민감하기 때문에 반응 시간 동안 암실에서 수행하였다. 면역 염색된 세포들은 형광현미경(Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰하고, 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 image를 중복시켜 관찰함으로서 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:800, Cell signaling), Cleaved Caspase-3 antibody(1:500, Cell signaling)와 monoclonal anti-neurofilament 200(NF-200, 1:400, Sigma-Aldrich)이었다.

(4) Western blot 분석

PC12 cell을 60 mm culture dish에 2×10^5 cells/ml 로 분주한 후 (i) 식염수만 처리한 정상군, (ii) Aβ peptide 10 μM를 처리한 대조군, (iii) 人蔘養榮湯 열수추출물과 Aβ peptide 10 μM를 처리한 실험군으로 구분하였고, 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양한 PC12 cell은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4, 2 mM KH_2PO_4(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 ml의 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 Na_3VO_4, 1% Triron X-100, 10% glycerol, 5 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotinin, 2 μM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 15 μg의 단백질을 western blot analysis에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel(1.5 M Trisma base, 10% sodium dodecyl sulfate(SDS, 30% acrylamide, 10% ammonium persulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. 항체와 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovine serum albumin(BSA, Sigma), 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 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 membrane을 씻어내고 goat anti-rabbit IgG(Santa cruz biotechnology) 또는 anti-mouse/rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:2000의 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. 본 실험에 사용한 1차 항체는 phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling), p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling), cleaved Caspase-3 antibody(1:1,000, Cell Signaling), phospho -c-Jun antibody(1:1,000, Cell Signaling) 과 Actin (1:30,000, MP biomedicals)이었다.

2) AD 동물 모델의 실험

(1) AD 동물 모델의 설립

10주령 ICR계 생쥐에 대해 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군, (ii) Aβ peptide를 측뇌실(lateral ventricle) 양쪽에 200 pmol의 농도로 5 μl 주입한 대조군 (iii) Aβ peptide를 측뇌실 양쪽에 200 pmol의 농도로 5 μl 주입 후 galantamine (3 mg/kg)을 투여한 양성대조군, (iv) Aβ peptide를 측뇌실 양쪽에 200 pmol의 농도로 5 μl 주입 후 人蔘養榮湯 열수추출물(400 mg/kg, *p.o*)을 처리한 실험군으로 나누었다. Aβ peptide의 주입을 위하여 생쥐의 피부를 제거하고 미세드릴로 skull을 제거한 후 Picoinjector(Harvard Instrument, USA)를 이용하여 미세유리관으로 대뇌의 양측방 뇌실부위(coordinates: 0.5 mm postterior to bregma, 1.5 mm lateral to midline, 2.5 mm ventral to the brain surface)에 5분간 서서히 약물을 주입하였다. 주입 2일 후 실험군은 400 mg/kg의 人蔘養榮湯 열수추출물을, 양성대조군은 식염수 100 μl를 7일 동안 경구 투여하였다. 실험군은 3일간 방치하고, 양성대조군은 8일자부터 3일 동안 1일 1회 3 mg/kg의 galantamine을 복강 주사한 후, 모든 처리가 끝난 동일 시점에서 각 생쥐군의 뇌를 분리하였다.

(2) Hemotoxylin & Eosin(H & E) 염색

뇌조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 붙이고, 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 씻

으며 염색을 제거하였다. 이러한 과정을 마친 후 xylene에 1분간 담가 놓고, 마지막으로 gelatine mount medium을 이용하여 coverslide를 부착하였다. 이러한 샘플들은 광학현미경(Bright-field microscope, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

(3) 면역형광염색

생쥐 뇌조직은 -20℃에서 냉동시킨 후 Cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 PBS에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 정해진 비율로 혼합하여 처리한 후 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST로 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 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하고 3회에 걸쳐 PBST로 세척하였다. Hoechst33258 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 모든 조직 시료는 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 image를 중복시켜 관찰함으로서 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody (1:800, Cell signaling), Cleaved Caspase-3 antibody (1:500, Cell signaling), monoclonal NF-200(1:400, Sigma-Aldrich)이었다.

(4) Western blot 분석

뇌조직을 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4, 2 mM KH_2PO_4(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 μl의 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 Na_3VO_4, 1% Triron X-100, 10% glycerol, 5 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotinin, 3 μM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) 용액 하에서 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 15 μg의 단백질을 western blot 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 전기 영동시킨 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 washing 한 후 1차 항체를 Blocking buffer(1X TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 membrane을 씻어내고 anti-mouse/rabbit IgG (Santa Cruz Biotech, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:2000의 비율로 희석

하여 상온에서 30분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어내었다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film(Eastman Kodak Co., USA)에 감광하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell signaling), p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell signaling), cleaved Caspase-3 antibody(1:1,000, Cell signaling), monoclonal anti-neurofilament 200(1:2,000, Sigma-Aldrich) 과 Actin(1:30,000, MP biomedicals)이었다.

(5) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직 및 H & E 염색조직은 Nikon 형광현미경을 이용하여 분석한 후 현미경에 부착된 디지털 카메라로 이미지를 포착하여 ACT-1 software를 이용하여 분석하였다. 중첩 이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

(6) 통계분석

실험 집단 간 수치 데이터는 One-way ANOVA를 이용하여 비교분석하였다. p 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001보다 작은 경우로 구분하여 분석하였으며 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. β-amyloid 처리 PC12 세포에 대한 영향

1) MTT 분석을 통한 세포독성

PC12 세포에 10 μM의 Aβ peptide를 처리한 결과 세포의 생존율은 식염수 처리군에 비하여 40% 수준으로 감소하였다. 이에 人蔘養榮湯 열수추출물을 0.3 mg/ml와 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 경우 생존율은 80% 이상으로 유지하였으나 1.0 mg/ml의 농도에서는 생존율이 60% 이하로 나타났다.

2) NF-200 단백질의 변화 관찰

위상차현미경 하에서 형태적 변화를 관찰한 결과, 정상군의 일부 세포에서 확장하는 신경돌기를 관찰할 수 있었다. PC12 세포에 Aβ peptide를 처리한 경우 세포체의 위축이 관찰되었고 신경돌기의 확장은 거의 보이지 않았다. 그러나 人蔘養榮湯 실험군의 경우 신경돌기가 관찰되었고, 특히 0.5 mg/ml 농도에서는 길게 연장된 신경돌기가 관찰되었다(Fig. 1).

3) Caspase 3 단백질의 변화 관찰

면역형광염색으로 관찰한 결과, 정상군 세포에서는 caspase 3 양성세포가 전혀 관찰되지 않았으나 Aβ peptide 처리 대조군의 경우 일부 세포에서 뚜렷한 caspase 3 단백질 신호가 관찰되었다. 반면 人蔘養榮湯 실험군에서는 caspase 양성 세포수가 감소되었다.

4) Phospho-Erk1/2 단백질의 변화 관찰

Western blot 분석 결과, 정상군 세포에서는 일정 수준의 phospho-Erk1/2 단백질이 관찰되었고, Aβ peptide를 처리한 대조군에서는 다소 감소하였다. 人蔘養榮湯 실험군에서는 0.3 mg/ml과 0.5 mg/ml 두 가지 농도에서 유사하게 정상군 이상으로 증가하였다(Fig. 2).

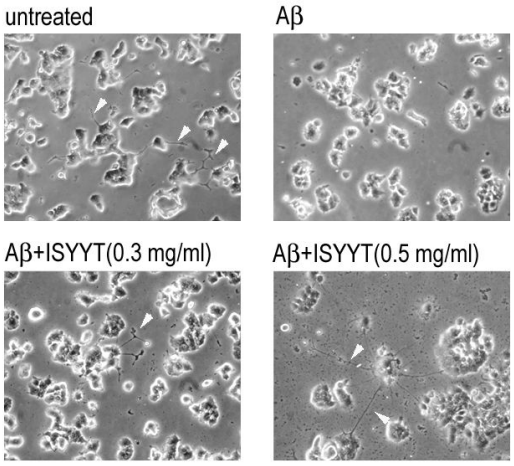


Fig. 1. Morphological characteristics of PC12 cells after different treatments with drugs.
PC12 cells were cultured in the presence of NGF for 7 days, treated with Aβ peptide and ISYYT for 24 hrs as indicated in the figure. Cells were observed under the phase contrast microscope. In normal cells, some of healthy individual cells showed neurite outgrowth(arrows), but Aβ-treated cells failed to show any clear neurite extension. Cells treated with ISYYT in addition to Aβ peptide showed enhanced neurite processes, and longer extension with several branches were clearly seen in PC12 cells treated with 0.5 mg/ml.

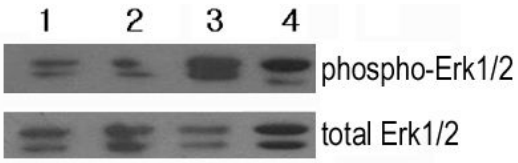


Fig. 2. Western blot analysis of phospho-Erk1/2 protein in PC12 cells.
Protein extracts were prepared from cultured PC12 cells and 15 μg of protein was used for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoprecipitation with anti-phopsho-Erk1/2 antibody. Western blot analysis for total Erk1/2 was performed on the same membrane as an internal loading control. 1: normal, 2: Aβ(10 μM). 3: Aβ(10 μM)+0.3 mg/ml ISYYT, 4: Aβ(10 μM)+0.5 mg/ml ISYYT.

2. 손상된 생쥐의 해마조직 세포에 대한 영향

1) NF-200 단백질의 변화 관찰

면역형광염색으로 관찰한 결과, 정상군에서는 dentate gyrus의 granule 세포층과 CA3, CA1 부위에서 신경세포의 가지 즉 수상돌기나 축삭이 세포체로부터 주변으로 뻗어나가는 것이 관찰되었다. Aβ peptide 처리 대조군에서는 세포층 세 부위에서 가지 성장이 제한되었다. Galantamine 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군의 경우 신경세포 가지들이 정상군과 유사한 양상으로 뻗어가는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

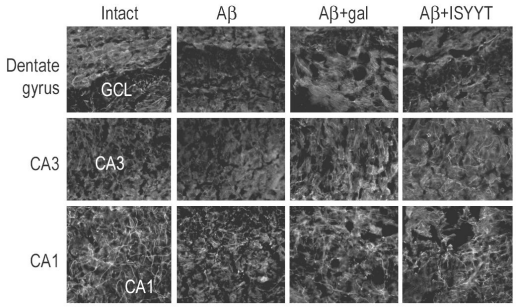


Fig. 3. Analysis of neuritic processes of neurons in the hippocampal fields.
Hippocampal sections were used for immunofluorescence staining for the detection of NF-200 protein(in green). Animals were administered with Aβ(200 pmol), galatamine(3 mg/kg), or ISYYT(400 mg/kg). NF-200 protein signals labeled mostly neuritic processes such as dendrites and axons which were arborized from the neuronal cell body layers. GCL; granule cell layer.

2) Caspase 3 단백질의 변화 관찰

Hoechst33258으로 핵염색을 한 결과, 정상군에서 dentate gyrus의 granule cell 층과 pyramidal CA3 및 CA1 세포층이 뚜렷이 관찰되었다. 동일 조직에 대하여 면역형광염색을 시행한 결과, caspase 3 단백질은 granule 세포층과 CA3 및 CA1 pyramidal 세포층의 모든 부위에서 전혀 탐지되지 않은 반면 Aβ peptide 처리 대조군의 경우 해마조직의 CA3 및 CA1 pyramidal 세포층에서 caspase 3 단백질 신호가 명확히 관찰되

었다. Aβ peptide와 galantamine을 투여한 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군에서는 caspase 3 단백질 신호가 상당 수준 감소하였다(Fig. 4A). CA3 부위의 caspase 3 단백질 신호를 고배율 조건에서 관찰한 결과 caspase 3 단백질 신호는 핵부위가 아닌 주변부에서 주로 관찰되었다(Fig. 4B).

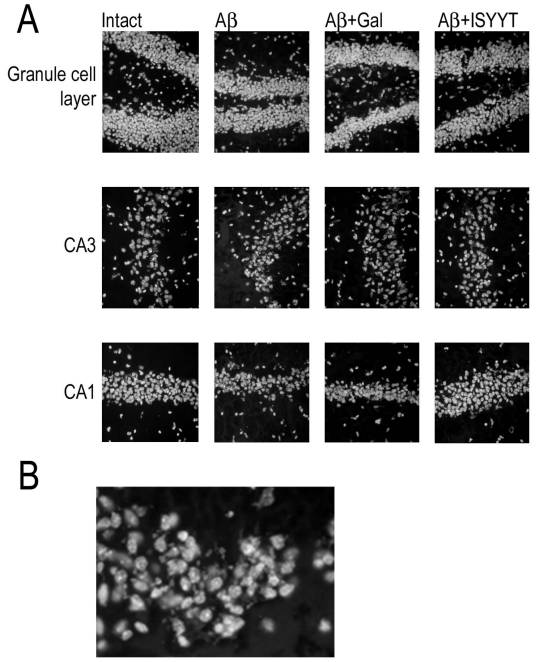


Fig. 4. Identification of caspase 3-positive cells in the hippocampus.
(A) Immunofluorescence view of caspase 3 signals in the hippocampal tissue was seen in red. The sections were also stained with Hoechst33258 dye to visualize individual nuclei(blue). (B) Merged image of caspase 3-positive signals with Hoechst-stained nuclei. Animals were administered with Aβ(200 pmol), galatamine(3 mg/kg), or ISYYT(400 mg/kg). The image was taken from the brain sections teated with Aβ peptide.

3) Phospho-Erk1/2 단백질의 변화 관찰

Western blot 분석 결과, 정상군에서 뚜렷한 phospho-Erk1/2 단백질이 확인된 반면, Aβ peptide 처리 대조군의 경우 phospho-Erk1/2 단백질이 전혀 검출되지 않았다. Galantamine 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군의 경우 정상군과 유사한 수준의 phospho-Erk1/2 단백질이 확인되었다 (Fig. 5).

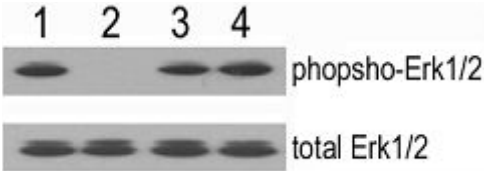


Fig. 5. Western blot analysis for phospho-Erk1/2 protein in the hippocampal lysates.
After various treatment into mice, hippocampal tissues were dissected out and used for western blot analysis. 15 μg protein lysates were used for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Western analysis for total Erk1/2 protein for the same transferred membrane was used as an internal loading control. lane 1; normal, 2; Aβ(200 pmol in 5 μl), 3; Aβ+galantamine(3 mg/ml), 4; Aβ+ISYYT(400 mg/kg).

3. 손상된 생쥐의 대뇌피질 세포에 대한 영향

1) Caspase 3 단백질의 변화 관찰

Western blot 분석 결과, 모든 군에서 caspase 3 단백질이 검출되지 않았다. 반면 면역형광염색으로 caspase 3 단백질의 생성수준을 조사한 결과, 정상군의 경우 caspase 3 단백질 신호는 전혀 검출되지 않았으며 galantamine 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군의 경우에도 caspase 3 단백질 신호는 확인되지 않았으나, Aβ peptide 처리 대조군에서는 미약하지만 양성신호가 확인되었다.

2) Phospho-Erk1/2 단백질의 변화 관찰

면역형광염색 결과, 정상군에서는 뚜렷한 phospho-Erk1/2 단백질 신호가 관찰되었으나 Aβ peptide

처리 대조군에서는 phospho-Erk1/2 단백질의 생성이 감소하였다. Galantamine 양성대조군에서는 phospho-Erk1/2 단백질의 생성 수준이 증가하는 양상을 나타내었으나 人蔘養榮湯 실험군에서는 Aβ peptide 처리 대조군과 비교하여 큰 변화가 없었다(Fig. 6).

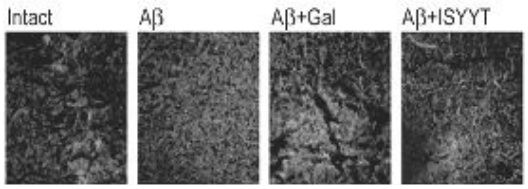


Fig. 6. Identification of phospho-Erk1/2-positive cells in the cerebral cortex.
Brain sections were used for double immunofluorescence staining for NF-200 protein(in green) and phospho -Erk1/2 protein(red), and the merged images were shown in the figure. Animals were administered with Aβ (200 pmol), galatamine(3 mg/kg), or ISYYT (400 mg/kg).

4) NF-200 단백질 관찰

면역형광염색으로 관찰한 결과, Aβ peptide 처리 대조군에서는 정상군에 비하여 대뇌피질 부위에서 신경세포의 가지들은 다소 위축된 범위로 뻗어있는 것이 관찰되었다. 그러나 galantamine 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군에서는 정상군과 유사한 양상의 가지 분포를 보였다.

Ⅳ. 고 찰

AD는 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)을 이해하기 위한 근거가 되어 많은 연구가 진행되고 있다[29-31]. 치매 환자의 뇌를 사후 부검시 Aβ peptide의 축적에 따른 섬유상 구조의 엉김체가 세포외 기질 부분에 잘 관찰되고, 세포 내부에서는 tau 단백질의 과인산화에 의한 neurofibrillary tangle 구조가 일반적으로 관찰되며, 이러한 구조가 서로 축적되어 노인반이라고 하는 조직학적 구조체를 형성하게 된다[32]. 치매 환자의 뇌조직에서 관찰되는 조직학적 특성이 생검 조직에서 관찰할 수 있는 것이 아닌 사후 조직상 특성이기 때문에, 관련된 병리학적 특성이 치매의 원인으로 작용하는지 또는 치매의 진행과정에서 부수적으로 형성되는 산물인지를 규명하는 것에 어려움이 있다. 따라서 많은 연구자들은 치매에 대한 실험동물 모델을 생성하여 관련 기전을 연구하여 왔다[33-34]. 대표적으로 amyloid precursor protein(APP)을 과발현시킨 유전자 전이 생쥐모델이 개발되었는데[35,36], 설치류 실험동물 모델을 통한 연구의 핵심 내용 중 하나는 APP의 비정상적 생화학적 반응에 의한 Aβ peptide 형성과 치매의 병리학적 반응과의 상관성에 대한 연구이다. 아울러 많은 배양세포를 이용한 연구를 통하여 Aβ peptide의 개별 분자들이 표적 세포에 작용하여 독성을 나타낸다는 것이 입증된 바 있다[37,38].

한의학에서 '痴呆'라는 病名은 『景岳全書·雜病謨』[9]에서 "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 기술되었으나, 이미 『素問·調經論』[8]에서 "血幷於上 氣幷於下 心煩惋善怒 血幷於下 氣幷於上 亂而喜忘"라 하여 '善忘'이라는 기억력이 감퇴하는 증상을 서

술하여 內經時代부터 치매와 관련된 인식이 있던 것으로 보인다. 치매의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 치매의 원인은 주로 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다[39-42]. 치매의 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[10].

한편, 중의학에서는 치매를 健忘[43-46] 痴呆[43,45,46], 呆病[43,44,47], 癲狂[47-49], 鬱證[44,45,48] 등의 범주에서 인식하고 있으며, 髓海不足, 肝腎陰虛, 脾腎陽虛, 心肝火旺, 脾虛痰阻, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등을 원인으로 보고 그에 다른 변증시치를 하고 있다[50,51].

人蔘養榮湯은 宋代의 『太平惠民和劑局方』[19]에 수록된 이후 明代의 龔廷賢이 『萬病回春』[20]에 變方하여 기재한 방제로 "治積勞虛損, 四肢倦怠, 肌肉消瘦而少顔色, 吸呼氣短, 飮食無味也." 라 하였다. 『東醫寶鑑』[28]에서 "人蔘養榮湯은 虛勞로 損證이 되어 氣血이 부족하여 몸이 몹시 여위고 나름하며, 숨이 가쁘고 음식을 적게 먹으며 惡寒과 身熱로 저절로 땀이 나는 것을 치료한다"라 하였으며, 『萬病回春』[20]의 方에서 茯苓을 祛하고 防風을 加하였다. 人蔘養榮湯의 方劑를 살펴보면 人蔘, 黃芪, 五味子는 補肺하여 氣로 하여금 生血하게 하고, 甘草, 陳皮, 白朮은 健脾하며 通血케 하고 當歸, 白芍藥은 養肝하여 藏血케 하고 熟地黃은 滋腎하여 腎精으로 하여금 血을 生하게 하며, 黃芪, 防風은 固表하고, 陳皮, 生薑은 疏通祛痰하며 五味子는 補肺潤津하고 肉桂는 溫散하고 諸藥을 能導하여 入營生血케하며 大棗는 補營하고 甘草는 調和諸藥하며 遠志는 腎氣를 能通하여 心에 上達하게 함으로써 補陰補血 補氣補陽의 功效가 있다[52].

人蔘養榮湯에 대한 실험적 선행연구에 따르면 하[21]는 人蔘養榮湯은 항암 및 면역조절에 미치는 영향에 대한 연구에서 人蔘養榮湯이 임파구를 증식시키고 NK-activity와 IL-2의 생산능력을 증가시킨다고 보고하였고, 은 등[22]은 人蔘養榮湯을 생쥐에게 경구투여시 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율을 증가시키고 helper T 세포 중 Th1 세포를 활성화한다고 하였다. 김[26]은 人蔘養榮湯에 녹용을 가한 처방이 신독성 및 면역세포를 감소시킨다고 하였으며, Nam 등[23]은 人蔘養榮湯 경구 투여가 외부 자극에 의한 피부장벽 손상을 억제하는 효과가 있다는 것을 밝혔다. 반 등[27]은 갱년기 환자 15례에 人蔘養榮湯 투여를 한 임상 고찰에서 人蔘養榮湯 복용이 인지기능의 향상을 가져왔다고 발표하였으나, 그 기전에 대해서 명확하게 밝혀진 것은 없었다. Huang 등[24]은 人蔘養榮湯 구성 약물들의 항산화 효과 및 뇌세포 보호 효과를 실험적으로 연구 보고하였고, 김 등[25]은 人蔘養榮湯 추출물이 human neuroblastoma cell과 태아중뇌 도파민세포에서 6-OHDA로 유도된 세포독성에 대한 보호효과를 실험적으로 연구 보고하였으나 AD와 관련된 병태기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 상기 선행 연구의 결과를 바탕으로 『韓醫神經精神科學』[10]에서 精竭神衰型 健忘에서 養營固本, 補精益腦의 治法에 활용되는 대표적인 治方으로 제시된 人蔘養榮湯이 뇌의 신경세포에 대하여 양성적 효과가 있을 것으로 사료되어 본 실험을 계획 실시하였다.

먼저 배양 PC12 세포에 대하여 Aβ의 처리에 의한 세포의 독성 효과를 세포의 기능적 변화 즉, 대사활성도의 변화, 형태적 변화, 그리고 생화학적 활성도의 변화 등의 방법으로 분석하였다. 대사활성도는 MTT 분석을 이용하였는데, Aβ 처리에 의하여 PC12 세포의 생존율이 40%

수준으로 감소하였으나 人蔘養榮湯을 처리한 실험군의 경우 세포의 생존율이 80% 수준으로 크게 개선되어 人蔘養榮湯이 PC12 세포의 생존율 향상에 기여한다는 것을 확인하였다. 이러한 세포생존 반응성의 변화와 세포의 형태적 변화의 상관성을 알아보기 위해 세포형태, 핵형태, 자멸경로분석의 세가지 방법을 통하여 세포를 분석하였다. PC12 세포의 형태적 변화는 신경영양인자(nerve growth factor; NGF)의 처리에 의하여 신경돌기의 성장을 유도한 후 약재 처리에 의한 변화를 손쉽게 관찰할 수 있다[53]. PC12 세포의 경우 NGF 처리에 의하여 신경돌기의 확장을 현미경 상에서 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 신경돌기는 Aβ 처리에 의하여 위축되었고, 신경세포에 특이적으로 존재하는 neurofilament 단백질을 염색함으로써 유사한 형태적 변화를 확인하였다. 따라서 Aβ는 PC12 세포의 사멸을 유도하며, 人蔘養榮湯은 이러한 사멸을 지연하거나 막는 방법으로 세포의 생존율을 향상시키는 것으로 판단된다.

신경세포에 있어 mitogen activated protein kinase(MAP kinase)의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. MAP kinase는 일반적으로 세포의 외부에서 주어지는 growth factor, osmotic shock, stress 등 여러 종류의 자극에 대하여 단계별 인산화과정을 통하여 활성화를 진행하는 인산화단백질 집단으로, External signal-regulated protein kinase(Erk)[54], c-Jun-N-terminal kinase(JNK)[53,55], p38 kinase[53] 등이 이에 속한다. 이 단백질들 중 Erk 부류의 대표적 단백질인 Erk1과 Erk2는 구조적 기능적으로 매우 유사하여 Erk1/2로 통칭하여 분석된다[54]. Erk1/2는 하위 기질로서 CREB나 MEF2C 등의 세포의 생존이나 증식에 관여하는 경로를 활성화에 관여하는 단백질의 활성화에 관여하는 반면, JNK와 p38 단백질은 세포에 주어지는 스트레스 등에 의한 세포의 자멸경로의 활성화에 관여한다[53]. 본 실험에서는 PC12 세포의 생존력 관련 생화학적 반응성을 조사하기 위하여 Aβ와 人蔘養榮湯을 동시 처리 후 인산화된 Erk1/2(phospho-Erk1/2)와 phospho-c-Jun의 생성수준을 조사하였다. Phospho-Erk1/2의 경우 Aβ 처리에 의하여 감소하였으나 人蔘養榮湯의 처리에 의하여 생성수준이 증가하는 양상을 보여(Fig. 2). 人蔘養榮湯에 의한 세포생존의 활성화에 Erk1/2 활성화 경로가 관여할 가능이 있는 것으로 해석할 수 있다.

人蔘養榮湯 처리에 의한 Aβ 매개성 치매모델 생쥐에서 신경보호 효과를 조사하기 위하여 Aβ를 측뇌실(lateral ventricle) 부위에 주입 후 해마와 대뇌피질 부위에서 조직학 및 생화학적 변화를 조사하였다. 대뇌 측두엽 부위에 위치한 해마는 단기기억의 정보를 장기정보로 처리하는 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다[56]. 또한 뇌조직에 뇌졸중이나 간질 등 허혈성 혹은 과흥분성 자극을 받을 경우 신경세포의 손상 반응성을 나타내는 것으로 알려져 있다[57,58]. 인간이나 실험동물을 통한 연구에 따르면 치매 환자의 대뇌피질 부위는 표면 해부학적, 조직학적 구조에 있어 세포가 크게 위축되어 있는 것이 대표적 특징으로 관찰된다. 치매환자의 뇌 조직에 대한 fMRI 영상 분석에 따르면 해마조직 역시 크게 위축되어 있는 것으로 보고되었다[59]. 따라서 본 연구에서는 Aβ 처리에 의한 해마나 대뇌피질의 조직학적 생화학적 변화를 조사하고 人蔘養榮湯 처리에 의하여 변화가 유발되는지 조사하였다. 먼저 신경세포의 조직학적 결체성을 조사하기 위하여 신경세포 특이적 단백질인 NF-200의 면역형광염색을 통하여 신경세포의 가지가 뻗어나는 분포를 분석하였다. Aβ를 처리한 경우 정상동물에 비하여 해마나 대뇌피질의 신경세포에서 신

경돌기의 확장이 상당히 제한되어 있었으나, galantamine을 처리한 양성대조군과 人蔘養榮湯을 처리한 실험군에서는 세포가지의 형태적 양상이 정상군과 유사하게 회복되었다(Fig. 3). 신경돌기의 제한은 신경세포의 위축과 관련된 것이며 人蔘養榮湯 처리에 의하여 신경돌기의 확장이 회복된 것으로 사료된다.

人蔘養榮湯 처리에 의한 신경세포의 생존성 및 사멸 반응성을 알아보기 위하여 phospho-Erk1/2와 caspase 3 생성수준의 변화를 조사하였다. 해마조직의 경우 phospho-Erk1/2는 Aβ 처리 후 완전히 소멸되었으나 galantamine 양성대조군과 人蔘養榮湯 실험군에서 정상군 수준으로 회복되었다(Fig. 5). 반면 대뇌피질 조직에서는 각각의 처리군 간에 현저한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6). 이러한 조직의 차이는 신경세포 간의 본질적인 외부손상에 대한 민감도의 차이를 반영하는 것으로 사료되며, 人蔘養榮湯 처리에 의하여 phospho-Erk1/2이 정상군 수준으로 회복된 것으로 미루어 보아 人蔘養榮湯이 세포의 생존성에 양성적으로 작용하였음을 암시한다. Caspase 3는 해마조직과 대뇌피질의 Aβ 처리 대조군에서 면역형광염색 결과 낮은 수준이지만 신호가 관찰되었으며, 人蔘養榮湯 처리에 의하여 신호가 감소하였다(Fig. 4A). 이러한 결과는 Aβ에 의한 세포손상에 세포자멸(apoptosis) 경로의 활성화가 크게 관여하지 않고 있다는 것을 암시하며, 동시에 다른 세포사멸 기전인 괴사가 활성화되었을 가능성을 암시한다. 즉 본 실험조건 하에서 Aβ 처리에 의하여 유도되는 세포의 손상수준은 세포를 완전히 사멸시키는 정도가 아닌 손상경로의 활성화 수준이었을 것으로 추정된다. Erk1/2와 caspase 3 경로에 대한 결과를 종합하면, Aβ 처리에 의한 세포손상 혹은 손상 경로의 활성화가 人蔘養榮湯의 처리에 의하여 억제 효과를 나타낸 것으로 평가된다.

본 연구 결과를 요약하면, Aβ 처리가 배양 PC12 세포와 생쥐의 해마조직 세포 및 대뇌피질의 신경세포를 손상시키는 결과를 초래하며 人蔘養榮湯은 손상으로부터 해당 세포를 회복시키는 효과를 나타냈다. 따라서 Aβ가 치매 환자의 뇌에서 생성되어 뇌조직의 퇴행에 관련된다는 사실을 고려하면 人蔘養榮湯은 신경조직 손상으로 인해 야기될 수 있는 AD 치료를 위한 약물로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 人蔘養榮湯의 약리학적 기전 및 임상적 활용에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

人蔘養榮湯이 Aβ를 처리한 PC12 배양세포와 생쥐의 해마조직 세포 및 대뇌피질의 신경세포의 손상에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 분석과 세포조직학적 분석결과, 人蔘養榮湯은 Aβ를 처리한 PC12 세포와 생쥐 해마조직의 dentate gyrus 부위의 hilus 부위, CA3, CA1 pyramidal cell 층 및 생쥐 대뇌피질의 신경세포에서 세포의 생존율을 향상시켰고, 세포의 형태를 정상세포와 유사하게 회복시켰다.
2. 人蔘養榮湯은 Aβ를 처리한 PC12 세포와 생쥐 해마조직 및 생쥐 대뇌피질의 신경세포에서 Aβ의 처리에 의하여 증가된 세포의 자멸유도 단백질인 caspase 3의 생성 수준을 억제시켰다.

3. 人蔘養榮湯은 Aβ를 처리한 PC12 세포와 생쥐 해마조직 및 생쥐 대뇌피질의 신경세포에서 Aβ의 처리에 의하여 감소된 세포의 생존에 관여하는 단백질인 phospho-Erk1/2의 생성 수준을 증가시켰다.
4. 人蔘養榮湯의 손상 신경세포에 대한 효과는 양성대조군으로 이용된 galantamine 처리군과 유사한 양상을 나타내었으며, 배양 PC12 세포와 해마 및 대뇌피질의 신경세포에서 유사한 방식의 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 人蔘養榮湯은 Aβ를 처리한 AD 연계성 뇌조직에서 신경세포의 손상에 회복 효과를 갖는 것으로 평가되며, AD의 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 대한치매학회. 치매 임상적 접근. 서울:아카데미아. 2006:23-4, 30-4, 201, 233-6.
2. Sisodia SS, Price DL. Role of the β-amyloid protein in Alzheimer's disease. FASEB J. 1995;9(5):366-70.
3. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron1 M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β-secretase cleavage within the secretory pathway. Nat Med. 1995;1(12):1291-6.
4. Wakabayashi T, Craessaerts K, Bammens L, Bentahir M, Borgions F, Herdewijn P, Staes A, Timmerman E, Vandekerckhove J, Rubinstein E, Boucheix C, Gevaert K, De Strooper B. Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. Nat Cell Biol. 2009;11(11):1340-6.
5. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. The β-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. J Neurosci. 2009;29(41):12787-94.
6. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:행림출판사. 1982: 129-35, 534, 545, 550.
7. 王肯堂. 證治準繩. 서울:정담출판사. 1992:306-7.
8. 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.
9. 張介賓. 張氏景岳全書, 서울:翰成社. 1978:610-1.
10. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기도:집문당. 2007:236-8, 324-33.
11. 서정열, 손인철, 금경식. 치매에 대한 東西醫學의 文獻的 考察. 1997;14(1):226-38.
12. 안탁원, 홍석, 김희철. 腦血管性 치매에 대한 東西醫學的 考察. 한국한의학연구원논문집. 1996; 2(1):40-70.
13. 최용덕, 이광규, 강형원, 유영수. 치매의 病理에 대한 東·西醫學的 考察. 동의생리병리학회지. 1999;13(1):36-46.
14. 김현수, 이상룡, 정인철. 洗心湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태모델에 미치는 영향 동의생리병리학회지. 동의신경정신과학회지. 2007;21(3):688-99.
15. 임정화, 이상룡. 八味合聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2008;19(2):95-110.
16. 최강욱, 정인철. 천왕보심단 열수추출물, 초

미세분말제형이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2008;19(2):77-93.
17. 김지현 등. 새로운 제형의 치매치료제제의 효능연구. 동의생리병리학회. 2002;16(2):303-10.
18. 최성열, 김대현, 김상태, 김태헌, 강형원, 류영수. 치매에 대한 최신 실험적 연구 동향(2000년 이후 한의학 학술지를 중심으로). 2008;19(1):125-46.
19. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1990;165-6.
20. 龔廷賢. 國譯萬病回春. 서울:癸丑文化社. 1997:371-2.
21. 하지용, 조성연. 人蔘養榮湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 대한동의병리학회지. 1998;12(1):60-71.
22. 은재순, 김대근, 최훈, 오찬호. 人蔘養榮湯이 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(4):729-33.
23. Nam HJ, Kim YB. Effect of Insamyangyoung-tang on the Skin Barrier Function of Hairless Mice. Korean Journal of Oriental Medicine. 2007;28(4):18-26.
24. Huang S, Lin CM, Chian BH. Protective effects of Angelica sinensis extract on amyloid β-peptide-induced neurotoxicity. Phytomedicine 2008;15;710-21.
25. 김승현, 이창훈, 이진무, 조정훈, 장준복, 이경섭. 人蔘養營湯의 산화적 stress에 대한 뇌세포 보호효과. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):1-14.
26. 金甫燮. 人蔘養榮湯加鹿茸과 鹿茸이 Cisplatin으로 誘發된 白鼠의 腎毒性 및 免疫細胞減少에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 2001.
27. 반혜란, 조현정, 정지예, 박경미, 양승정, 조성희. 인삼양영탕 투여로 호전된 갱년기장애 15례에 대한 임상 고찰. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):257-66.
28. 허준. 동의보감. 경남:동의보감출판사. 2005:170, 554, 1184, 1189, 1261.
29. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. J Alzheimers Dis. 2008;13(4):359-69.
30. 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.
31. Dodart JC, May P. Overview on rodent models of Alzheimer's disease. Curr Protoc Neurosci. 2005;9(9):22.
32. Lannfelt L, Folkesson R, Mohammed AH, Winblad B, Hellgren D, Duff K, Hardy J. Alzheimer's disease: molecular genetics and transgenic animal models. Behav Brain Res. 1993;57(2):207-13.
33. Duff K. Transgenic models for Alzheimer's disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 1998;24(2):101-3.
34. Volloch V. Possible mechanism for resistance to Alzheimer's disease (AD) in mice suggests a new approach to generate a mouse model for sporadic AD and may explain familial resistance to AD in man. Exp Neurol. 1997;144(1):214-8.
35. 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.
36. Downey D. Pharmacologic management of Alzheimer disease. J Neurosci Nurs. 2008; 40(1):55-9.
37. Yamin G, Ono K, Inayathullah M, Teplow DB. Amyloid β-protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease. Curr Pharm Des. 2008;14(30):3231-46.
38. Zetterberg H. Update on amyloid-β homeostasis markers for sporadic Alzheimer's disease. Scand J Clin Lab Invest. 2009;69(1):18-21.
39. Song LL, Du GJ, Fan BY, Zhang DL. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2002;27(6):436-9.
40. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
41. Tuppo E, Arias H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005;37(2): 289-305.
42. Suo Z, Tan J, Placzek A, Crawford F, Fang C, Mullan M. Alzheimer's β-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40. Brain Research. 1998;807(1-2):110-7.
43. 周亞濱, 楊華升. 中藥治療老年性痴呆病近況. 中醫藥學報. 1999;124:73.
44. 董洪濤, 張天嵩. 中醫藥治療老年性痴呆的概況與分析. 上海中醫藥雜誌. 2000;34(4):17-9.
45. 王宏獻. 地黃陰子加減治療老年性痴呆50例. 北京中醫. 1998;17(1):13.
46. 李同新, 劉兆成. 健腦益智合劑治療痴呆96例. 陝西中醫. 2000;21(9):101-2.
47. 孫景波, 華榮, 曹曉菊. 老年性痴呆病中醫機探討. 陝西中醫. 2000;21(2):71-2.
48. 韓 旭, 陳美蘭, 胡銑城. 中醫辨證分型治療老年性痴呆病60例. 遼寧中醫雜誌. 1998;25(12):557-8.
49. 朱俊程. 益氣活血法治療老年期痴呆症54例. 四川中醫. 1999;17(5):30.
50. 陳 輝. 實用中醫腦病學. 北京, 學苑出版社. 1993: 793-5.
51. 黃大東. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-81
52. 신재용. 方藥合編解說, 서울:成輔社. 1988:42.
53. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science. 1995;270(5240):1326-31.
54. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell. 2000;103(2): 239-52.
55. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Genet Dev. 2002;12(1):14-21.
56. Lucas JA. Disorders of memory. Psychiatr Clin North Am. 2005;28(3):581-97, 594.
57. Ohm TG. The dentate gyrus in Alzheimer's disease. Prog Brain Res. 2007;163:723-40.
58. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. Science. 1997; 278(5337):412-9.
59. Laakso MP, Lehtovirta M, Partanen K, Riekkinen PJ, Soininen H. Hippocampus in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up MRI study. Biol Psychiatry. 2000;47(6):557-61.