동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):43-57

뇌해마배양조직을 이용한 치매 뇌손상 모델에 대한 疏風順氣元과 黃連解毒湯 처방약재의 신경보호효과 연구

곡경내, 김종우, 정선용, 박지호*

경희대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 경희대학교 동서의학대학원*

Investigation of Neuroprotective Effect Using Herb Medicine against Dementia related Brain Damage in Organotypic Hippocampal Slice Culture

Ching-Nai Chu, Jong-Woo Kim, Sun-Yong Chung, Ji-Ho Park*

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University
Grauate school of east-west medical science, Kyung-Hee University*

Abstract

Objectives :
This study was designed to assess neuroprotective effects of herb medicine against Alzhheimer's disease related brain damage in organotypic hippocampal slice culture.

Methods :
We induced dementia related brain damage in organotypic hippocampal slices by β-amyloid. Those slices were treated with herb medicines - Hwangryeonhaedoktang, Sopungsoongiwon. Using by PI staining, the extents of cell death were assessed. After that, we selected the best effective one among those herb medicines and the major components of that medicine were studied to reveal neuroprotective effects and related proteins by using PI stating.

Results :
In PI staining, Sopungsoongiwon is the best effective herb medicine between Hwangryeonhaedoktang and Sopungsoongiwon. Notopterygii Rhizoma, Corni Fructus, Areca Catechu, Aurantii Fructus Immaturus, Plantaginis Semen is the best effective one among the components of Sopungsoongiwon.

Conclusions :
We suggested that purgative effect would be the best effetive medicine on dementia related brain damage between clearing heat and toxic materials.

Key Words :
Notopterygii Rhizoma, Corni Fructus, Areca Catechu, Aurantii Fructus Immaturus, Plantaginis Semen, Neuroprotective, β-amyloid, Organotypic hippocampal slice culture

투고 : 2010. 2. 18. 수정 : 2010. 3. 12. 채택 : 2010. 3. 12.
교신저자 : 김종우, 서울시 강동구 상일동 149 경희대학교 동서신의학병원 화병스트레스클리닉
Tel) 02-440-7133, Fax) 02-440-7143, E-mail) aromaqi@khu.ac.kr
이 논문은 2010년 2월 경희대학교 일반대학원 한의학과 임상한의학(신경정신과학전공) 석사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

치매는 대표적인 퇴행성 뇌질환으로서, 사회가 노령화 되어감에 따라 질환 발생률 또한 증가하여, 지불되는 진료비 또한 매년 증가하는 추세를 나타내고 있다. 치매의 유병율은 연령에 따라 증가하여 65세 이상에서 약 5~10%, 80세에는 20~30%정도로 나타나며, 그 중에서 Alzheimer's Disease (AD)가 차지하는 부분이 50~60%이상으로 가장 크다[1].

AD의 발병에는 β-amyloid peptide(Aβ), Estrogen, Apolipoprotein E, Presenilin, Oxidants free radicals, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며[2], 뇌의 Microglial cell이 뇌손상 및 외부로부터의 이물질 침입으로 활성화되면, Proinflammatory Cytokines[3], Nitric Oxide (NO)[4] 및 Prostaglandin을 다량 분비하여 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다[5].

AD의 신경병리학적 특징은 Aβ가 많이 함유된 비정상적인 물질들의 집합체인 노인성반(amyloid rich senile plaques), 신경섬유다발(Neurofibrillary tangles; NFTs) 및 신경세포의 퇴행변성(neuronal degeneration)이다[6]. 그 중 AD 환자의 특징적 소견인 Aβ에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고, 생성 기전에 대해서는 아직까지 명확하게 규명되지 않고 있다. Aβ가 축적되면서 자유기와 산화적 스트레스 및 DNA의 손상이 일어나고, 이로 인하여 신경세포에 대한 독성과 변성이 야기된다. 또한 AD가 진행되면 신경세포뿐만 아니라, 신경전달물질에도 변화가 일어나는데, AD환자의 인지기능 저하와 밀접한 관련성을 지닌 것이 바로 Acetylcholine의 양적 감소이다. 따라서 현재 AD환자에게 사용되고 있는 대부분의 치료제는 아세틸콜린 분해효소 저해제(acetylcholinesterase inhibitor)이며, AD의 진행속도를 감소시키거나 신경세포의 손상 보호를 목적으로 항산화제가 또한 주목받고 있다.

본 연구에서 채택한 실험방법은 살아 있는 조직 상태와 유사한 환경에서 실험을 하기위하여 ex-vivo를 선택하였다. 실질적으로, In vitro에서의 연구는 실제 생체와의 거리가 멀고, in vivo에서의 연구는 외부환경의 영향을 많이 받는 단점이 있으므로, 기존의 한약 연구들이 임상연구로 이어지는 경우들이 극히 드문 것이 현실이다.

黃連解毒湯은 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성된 淸熱解毒瀉實火의 대표적인 처방으로 약성이 苦寒하여 淸熱解毒, 健胃平肝 등의 효능이 있으며, 一切實熱, 火毒之症, 大熱煩燥, 口燥咽乾, 譫語不眠, 或熱病吐血, 衄血, 或熱甚發狂, 身熱下痢, 濕熱黃疸, 外科膿瘍疔毒, 小便黃赤, 因飮酒復劇, 舌紅苔黃, 脈數有力한 증상 등의 치료에 널리 사용되었다[7]. 최근 연구보고에 의하면 항고혈압[8], 항고지혈[8], 항궤양[9], 항균, 진통, 소염, 해열[10], 수면시간 연장[11], 항우울[12,13], 항산화[14] 인지기능 회복[15], 항알러지[16] 등 다양한 약리작용이 보고되어 신경[12], 정신병[2], 불면[12], 인후염, 고혈압, 중풍 후유증[12], 뇌혈관질환[2], 갱년기 장애, 알레르기성 피부염 등의 여러 질환에 활용하고 있다. 疏風順氣元은 大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 防風, 獨活로 구성되어, 『東醫寶鑑·風門』[17]에서 風痱에서 "風痱者　緩者四肢不擧急則一身皆仰或左癱右瘓或一臂不遂智亂不能言者難治脾實者膏粱之疾"에 사용한다고 하였고, 『東醫寶鑑·大便門』[17] 에서용이" 老人秘結宜疏風順氣元"이라 하였다. 이 처방은 中風患者의 便秘[18], 공복 및 비공복시 혈당, 당화혈색소, 중성지방의 농도, 小腸의 gluc仁, 해열se 활성억제, 근육조직의 GLUT4 mRNA 양의

감소[19], 혈당강하, 체중증가 감소, 총 cholesterol 수치 감소, TG감소[20] 등의 효과가 보고되고 있다.

한약물의 인지기능과 관련된 항염 작용과 더불어 in vitro에서 뇌신경세포 보호효과의 기전 연구에서 淸肺瀉肝湯[21], 黃連解毒湯[22] 등이 효과가 있다고 보고되었고, 黃連解毒湯과 黃連解毒湯에 大黃을 가한 처방 淸血丹[23]이 in vitro와 in vivo 및 임상 연구에서 신경세포 보호효과 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 보고되었고, 淸血丹[24]을 중풍예방 및 항고혈압 효과와 관련하여 임상시험을 시행하여 유효한 효능이 있는 것으로 보고되었다. 이와 같이 淸熱藥들은 세포를 보호하는 효과가 뛰어난 것으로 보고되어 왔으나, 치매성 뇌손상에 대한 뇌신경세포보호에 대한 효과를 비교 연구한 것은 없었으며, 기존의 많은 연구가 되어있지 않은 분야에서 새로운 약물을 탐색하기 위하여 유의한 치료법을 찾고자 하였다. 이에 저자는 기관형적 해마 절편 배양에서 黃連解毒湯, 疏風順氣元을 처리하여 Aβ로 유발된 치매성 뇌세포손상에 대한 보호효과가 있는지 살펴보기 위해 Propidium iodide(PI) 염색을 통해 세포손상정도를 관찰하였고, 또한 黃連解毒湯과 疏風順氣元 각각의 처방 구성약물들을 PI 염색을 통해 세포손상정도를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고 하는 바이다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 실험개관

본 실험은 기관형적 해마 절편 배양에 Aβ로 치매성 뇌세포 손상을 유발하고, 黃連解毒湯, 疏風順氣元으로 처리하여 세포보호효과를 알아보았다. 또한 각각의처방인 黃連解毒湯과 疏風順氣元의 각각 구성약물별로 세포보호 효과를 알아보기 위하여 PI 염색을 수행하였다(Fig. 1).

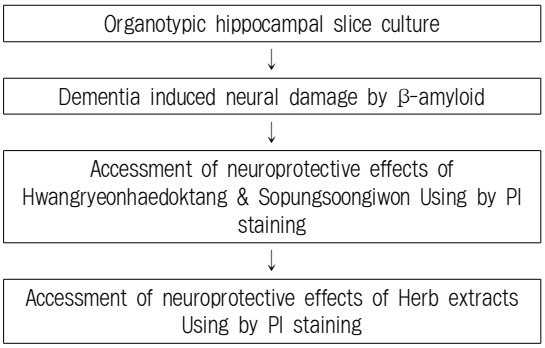


Fig. 1. Procedures of investigation.

2. 실험재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 黃連解毒湯, 疏風順氣元은 모두 東醫寶鑑 처방에 의한 구성 약물로 되었다.

이 실험에서 사용된 약재는 경희대학교 동서신의학병원 藥劑科를 통해 구입 정선한 것을 사용하였다. 黃連解毒湯, 疏風順氣元의 처방구성 약물 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ, Ⅱ).

Table Ⅰ. The Composition of Hwangryeonhaedok-tang

Herbs	Pharmaceutical Name	Dose
黃芩	Scutellariae Radix	5 g
黃連	Coptidis Rhizoma	5 g
黃柏	Phellodendri Cortex	5 g
梔子	Gardeniae Fructus	5 g
	Total amount	20 g

Table Ⅱ. The Composition of Sopungsoongi-won

Herbs	Pharmaceutical Name	Dose
大黃	Rhei Rhizoma	10 g
車前子	Plantaginis semen	5 g
郁李仁	Pruni Semen	4 g
檳榔	Arecae Semen	4 g
麻子仁	Cannabis Fructus	4 g
兎絲子	Cuscutae Semen	4 g
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	4 g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	4 g
山茱萸	Corni Fructus	4 g
枳殼	Aurantii Fructus	2 g
防風	Saposhnikovia Radix	2 g
獨活	Angelicae Pubescentis Radix	2 g
	Total amount	49 g

2) 시료 제조

黃連解毒湯 20 g, 疏風順氣元 49 g (Table Ⅰ, Ⅱ)에 각각 물 2리터씩 넣고 1시간 30분 동안 가열한 후 여과하여 여액을 분리하였다. 얻어진 여액을 모두 합하여 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 다시 동결건조를 통해 수분을 완전히 제거하여 건조된 추출물을 얻었다. 동결건조 했을 때 최종적으로 얻은 시료량은 黃連解毒湯 3.13 g (수득율 15.65%), 疏風順氣元 4.75 g(수득율 9.69%), 이었다. 이 약물을 실험할 때 마다 생리 식염수를 사용하여 실험에 필요한 농도로 희석한 후 0.45 μm syringe filter로 걸러 사용하였다.

이후 黃連解毒湯의 구성약물인 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子와 疏風順氣元의 구성약물인 大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 獨活 15가지 약재의 시료를 제조하였다. 각각의 구성약물 300 g을 물 1.2리터에 1시간 30분 동안 가열한 후 여과하여 여액을 분리하였다. 얻어진 여액을 모두 합하여 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 다시 동결건조를 통해 수분을 완전히 제거하여 건조된 추출물을 얻었다. 동결건조 했을 때 최종적으로 얻은 시료량은 黃芩 4.3849 g(수득율 43.849%), 黃連 1.8559 g (수득율 18.559%), 黃柏 2.2372 g(수득율 22.372%), 梔子 3.04q 19 g(수득율 30.419%), 大黃 1.2864 g (수득율 12.864%), 車前子 0.3752 g(수득율 3.752%), 郁李仁 0.4093 g(수득율 4.093%), 檳榔 0.8077 g (수득율 8.077%), 麻子仁 0.6497 g(수득율 6.497%), 兎絲子 1.2247 g(수득율 12.247%), 牛膝 3.3039 g(수득율 33.039%), 山藥 1.486 g(수득율 14.86%), 山茱萸 3.4919 g(수득율 34.919%), 枳殼 2.882 g (수득율 28.82%), 獨活 3.9751 g(수득율 39.751%) 이었다.

3. 기관형적 해마 절편 배양

배양 준비의 모든 과정은 멸균상태를 유지하기 위해 무균대에서 수행되었다. 7일된 Sprague-Dawley 쥐의 목을 자른 후 빠르게 뇌를 적출하였다. 뇌는 즉각적으로 20 mM HEPES(H-4034, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 들어있는 냉각된 HBSS-medium (LB003-01, Sigma, St.Louis, MO, USA)에 담근다. 해마 적출 후에, tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering Co., Surrey, UK)를 사용하여 350 ㎛로 횡단면으로 자른다. Slice는 membrane insert (polytetrafluorethylene membranes, 0.4 ㎛, Millicell-CM, Millipore Co., Bedford, MA, USA)위에 올려놓은 상태로, 6-well plates에 옮겨 놓고, 각 well마다 Culture medium [50% MEM-medium(LM 007-01, JBI, Daegu, South Korea), 25% inactivated horse serum(S 104-01, Daegu, South Korea), 25% Hank's balanced salt solution(LB 003-1, JBI, Daegu, South Korea), 6 g/L D-glucose(G-7528, Sigma, CO., St. Louis, MO, USA), 1 mM L-glutamine (G-8540, Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 mM HEPES(H-4034, Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% penicillin-streptomycin(LS 202-02, Gibco

BRL, USA), pH 7.3] 1 ml를 채웠다. 배양액은 1주에 두 번씩 바꿔주고, 5% CO_2 하에서 36°C 유지하며 incubator안에서 14일간 배양한 후에 실험에 사용하였다.

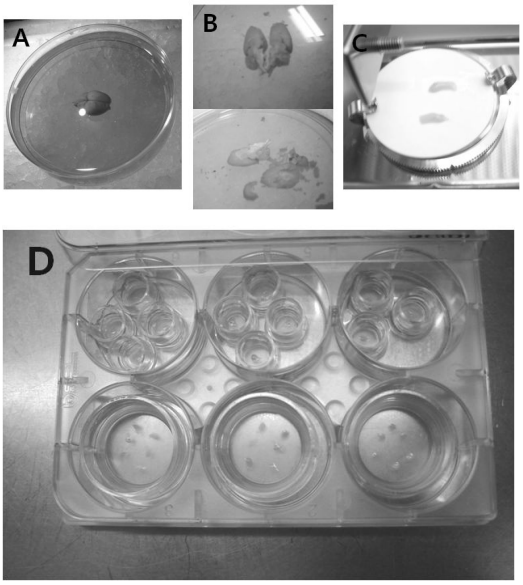


Fig. 2. Organotypic hippocampal slice culture process.
(A) Sprague-Dawley rats (7 days old) were decapitated and their brains were quickly removed. (B) The brain was divided into two hemisphere and each side hippocampus was isolated from a hemisphere. (C) Their dorsal halves were sectioned transversely at 350 μm using a tissue chopper. (D) A six-well culture dish and fitting memebrane insert was used to maintain slices for culture.

4. 신경세포 손상의 평가

1) 약물처리

한약물에 따른 효과를 보기 위해서 2주간 배양한 기관형적 해마 절편의 영양배지를 영양분이 없는 배지로 바꾸었으며, 뇌독성이 있어 실험동물 뇌에 주입하면 기억력 장애를 유발하는 것으로 알려져 있는 Aβ[25]로 세포손상을 유발시켰다. 대조군은 Aβ 100 μM를 주입하였으며, 실험군은 黃連解毒湯, 疏風順氣元을 Aβ 100 μM 주입 1시간 전 100 μg/ml 씩을 처리 후 각각 72, 96시간동안 추가 배양 관찰하였다. 실험은 5개를 한 군으로 하였다(Table Ⅲ, Fig. 3).

Table Ⅲ. Kind of Interventions(黃連解毒湯, 疏風順氣元)

Group	Intervention
Normal control group	Non-intervention
Control group	100 μM Aβ
Experimental group 1	100 μM Aβ + 황련해독탕(100 μg/ml)
Experimental group 2	100 μM Aβ + 疏風順氣元 (100 μg/ml)

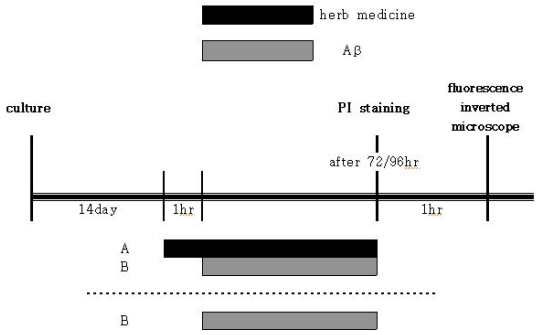


Fig. 3. Repertories of treatment.
A : the experimental procedure for herb medicine treatment.
B : the experimental procedure for Aβ(100 μM).

黃連解毒湯과 疏風順氣元의 구성약물도 같은 방법으로 처리하였다. 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子, 大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 獨活은 약제 효능이 100 μg/ml에서 효과가 보이지 않아서 1 mg/ml로 처리하였다. 이것 또한 1시간 전에 처리한 후에 Aβ를 주입하여 72시간 동안 추가 배양 후 관찰하였다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Kind of Interventions(Each compositions of 黃連解毒湯, 疏風順氣元)

Group	Intervention
Normal control group	Non-intervention
Control group	100 μM Aβ
Experimental group 1	100 μM Aβ + 黃芩 (1 mg/ml)
Experimental group 2	100 μM Aβ + 黃連 (1 mg/ml)
Experimental group 3	100 μM Aβ + 黃柏 (1 mg/ml)
Experimental group 4	100 μM Aβ + 梔子 (1 mg/ml)
Experimental group 5	100 μM Aβ + 大黃 (1 mg/ml)
Experimental group 6	100 μM Aβ + 車前子 (1 mg/ml)
Experimental group 7	100 μM Aβ + 郁李仁 (1 mg/ml)
Experimental group 8	100 μM Aβ + 檳榔 (1 mg/ml)
Experimental group 9	100 μM Aβ + 麻子仁 (1 mg/ml)
Experimental group 10	100 μM Aβ + 兎絲子 (1 mg/ml)
Experimental group 11	100 μM Aβ + 牛膝 (1 mg/ml)
Experimental group 12	100 μM Aβ + 山藥 (1 mg/ml)
Experimental group 13	100 μM Aβ + 山茱萸 (1 mg/ml)
Experimental group 14	100 μM Aβ + 枳殼 (1 mg/ml)
Experimental group 15	100 μM Aβ + 獨活 (1 mg/ml)

2) Propidium iodide(PI) 염색

PI(H-4034, Sigma, USA)는 손상된 세포막을 통해 죽은 세포나 죽어가는 세포에만 들어가는 극성을 가지는 물질로 세포 내부로 들어가서 핵산과 붙으면 초록색 빛으로 흥분되어 붉은 색으로 형광 빛을 낸다[26]. PI는 기본적으로 5 μg/ml의 농도에서 신경세포에 독성이 없는 것으로 알려져 있으므로[27] 이를 기준으로 사용하였다.

위의 약물처리 방법대로 배양 후에 PI(5 μg/ml)를 각 배양액에 넣고, 1시간이 경과한 후에 PI stained image를 digital CCD camera(Axiocam, Zeiss, Oberko, Germany)가 부착된 형광현미경(fluorescence inverted microscope, Axiovert S 100, Zeiss, Oberko, Germany)으로 찍었다. 관찰된 PI uptake area는 영상분석프로그램(Scion image beta 4.02 win, Scion Co., Maryland, USA)에 있는 'density slice'로 측정하여 신경세포가 죽은 비율을 계산하였다.

5. 통계분석

PI 형광 현미경으로 관찰한 대조군과 실험군의 72, 96시간 후 신경세포손상 정도를 비교하기 위해 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Windows for 10.0 USA) 프로그램을 사용하여 Mann-Whitney U test를 시행하였다. P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 각 처방의 신경세포 보호효과

黃連解毒湯(H)과 疏風順氣元(S)을 농도별로 Aβ와 함께 처리 후 시간별로 신경세포 보호효과를 비교하였다. 72시간에서는 Aβ단독 처리한 군보다 疏風順氣元이 통계적으로 유의하게 세포사멸이 적은 것으로 나타났다. 이에 반해 黃連解毒湯은 Aβ를 단독으로 처리한 군과 비교하여 어떠한 농도에서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table Ⅴ, Fig. 4).

96시간에서는 黃連解毒湯, 疏風順氣元군 모두에서 Aβ 단독 처리한 군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table Ⅴ, Fig. 5).

Table Ⅴ. The Protective Effect of Herbal Medicines against Aβ Treated Damage after 72, 96 Hours Treatment

Drug	Post 72h		P-value	Post 96h		P-value
Cont	0.2400	±0.1624	0.0020†	2.7661	±1.1852	0.092
Aβ	5.6481	±1.5362		10.5340	±2.3267	
H1000μg	6.2125	±1.4008	0.4540	25.5268	±4.9201	0.025*
H100μg	2.6083	±1.1768	0.1600	13.7693	±4.7559	0.708
H10μg	3.4392	±1.1871	0.3030	12.8330	±3.1027	0.512
S1000μg	0.7000	±0.3568	0.0020†	5.9035	±1.9762	0.399
S100μg	0.1102	±0.0460	0.0010†	4.8202	±1.3809	0.160
S10μg	1.5694	±0.4472	0.0070†	4.3029	±2.4736	0.134

All values are mean±S.E.
Each P-value was calculated with Dex by Mann-Whitney U test
* P<0.05, † P<0.01
Aβ means Amyloid-Beta ; H means Hwangryeonhaedoktang, S means Sopungsoongiwon

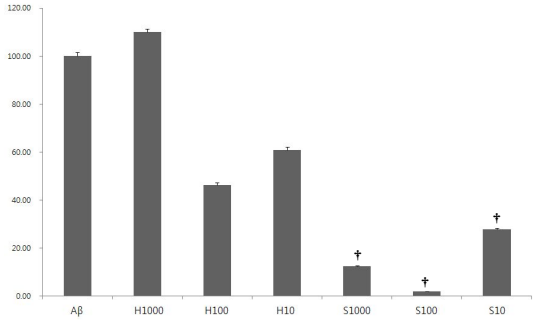


Fig 4. The protective effect of herbal medicines against Aβ treated damage after 72 hours.
Two different herbal medicines was tested for their protective effect.
H means Hwangryeonhaedoktang, S means Sopungsoongiwon
1,000 μg/ml, 100 μg/ml, 10 μg/ml each.

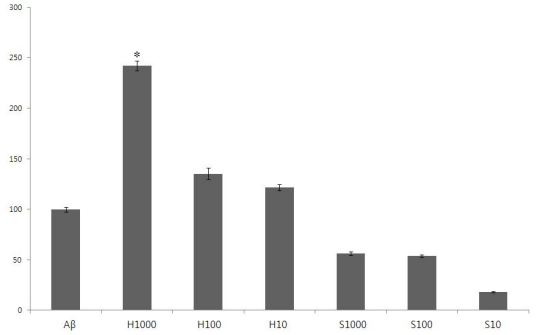


Fig 5. The protective effect of herbal medicines against Aβ treated damage after 96 hours.
Two different herbal medicines was tested for their protective effect.
H means Hwangryeonhaedoktang, S means Sopungsoongiwon
1000 μg/ml, 100 μg/ml, 10 μg/ml each

2. 각 단미제의 신경세포 보호효과

黃連解毒湯의 구성약물인 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子와 疏風順氣元의 구성약물인 大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 獨活을 선택하여 PI 염색을 실행하였다.

각각의 약물과 Aβ를 처리하였을 때 72시간 경과한 후 관찰한 결과 Aβ 단독 처리한 군보다 檳榔, 山茱萸, 枳殼, 車前子, 獨活은 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 하지만, 菟絲子는 유의하게 세포사멸이 더 많이 증가하였다(Table Ⅵ, Fig. 6).

Table Ⅵ. The Protective Effects of Herb Extracts against Aβ Induced damage after 72 Hour Treatment

Drug	N	Pre	Post 72h	P-value
Control	5	1.459±0.827	0.455 ±0.169	0.002†
Aβ	10	0.091±0.034	48.966±10.021	
C1	6	0.189±0.067	15.490±7.191	0.023*
C2	5	0.024±0.021	23.279±8.480	0.221
C3	6	0.049±0.012	63.529±12.275	0.386
C4	6	0.208±0.057	35.282±14.883	0.515
C5	5	0.036±0.014	43.586±5.312	0.903
C6	5	0.103±0.049	74.083±15.583	0.142
C7	6	0.093±0.045	81.237±12.864	0.083
C8	6	0.763±0.738	47.537±9.534	1.000
C9	6	0.053±0.031	36.356±8.834	0.745
C10	6	0.511±0.472	9.258±3.914	0.007†
C11	6	0.010±0.005	16.04±5.955	0.030*
C12	5	0.234±0.225	0.327±0.059	0.002†
C13	6	0.448±0.335	91.084±7.011	0.023*
C14	5	0.012±0.007	22.931±9.637	0.142
C15	5	1.102±0.017	6.259±3.401	0.005†

All values are mean±S.E.
Each P-value was calculated with Dex by Mann-Whitney U test
* P<0.05, † P<0.01
(Aβ) Amyloid beta, (C1) Plantaginis Semen: 車前子, (C2) Scutellariae Radix: 黃芩, (C3) Gardeniae Fructus: 梔子, (C4) Phellodendri Cortex: 黃栢, (C5) Cannabis Fructus: 麻子仁, (C6) Dioscoreae Rhizoma: 山藥, (C7) Rhei Rhizoma: 大黃, (C8) Achyranthis Bidentatae Radix: 牛膝, (C9) Pruni Semen: 郁李仁, (C10) Aurantii Fructus Immaturus: 枳殼, (C11) Angeliacae Pubescentis Radix: 獨活, (C12) Arecae Semen: 檳榔, (C13) Cuscutae Semen: 菟絲子, (C14) Coptidis Rhizoma: 黃連, (C15) Corni Fructus: 山茱萸

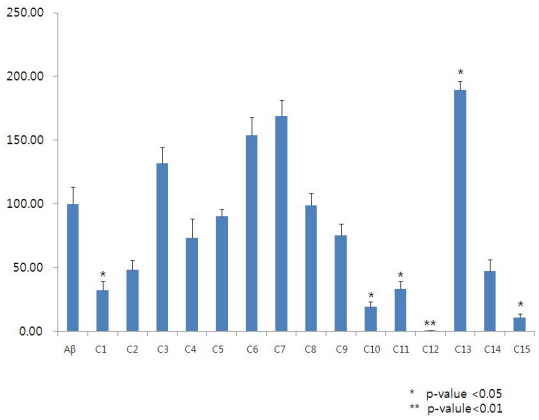


Fig. 6. The protective effect of herb extracts against Aβ induced damage after 72 hours treatment.
(Aβ) Amyloid beta, (C1) Plantaginis Semen: 車前子, (C2) Scutellariae Radix: 黃芩, (C3) Gardeniae Fructus: 梔子, (C4) Phellodendri Cortex: 黃栢, (C5) Cannabis Fructus: 麻子仁, (C6) Dioscoreae Rhizoma: 山藥, (C7) Rhei Rhizoma: 大黃, (C8) Achyranthis Bidentatae Radix: 牛膝, (C9) Pruni Semen: 郁李仁, (C10) Aurantii Fructus Immaturus: 枳殼, (C11) Angeliacae Pubescentis Radix: 獨活, (C12) Arecae Semen: 檳榔, (C13) Cuscutae Semen: 菟絲子, (C14) Coptidis Rhizoma: 黃連, (C15) Corni Fructus: 山茱萸

Ⅳ. 고 찰

최근 들어 한의학계에도 치매와 관련된 다수의 문헌적, 실험적, 임상연구가 보고되고 있으며, 치매에 대한 다양한 비임상 연구가 진행되어 기초 연구는 비교적 많은 부분이 이루지고 있다.

복합처방에 대한 연구는 in vitro에서 항염작용과 더불어 淸肺瀉肝湯[21], 黃連解毒湯[24]이 뇌신경세포 보호효과가 있고, 天王補心丹[29], 加減固本丸[30]이 AChE의 발현 및 활성을 억제했다는 보고가 있었으며, 星香正氣散加蒲公英[31]은 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1 및 Aβ의 생성을 억제 효과를 보였으며, 益精地黃湯[32], 導痰益氣活血湯[33], 補益淸腦湯[34]은 PC12cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제 능력과 항콜린작용을 나타냈다. in vivo실험에서는 天王補心丹[29], 加減固本丸[30], 調胃升淸湯[35,36]과 荊防地黃湯[37]이 학습과 기억을 증진시키는 효과를 나타냈고, 인지기능 보호 및 개선 효과에 대해서는 荊防地黃湯[38], 香附子八物湯[39], 調胃升淸湯[36]이 효과가 있다고 보고하였다. 기억력감퇴 유도 생쥐에 대한 聰明湯[40-42]의 효과를 연구하였으며, CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포쥐의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하고 기억력 개선효과가 있고, 左歸飮, 右歸飮[28]으로 뇌의 노

화와 연계하여 노화를 유발하는 항산화작용에 대한 연구를 활발하게 진행하여 왔고, 麝香蘇合元[43]이 白鼠의 기억과 행동에 미치는 영향을 연구하였다.

복합처방이 아닌 단미제로는 세포실험에서는 日黃連[44], 香附子[45], 忍冬藤, 天花粉, 赤芍藥, 玄參, 魚腥草, 大腹皮, 桑寄生[46] 등이 AChE 효소활성을 억제하는 효과가 있다는 보고와 合歡皮와 細辛의 성분 중에 항산화 효과가 있다는 보고가 되었으며[47], 동물실험에서 石菖蒲[48,49], 日黃連[44], 香附子[45] 등이 학습과 기억을 증진시키는 효과를 보였다고 보고가 되었으며, 釣鉤藤[50]이 Aβ APP 과발현에서 신경세포사 억제작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 遠志와 石菖蒲[48]의 혼합추출액이 APP의 pCT105로 유도된 SK-N-SH 세포쥐인 neuroblastoma 세포에서 치매와 동일한 신경세포의 세포사 유도에 대한 억제효과가 있다고 보고되었으며, 巴戟天[52]이 치매 병태모델에 미치는 영향을 실험하여 유의한 효과가 있다고 보고되었다. 香附子[45]는 항콜린작용과 APP와 Presenilin-1, Presenilin-2 발현을 억제하는 효과가 있으므로 치매의 예방과 치료에 활용할 수 있다는 연구를 발표하였다. 녹차 등[53] 단일약물에 대해서도 뇌세포보호효과가 있다고 보고되었으며, 동물실험에서 흰쥐를 뇌혈관을 폐쇄후 재관류 시켰을 때 石菖蒲[49]를 투여한 경우가 그렇지 않은 경우보다 뇌세포의 사멸이 현저하게 억제되었다고 보고되었으며, 항치매 약효를 나타내는 천연물 연구에서 吳茱萸[47]에서 분리된 성분 DHED(Dehydroevodiamine·HCl)는 AchE 저해활성을 가지며, 인지기능 손상의 개선과 CBF (Cerebral Blood Flow)활성을 증대시키는 효능으로 인해 AD와 혈관성 치매에 있어서 주목할 만한 물질이라 하였고, 玄胡索으로부터 얻은 알카로이드인 Propin 1은 AchE 저해 효능이 tactine 유도체인 velnacrine과 거의 대등한 것으로 나타나 치매 치료제로서의 연구 가능성이 보인다고 보고되었다. 그 외에 AchE 저해 활성을 보이는 것으로 蘇木, 黃連, 枇杷, 金銀花, 牡丹皮, 竹茹, 釣鉤藤, 夏枯草, 蘇木, 陳皮, 麥芽, 黑豆, 乾地黃, 熟地黃 등을 보고되었으며, Aβ독성을 차단하는 것으로 藿香, 茵蔯蒿, 楡根皮, 車前子, 當歸를 보고되었고, Aβ저해 활성을 보인 것으로 天麻, 厚朴, 丹參, 玄胡索, 天南星을 보고되었다[47].

하지만 많은 in vitro 및 in vivo 실험결과에서 우수한 효과를 보인 한약물들이 있으나 임상에서 실질적으로 적용되어 사용 되고 있는 것은 부족한 실정이며, 연구된 복합처방 사이의 비교연구와 각각의 단미제에 대한 비교연구가 없었으며, 또한 대부분은 補精之劑, 祛痰之劑에 관련된 처방의 치매연구만 보고되었고 淸熱之劑는 비교적 적은편이다. 최근 淸熱을 기본 기전으로 하고 있는 黃連解毒湯과 黃連解毒湯에 大黃을 가한 처방 淸血丹[23]이 in vitro와 in vivo 및 임상 연구에서 신경세포 보호효과 및 항염증 효과에서 좋은 결과를 얻었으며, 또한 淸血丹[24]을 중풍예방 및 항고혈압 효과와 관련하여 임상시험을 시행하여 유효한 효능을 입증하였다.

한약물의 연구는 항염증 및 인지 기능강화의 약효가 기대되는 복합처방 및 단미제를 중심으로 Aβ저해 효능이 임상적으로 시험되고 있는 단계이며, Aβ침착을 효과적으로 방지하거나, 이미 형성된 Aβ를 제거할 수 있는 한약물을 발견하는 것은 치매 치료의 새로운 장을 여는 계기가 될 것이라 사료된다. 그러므로 Aβ의 축적과 NTFs 형성을 차단할 수 있는 천연물의 검색은 『東醫寶鑑』, 『本草學』, 『天然藥物大辭典』, 『傷寒論』 등에 나타나있는 癲, 癎, 狂, 脫營, 失精, 怔忡, 驚悸, 健忘, 譫語등의 한의학적 신경 질환에 약효가 있는 물질을 중심으로 하는 것이 효과적

일 것이다[54]. 이에 저자는 치매로 유발되는 여러 병증 중에 淸熱 또한 중요한 병증으로 보고, 이를 치료하는 대표적 처방으로 淸熱瀉火하는 黃連解毒湯과 淸熱兼潤腸 시키는 疏風順氣元과 각 처방의 구성약물인 단미제를 選定하여 치매에 의한 뇌손상에 대해 보호효과가 가장 좋은 치료법을 찾아내고자 하였다. 疏風順氣元은 大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 防風, 獨活로 구성된 처방이다. 『東醫寶鑑·風門』[17]에서 風痱에서 "風痱者 緩者四肢不擧急則一身皆仰或左癱右瘓或一臂不遂智亂不能言者難治脾實者膏粱之疾"에 사용한다고 하였고, 『東醫寶鑑·大便門』[17]에서는 "老人秘結宜疏風順氣元"이라 하여, 老人便秘 증상을 치료하는 처방이며, 또한 '이 藥은 大便의 秘澁을 全治하는 良方이다. 오래 먹으면 정신이 건강하고 百病이 나지 않으니 老人에게 適宜한 처방이다'. 라고 하여 虛弱한 老人들도 長服할 수 있는 藥임을 기술하였다. 疏風順氣元에 관한 연구로 中風患者의 便秘[18]에 사용할 수 있고, 공복 및 비공복시 혈당, 당화혈색소, 중성지방의 농도, 소장의 glucosidase 활성억제, 근육조직의 GLUT4 mRNA 양의 감소[19]를 나타냈고, 혈당강하, 체중증가 감소, 총 cholesterol수치 감소, TG감소 등의 효과[20]가 있다고 보고되었다. 이렇듯 疏風順氣元을 이용한 치매의 실험적 연구는 거의 없는 실정이며, 疏風順氣元의 효능에 대한 연구도 찾아보기 힘들었다. 方劑의 내용을 살펴보면 性味가 苦寒沈降하고 力勇善行하여 下焦에 직달하는 大黃은 腸胃의 積滯를 蕩滌하고, 郁李仁은 甘潤滑利 하여 大小便의 秘結을 通導하고, 麻子仁은 潤燥潛陽, 通便하는 효능이 있어 緩下通便하고, 兎絲子는 補陽하고 益陰시키며, 山藥은 補脾養胃, 補肺益腎의 作用을 하며, 車前子는 濕熱의 邪氣를 小便을 따라 배출케하며, 檳榔은 行氣, 消積, 利水하고, 牛膝은 肝腎二經에 들어가 活血祛瘀하여 引血下行시키며, 山茱萸는 補益肝腎, 澁精固脫, 治腰膝痠痛의 작용이 있으며, 枳殼은 理氣寬中, 行痰消積하고, 防風은 祛風邪하여 治風에 通用하는 要藥이며, 性味가 辛散苦降 氣香溫燥한 獨活은 祛風除濕하고 그 性이 下行하여 腰部 以下의 痺症을 치료하는 약제들로 구성되었다[55]. 약제들을 분류해보면 淸熱瀉下시키는 大黃을 主劑로 하는 瀉下潤腸藥 3가지(大黃, 郁李仁, 麻子仁)와 補益藥 2가지(兎絲子, 山藥), 그리고 기타 利水滲濕(車前子), 驅蟲(檳榔), 活血祛瘀(牛膝), 收澁(山茱萸), 理氣(枳殼), 解表(防風), 祛風濕之劑(獨活)으로 분류된다.

본 연구는 살아 있는 조직 상태와 유사한 환경에서 실험을 하기 위해 Ex-vivo상태인 기관형적 해마 절편 배양을 선택했다. 기관형적 해마 절편 배양[56]은 생후 6-8일된 어린 쥐의 해마 조직을 체외 배양하여 신경 세포들의 형태뿐만 아니라 연접부 연결을 그대로 유지할 수 있는 방법으로 신경세포들이 계속 분화하면서 생체 정상부위에서 관찰되는 것과 매우 흡사한 표현 형태와 외형을 갖춘 조직 기관화가 이루어지기 때문에, 장기간의 생존이 요구되는 실험에 많이 이용되고 있다[57]. 특히, 신경세포 죽음에 대한 세포단위 또는 분자단위의 기전을 연구하거나, 약제의 신경세포 보호효과를 보는데 훌륭한 모델로 알려져 있다[58].

기관형적 해마 절편 배양에 Aβ를 처리하면 해마가 치매에 노출된 것과 유사한 환경이 만들어지므로 본 연구는 이를 이용하여 실험을 진행하였다. Aβ는 뇌독성이 있어 실험동물 뇌에 Aβ를 주입하게 되면 기억력 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다[25]. 기관형적 해마 절편 배양에 Aβ으로 치매 환경을 만든 후 黃連解毒湯과 疏風順氣元을 처리한 후 PI 염색으로 신경세포 보

호효과를 관찰한 결과 疏風順氣元이 치매성 뇌손상에 대한 보호효과가 더욱 뚜렷하게 나타났다.

본 연구 결과 黃連解毒湯보다 疏風順氣元이 효과가 있는 것으로 봤을 때, 치매는 淸熱解毒瀉火보다는 淸熱瀉下와 함께 潤腸을 시켜줬을 때 치료효과가 좋을 가능성이 더 높고, 虛弱한 老人들도 長服할 수 있게, 淸熱瀉下兼潤腸에 초점이 맞춰져야할 것으로 사료된다. 또한 黃連解毒湯과 疏風順氣元 각각의 구성약물과 Aβ를 함께 처리하여 72시간 경과한 후 관찰결과 Aβ단독 처리한 군과 비교한 결과상에서도 疏風順氣元의 構成藥物인 檳榔, 山茱萸, 枳殼, 獨活, 車前子가 유의하게 세포보호효과를 나타냈다. 시험관상에서 Aβ의 독성 차단 활성이 뛰어난 천연물에는 藿香, 茵蔯蒿, 柳根皮, 車前子가 있고, 특히 當歸는 생체 조건에서 Aβ저해 활성이 더욱 뛰어난 것으로 보고되었다[59]. 단미제를 실험한 연구에서 車前子가 유의한 효과를 보인 결과와 맥락이 비슷하다고 볼 수 있다.

Aβ으로 유발한 치매성 세포손상에 유의한 효과를 보인 檳榔, 山茱萸, 枳殼, 車前子, 獨活에 대한 국내 실험연구들을 살펴보면 檳榔은 위장의 보호, 타액의 분비, 살충, 항진균 및 항 virus 효과, 소화액의 분비와 위장의 연동촉진에 사용되며 그 약리효과는 이미 임상적으로 확인되었다는 연구[60,61]가, 山茱萸는 면역계통에 있어 비특이성 면역기능의 증진작용, 항염작용, 항균작용, 항암작용, 항바륨작용[62]이 있는 것으로 보고되었으며, 車前子는 혈압하강작용, 장관에 자궁에 대한 수축작용, 심박동수 감소 및 尿量감소[63], 항암활성 성분[64], 강장효과[65], 간 보호효과[66]가 있다고 보고되었고, 獨活은 항산화활성[67], 항염증작용[68]에 관한 보고가 되었다.

실험 결과 72시간에 비해 96시간이 경과한 후에 관찰했을 때 전체적으로 세포 손상이 늘어난 경향을 보이는데, 이는 한약재들의 뇌세포손상에 대한 보호효과가 감소하는 것으로 단정 짓기보다는 생체에서 분리된 시간이 경과하면서 세포의 상태가 전체적으로 악화되는 것도 배제할 수는 없다. 72시간에서 유의한 세포보호효과를 보였던 疏風順氣元의 경우 96시간에서는 유의한 세포보호효과가 없는 것으로 나타났다. 특히, 疏風順氣元의 경우 96시간이 경과한 후 관찰했을 때 그 보호효과가 현저하게 떨어지는 경향을 보였다. 이는 자체가 가지는 세포 독성에 의해서 이러한 결과를 초래하지 않았나 추측할 수 있지만 앞으로 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

PI 염색을 통한 본 연구 결과, 치매성 뇌손상에 대한 세포보호효과는 疏風順氣元과 疏風順氣元의 처방구성인 檳榔, 枳殼, 獨活, 山茱萸, 車前子가 가장 우수한 것으로 밝혀져, 淸熱瀉下兼潤腸시키는 치료법이 淸熱瀉火보다 우수할 것으로 생각되며, 향후 치매성 뇌손상에 대한 복합제 간의 비교와 단미제들의 신경세포 보호효과에 대한 연구가 기대되고, 치매의 특성상 장기간의 치료를 위한 효과적인 신약 개발의 필요성을 감안할 때의 보편성이 확인된 약물로부터 약효를 검색하여 치매 치료제로 개발하는 것이 효과적일 것이라 사료된다.

마지막으로 생각해볼 과제는 여러 가지 다양한 치료법들이 실험연구 되고 있지만, 그 약제들이 효과적으로 뇌혈뇌장벽(BBB) 통과하는 문제점이 남은 과제라고 생각하여, 생리활성이 강하고 독성이 적으면서 주사와 경구 투여가 가능한 저분자 구조의 새로운 물질의 개발이 필요하다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

기관형적 해마 절편 배양에서 黃連解毒湯, 疏風順氣元및 처방구성 약물을 처리하여 Aβ로 유발한 치매성 뇌세포 손상에 대한 보호효과를 살펴 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 黃連解毒湯과 疏風順氣元 각각의 처방을 Aβ을 함께 처리하였을 때 72시간에서 Aβ단독 처리한 군보다 疏風順氣元이 통계적으로 유의하게 세포 사멸이 적은 것으로 나타났다. 이에 반해 黃連解毒湯군은 Aβ을 단독으로 처리한 군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. 黃連解毒湯의 처방구성인 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子와 疏風順氣元의 처방구성인大黃, 車前子, 郁李仁, 檳榔, 麻子仁, 兎絲子, 牛膝, 山藥, 山茱萸, 枳殼, 獨活과 Aβ을 함께 처리하였을 때 72시간 에서 Aβ단독 처리한 군보다 檳榔, 山茱萸, 枳殼, 車前子, 獨活은 통계적으로 유의하게 세포 사멸이 적었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(과제고유번호:B090039)

참고문헌

1. 전국한의과대학 신경정신과 교과서 편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기:집문당. 2007:324-33.
2. Whitehouse PJ, Price DL, Strble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. Science. 1982;215(4537):1237-9.
3. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytess. J Immunol. 1998;150:2659.
4. Peterson PC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EC, Peterson PK. Activated microglia mediated neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol. 1992;149:2730.
5. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Joh I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-9.
6. Veurink G, Fuller SJ, Atwood CS, Martins RN. Genetics, lifestyle and the roles of amyloid beta and oxidative stress in Alzheimer's disease. Annals of human biology. 2003;30(6):639-67.
7. 김형휼. 東醫寶鑑 中 黃連解毒湯의 活用에 대한 硏究. 원광대학교 대학원. 2008.
8. 김은선, 박치상, 박창국. 黃連解毒湯과 溫淸飮이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20(1):185-96.
9. 안중환. 黃連解毒湯이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2006.
10. 김광호, 김성수. 黃連解毒湯과 온성오혈방의 수침 및 경구투여가 진통, 소염, 해열작용에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994;15(1):9-25.
11. 류순현, 양대진, 조기호, 김영석. 黃連解毒湯 가미방으로 호전시킨 중풍환자 불면증 3예.

대한한의학회지. 2001;22(2):120-7.
12. 정선용. 黃連解毒湯이 우울증 모형 동물의 우울성향 및 PVN의 c-Fos 발현에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 2003.
13. 홍성원. 黃連解毒湯이 우울증 모형 동물의 수중미로학습과 뇌의 Tyrosine Hydroxylase 발현 수준에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 2003.
14. 문진영. 黃連解毒湯의 산화적 DNA 손상에 대한 보호효과 및 항산화효소계의 발현과 Acetylcholinesterase 활성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22(1):7-12.
15. 공민정, 하니나, 이하영, 김용태, 노승주, 김호철. 黃連解毒湯과 및 加味方의 인지기능회복에 대한 연구. 대한본초학회지. 2004;19(4):161-8.
16. 이건호. 黃連解毒湯의 항알러지 효과. 경희대학교 대학원. 2004.
17. 허준. 동의보감. 법인문화사. 1999:466-76, 945-74.
18. 정재욱. 중풍환자의 변비에 대한 疏風順氣元의 임상적 연구. 동의대학교 석사학위논문. 2005.
19. 이성현, 안세영, 두호경, 정성현. db/db 마우스에서 수풍순기환의 혈당강하 및 기전연구. 응용약물학회지. 1999;7:335-41.
20. 배미라, 정성현. 고지방식이 섭취 마우스에서 수풍순기환의 혈당강하활성 및 기전. 경희약대논문집. 2000;28:101-8.
21. 문하경, 김종우, 강철훈, 황의완. 淸肺瀉肝湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상 받은 Mouse Neuroblastoma 2a cells에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;16(2):89-112.
22. 안상훈, 김종우, 강철훈, 황의완. 黃連解毒湯이 Hypoxia-reoxygenation에 의해 손상 받은 Mouse Neuroblastoma 2a cells에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):37-59.
23. 김광호. 청혈단의 6-hydroxydopamine에 의해 유발된 독성에 대한 신경세포보호효과. 경희대학교 대학원. 2009.
24. 김이동, 이상호, 김은주, 김태훈, 박영민, 정동원, 신원준, 정우상, 배형섭, 윤상필. 중풍환자 1기 고혈압에 청혈단(淸血丹)의 항고혈압 효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(2):195-201.
25. Ramsden M, Henderson Z, Pearson H. Modulatino of Ca2+ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein(1-40) is dependent on solubilit status. Brain Res. 2002;956:254-61.
26. Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. J Neurosci Methods. 1990;31:43-6.
27. Laake JH, Haug FM, Wieloch T, Ottersen OP. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. Brain Res Protoc. 1999;4:173-84.
28. 鄭智天. 左歸飮과 右歸飮에 의한 활성 산소류의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性增加效果에 대한 연구. 大韓韓醫學會誌. 1996;17(1):21-36.
29. 이준영, 정인철, 이상룡. 天王補心丹이 치매 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):149-71.
30. 하수영, 정인철, 이상룡. 加減固本丸이 치매 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(1):53-77.

31. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升淸湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1997;8(1):69-79.
32. 이웅석, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升淸湯이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. 1998;21(1):479-501.
33. 박순권, 이홍재, 김현택, 황의완. 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):19-35.
34. 박진성, 강형원, 유영수. 생체외 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):157-72.
35. 최병만, 이상룡. 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2000;11(2):23-42.
36. 정인철. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's desease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2001.
37. 고태준, 이상용. 補益淸腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):151-67.
38. 이재혁, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morris 水中 迷路學習과 記憶에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1998.
39. 강현근, 김종우, 황의완. 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):39-51.
40. 김영욱. 총명탕이 건망유도 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1998;8(2):464-79.
41. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's disease병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;17(1):59-78.
42. 박지운. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):37-57.
43. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
44. 박지운, 정인철, 이상룡. 日黃連이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):87-9.
45. 윤상학, 정인철, 이상룡. 香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):59-74.
46. 최재환, 김미영, 김현미, 최훈, 전훈, 김대근, 임종필, 임강현. 수종 한약의 아세틸콜린 에스터레이즈 효소활성에 대한 효과. 대한본초학회지. 2002;17(1):131.
47. 이정희. 항치매 약효를 나타내는 천연물의 의약 화학적 연구. 연세대학교 교육대학원. 2000.
48. 康永祿. 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1997.
49. 류성진. 한약재로부터 뇌세포 산화억제와 항허혈 치매 물질 탐색. 인제대학교 대학원. 2003.
50. 김상호, 강형원, 류영수. 釣鉤藤이 βAPP과 발현 인간세포아세포암에서의 항치매효과에 대한연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(5):960-6.
51. 김영석. 血栓症 및 高粘度血症에 대한 당귀음과 黃連解毒湯의 실험적 비교연구. 경희의학. 1991;8(3):322-31.
52. 김현수. 巴戟天이 치매 병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):45-58.

53. 백봉숙. 녹차로부터 분리된 Epicatechin3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구. 釜山大學校 藥學硏究誌. 1995;29(2):49-56.
54. 임홍. 선도기술 개발사업;Heterocyclic 퇴행성 신경질환 치료제의 개발(NDSL-DB). 대한민국:KISTI. 1998.
55. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 영림사. 2004:166, 286, 291, 293, 305, 358, 397, 423, 469, 584, 621, 690.
56. Stoppini LP, Buchs A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Methods. 1991;37:173-93.
57. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, Mckinney RA, THompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. Trends Neurosci. 1997;20:471-7.
58. Irma E Holopainen. Organotypic hippocampal slice culture : A model system to study basuc cellular and molecular mechanism s of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. Neurochemical Research. 2005;30(12):1521-8.
59. Research, "Development of Functiopnal Foods for the Prevention of the Circulatory Disseases and Dementia Using Agricultural and Fishery Resources" the Ministry of agriculture and Forestry. Korea. 1998.
60. 이상인. 한약임상응용. 서울:성보사. 1990:497.
61. 문관심. 약초의 성분과 이용. 서울:일월서각. 1994:694.
62. 國家中醫藥管理局 <<中華本草>>編委會. 中華本草(第五卷). 上海:上海科學技術出版社. 1995:738-42.
63. 고석태, 임동윤. 車前子(질경이)의 약리학적 연구. 약제학회지. 1977;7(1):28-35.
64. 지옥표, 문형인. 차전자의 항암활성성분. 한국약용작물학회지. 1999;7(2):143-6.
65. 윤혜숙, 장일무. 강장제로 사용된 생약의 조사연구 차전자의 강장효과에 관하여. 생약학회지. 197;89(3):139-44.
66. 윤혜숙, 강길종, 장일무. 차전자의 간보호효과. 생약학회지. 1979;10(1):36.
67. Kim JS, Kang SS, Choi JS, Lee MW, Lee TS. Antioxidant components from Aralia continentalis. Kor J Pharmacogn. 1998;29:13-7.
68. Park HJ, Hong MS, Lee JS, Leem KH, Kim CJ, Kim JW, Lim S. Effects of Aralia continentalis on hyperalgesia with peripheral inflammation. Phytother Res. 2005;19:511-3.