동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):171-189

βA로 유도된 Alzheimer's Disease 동물모델에 대한 荊防瀉白散의 효과

윤종천, 이상룡, 정인철

대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of *HyungBangSaBaek-San(JingFangXieBaiSan)* on the Alzheimer's Disease Model Induced by βA

Jong-Cheon Yoon, Sang-Ryong Lee, In-Chul Jung

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

Abstract

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

Methods :
The effects of the HBSBS extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α and NOS-II mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS plus βA were investigated. The effects of the HBSBS extract on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :
1. The HBSBS extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α and NOS-II mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS plus βA.
2. The HBSBS extract suppressed the expression of βA protein production in BV2 microglial cell line treated with LPS plus βA.
3. The HBSBS extract showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze.
4. The HBSBS group suppressed the over-expression of IL-1β protein, TNF-α protein significantly in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
5. The HBSBS group reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by βA.
6. The HBSBS group reduced tau protein, and GFAP in the brain tissue of the mice with AD induced by βA.

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

Key Words :
Alzheimer's disease, *Hyungbangsabaek-san(JingFangXieBaiSan)*, Memory deficit, Proinflammatory cytokines

투고 : 2010. 5. 7. 수정 : 2010. 6. 1. 채택 : 2010. 6. 3.
교신저자 : 정인철, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel) 042-470-9129, Fax) 042-470-9006, E-mail) npjeong@dju.ac.kr
이 논문은 2010년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

알츠하이머 병(Alzheimer's Disease)은 퇴행성 뇌질환으로, 노화의 과정 속에서 뇌 조직이 기능을 잃으면서 점차 정신 기능이 쇠퇴하는 병으로 치매를 유발하는 대표적인 질환이다[1]. 병리조직학적으로는 뇌의 전반적인 위축, 뇌실의 확장, 노인반 및 신경섬유 다발성 병변 등의 특징을 보이고 임상적으로는 기억, 판단, 언어 능력 등 지적인 기능의 점진적인 감퇴, 일상생활능력·인격·행동양상의 장애 등의 주요증상을 나타내며[2] 우울증세, 인격의 황폐, 격한 행동 등의 행동심리적 증상도 동반될 수 있다[3].

한의학에서 치매는 痴獃[4], 呆病[5], 健忘[6]등의 범주에 해당하는데, 주요 원인은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷 등이고 대표적인 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 등이다[7].

최근 한의학계에서는 치매에 대한 다양한 약물의 실험적 연구[8-13]가 진행되었고 치매치료를 위한 한약제제 개발사업[14-17]도 활발히 진행되고 있다.

荊防瀉白散은 四象體質醫學에서 少陽人 亡陰證에서 나타나는 身熱, 頭痛, 泄瀉와 膀胱煎燥에 사용되는 處方이다[18]. 현재까지 荊防瀉白散의 연구로는 갱년기 장애, 임신오저에 대한 증례보고[19,20]와 혈압, 혈류량에 미치는 영향에 관한 실험연구[21] 등이 있었으나, 치매와 관련된 연구는 없었다. 약물구성으로 볼 때 荊防瀉白散은 心熱을 瀉하고 腎臟을 補하는 효과를 가지고 있어 肝腎不足, 熱毒熾盛으로 인한 치매에 활용할 수 있을 것으로 판단하여 본 연구를 진행하게 되었다.

이에 저자는 AD 동물모델에 대한 荊防瀉白散의 효과를 실험적으로 규명하고자, In vitro 실험으로 lipopolysacchride(LPS)와 β-amyloid(βA)를 처리한 BV-2 microglial cell line에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, 그리고 NOS-II mRNA 유전자 발현을 관찰하였으며, AD 관련 유전자인 APP mRNA 유전자 발현 및 βA protein 생산량 APP 발현량을 western blot으로 관찰하였다. In vivo 실험으로 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 기억 행동변화를 측정하였으며, βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 cytokine, 지질과산화도(MDA), acetylcholinesterase(AChE)와 CD68+과 CD11b+의 발현을 관찰하였고, 뇌조직의 허혈상태, 조직손상의 변화를 면역조직염색법으로 tau 단백질과 glial fibrillary acidic protein(GFAP)을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 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, 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, Agarose

는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, β-amyloid peptide (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) 동물선정 및 실험군 분리

본 실험에 사용된 암컷 8 주령의 SPF (specific pathogen-free) C57bl/6 (18~20 g) 생쥐는 오리엔트바이오 (Korea)사에서 공급받아 그룹 당 8마리씩 총 40마리를 사용하였다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)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:DJUARB2009-040)을 받았다.

3) 약물

본 실험에 사용한 荊防瀉白散(HBSBS)의 구성은 『東醫壽世保元』[18]에 준하였으며, 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 사용하였고 1첩의 내용과 구성은 다음과 같다(Table I).

Table I. Composition of *HyungBangSaBaek-San* (HBSBS)

Herbal Name	Scientific Name	Doset(g)
生地黃	*Rehmanniae Radix*	11.25
茯苓	*Poria*	7.5
澤瀉	*Alismatis Rhizoma*	7.5
石膏	*Gypsum Fibrosum*	3.75
知母	*Anemarrhena asphodeloides Bunge*	3.75
羌活	*Ostericum koreanum*	3.75
獨活	*Aralia continentalis Kitagawa*	3.75
荊芥	*Nepeta japoica Maximowicz*	3.75
防風	*Ledebouriella seseloides*	3.75
	Total amount	48.75g

4) HBSBS 추출물 분리

荊防瀉白散 3첩 분량 (146.25 g)에 증류수 2,000 ㎖를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vaccum evaporator)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 荊防瀉白散 투여군 19.0 g을 냉동 보관(-84℃)하

면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) BV2 microglaial cell 배양 및 염증억제 측정

(1) 세포배양

본 실험에서 사용된 BV-2 cell line은 primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogene을 감염시켜 만들어진 세포주이며 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary cell과 같다[22]. 동결된 BV-2 세포를 해동하여 10% FBS-DMEM (Cellgro, USA) 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS-DMEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV-2 세포의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS-DMEM 배지에서 안정화시킨 BV-2 세포를 *in vitro* 모델로 사용하였다[23].

(2) 배양 조건 및 HBSBS 처리

荊防瀉白散을 처리하기 전 BV-2 microglial cell을 24시간 동안 serum-free DMEM으로 배양한 후 10 ㎍/㎖ LPS(Sigma, USA)와 25 ㎛ synthetic βA fragment, residues 25-35 (βA; Bachem California, Torrance, CA), LPS와 βA 25 ㎛에 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170 (35 ㎛, MDL 28170)을 처리하고, 6시간을 배양하였다[24].

2) BV2 microglial cell line에서 pro-inflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 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 荊防瀉白散 투여군을 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고 LPS 10 ㎍/㎖와 βA 25 ㎛를 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 荊防瀉白散 추출물 (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (10 ㎍/㎖)와 βA 25 ㎛를 각각의 well에 첨가한 후 6 시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170 (35 ㎛, 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/tube에 37℃ heating block에서 30분간 반응 시킨 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, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다[25].

③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 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-α
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-1β
Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
mouse NOS-II
Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

3) BV2 microglial cell line 배양상층액내 βA 생성량 측정

BV2 microglia세포주를 실험 3일전에 subculture (1×10^5 cells/㎖) 하여 96 well plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 荊防瀉白散 (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (10 ㎍/㎖)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 荊防瀉白散 (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 40 시간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한다. 배양 종료후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 βA protein 생성량을 ELISA (Code No. 27720, Mouse/Rat Amyloid β(1-40) High Specific Assay Kit-IBL, USA)로 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 완충용액으로 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[26].

4) APP activity 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

BV2 microglia cell line을 실험 3일전에 subculture ($1x10^5$ cells/㎖) 하여 96 well plate에 $2x10^5$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시킨다. 荊防瀉白散 (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS (10 ㎛M)와 βA (25-35) 25 ㎛M, 그리고 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170 (35 ㎛M, MDL 28170)을 처리한다. 24시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 荊防瀉白散 (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 40 시간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 β-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, 0.1mM DTT, 10 ㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법[27]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) APP의 immunoblotting 분석

세포 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 sceondary Ab(1:4000, Amersham, Arlington Heights, IL)과 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting하여 분석하였다.

5) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

(1) HBSBS 및 aricept 투여

荊防瀉白散 380 mg/kg(mpk)과 95 mpk를 AD 생쥐에 매일 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다. 그리고 양성대조군으로 AD에 사용되는 acethylcholinesterase inhibitor인 Aricept를 3 mpk로 주 3회 투여하였다[28].

(2) C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 βA 주입

βA (10 ㎛M)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 ㎛M)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), 荊防瀉白散 투여군 (380 mpk, 95 mpk)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

(3) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주 동안 荊防瀉白散을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군 (aricept), 荊防瀉白散 투여군 (380 mpk, 95 mpk)으로 분류하

였고, 계속 8주 동안 1일 1회 약물 투여와 1주 1회 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(4) 행동 관찰

훈련과 荊防瀉白散을 투여 종료 후 9주째 AD 유발생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다.

6) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

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

8주간의 荊防瀉白散 380 mpk 투여군와 95 mpk 투여군의 경구투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 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 미세아교세포를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-$CD14^+$ 세포만 포집하였다.

(2) microglial cell내 pro-inflammatory cytokine 염색법

포집한 미세아교세포를 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azaide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284 ㎕와 동량의 인산완충용액 (2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, 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 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 마아크로글리아 세포내 발현된 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법[29]에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200 ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 ul를 가하고 5 sec.동안 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5 ㎖을 가하고 그리고 75 ul 증류수를 넣고 5 sec.동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1 ㎖씩 tube에 더하고, clean dry marble (유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000 r.p.m에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하여 532 n.m에서 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 ㎖ sylinge rubber로 뇌조직을 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수한다. 회수된 부유액을 0/50/70% percoll gradient (Sigma) 3 ㎖과 뇌세포 부유액 1 ㎖을 gradient를 만든 다음 2400 rpm에서 30분간 원심분리를 한 후 Microglia부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다.

7) AD 병태 생쥐 뇌조직에서 허혈 및 조직 손상에 미치는 영향

(1) 뇌조직의 허혈 크기 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 brain matrix를 이용하여 2 ㎜의 두께로 자른후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Brian의 방법[30]으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A_1 / ST_1) + (A_2 / ST_2) + (A_3 / ST_3) + (A_4 / ST_4)]이고, A는 사진상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2 ㎜)의 전체 면적. BH(brain Hipocampus)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) x 100로 분석하였다[31].

(2) 병리조직검사

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음 포매한다. 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 세절하고 probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 (Deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전 처리하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다.

① Tau protein

Primary mouse tau Ab를 1:500으로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse IgG-secondary Ab를 15분간 염색 후 3회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA)용액으로 수세하였고, HRP로 15분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 2분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen으로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하여 광학현미경으로 관찰하였다[32].

② GFAT

Primary mouse GFAT Ab(1:400)로 희석하여 30분간 slide를 염색하고, 2회 PBST로 수세하였다. 다시 mouse post prymary Ab를 8분간 염색 후 3회 PBST로 수세한 후 polymer-HRP로 8분간 염색 후 다시 2회 수세하였다. 그리고 DAB로 5분간 염색 후 2회 수세하고 hematoxylen로 5분 염색 후 2회 수세하여 permount를 수행하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluoroseince microscope, Nikon, Japan)을 사용하여 x100 배율로 관찰하였다.

8) 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. HBSBS의 염증유전자 발현 억제 효과

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-1β mRNA유전자 발현은 LPS+βA로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ 값이 1 일 때 정상군의 IL-1β mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.038±0.004이었고, 荊防瀉白散 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군은 각각 0.770±0.006 ($p<0.001$)과 0.896±0.041 (RQ)로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 IL-6 mRNA유전자 발현은 LPS+βA로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ 값이 1 일 때 정상군의 IL-6 mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.011±0.003이었고, 양성대조군 (MDL28170) 35 ㎛M처리군은 0.330±0.086 (RQ)로 나타났으며, 荊防瀉白散 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군은 각각 0.572±0.087 ($p<0.001$)과 0.722±0.069 ($p<0.01$) (RQ)로 나타나 유의성 있게 유전자 발현을 억제하였다.

3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 TNF-α mRNA유전자 발현은 LPS+βA로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 TNF-α mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.059±0.047이었고, 양성대조군 (MDL28170) 35 ㎛M처리군은 0.274±0.024 (RQ)로 나타났으며, 荊防瀉白散 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군은 각각 0.597±0.073 ($p<0.001$)과 0.936±0.150 (RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖ 투여군에서만 유의한 발현 억제를 보였다.

2. HBSBS의 APP mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 세포주에서 APP mRNA유전자 발현은 LPS+βA로 활성화시킨 대조군에 대한 실험군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 대조군의 RQ 값이 1 일 때 정상군의 APP mRNA 유전자 발현의 상대정량은 값은 0.574±0.225이었고, 양성대조군 (MDL28170) 35 ㎛M처리군에서는 0.773±0.032 (RQ)로 나타났고, 荊防瀉白散 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군에서는 각각 0.849±0.035 ($p<0.01$)와 1.049±0.073 (RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖ 투여군에서만 유의한 억제를 보였다.

3. βA protein 생성량에 미치는 영향

배양상층액에서 βA protein 생성량을 측정한 결과, 정상군은 0.926±0.230 (pg/㎖)이었고, 대조군은 27.7±15.4 (pg/㎖)로 나타났고, 양성대조군 (MDL28170) 35 ㎛M처리군에서는 6.9±3.9 (pg/㎖)로 나타났다. 荊防瀉白散 투여군은 100 ㎍/㎖에서 11.9±4.3 (pg/㎖)으로, 50 ㎍/㎖에서는 14.8±5.4 (pg/㎖)로 대조군에 비하여 감소되었으나 유의성은 없었다.

4. β-APP의 immunoblotting 분석

BV-2 microglial cell line에서의 β-APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, LPS와 β-APP만을 처리한 대조군에 비해 50 ㎍/㎖와 100 ㎍/㎖의 荊防瀉白散 투여군을 함께 처리한 실험군에서 β-APP 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 1).

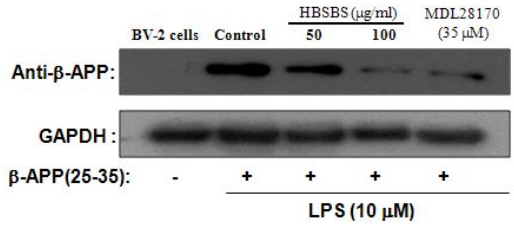


Fig. 1. Suppression effect of HBSBS extract on the amyloid precursor protein (APP) in BV-2 stimulated LPS plus βA co-treatment by Western blot analysis.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of HBSBS extract (100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 10 μM)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

5. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

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

荊防瀉白散 투여군을 경구투여 8주 후 Step-through latency를 관찰한 결과, 정상생쥐가 7.2±1.05 (sec.)로 관찰되었고, 대조군은 83.7±2.59 (sec.)이었고, Aricept 투여군은 7.3±1.60 (sec)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p<0.001$). 荊防瀉白散 380 mpk, 95 mpk 투여군은 각각 13.7±1.79 (sec)와 42.6±5.00 (sec)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다($p<0.001$) (Fig. 2).

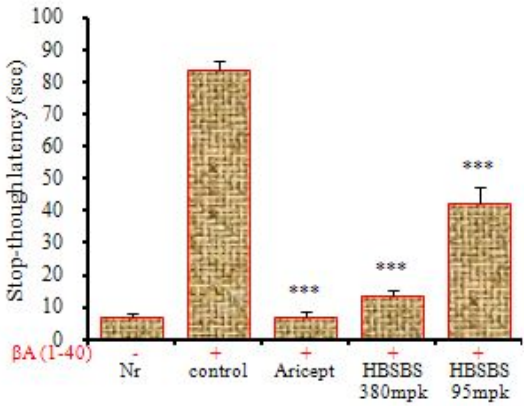


Fig. 2. Effects of HBSBS on the bA-induced Alzheimer's mice of impairment of learning and memory in the Step-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS or Aricept, and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial and injected bA-induced mice. Data represent means±S.E (N=10). Control, bA-induced alzheimer's mice; Aricept (2 mpk , *p.o*); HBSBS extract (380 mpk and 95 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 bA -induced Alzheimer's mice group (control) data by T test (***$p<0.001$).

2) Distance movement-through latency 측정 및 운동성 감퇴 효과

荊防瀉白散 투여군을 경구투여 8주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 정상생쥐는 117.7±26.1 (cm)로 관찰되었고, 생쥐의 뇌에 βA를 처리한 대조군은 901.9±199 (cm)이었고, 8주간 Aricept 투여군은 127.5±34.1 (cm)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다 ($p<0.01$). 荊防瀉白散 380 mpk 투여군은 261.3±46.0 (cm)($p<0.01$)를 나타내었고, 95 mpk 투여군은 596.2±117.4 (cm)로 나타나 380 mpk 투여군에서만 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

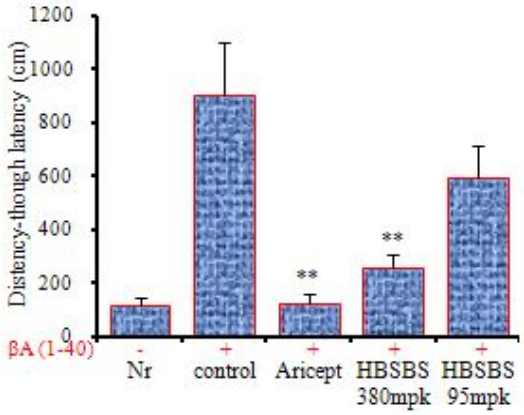


Fig. 3. Effects of HBSBS on the bA-induced Alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS or Aricept.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 60 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 8 week after orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial and injected bA-induced mice. Data represent means±S.E (N=10). Control, bA-induced Alzheimer's mice; Aricept (2 mpk , *p.o*); HBSBS extract (380 mpk and 95 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 bA-induced Alzheimer's mice group (control) data by T test (**p<0.01).

6. 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

Microglial 세포내에서의 IL-1β과 TNF-α 발현을 관찰한 결과, IL-1β의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 4.8±0.5 (%)이었고, 대조군은 72.8±6.5 (%)이었고, aricept을 투여한 양성대조군이 32.0±5.3 (%)이었다. 荊防瀉白散 380 mpk 투여군은 49.0±4.9 (%), 95 mpk 투여군은 55.3±5.0 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다(p<0.01, p<0.05). TNF-α의 세포내 단백질은 정상 생쥐의 뇌에서는 35.0±6.4 (%)이었고, 대조군이 87.3±3.0 (%)이었고, aricept을 투여한 양성대조군이 41.2±4.5 (%)이었고, 荊防瀉白散 투여군 (380 mpk과 95 mpk)은 49.9±6.6, 69.3±5.5 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다(p<0.001, p<0.01)(Fig. 4).

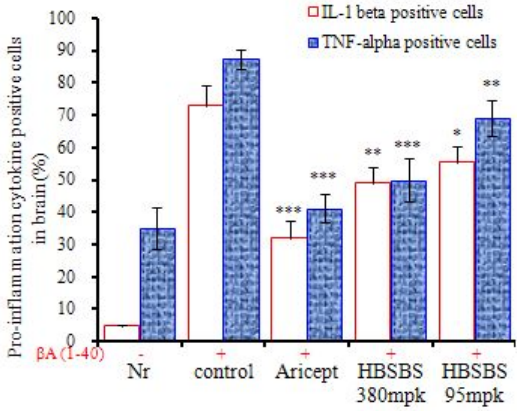


Fig. 4. Intracellular staining of IL-1b and TNF-α activity on the brain CD14⁺cells in bA-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of HBSBS.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) and Aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days, continued once a day for 60 days. IL-1b and TNF-α activity measured by FACScalibur, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=10). Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group (control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

(2) 지질과산화도(MDA) 억제 효과

AD 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, 정상 생쥐의 뇌조직에서는 24.4±12.1 (pg/mg brain tissue)이었고, 대조군이 180.3±24.0 (pg/mg brain tissue)이었고, Aricept

을 투여한 양성대조군이 67.7±8.8 (pg/mg brain tissue)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. 荊防瀉白散 380 mpk 투여군은 89.6±12.8 (pg/mg brain tissue), 95 mpk 투여군은 106.9±17.5 (pg/mg brain tissue)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다($p<0.01$, $p<0.05$)(Fig. 5).

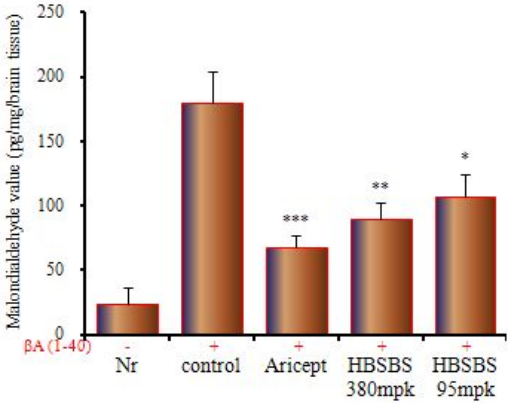


Fig. 5. Effect of HBSBS on the malondialdehyde value in the brain tissue in bA-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS (380 mpk and 95 mpk *p.o*) and Aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days. Malondialdehyde (MDA) value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry. Tissue (mg) in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. Data represent means± S.E (N=3). Statistically significant value compared with bA-induced Alzheimer's mice group (control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

(3) $CD68^{+}/CD11b^{+}$ 발현 세포수 억제 효과

AD 유발 생쥐의 병변 뇌조직에서 astrocyte세포와 microglial세포의 활성표면 분자인 CD68+과 CD11b+가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, 정상 생쥐의 뇌조직중 CD68+과 CD11b+의 세포수는 5.2±2.4 (%)이었고, βA를 생쥐의 뇌에 주입한 대조군의 CD68+과 CD11b+의 세포수는 48.2±1.9 (%)로 현저하게 증가를 나타내었고, 양성대조군인 Aricept 투여군은 20.8±1.9 (%)로 대조군에 비하여 현저하게 통계학적 유의성 있는 감소를 나타냈다. 荊防瀉白散 투여군 380 mpk 투여군에서의 CD68+과 CD11b+의 세포수는 30.2±3.5으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈다 ($p<0.001$). 또한 荊防瀉白散 투여군 95 mpk 투여군에서의 CD68+과 CD11b+의 세포수도 43.0±5.7로 대조군과 차이가 나타나지 않았다(Fig. 6).

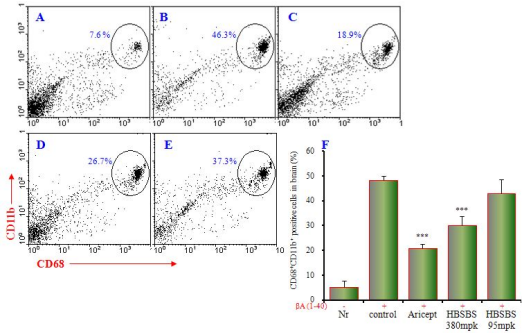


Fig. 6. Effects of HBSBS on the percentage of CD68+ and CD11b+ gated cells in bA-alzheimer disease mouse model.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS (380 mpk and 95 mpk *p.o*) and Aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days. After 8 weeks, mouse brain cells ($5x10^5$ cell/ml) were isolated, and the brain cells were washed twice and analyzed by flow cytometer, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to bA-induced Alzheimer's disease model. At the end of the experiment, the mice brain CD14 cells were removed and bA-induced Alzheimer's disease model. C57bl/6 normal (A), control CD68+/ CD11b+ (B), Aricept (2 mpk, *p.o* C) treated, and HBSBS extract 380 mpk (D) and 95 mpk (E), CD68+ /CD11b+ cell population (%) were measured by analyzed by flow cytometer (F). Statistically significant value compared with bA -induced Alzheimer's mice group (control) data by T test (***p<0.001).

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

1) 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, βA를 뇌에 주입한 대조군에서 허혈의 크

기가 72.9±3.5 (%)이었고, aricept 투여군은 27.0 ±6.5 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고($p<0.001$), 荊防瀉白散 380 mpk 투여군은 39.6±2.0 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타냈으며($p<0.001$) 95 mpk 투여군은 60.3±7.2 (%)로 감소를 나타내었다(Fig. 7).

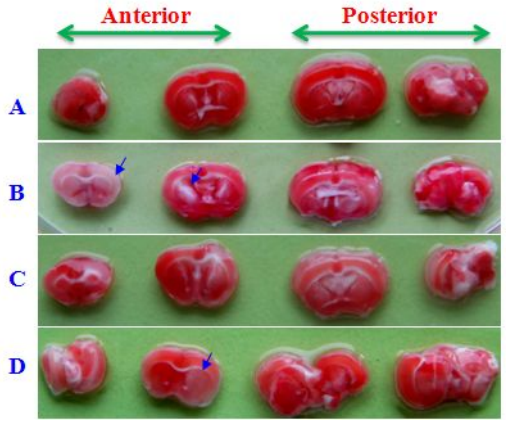


Fig. 7. Effects of HBSBS on the coronal section of bA-induced Alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) (380 mpk ,D *p.o*) and Aricept (2 mpk, *p.o*) for 60 days. Normal C57BL/6 mice was not treated (A). bA-induced Alzheimer's mice (control, B); 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 localizies 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 보이고 대조군은 뇌조직의 염증과 병변으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 aricept 양성대조군과 荊防瀉白散 (380 mpk)을 투여한 실험군은 정상과 가깝게 뚜렷한 조직 형태를 갖추고 있다(Fig. 8). 그리고 hippocampus의 neuronal line이 정상군은 뚜렷이 보이고 대조군은 뇌조직의 염증세포와 병변 등으로 그 형태가 뚜렷하지 않지만 aricept를 투여한 양성대조군은 정상과 가깝게 뚜렷한 hippocampus의 neuronal line를 보이고 있다. 그리고 荊防瀉白散 380 mpk 투여군에서는 희미하게 hippocampus의 neuronal line를 보이고 있다(Fig. 9). 또한 hippocampus에 astrocytes와 microglial 세포가 침투하여 neuronal line이 사라지고 병변이 심화된 것을 볼 수 있다. 그리고 aricept와 荊防瀉白散 380 mpk 투여한 실험군은 macrophage와 microglial 세포가 hippocampus로 침투하는 것이 억제된 것을 알 수 있었다. 그리고 荊防瀉白散 투여군에서는 대조군에서 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes -like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다.

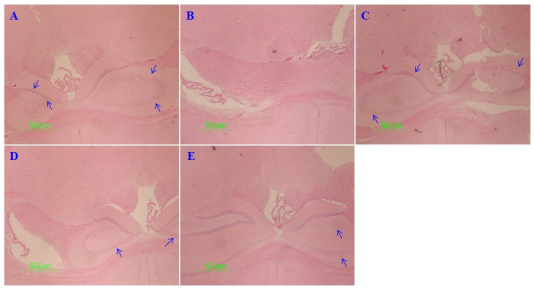


Fig. 8. Histological analysis of hippocampal lesions of bA-induced Alzheimer's mice.
C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) or Aricept.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. C57bl/6 normal (A), Control, bA-induced Alzheimer's mice (B); Aricept (2 mpk, *p.o*, C); HBSBS (380 mpk, D and 95 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, ×40)

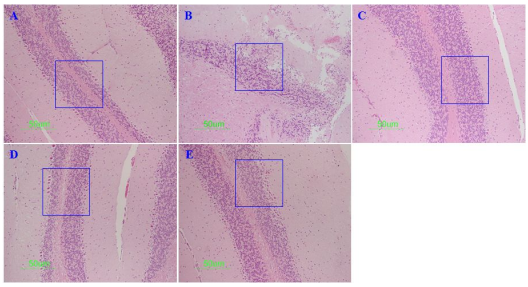


Fig. 9. Histological analysis of the neuronal loss of hippocampus of bA-induced Alzheimer's mice.

C57BL/6 mice were orally administered of HBSBS extract (380 mpk and 95 mpk p.o) or Aricept.HCl and the acquisition taining trial continued once a day for 60 days. C57bl/6 normal (A), Control, bA -induced Alzheimer's mice (B); Aricept (2 mpk, *p.o*, C); HBSBS (380 mpk, D and 95 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).

Ⅳ. 고 찰

우리나라는 평균수명의 연장과 출산율 감소로 인하여 2000년에 65세 이상 노령인구가 전체인구의 7.2%로 고령화사회에 이미 진입을 하였고, 2019년에는 14.4%로 고령사회에, 2026년에는 20.0%로 초고령사회에 도달할 것으로 전망되고 있다[33]. 치매는 60세 이후로는 나이가 들어감에 따라 발생빈도가 점진적으로 증가하기 때문에 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중요한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[34].

치매는 겉으로 드러나는 증상일 뿐 발병 경로는 다양한데, 원인은 AD와 중풍으로 전체 치매 환자의 80~90%에 해당하며 약 15~20%는 AD와 혈관성 치매(Vascular dementia;VD) 양쪽을 다 앓고 있는 것으로 알려져 있다. 기타 알코올성 질환, 파킨슨병, 가성 치매, 정상압뇌수종, 두개내 종양, 두부외상 등이 치매를 일으키는 원인 질환으로 보고되고 있다[35].

AD의 발병기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않고 여러 가지 가설이 제시 되어 왔으나 최근에는 뇌병변에 침착하는 신경독성단백질의 독성이 가장 중요한 원인으로 제시되고 있다. AD로 사망한 환자의 뇌를 살펴보면 전반적으로 뇌위축이 관찰되며, 뇌신경세포가 병적으로 많이 파괴되어 없어진 사실을 알 수 있다. 최근 유전공학적 방법을 이용한 연구 결과에서는 베타-아밀로이드(βA)나 타우(tau)등 독성 단백질이 세포와 혈관에 쌓여 신경세포에 독성을 미침으로써 결과적으로 뇌기능에 장애가 초래된다는 사실이 밝혀졌다[36].

한의학에서 치매의 주요 치법을 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 하고 있다[7]. 荊防瀉白散(HBSBS)은 『東醫壽世保元』[18]에 제시된 處方으로 소양인에게 사용되는 處方 중 한가지로 生地黃, 茯笭, 澤瀉, 石膏, 知母, 羌活, 獨活, 荊芥, 防風으로 구성된다. 각각의 효과를 살펴보면 生地黃은 熱性病의 심장쇠약에 적용되며 생식능력을 증가시키고 노쇠를 방지하고 茯笭은 安心神하며 澤瀉는 利膀胱하여 長服하면 耳目이 聰明하고 不飢延年輕身하고 知母는 신장의 水氣를 도와주며 石膏는 頭痛身熱을 다스리고 羌活은 頭痛을 다스리며 獨活은 頭痛眩暈頸項强直을 다스리고 荊芥는 頭目의 경락을 풀어주며 防風은 頭痛頭重과 중풍을 다스린다[37].

사상의학적인 관점에서는 茯笭과 知母는 신장을 튼튼하게 하며 石膏, 羌活, 防風 등은 表邪를 다스리고 石膏로 外熱을 다스려 腎臟의 기운을 도와준다[38]. 따라서 荊防瀉白散은 補益補腎 行氣活血의 기능과 아울러 淸熱解毒의 효과가 같이 있음을 알 수 있다. 따라서 치매치료에 충분히

응용해 볼 수 있는 가치가 있을 것으로 보고 본 연구를 진행하였다.

이에 저자는 荊防瀉白散이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, LPS와 βA를 처리한 BV2 microglial cell line에서 염증반응 cytokine의 유전자 발현[39]을 관찰하였다.

실험결과 BV2 cell에서 발현된 염증반응 cytokine 중, IL-1β 유전자는 LPS와 βA만을 투여한 대조군에 비해 荊防瀉白散을 투여한 실험군 모두에서 발현이 억제되었고, IL-6 유전자는 LPS와 βA만을 투여한 실험군에 비해 荊防瀉白散을 투여한 실험군 모두에서 IL-6 유전자 발현이 억제되었으며, TNF-α 유전자 역시 LPS와 βA만을 투여한 대조군보다 荊防瀉白散을 투여한 실험군의 발현이 억제되었다. 이것으로 荊防瀉白散이 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 과잉발현을 감소시켰음을 알 수 있는데, 이는 荊防瀉白散이 AD의 원인 중 하나로 알려진 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 사료된다. 본 실험에서는 荊防瀉白散 투여군에서 NOS-II의 유의한 억제를 보였다. 이러한 결과는 gene expression 및 protein analysis에서 보다 구체적인 비교를 실시하였으며, 결과적으로 iNOS gene expression은 荊防瀉白散에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다. 특히 荊防瀉白散 100 μg/㎖에서 가장 효과적인 억제가 관찰되었으며, 50 μg/㎖ 미만의 저농도에서 NOS-II의 up-regulation이 관찰되어 荊防瀉白散의 biphagic 효과의 가능성이 기대되었다.

본 연구에서는 荊防瀉白散이 BV-2 microglial cell line에서 LPS와 βA의 자극으로 유도되는 β-APP의 발현량을 조절하는지를 Western blot으로 분석하였다. 그 결과 대조군에 비하여 농도의존적으로 β-APP 발현량이 감소하는 것을 관찰하였고, 양성대조군인 MDL28170 처리군에서도 현저하게 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다.

In vivo 동물실험은 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 cytokine과 CD68+/GFAP의 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[40], 이 방법을 이용하여 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 荊防瀉白散의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다. 荊防瀉白散 투여 8주 후 Step-through latency를 관찰한 결과 荊防瀉白散 투여군은 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여, 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement- through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 荊防瀉白散 투여군은 8주 후 역시 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 현저한 운동성 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 AD 생쥐의 병변 뇌에서 荊防瀉白散 투여로 지질 과산화물질을 억제할 수 있는지를 규명하고자 하였다. 그 결과 荊防瀉白散 투여군을 투여로 AD 생쥐의 병변 뇌부위에 MDA의 양이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 그 원리는 과산화 지질의 분해에 생성되는 MDA의 2 분자와 thiobarbituric acid (TBA)가 결합하여

생성되는 적색물질의 흡광도를 측정하는 원리를 사용하였다. βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 병변 뇌조직에서의 염증반응 cytokine, CD68+과 CD11b+ 발현을 관찰하였는데 먼저 병변 뇌조직에서의 염증반응 cytokine의 일종인 IL-1β 생산량을 관찰한 결과, 정상군에 대해 βA를 뇌에 주입한 대조군에서는 증가되었으나 荊防瀉白散 투여군에서는 그 발현이 현저히 감소했고, TNF-α 단백질 역시 정상군에 비해 βA를 뇌에 주입한 대조군은 증가하였으나 荊防瀉白散 투여군은 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있다. 이는 荊防瀉白散이 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 세포성 단백질 수준과 유전자 수준 모두 효과적으로 억제한 것으로, 荊防瀉白散의 투여를 통해 과잉 생산된 염증반응 cytokine으로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

AD 병태 생쥐모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과 βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 荊防瀉白散 투여군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져, 荊防瀉白散이 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 hippocampus 주위에 정상군과 비교할 때 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, 荊防瀉白散 투여군은 대조군에 비하여 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 있는 데 이는 荊防瀉白散이 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 예방할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다. 또한 hippocampus 병변부위에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 대조군에 비하여 荊防瀉白散을 투여한 실험군에서 tau 단백질과 GFAP 단백질의 발현량이 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 βA로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 Step-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고 또한, βA로 유도된 AD 병태 생쥐 모델의 미세아교세포에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, TNF-α의 발현, 과산화 지질도 (MDA)를 억제하였고, CD68+과 CD11b+의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 荊防瀉白散은 βA의 과다 생성, 미신경교세포의 염증반응 cytokine의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 荊防瀉白散의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

HBSBS가 βA로 유도된 AD 동물 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

In vitro

1. HBSBS 투여군은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 NOS-II 유전자 발현을 억제하였다.
2. HBSBS 투여군은 BV2 microglial cell line에서 APP 유전자 발현을 억제하였다.
3. HBSBS 투여군은 BV2 microglial cell line에서 βAPP 단백질 발현을 억제하였다.

In vivo

1. HBSBS 투여군은 Morris water maze를 통한 Step-through latency, distance movement-through latency 측정에서 기억력 개선 효과를 나타냈다.
2. HBSBS 투여군은 AD 병변 뇌조직에서의 세포내 IL-1β, TNF-α의 발현 측정에서 양성세포수를 억제하였다.
3. HBSBS 투여군은 AD 병변 뇌조직에서의 MDA와 CD68+, CD11b+의 세포수를 억제하였다.
4. HBSBS 투여군은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.
5. HBSBS 투여군은 AD 병변 뇌조직에서 tau 단백질과 GFAP의 발현을 억제하였다.

참고문헌

1. Fuh JL, Wang SJ, Cummings JL. Neuropsychiatric profiles in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005;76:1337-41.
2. Cummings JL. Frontal-subcortical circuits and human behavior. Arch Neurol. 1993;50:873-80.
3. Binetti G, Mega MS, Magni E, Padovani A, Rozzini L, Bianchetti A. Behavioral disorders in Alzheimer disease: a transcultural perspective. Arch Neurol. 1998;55:539-44.
4. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
5. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-35.
6. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37, 124, 196, 217-8, 229.
7. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울:집문당. 2005:311-6.
8. 박지운. 日黃連이 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):87-100.
9. 박경. 補中益氣湯加味方 투여로 호전된 혈관성 치매 환자 1례 보고. 동의생리병리학회지. 2008;22(4):943-7.
10. 원호영. 반하백출천마탕이 국소 뇌허혈로 인한 치매 병태 백서에 미치는 영향. 대한한방신격정신과학회. 2006;17(2):61-73.
11. 임정화. 총명탕과 파극천총명탕 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):997-1008.
12. 한원주. 김형수. 김상태. 김태헌. 류영수. 강형원. 원지와 석창포의 단독 및 혼합추출액이 CT105 로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(2):95-105.
13. 김명진. 木瓜가 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2005;16(1):97-118.

14. 김지현. 새로운 제형의 치매치료제제의 효능 연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):303-10.
15. 오영진. 총명탕과 향부자총명탕의 추출물, 나노분말 제형을 이용한 치매에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):79-105.
16. 이승희. 귀비총명탕 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):921-33.
17. 강형원. 김상태, 손형진, 한평림, 조형권, 이영재, 유영수. LMK02의 품질규격화와 Aβ 올리고머에 의해 유도된 흰쥐해마 H19-7세포주에 미치는 항치매효과. 동의생리병리학회지. 2009;23(2):397-404.
18. 이제마. 東醫壽世保元. 서울:행림출판. 1986:102.
19. 이상민. 배영춘. 유관석. 주종천. 서은희. 소양인 임신오저환자를 형방사백산으로 치료한 치험례. 사상체질의학회지. 2004;16(2):114-21.
20. 김경석. 갱년기 장애 환자를 少陽人 형방사백산으로 치료한 치험 1례. 사상체질의학회지. 2003;15(3):118-23.
21. 이기주. 十二味貫中湯 凉膈散火湯, 荊防瀉白散이 백서의 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 한국전통의학지. 1999:263-72.
22. 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;27:229-37.
23. 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;31:616-21.
24. Louise B, Asha N, Barbara C, Greer M. 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, 16084-9.
25. 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;19:1236-43.
26. Suzuki N, Cheung T, Cai X, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde T, Younkin S. Science. 2004:264, 1336-40.
27. Bradford, M. A 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.
28. Tariot MD, PN et al for the 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;291:317-24.
29. Suematsu T, Matsumura T, Sato N. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in humans. Alcohol Clin Exp Res. 1981;5:427-30.
30. Brain R, Douglas H, Hishyuki M, Grant S, Kathryn E. Ramesh R, Raymond T, Tracy K. Metabolic quantification of lesion volume following experimental traumatic brain injury in the rat. Journal of Neurotrauma. January. 1997;14:15-22.
31. Vosselera M, Abegunewardenea N, Hoffmannb N, Petersene SE, Beckera D, Cleppienb D, Kunzc P, Kreitnerc KF, Lauterbacha M,

Bierbachd B, Düberc C, Goria T, Münzela T, Schreiberb LM, Horsticka G. Area at risk and viability after myocardial ischemia and reperfusion can be determined by contrast -enhanced cardiac magnetic resonance imaging. Eur Surg Res. 2009;43:13-23.

32. 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.
33. 서유헌. 뇌의학연구의 최근 동향과 전망. 보건산업기술동향. 2002;봄:3-9.
34. Heinz A. Alzheimer disease: a status report for 2002. American Council on Science and Health. 2002.
35. Neal R. Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: Challenges for drug development. Prog Neuro-Psychopharmacol & Bio Psychiat. 2001;25: 27-57.
36. Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ. A learning deficit related to age and β-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimers disease. Nature. 2000; 408:975-9.
37. 申佶求. 신씨본초학. 서울:壽文社. 1988:89, 218, 283, 286, 357, 369, 615, 629, 1988.
38. 박인상. 동의사상요결. 서울:소나무. 1991:63-4, 248.
39. Joo SS, Won TJ, Lee DI. Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). Arch Pharm Res. 2004;27:954-60.
40. 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.