동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):125-140

癡呆病態모델에서 天麻의 神經細胞 損傷 保護效果

정영수, 강재현, 박세환, 권영미*, 김근우, 구병수

동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 원광대학교 한의과대학 영상의학과*

Protective Effect of *Gastrodia Elata* on Neuronal Cell Damage in Alzheimer's Disease

Young-Su Jung, Jae-Hyun Kang, Se-Hwan Prak, Young-Mi Kwon, M.D.*,
Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo

Dept. of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Dong-Guk University
Dept. of Diagnositic Radiology, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University*

Abstract

Objectives :
The purpose of this study is to examine from various angles the protective effect of Gastrodia elata Blume (GEB) against nerve cell death induced by β-amyloid by using the cell line SH-SY5Y, which is commonly utilized for toxicity testing in nerve cells, and to find out its mechanism of action.

Methods :
To begin with, as a result of assessing the rate of cell survival by employing MTT reduction assay, the treatment with β-amyloid at different concentrations caused cytotoxicity, which was inhibited by preprocessing GEB extract. In addition, after β-amyloid was processed with the cell SH-SY5Y, apoptosis progressed, which was reduced effectively by processing GEB extract.

Results :
When cytotoxicity was caused by using hydrogen peroxide, a representative ROS, in order to examine the antioxidant effect of GEB, its protective effect was also observed. Apart from ROS, reactive nitrogen species (RNS) are also known to play a crucial role in nerve cell death. The treatment with the NO donor SNAP increased the production of nitric oxide and the expression of iNOS, which was also inhibited by GEB extract. Meanwhile, as an attempt to find out the mechanism of action explaining the antioxidant effect, the intracellular antioxidant enzyme expressions were measured by RT-PCR, which showed that GEB extract increased the expressions of heme oxygenase-1, GAPDH and γ-glutamate cysteine ligase. Lastly, GEB extract had a protective effect against impaired memory induced by scopolamine in animal models (in vivo).

Conclusions :
These findings indicate that GEB has a protective effect against the death of cranial nerve cells, suggesting possibilities for the prevention and treatment of AD.

Key Words :
Alzheimer's disease, Gastrodia elata Blume, Damage to brain cells, β-amyloid, Cytotoxicity, Antioxidant

투고 : 2010. 5. 10. 수정 : 2010. 6. 3. 채택 : 2010. 6. 4
교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel) 031-961-9140, Fax) 031-961-9009, E-mail) koobs@dongguk.ac.kr
이 논문은 2007년 8월 동국대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학 전공 석사학위 논문임.

Ⅰ. 서 론

치매는 특정 진단에 의한 질환이 아니라 흔히 기억장애와 인지기능장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말하며 뇌의 만성적 진행성 변성질환 등 다양한 원인에 의해 발생한다. 좀 더 넓은 의미로는 지적 황폐화뿐만 아니라 행동 이상 및 인격 변화를 초래하며, 정서적 기능상실과 진행성인 지적 황폐화가 사회적 혹은 직업적 기능의 장애를 초래하게 되는 상태이다[1,2].

주로 노년기에 많이 생기며 현재 심장병, 암, 뇌졸중에 이어 4대 주요 사인으로 불릴 정도로 중요한 기질성 장애의 하나로, 유병률이 65세 이상의 노년 인구에서 5~7%, 만80세 이상에서는 30~40%에 이른다고 보고되어 있으며, 알츠하이머병(Alzheimer Disease : AD)의 경우에는 1.6~15.3%로 보고되는 노인성 질환으로, 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되고, 가족과 치매 환자와의 갈등 혹은 적절한 관리의 부재로 인하여 여러 가지 비극이 일어나기도 하는 질환이다[2,3].

치매는 뇌세포의 손상으로 인한 질병으로 뇌세포가 손상되는 원인은 여러 가지가 있으며 대부분 oxidative stress가 관여한다고 알려져 있으나 근본적인 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. Amyloid precursor protein(APP)으로부터 유래되는 39~42개의 아미노산 잔기로 이루어진 베타아밀로이드(β-amyloid : Aβ)는 AD 환자 뇌의 노인반(senile plaque : SP)에 축적되는 주요 물질로서, 지금까지의 연구결과 신경세포의 벽을 파괴하여 AD의 발병에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며 특히 Aβ는 신경전달물질인 아세틸콜린을 만드는 대뇌 부분과 대뇌피질의 신경세포를 파괴하여 아세틸콜린의 활성상태를 감소시키며, 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)을 생성하여 산화적 손상을 유발함으로써 신경세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다[1,4].

그러므로 AD의 예방 및 치료에 있어서 Aβ의 생성 억제, 응집 억제, 형성된 Aβ의 제거촉진, 아세틸콜린 분해효소인 acetylcholine esterase(AchE)의 억제, 항산화 및 항염증 작용 등을 통한 신경세포 사멸 방지로 그 연구가 집중되고 있으며 최근에는 치매의 예방 및 치료 물질 개발에 있어 천연 한약제제의 많은 가능성에 대해 다양한 연구가 진행되고 있다[5,6].

天麻는 蘭科 식물인 천마 Gastrodia elata BL.의 根莖을 건조한 것으로, 최초의 기록은 『神農本草經 上品』에 '赤箭'으로 "味辛溫 主殺鬼精物蠱毒惡氣 久服益氣力 長陰 肥健 輕身 增年"이라고 되어있다. 이후 平肝潛陽의 효능으로 振顫, 頭痛, 眩暈, 不眠, 心煩, 파상풍, 肢體痲木, 風濕痺痛 등의 질환에 상용되어 왔는데, 天麻에는 주로 vanillyl alcohol, vanillin 및 gastrodin 등이 함유되어 있으며, 면역기능의 증강작용과 장관운동을 촉진시키는 작용 및 중추신경계에 대한 연구로는 천마추출물과 p-hydroxybenzyl alcohol (HBA) 및 vanillin의 antioxidant 작용, gastrodin과 HBA의 기억력 증강작용 등이 보고되고 있다[7,8].

본 연구에서는 AD의 치료와 예방에 천마가 미치는 효과를 알아보기 위하여 신경세포 독성실험에 널리 활용되고 있는 SH-SY5Y neuroblastoma 세포주를 사용하여, Aβ로 유도되는 신경세포 사멸에 대한 천마의 보호효과를 다각적으로 비교검토하고, 그 작용기전을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 材料

1) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin, 우태혈청(fetal bovine serum : FBS)은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], scopolamine, anti-iNOS 및 anti-actin antibody는 Sigma (St. Louis, MO, USA), peroxidase-conjugated anti-goat antibody, horseradish peroxidase conjugated antibody는 Zymed에서 구입하여 사용하였다.

베타아밀로이드 (Aβ25-35)는 Bachem Inc. (Torrance, CA, USA) 제품을 사용하였으며, 탈이온수에 1 mM 농도로 녹여 -20℃에 보관하였으며, 시약처리하기 직전에 녹여 실험에 사용하였다. Microplate reader는 TECAN GmbH (Salzhurg, Austria), in situ detection kit은 Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Germany), 감압농축기는 EYELA Co. (Japan), enhanced chemoluminescence (ECL) reagent는 Amersham Pharmacia Biotech (Arlington Heights, IL, USA) 제품을 사용하였다. Video-tracking system은 Ethovision (Noldus, Netherlands) 제품을 사용하였다.

2) 한약제의 제조

천마추출물(Gastrodia elata extract : GEE)은 천마(한국산) 80 g을 수동분쇄기를 이용하여 으깬 후 1.3 ℓ의 물로 150분 동안 추출하여 상층액을 모아 감압농축기로 농축한 후 동결건조하여 제조하였다.

3) 세포배양

Human neuroblastoma cell line인 SH-SY5Y 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM/F12 90% 배지를 사용하여 37℃, 5% CO2-95% 대기상태에서 배양하였다. 항생제로는 페니실린지 및 스트렙토마이신 (penicillin G sodium, streptomycin sulfate, 100 mg/ ℓ each)을 사용하였다.9)

4) 실험동물

실험동물로는 체중 200 g 전후의 Spraque-Dawley 웅성 랫트 (효창사이언스, 대전)를 일주일간 실험환경(온도 21-26℃, 습도 40-60%, 낮 12시간 · 밤 12시간 주기)에 적응시켜 사용하였으며 적응기간 및 실험기간 동안 물과 사료를 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 정상군, 실험군 및 대조군의 3개의 군에 각각 5마리씩 나누었다.

2. 방법

1) 베타아밀로이드로 유도된 세포생존률 측정

MTT reduction assay를 이용하여 세포 생존율을 정량적으로 측정하였다. 세포를 48-well plate에 6×104 개/well의 밀도로 plating한 다음, 이튿날 serum을 제거한 DMEM배지에 GEE를 정해진 농도로 녹여 30분 전처리 한 다음, 10μM Aβ를 가하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT solution (최종농도 1㎎/㎖)을 가하고 2시간 동안 배양한 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해시켜 570 ㎚에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

2) 베타아밀로이드로 유도된 세포사멸형태 측정

TUNEL staining (DNA fragmentation in situ)을 이용하여 apoptosis를 측정하였다. TUNEL staining은 apoptosis 과정에서 활성화된 endonuclease에 의해 180-200 bp 단위로 fragmentation 된 DNA를 3-OH위치에 표식된 dUTP를 결합시켜 기질

을 공급하여 발색시키는 방법이다. 세포를 4-well chamber slide에 plating한 뒤, GEE와 Aβ를 처리하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 덜어낸 후 4% neutral buffered formalin (100 ㎕)을 넣어 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 과산화수소 용액 (0.3% in methanol)으로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단한 후, 4℃에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 세포의 투과성을 증가시켰다. TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT, digoxigenin-11-dUTP)를 50 ㎕ 가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하여 label한 후, peroxidase- conjugated anti-goat antibody를 50 ㎕ 가하고 37℃에서 30분 동안 추가 배양하였다. 이후 DAB solution을 50-100 ㎕ 넣고 10분간 incubation한 후 50% glycerol로 mounting하고 현미경으로 세포형태를 관찰하였다.

3) 산화적 세포독성에 대한 세포생존률 측정

MTT reduction assay를 이용하여 세포 생존율을 정량적으로 측정하였다. 세포를 48-well plate에 6×104 개/well의 밀도로 plating한 다음 이튿날 serum을 제거한 DMEM배지에 GEE를 정해진 농도로 녹여 30분간 전처리 한 다음, 과산화수소를 가하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT solution (최종농도 1㎎/㎖)을 가하고 2시간 동안 배양한 다음 DMSO로 용해시켜 570 ㎚에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

4) S-nitroso-penicillamine(SNAP)로 유도된 세포생존률 측정

GEE를 SH-SY5Y 세포에 30분 처리한 후에, 대표적인 NO 공여제인 SNAP 0.2 mM을 가하고 24시간 동안 배양한 다음 MTT reduction assay로 세포생존 정도를 정량하였다.

5) Nitric oxide (NO) 생성 측정

SH-SY5Y 세포에 GEE와 SNAP를 처리한 후 배지에 생성된 NO의 양을 Griess reaction을 통해 측정하였다. 상등액을 150 ㎕ 취하여 동량의 Griess reagent (1% sufanilamide, 0.1% naphtylethylene diamine in 5% phosphoric acid)와 반응시켜 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

6) iNOS 단백질 발현 측정 (Western blot analysis)

iNOS 단백질 발현 정도는 Western blot analysis로 측정하였다. GEE와 Aβ를 24시간 처리 후 세포를 RIPA bufer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na3VO4, protease inhibitor cocktail)로 0℃에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000G에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 ㎍을 12.5% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide)에서 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-iNOS 또는 anti-actin primary antibody을 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing 하였다. 이후 ECL reagent를 사용하여 1분간 반응한 뒤

X-ray 필름에 노출시켰다. 노출시킨 후 발색시켜 검출하였다[10].

7) 실험동물의 기억력 손상 측정

천마가 실험동물 모델에서 기억력 손상 회복 효과가 있는지 검토하기 위하여 scopolamine을 사용하였다. Scopolamine은 acetylcholine receptor antagonist로 작용하여 기억력을 억제시키는 것으로 알려져 있다.11) Scopolamine을 투여하기 7일전부터 GEE를 200 ㎎/㎏의 용량으로 경구투여 하였다. 이후 scopolamine 0.5 ㎎/㎏을 복강으로 4일간 투여하여 기억력 손상을 유발하였으며, 매일 세 번씩 물-미로검사 (water-maze test)을 실시하였다.

물-미로검사(Water-maze test)는 플랫폼 (지름 10cm, 높이 25cm)이 설치된 원통의 물탱크 (지름 180cm, 높이 50cm)와 쥐의 움직임을 기록하는 비디오 추적장치 (video-tracking system)를 사용하여 시행하였다. 이 때 물의 온도는 26-27℃, 물의 높이는 플랫폼 위 2cm까지로 하였다. 실제 실험은 실험용 랫트가 플랫폼까지 찾아가서 플랫폼에서 30초 이상 머무르면 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출 잠복기 (escape latency)로 하였으며, 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출 잠복기(mean escape latency)로 하였다. 이 때 평균 탈출 잠복기가 90초를 초과하는 경우에는 90초로 동일한 값을 취하였다. 따라서 4일 조사기간 동안에 랫트 한 마리당 총 12회의 실험을 실시하였다. 아울러 랫트가 플랫폼을 정확하게 기억하는지를 확인하기 위해 쥐가 머무는 플랫폼을 제거한 후 랫트가 이곳을 찾아와 머무는 시간(Time Staying on PF)도 5일째 측정하였다.

8) 항산화효소 mRNA 발현 측정

항산화효소 mRNA 발현 측정은 PCR(polymerase chain reaction) 방법을 이용하였다. Trizol을 사용하여 total RNA를 추출, 분리한 다음, M-MLV reverse transcriptase를 이용하여 상보적인 DNA (complementary DNA : cDNA)로 전환시켰다. 특정 DNA sequence는 다음과 같은 각각의 primer를 사용하여 PCR 반응용액으로 증폭시켰다. Heme oxygenase-1 (HO-1), 5′-ACT TTC AGA AGG TGT CC-3′ (sense) and 5′-TTG AGC AGG AAG GCG GTC TTA G-3′ (antisense); catalase, 5′-CCG ACG AGA TGG CAC ACT TTG ACA-3′ (sense) and 5′-CGC GAG CAC GGT AGG GAC AGT TC-3′ (antisense); glyceraldehydes-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5′-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3′ (sense) and 5′-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3′ (antisense). γ-glutamate cysteine ligase (GCLC), 5′-CTG ACA CGT AGC CTC GGT AA-3′ (sense) and 5′-AGA CAC GGC ATC CTC CAG TT-3′ (antisense). 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초간 25 cycle 증폭시킨 다음 생성물을 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동 한 뒤 UV 현미경 하에서 촬영하였다.

3. 통계분석

데이터는 평균값 ± S.D.로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 처리하였다. p값이 0.05 이하의 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다 (*$p < 0.05$, **$p<0.01$).

Ⅲ. 실험결과

1. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 천마의 보호효과

Aβ로 유도된 신경세포 독성에 대한 천마의 보호효과를 검토하기 위하여 우선, 천마 추출물을 단독으로 처리하여 세포생존에 미치는 영향을 살펴보았다. 다양한 농도 (0, 0.0625, 0.25, 1 ㎎/㎖)의 GEE를 SH-SY5Y 신경세포주에 24시간 동안 처리하고 MTT reduction assay로 세포생존 정도를 정량하였다 (Fig. 1A). 이를 바탕으로 GEE의 농도를 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ㎎/㎖로 고정하고 30분간 전처리 한 다음 10 μM의 Aβ를 가하고 24시간 동안 배양하여 세포독성에 미치는 GEE의 보호효과를 검토하였다. 그 결과 Aβ를 첨가한 경우에는 세포생존율이 약 50%로 감소하였으며, GEE을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율은 농도 의존적으로 회복되었다 (Fig. 1B). 이는 GEE가 신경세포에서 Aβ에 의한 세포독성을 감소시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

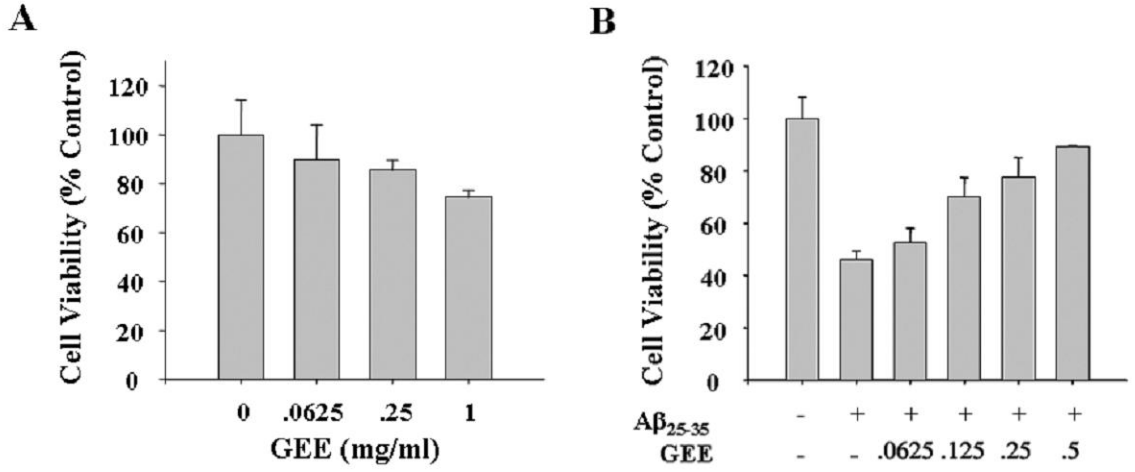


Fig. 1. The protecive effects of GEE on SH-SY5Y cytotoxic derived from β-amyloid.
A. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of GEE (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 1 ㎎/㎖) for 24 hours. B. Cells were pretreated with GEE (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ㎎/㎖) for 30 minutes before exposure to 10μM β-amyloid for 24 hours. Cell viability was determined by the MTT reduction assay. GEE means Gastrodia elata extract.

2. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸에 대한 천마의 보호효과

Aβ로 인한 세포사멸의 형태를 규명하기 위하여 apoptosis를 측정하는 대표적인 지표중의 하나인 DNA fragmentation을 in situ nick-end labeling (TUNEL staining)을 통하여 측정하였다. Aβ를 10 μM의 농도로 24시간 처리한 결과 TUNEL staining에 positive한 세포의 수가 증가되었으며, 이는 0.5 ㎎/㎖ GEE를 30분 전처리함으로써 효과적으로 억제되었다(Fig. 2).

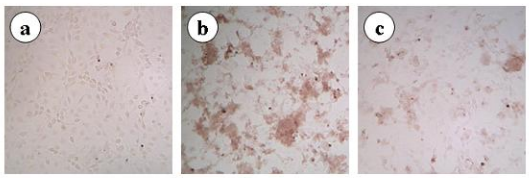


Fig. 2. The protecive effects of GEE on the cell extinction derived from β-amyloid.
a) Vehicle control b) Cells were exposed to 10 μM β-amyloid for 24 hours. c) Cells were pretreated with 0.5 ㎎/㎖ GEE for 30 minutes followed by exposure to β-amyloid for 24 hours. GEE means Gastrodia elata extract.

3. 산화적 스트레스에 대한 천마의 보호 효과

천마가 Aβ로 인한 신경세포사멸에 대해 보호 효과를 갖는 작용기전을 규명하기 위하여, 대표적인 활성산소종인 과산화수소를 200, 300, 400 μM의 농도로 24시간 동안 처리하고 MTT reduction assay로 세포생존 정도를 정량하였다. 그 결과 세포독성이 농도 의존적으로 유도되었다. 한편, GEE의 농도를 0.5 ㎎/㎖로 고정하여 30분간 세포에 처리한 후에, 과산화수소의 농도를 200, 300, 400 μM로 24시간 동안 처리한 다음 세포생존율을 측정한 결과 GEE가 산화적 세포사멸에 대해 보호효과를 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 질소적 스트레스에 대한 천마의 보호 효과

SNAP를 세포에 처리한 경우 유도된 세포독성은 GEE를 처리함으로써 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4).

NO 생성에 미치는 천마의 효과를 검토하기 위하여 Griess assay를 수행하였다. 세포에 GEE를 30분 전처리 한 이후, 0.2 mM SNAP를 가하여 24시간 배양한 다음 배지에 존재하는 NO의 양을 생성된 nitrite 량으로 환산하여 측정하였다. 결과, SNAP를 처리한 경우 NO의 생성량이 증가된 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 NO의 생성은 GEE를 전처리 한 경우 억제되었다(Fig. 5).

Aβ를 24시간 처리한 경우 세포내 iNOS 단백질의 발현이 증가되는 것을 Western blot을 통해 관찰할 수 있었으며, 반대로 GEE를 전 처리한 경우 유도된 iNOS의 단백질 양은 효과적으로 감소되었다(Fig. 6).

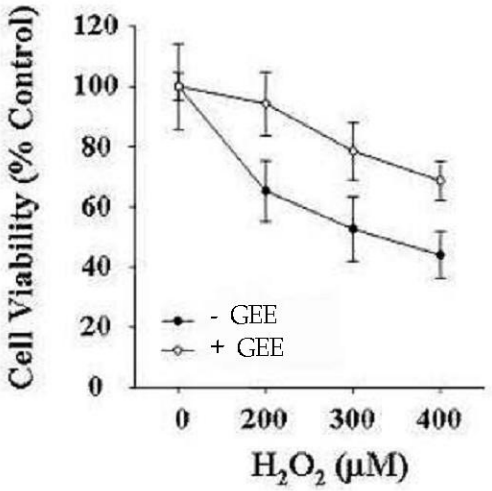


Fig. 3. The protecive effects of GEE on cytotoxic derived from H_2O_2.
SH-SY5Y cells were pretreated with 0.5 ㎎/㎖ GEE for 30 minutes and incubated with indicated concentrations of H2O2 for additional 24 hours. Cell viability was determined by the MTT reduction assay. GEE means Gastrodia elata extract.

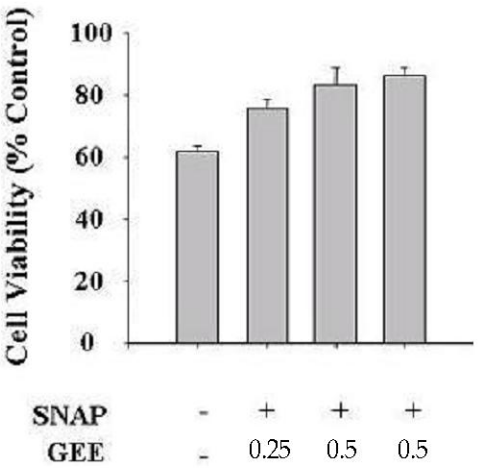


Fig. 4. The protecive effects of GEE on cytotoxic derived from SNAP.
SH-SY5Y cells were pretreated with indicated concentrations of GEE for 30 minutes before exposure to 0.2 mM SNAP for 24 hours. Cell viability was determined by the MTT reduction assay. GEE means Gastrodia elata extract.

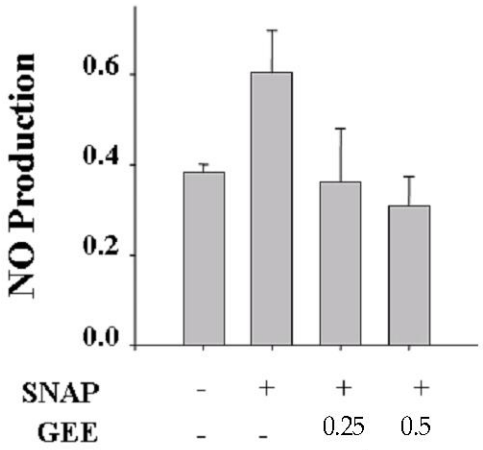


Fig. 5. The depression effect of GEE on the creation of NO.
NO released into the medium was measured by using the Griess assay. SH-SY5Y cells were pretreated with 0.25, 0.5 ㎎/㎖ GEE for 30 minutes and exposed to 0.2 mM SNAP for additional 24 hours. GEE means Gastrodia elata extract.

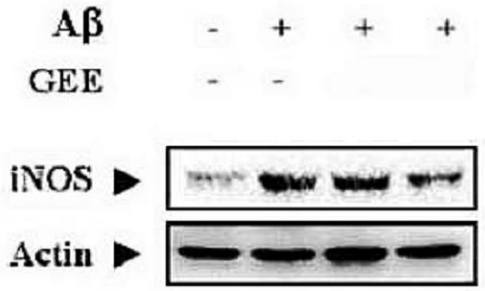


Fig. 6. The depression effects of GEE on the generation of iNOS protein derived from β-amyloid.
SH-SY5Y cells were incubated 10 μM β-amyloid for 24 hours in the presence or absence of GEE (0.25, 0.5 ㎎/㎖) and harvested for Western blot analysis. Immunoblots of lysates from treated SH-SY5Y cells were probed with iNOS antibodies. Actin levels were measured for the confirmation of equal amount of protein loading. GEE means Gastrodia elata extract.

5. 스코폴라민으로 인한 기억력 손상에 대한 천마의 효과

스코폴라민으로 기억력 손상을 유발한 단기간 실험동물 모델에서 대조군의 경우 (5마리, normal) training 기간이 길어질수록 플랫폼을 찾아가는 시간이 현저히 감소되었으며, 스코폴라민만 복강으로 투여한 랫트 (5마리, SC)의 경우 training 기간과 관계없이 거의 플랫폼을 찾아가지 못하는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 비하여 GEE를 200 ㎎/㎏k/day로 경구 투여한 랫트 (5마리, SC + GEE)는 플랫폼을 찾아가는 시간이 감소되었다(Fig. 7A).

아울러 랫트가 플랫폼을 정확하게 기억하는지를 확인하기 위해 쥐가 머무는 플랫폼을 제거한 후 랫트가 이곳을 찾아와 머무는 시간을 5일째 측정하였다. 스코폴라민 복강 투여 후 GEE를 경구 투여한 실험군의 경우 스코폴라민 단독 투여한 대조군에 비해 오랫동안 플랫폼이 있는 위치에 머물렀음을 알 수 있다. 이러한 결과는 GEE

의 투여는 랫트가 플랫폼을 찾아가는 길을 기억하게 할 뿐만 아니라, 플랫폼이 있는 위치도 확실하게 기억하도록 하는 것을 나타낸다(Fig. 7B).

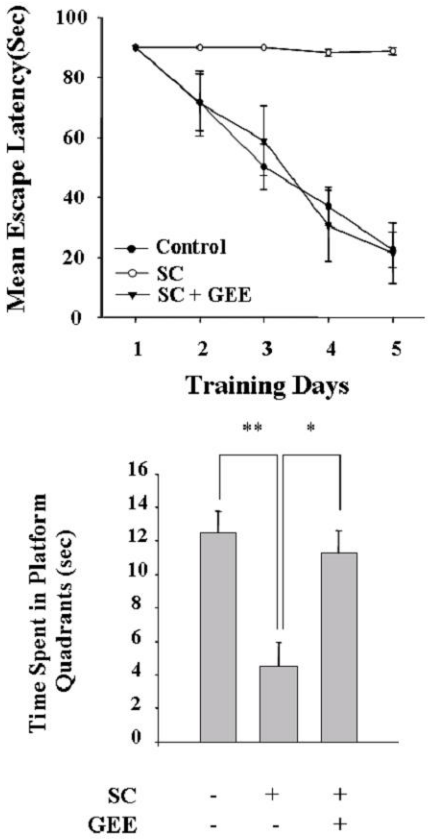


Fig. 7. The effects of GEE on the damage to the memory derived from Scopolamine.
(Water-maze test)
A. Mean escape latency for the visible platform task was expressed as a function of trials. Each rat was subjected to three trials per day for 4 consecutive days. B. Time spent in the invisible platform task was subjected at the 5th day(*p < 0.05, **p<0.01). SC means scopolamine. GEE means Gastrodia elata extract.

6. 천마의 세포내 항산화 증가 효과

Aβ로 유도된 세포사멸 및 손상에 산화적 스트레스와 염증반응이 중요한 역할을 담당하고 있으므로, 천마가 신경세포 보호작용 및 기억력 향상 효과를 갖는 작용기전을 규명하기 위하여 생체 내에 존재하는 대표적인 항산화 효소들의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 실험동물의 뇌에서 특히 기억력에 중요한 역할을 하는 hippocampus 부위를 적출하여 Trizol을 사용하여 RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하였다. 복강으로 스코폴라민 단독 투여한 대조군 랫트의 경우 heme oxygenase-1 (HO-1) 및 또 다른 항산화 효소인 γ-glutamate cysteine ligase (GCLC)의 mRNA 발현이 감소되었으며, 스코폴라민 복강 투여 후 GEE를 경구 투여한 실험군의 경우에는 발현이 현저히 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 8).

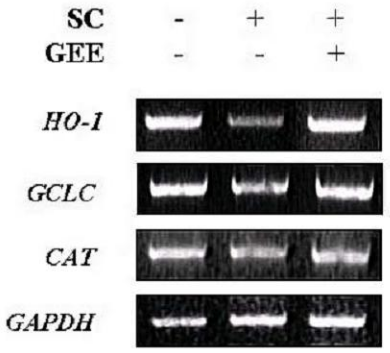


Fig. 8. The effects of GEE on the generation of the anti-oxidant enzyme in the cell.
RT-PCR showing HO-1, GCLC, CAT and GAPDH mRNA expression in rat hippocampus injected with SC in the presence or absence of GEE. The samples were processed as described in Materials and Methods. The GAPDH level was shown to confirm equal amount of DNA loading. SC; scopolamine, GEE; Gastrodia elata extract, HO-1; heme oxygenase-1, GCLC; γ-glutamate cysteine ligase, CAT; catalase, GAPDH; glyceraldehydes-3- phosphate dehydrogenase

Ⅳ. 고 찰

우리나라는 경제발전에 따른 의료와 복지 분

야의 향상으로 인한 평균수명의 급격한 신장과 함께 서구화된 생활 패턴의 영향 등으로 말미암아 사망연령과 사인구조의 큰 변화를 맞고 있다. 감염성질환에서 만성퇴행성질환으로 사인양상이 변화하는 것은 물론 뇌졸중, 치매 등의 노인성 질환의 발생률이 증가하는 추세이다[12,13].

AD는 1989년 독일인 의사 Alois Alzheimer가 노인성치매 환자에게서 SP을 관찰하고, 1907년에는 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangle : NFT)의 소견이 나타남을 관찰하여 조직학적으로 입증되었다. 1910년에 Kraepelin은 이러한 SP와 NFT의 병리학적 소견을 보이는 치매 환자를 Alzheimer's disease라 최초로 명명하였다[3,14].

우리나라 치매 환자의 경우 50% 이상이 AD에 속하는 것으로 추정된다. AD는 65세 이후에 나타나는 만발성 치매가 이 이전에 나타나는 조발성 치매보다 훨씬 더 흔하다. 65세 이상의 노인 가운데 2~4%가 AD를 나타내는 것으로 추산되고 있다[15].

AD 환자들의 증상은 보통 지적상실이 언제나 운동이상보다 선행된다. 자세, 발의 위치와 보행은 정신착란이 심해질 때까지는 정상적으로 유지된다. 초기 단계는 대부분 기억상실 (Memory loss), 언어능력감소 (Decreased language facility), 시공간장애 (Visual spatial dysfunction), 실행증 (Apraxia) 등의 4가지 이상이 포함된다[16]. 그러나 AD의 주된 원인으로 생각되는 뇌 속의 베타아밀로이드 반(Aβ plaque)의 축적은 이미 30년 전부터 시작되는 것이다. 그렇기 때문에 예방을 통해 발병시점을 늦추거나 더 나아가 증상이 나타나지 않도록 하는 것이 중요하다[17].

뇌졸중, 치매 등 중추신경계의 질환은 뇌에서 일정의 신경세포그룹이 변성 탈락하는 것을 증상발현의 기본으로 생각하고 있다[18]. 뇌의 기능을 담당하고 있는 세포는 하나하나가 서로 다른 뇌의 기능을 담당하고 있으므로, 극히 적은 수의 신경세포가 탈락되더라도 중대한 증상이 야기될 수 있다[19]. 따라서 일정한 신경세포의 손상발생에 대한 메커니즘의 연구가 신경질환의 이해를 도모하고, 치료를 발전시키는데 있어 중심적인 과제가 되고 있다. 뇌세포 손실의 원인을 이해하는 것은 어떻게 효과적으로 노화에 따른 뇌질환을 예방할 것인가에 대한 이해와 관련되어 있다.

AD에 있어서 뇌세포의 손상을 일으키는 많은 기전이 알려져 있다. 자유라디칼(Free radicals)이라 불리는 화학물질의 축적과 이로 인한 뇌세포의 손상, 자유라디칼의 형성으로부터 뇌를 보호하는 항산화물질 (antioxidants)의 부족이 부분적인 원인이 될 수 있다. 또한 뇌세포가 손상되면서 많은 양의 글루타메이트(glutamate)라는 신경전달 물질이 방출되며, 이렇게 방출된 과량의 글루타메이트는 다시 뇌세포를 손상시킨다.

Aβ의 축적은 뇌세포의 생화학적 경로에 장애를 주고, 전기적으로 단락을 일으킨다. 그리고 이 Aβ는 강력한 염증작용을 유발시켜 뇌를 더욱 손상시킨다. 뇌 속의 신경세포의 골격을 형성하는 타우(tau) 단백질은 구조적으로 비틀려져 신경세포 기능에 장애를 일으키며, 비틀려진 타우 단백질은 신경세포의 기능을 완전히 잃게 하고, 결국 세포는 죽게 된다. 이것을 NFT라고 부른다[17].

여러 역학 조사에 따르면 치매의 원인으로는 산화적 세포사멸과 염증에 관련하는 기전이 뇌세포 조직의 병리현상에도 중요하게 관련되고 있음이 보고되고 있어, 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 치매의 병인에 있어 산화적 및 염증적 조직손상에 관한 요인이 가장 큰 부분을 차지하고 있으므로, 이를 정확히 규명하고 잘 조절할 수 있다면 치매의 발생을 충분히 예방, 진단, 치료할 수 있다고 하겠다.

치매의 치료에는 환자들이 대부분 노인이기 때문에 그에 따른 신체적 취약성을 감안해야 하며 가족들의 이해와 주변 환경의 조절 등 일반적인 지지 요법들이 필요하다. 원인적 치료가 가능한 것은 약 20%에 불과하나 치매에 수반해서 발생하는 여러 가지 정신증상에 대한 약물치료는 가능하다[3,4].

기억을 비롯한 인지기능을 개선시키기 위한 약물은 크게 콜린성 약물과 비콜린성 약물로 구분할 수 있는데 대부분의 약물 연구는 AD에 관한 것이다. 지금까지의 경우 뇌 콜린성 신경세포의 광범위한 변성 및 소실이 인지 기능 감퇴의 주요 원인으로 생각되어, 남아있는 콜린성 신경계의 활성을 증가시켜 손상된 인지 기능을 부분적으로나마 회복시킬 수 있는 약물들에 관한 연구가 주로 진행되어왔다. 실제로 AD 치료제 사용되는 Exelon, Reminyl, Aricept 등은 모두 아세틸콜린 분해 효소의 활성을 억제함으로써 인지 기능을 항진시키는 아세틸콜린에스테라제 억제제 (acetylcholinesterase inhibitors)이다[1,11,20].

산화적 손상이 치매에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있기 때문에, 항산화 작용을 갖는 다양한 천연소재 물질에 대한 다각적인 연구 접근이 이루어지고 있으며, 은행 나뭇잎 성분(Gingko biloba) 등의 항산화물질은 의미 있게 질병의 진행을 늦추는 효과가 있다고 연구되어 있다[4,20].

한의학의 歷代文獻에서 살펴보면 『景岳全書』(1624년)에서 痴獃라고 하여 痴呆를 처음 언급하기 시작했다[21]. 그 후 淸代의 陳士鐸이 "呆病"을 記載하여 病因과 症狀을 설명하였으나 年齡과 老化에 대한 언급이 없으며[22], 『辨證奇聞』에 이르러 痴呆를 크게 三分하여 각각 辨證施治를 제시하였다. 痴呆라고 정확하게 표현한 文獻은 없지만, '癲狂', '虛勞', '健忘'등의 病名에서 知能 및 情緖의 障碍가 痴呆와 유사한 점을 찾아볼 수 있다. 呆病은 如痴, 終日閉戶獨居, 默默不言, 不飮不食 與之糞則大喜, 千奇萬怪等의 症狀을 나타내는 疾病이고, 癲狂症에서는 平日能言 癲則沈默, 或歌或哭 食糞穢或裸形露體, 夢遠行而精神懶散 魂魄妄行 등의 症狀이 보이고, 健忘門에서는 爲思有時無終 言談不知首尾, 遇事多忘, 善忘其前言 等 주로 記憶障碍의 症狀이 나타나 있으며, 虛勞門에서는 終日乃復言, 魂魄飛陽 邪神居之, 心傷善忘 등의 症狀이 나타나고 있으므로, 그 증상 표현으로 볼 때 현대의 老人性 癡呆를 이들 범주에 해당시킬 수 있다고 볼 수 있다[2,23,24].

임상적으로는 癡呆는 呆病, 健忘, 癲狂을 근거로 하여 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등으로 辨證施治를 하고 있다[2].

한의학 이론에 의하면 陰, 특히 肝陰이 부족하면 陽이 위로 뜨게 된다. 이를 '肝陽上亢'이라고 한다. 肝陽이 上亢되면 나타나는 현상은 肝火가 熾盛하게 되고 火가 극에 달하면 風이 생긴다. 이렇게 생긴 風은 平肝潛陽이나 平肝熄風의 방법으로 치료할 수 있다[25].

風이라는 것은 발병요인인 六淫 중 하나이며 外風과 內風으로 구분된다. 外風은 外感風邪를 말하며, 內風은 흔들거림 · 현기증 등의 병증으로 外感風邪에 속하지 않는 것을 말한다. 대체적으로 병리변화의 과정에서 나타나는 중추신경계통의 병증에 속한다. 예를 들어 현기증 · 졸도 · 경련 · 마비나 무의식적인 四肢의 震顫, 口眼喎斜 등의 병증이다[26].

天麻는 우리나라 中部以北 地方에 分布하고, 中國에서는 四川, 雲南, 貴州省 등 南北 各地에 分布하며, 栽培되고 있다. 가을에서 다음해 봄 사이에 採取하여 曬乾하는데 그 性은 平 無毒하고, 味는 甘하며 肝經으로 들어간다. 그래서 平肝, 息風, 止痙시키는 效能이 있어 肝風內動으로

인한 眩暈頭痛과 痙攣抽搐 및 肢體痲木, 手足不遂 등 일체의 風證에 寒熱을 막론하고 모두 적용 한다[8,27].

『東醫寶鑑』에 언급된 天麻를 사용한 95개의 처방을 살펴보면 각기 「風」門에 29개와 「小兒」門에 24개의 처방이 해당되어 가장 많은 비중을 차지하였는데, 그 외에도 「神」과 「頭」·「眼」·「耳」門 등 精神과 頭面部 관련 질환의 처방에도 총 18개의 처방이 사용되었으며 기타 門에서 나머지 24개의 처방이 사용되었다[28]. 風을 중추신경계통의 실조라고 볼 때, 대표적인 平肝藥으로써 일체의 風證에 사용되는 天麻와 중추신경계의 뇌세포 변성질환인 치매와의 연관성을 추측해 볼 수 있는 한의학적 단서가 될 수 있다.

현대의 여러 연구에서도 천마가 뇌혈류장애에 기인된 질환, 신경쇠약, 치매 등 뇌신경질환을 개선하는 효과가 있음이 보고되고 있으며[29], 신경보호효과를 통한 노화방지 및 기억력증강에 대한 연구[30,31], vanillin 성분을 이용한 간질억제 효과를 실험한 연구[32] 및 기타 간질발작에 대한 연구[33]도 이루어지고 있다. 또한 항우울작용[34], 항혈전작용[35], 항산화작용[36] 등에 대한 연구도 발표되고 있다.

본 연구에서는 Aβ로 유도된 SH-SY5Y neuroblastoma 신경세포 독성에 대한 천마의 보호효과를 검토하기 위하여 우선, GEE를 단독으로 처리하여 세포생존에 미치는 영향을 살펴 본 결과, Aβ를 첨가한 경우에는 세포생존율이 약 50%로 감소하였으며, GEE를 함께 처리한 그룹에서 세포생존율은 농도 의존적으로 회복되었다. 이는 GEE가 신경세포에서 Aβ에 의한 세포독성을 효과적으로 억제한다는 것을 보여준다. Aβ로 인한 세포사멸의 형태를 보기 위하여 apoptosis를 측정하는 대표적인 지표중의 하나인 DNA fragmentation을 in situ nick-end labeling (TUNEL staining)을 통하여, Aβ를 처리한 경우에 사멸된 세포의 형태를 쉽게 발견할 수 있었으며, GEE를 전처리 한 경우에는 apoptosis의 억제 효과를 발견할 수 있었다. Apoptosis는 자유라디칼이 세포를 손상시키는 중요한 메커니즘 중의 하나이다. 자유라디칼은 세포 내에서 세포가 자살하도록 하는 어떤 유전자를 작동시킨다. 이런 과정은 AD, 파킨슨씨병, 루이소체 치매, 전두엽-측두엽 질환, Huntington병, 뇌졸중, 간질과 같은 많은 질환에서 일어나는 것으로 알려져 있다. GEE를 전처리 한 경우 신경세포의 apoptosis를 억제하는 효과가 있다는 것은 이러한 뇌신경계 질환에 이용될 수 있다는 것을 의미한다고 사료된다.

산화적 스트레스에 대한 천마의 보호효과를 알아보기 위하여 세포에 과산화수소를 처리하여 살펴본 결과, 과산화수소 농도에 의존하여 세포독성이 유도되었다. GEE를 전처리 한 후에 과산화수소를 처리한 경우를 살펴보면 신경세포의 산화적 세포사멸에 대한 천마의 보호효과를 알 수 있었다.

Aβ는 활성산소종 뿐 아니라 활성질소종을 생성하여 신경세포 및 교세포에 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 가장 대표적인 활성질소종인 NO는 세포 내부 또는 외부에서 다양한 원인에 의하여 생성되며 특히 내인성 NO는 NOS 효소의 작용에 의하여 생성된다[37]. 대표적인 NO 공여제인 SNAP를 세포에 처리한 경우 유도된 신경세포에 대한 독성은 GEE를 처리함으로써 농도 의존적으로 억제되었으며, 이는 GEE가 NO로 유도된 신경세포의 질소적 손상에 대하여 보호효과를 가질 수 있음을 보여주었다. NO 생성에 GEE가 미치는 효과를 측정해본 결과, SNAP를 세포에 처리한 경우 세포에서 NO의 생성량이 증가된 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 NO의 생성은 GEE를 전처리 함으로써 억제되었

음을 확인했다. iNOS의 발현 역시 GEE가 억제함으로써 NO의 생성 을 감소시킬 수 있다. 이러한 결과는 GEE가 활성산소종에 대한 보호 작용이 있을 뿐만 아니라 활성질소종에 대해서도 Aβ에 의한 신경세포의 독성을 보호하는 작용이 있으며 이는 iNOS의 유전자 수준에서 보호하는 작용을 통해서 발휘되는 것으로 사료된다.

스코폴라민으로 기억력 손상을 유발한 단기간 실험동물 모델을 통해 물-미로검사(Water-maze test)를 수행하였다. 대조군의 경우에는 training 기간이 길어질수록 플랫폼을 찾아가는 시간이 현저히 감소되었으나, 스코폴라민만 복강으로 투여한 랫트의 경우에는 training 기간과 관계없이 거의 플랫폼을 찾아가지 못하는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 비하여 GEE를 경구 투여한 랫트는 플랫폼을 찾아가는 시간이 감소되었으며, 아울러 랫트가 플랫폼을 정확하게 기억하는지를 확인하기 위해 쥐가 머무는 플랫폼을 제거한 후 랫트가 제거된 플랫폼의 위치에 찾아와 머무는 시간을 5일째 측정한 결과, GEE를 투여한 랫트의 경우 스코폴라민만 복강으로 투여한 랫트에 비해 오랫동안 플랫폼이 있는 위치에 머물렀음을 알 수 있다. 이를 통해 GEE가 신경세포에 대한 독성보호효과 및 활성산소·활성질소 억제효과뿐만 아니라 실험동물에 GEE를 경구투여한 경우에도 기억력 손상 억제 효과가 있는 것을 알 수 있게 되었다.

천마의 세포내 항산화 증가 효과를 알아보기 위하여 대표적인 항산화 효소들의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였는데, 항산화 효소인 HO-1 및 GCLC의 mRNA 발현이 증가되었음을 확인할 수 있어, 이는 항산화 효소의 mRNA 수준에서 GEE가 작용한다는 것을 보여준다.

이상의 실험을 통하여 GEE는 Aβ에 의한 신경세포의 독성을 유의성 있게 억제시켰는데 이러한 효능은 신경세포의 산화적 세포사멸을 보호할 뿐만 아니라 iNOS의 생성을 유전자 수준에서 방어하여 NO 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 항산화효소인 HO-1, GCLC의 mRNA 발현도 증가시켜 신경세포를 보호하는 작용이 있으며, 이러한 작용을 통하여 실제로 실험동물의 기억력을 증가시키는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

인체는 40세 이후가 되면 신체 전반에 걸쳐 대사 작용이 감소하기 때문에 에너지도 그만큼 적게 생산하게 된다. 결과적으로, 각 세포들은 자유라디칼을 제거하고, 세포를 보호하는 항산화 물질(antioxidants)을 덜 생산하게 된다[17]. 그렇기 때문에 뇌세포의 사멸과 손상이 시작되는 40세 이후에는 산화적 뇌세포 사멸에 대한 위험도가 더 높아질 수밖에 없다. 앞에서도 언급했듯이 AD는 오랜 기간에 걸쳐 그 원인을 형성해오기 때문에 인체의 항산화 능력이 떨어지기 전부터의 예방이 반드시 필요하다.

AD은 지금까지의 연구결과 Aβ가 발병에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 Aβ를 통한 치매 유발 독성 실험이 다양하게 진행되고 있다. 본 연구에서 천마가 Aβ 처리와 같은 치매 유발 독성에 대한 뇌신경세포 사멸을 보호하는 효과가 있다는 것은 향후 천마가 AD의 예방 및 치료제로 이용될 가능성을 제시한다. 천마의 AD 예방 효과라는 것은 한의학의 "治未病"에 대한 개념으로 이해할 수 있다. 이미 진행된 뇌세포 손상을 치료하는 것도 중요하지만 그 이전에 치매의 발병 요인을 낮추는 것이 사회적 의료비용의 감소뿐만 아니라 개개인의 삶의 질을 더 향상시켜 줄 수 있기 때문이다.

V. 결 론

본 연구에서는 신경세포 독성실험에 널리 활용되고 있는 SH-SY5Y neuroblastoma 세포주를 사용하여, 베타아밀로이드로 유도되는 신경세포 사멸에 대한 천마의 보호효과를 다각적으로 비교 검토하고, 그 작용기전을 규명하고자 한 바 다음과 결론을 얻었다.

1. 세포생존율을 MTT reduction assay로 측정한 결과, 베타아밀로이드를 농도별로 처리한 경우 세포독성이 유발되었으며, 천마 추출물을 전처리 함으로써 억제되었다.
2. 베타아밀로이드를 SH-SY5Y 세포에 처리하였을 때 apoptisis를 통한 능동적 세포사멸이 진행되었으며, 천마 추출물을 전처리함으로써 효과적으로 감소되었다.
3. 천마의 항산화 효능을 검토하기 위하여 대표적인 활성산소종인 과산화수소를 사용하여 세포독성을 유발한 경우, 천마 추출물을 전처리 함으로써 보호효과를 관찰할 수 있었다. SNAP를 처리한 경우 대표적인 활성질소종인 nitric oxide의 생성이 증가되고 베타아밀로이드를 처리한 경우 iNOS의 발현이 증가되었으며, 이는 모두 천마 추출물에 의해 억제되었다.
4. 실험동물에 천마추출물을 경구투여 하였을 때, 스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대하여 보호효과를 가졌다.
5. 천마가 항산화 보호효과를 나타내는 작용기전을 규명하기 위하여 세포내 항산화 효소의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과, 천마 추출물에 의하여 heme oxygenase-1 및 γ-glutamate cysteine ligase의 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과는 천마가 베타아밀로이드 처리와 같은 치매 유발 독성에 대해 뇌신경세포 사멸을 보호하는 효과가 있음을 보여주는 것으로, 향후 알츠하이머병의 예방 및 치료제로 이용될 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. Jooghan Park. Causes and Management of Dementia. Korean J Psychophamacol. 1992; 3(1):33-42.
2. 대한한방신경정신과학회. 한방신경정신의학. 경기:집문당. 2005:311-9, 454-5, 700-1.
3. 대한노인정신의학회. 노인정신의학. 서울:중앙문화사. 2004:141-75.
4. 장상근. 치매. 서울:(주)신원문화사. 2004:21-2, 120-3.
5. Kim Sang-Tae, Kim Jeong-Do, Lyu Yeoung-Su, Lee Min-Yung, Kang Hyung-won. Neuroprotective Effect of Some Plat Extracts in Cultured CT105-Induced PC12 Cells. Bio. Pharm. Bull. 2006;29(10):2021-4.
6. Hsieh MT, Peng WH, Wu CR, Wang WH. The Ameliorating Effects of Cognitive-Enhancing Chinese Herbs on Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. Phytother. Res. 2000;14:375-7.
7. Kim Ho-Cheol, Ahn Duk-Kyun. Neuroprotective Effect of Gastrodiae Rhizoma on Global Ischemia Induced by 4-Vessel Occlusion in Rats. Kor. J. Herbology. 1999;14(1):121-9.
8. 全國韓醫科大學 本草學敎授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1999:504-5.
9. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual

of basic technique. 3rd ed. Wiley-Liss. 1994.
10. 대한진단검사의학회. 진단검사의학(임상병리학). 서울:고려의학. 2001:21, 27, 54-5, 595.
11. 김경환. 이우주의 약리학강의. 서울:의학문화사. 2001:143, 151, 237.
12. 사망원인 통계결과. 통계청. 2001.
13. 임달오, 김종석. 노령인구의 평균여명 개선에 관한 연구. 인구의학연구논집. 2005.
14. Jin-Soo Kim. Alzheimer's Dementia-General Concepts and Recent Advances-. Korean J Psychophamacol. 1991;2(1):30-42.
15. 대한신경정신의학회. 신경정신의학. 서울:중앙문화사. 2005:497-520, 534-5.
16. Frank H. Netter. CIBA원색도해의학총서. 서울:정담. 2000:145.
17. William Rodman Shankle · Daniel G. Amen. 알츠하이머 치매의 예방과 치료. 서울:고려의학. 2005:5, 9-10, 37-8, 41-2, 215-8, 292.
18. Aspey BS, Cohen S, Patel Y. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model or stroke. Neuropathol Appl Neurobiol. 1998;24:487-97.
19. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A. Elevation of the extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebra microdialysis. J Neurochem. 1984; 43(5):1369-74, 1984.
20. 권중돈. 치매환자를 위한 프로그램의 실제. 경기:현학사. 2004:66-74.
21. 張介賓. 景岳全書. 서울:정담. 1999:640, 846.
22. 陣士鐸. 石室秘錄(下). 서울:書苑堂. 1984:316-7.
23. 황의완, 김지혁. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1987:269-71.
24. 周 康, 黃躍東. 중서의학 결합 정신병치료. 서울:정담. 2004:25-7.
25. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울:성보사. 1996:146-66.
26. 전통의학연구소. 한의학사전. 서울:성보사. 1994: 112-3, 154-5, 243.
27. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울:정담. 1999:4105-10.
28. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 경남:동의보감 출판사. 2005:102, 103, 105, 110, 194, 446, 449, 453, 456, 457, 461, 500, 528, 559, 708, 710, 731, 732, 781, 790, 835, 836, 895, 985, 993, 1001-4, 1006, 1007, 1010-3, 1015, 1018, 1019, 1026, 1027, 1029, 1030, 1035, 1037, 1040, 1072, 1307, 1308, 1340, 1350, 1513, 1569, 1601, 1602, 1612, 1622, 1635, 1644, 1652, 1858, 1860, 1862, 1864-7, 1869-71, 1873-1875, 1890, 1900, 1915, 1934, 1977, 2148, 2149, 2154, 2183.
29. Kim HJ, Moon KD, Oh SY. Ether fraction of methanol extracts of Gastrodia elata, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus. Neurosci Lett. 2001; 314:65-8.
30. Sun XF, Wang W, Wang DQ, Du GY. Research progress of neuroprotective mechanisms of Gastrodia elata and its preparation. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004;29(4):292-5.
31. Hu JF, Li GZ, Li MJ. Protective effect of Gastrodia elata and E-gelatin on lead-induced damage to the structure and function of rat hippocampus. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2003;21(2):124-7.
32. Xie L, Wu HQ, Jin XN, Ge Q, Jin H, Liu GQ. The effect of vanillin on the fully amygdala-kindled seizures in the rat. Yao

Xue Xue Bao. 1989;24(7):482-6.
33. Hsieh CL, Lin JJ, Chiang SY, Su SY, Tang NY, Lin GG, Lin IH, Liu CH, Hsiang CY, Chen JC, Ho TY. Gastrodia elata modulated activator protein 1 via c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in kainic acid-induced epilepsy in rats. J Ethnopharmacol. 2007; 109(2):241-7.
34. Zhou BH, Li XJ, Liu M, Wu Z, Ming Hu X. Antidepressant-like activity of the Gastrodia elata ethanol extract in mice. Fitoterapia. 2006;77(7-8):592-4.
35. 백영숙, 송재경, 윤춘희, 정교순, 유혜숙. 천마(Gastrodia elata Blume)의 항혈소판, 항혈전활성. 생약학회지. 1996;26(4):385-9.
36. 허근. 천마 성분인 4-히드록시-3-메톡시벤즈알데히드 및 파라-히드록시벤즈알데히드의 흰쥐에서의 약물동태. 약제학회지. 1999;29(1): 47-53.
37. Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog. Neurobiol. 2005;76:126-52.