동의신경정신과 학회지 제22권 제2호(2011년 6월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(2):107-127

導痰湯合聰明湯이 LPS로 처리된 microglia 및 기억력 감퇴 생쥐 모델에 미치는 영향

박대명, 이상룡, 정인철

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of *DoDamTanghapChongMungTang*(*Daotantanghecongmingtang*) on LPS induced-Microglia and Memory Deficit Mice Model

Dae-Myung Park, Sang-Ryong Lee, In-Chul Jung

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

Abstract

Objectives :
This experiment was designed to investigate the efficacy of DDTCMT hot water extract & ultra-fine powder on Alzheimer's Disease Model.

Methods :
The effects of the DDTCMT hot water extract on expression of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-Ⅱ, IL-10, IL-1 receptor antagonist mRNA and production of IL-1β, IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) were investigated. Expression of NO, ROS in BV2 microglial cell line treated by LPS and AChE activity in PC-12 cell treated by NGF were investigated. anti-AChE was observed through Western blot analysis. The effects of the DDTCMT hot water extract & ultra-fine powder on the behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine were investigated.

Results :
1. The DDTCMT hot water extract significantly decreased the production of mIL-6, mNOS-Ⅱ, mTNF-α, and increased the production of mIL-10, mIL-1 receptor antagonist.
2. The DDTCMT hot water extract significantly suppressed the production of IL-1β, IL-6, TNF-α in BV2 microglial cell line treated by LPS.
3. The DDTCMT hot water extract significantly suppressed the NO and ROS production in BV2 microglial cell line treated by LPS.
4. The DDTCMT hot water extract groups showed inhibition of AChE activity in NGF treated PC-12 cell line.
5. The DDTCMT hot water extract suppressed anti-AChE expression in NGF treated PC-12 cell line was observed by Western blot analysis.
6. The DDTCMT hot water extract & ultra-fine powder groups showed significantly inhibitory effect on the scopolamine -induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze.

Conclusions :
These results suggest that the DDTCMT hot water extract & ultra-fine powder may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key Words :
Alzheimer's disease, *DoDamTanghapChongMungTang*(DDTCMT), Hot water extract, Ultra-fine powder

투고 : 2011. 05. 09. 수정 : 2011. 06. 08. 채택 : 2011. 06. 13.
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 2011년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

痴呆는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군으로[1] 원인으로 뇌조직의 퇴행, 변성, 노화, 중추신경계 감염, 뇌손상, 독성 대사장애, 혈관성 장애 등[2]이 있고, 원인 질환 중 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)이 50~60%를 차지하여 가장 큰 비율을 차지한다[1].

AD는 신경세포 소실에 따른 전반적인 뇌위축과 노인반(senile plaques), 신경섬유다발 (nurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며[3], 임상적으로 기억, 판단, 언어 능력 등 지적인 기능의 점진적인 감퇴, 일상생활능력, 인격·행동양상의 장애 등의 주요증상 을 나타내고[4] 원인으로는 β-amyloid(βA)로 유발된 신경독성[5], 콜린성 신경원의 소실[6], 산화적 손상[7], 에너지 대사 결함, 글루탐산염 독성, 미토콘드리아의 결함[8] 등이 제시되고 있다.

한의학 역대 의서[9-12]에서 痴呆는 健忘, 癲狂, 虛勞 등에서 유사한 증상이 언급되었고, 한의학적 변증 유형으로 腎精不足, 腎陽虛衰, 肝腎陰虛, 痰濁壅盛, 氣血虧虛 등이 있다[13].

導痰湯合聰明湯은 導痰湯과 聰明湯을 合方한 處方으로, 聰明湯은 『東醫寶鑑』[14]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며[15], 최근 한의학계에서 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[16-21]가 진행되었다. 導痰湯은 『濟生方』[22]에 "治一切痰厥, 頭目旋運, 痰飮留積不散"이라고 처음 기재된 이 후 痰迷心竅, 痰涎壅盛으로 인한 中風, 閉證에 사용되어 왔다[23-25]. 導痰湯에 대한 최근의 연구로 혈전증에 미치는 영향[26], 뇌손상 보호작용[27]에 대한 연구가 있다.

현재 널리 사용되는 한약 제형인 탕제는 복용, 저장, 보관의 불편함 때문에 새로운 제형의 개발이 요구되고 있으며[28] 이에 진행된 연구에서 열수추출물과 초미세분말 제형이 신경세포의 퇴화에 의한 기억력 감퇴에 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 연구[18-21,29-35]가 보고된 바 있다.

이에 저자는 痰涎壅盛에 기인한 뇌위축 및 痴呆에 導痰湯合聰明湯이 효과가 있을 것으로 판단되어, 導痰湯合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형의 AD 및 기억력 감퇴에 대한 효과를 실험적으로 규명하고자, *in vitro* 실험에서 열수추출물을 시료로 mouse lung fibrast cells(mLFC)에서 세포독성을 관찰하고, lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II, IL-10, IL-I receptor antagonist의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정하였다. 또한 배양상층액에서 NO의 생성량 측정, ROS 분석을 하였다. NGF를 처리한 PC-12 cell에서 AChE activity 측정하였고 immunoblotting을 통하여 anti-AChE의 발현을 관찰하였다. *in vivo* 실험에서는 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 기억과 관련된 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40,

Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), leupetin, N,N,N′,N′-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl2)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, 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, RNAzolB는 Tel-Test사 (USA) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone 사(USA) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, anti-CD14(Pharmingen, 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) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), 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, USA), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, USA), CO2 incubator(Lepco, USA), Cytometry(BD, USA), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., USA), VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, USA) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

평균체중 약 24 g의 10주령 雌性 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명공학연구원에서 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 실온 22±2℃을 유지하고, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 導痰湯合聰明湯(*Daotantanghecongmingtang*, DDTCMT)의 처방구성은 『東醫寶鑑』[14]을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Prescription of *DoDamTanghapChongMungTang* (*Daotantanghecongmingtang*, 이하 DDTCMT)

Herb	Scientific Name	Dose (g)
半夏	*Pinelliae ternata Breitenbach*	8
南星	*Arisaema amurense var. serratum*	4
枳殼	*Citrus aurantum L.*	4
橘紅	*Citrus unshiu Markovich*	4
赤茯苓	*Poria cocos Walf*	4
甘草	*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*	4
白茯神	*Poria cocos Walf*	4
遠志	*Polygala tenuifolia*	4
石菖蒲	*Acori Gramineus Soland*	4
	Total amount	40

4) 검액의 조제 및 투여

(1) 導痰湯合聰明湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제

導痰湯合聰明湯 1첩 분량(40 g)에 증류수 1,300 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 導痰湯合聰明湯 추출물(5.25 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 導痰湯合聰明湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)만수제약에서 실시하였는데, 半夏, 南星, 枳殼, 橘紅, 赤茯苓, 甘草, 白茯神, 遠志, 石菖蒲를 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1 mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater) 회전속도 6,750 rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(ACWS, air classifying wheel speed) 5,000~7,500 rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 평가

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5 ㎎/㎖), DNase type Ⅰ(0.15 ㎎/㎖), antibiotics(penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5 cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법[36]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 導痰湯合聰明湯 열수추출물(최종 농도 200 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였고 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA) 50 ㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic

acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

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

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh (Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아, 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍(DMEM)에서 배양한 후 導痰湯合聰明湯 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1 ㎍/㎖를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000 rpm에서 5분간 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 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum 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

Reverse transcription(RT) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I(10 U/㎕) 2 U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 ㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1 ㎕의 M-MLV RT(200 U/㎕)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 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.

③ Real Time Quantitative PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Proinflammatory cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min 50℃, 10 min 94℃, 그리고 40 cycles는 0.15 min 95℃, 1 min

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 primers는 다음과 같다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Sequences of Primers Set Used Real-Time Quantative PCR

	Forward Primer	Reverse Primer
mouse G3PDH	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
mouse IL-1β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
mouse IL-6	5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
mouse TNF-α	5' CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'	5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
mouse COX-2	5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'	5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
mouse NOS-Ⅱ	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC
mouse IL-10	TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT	AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA
mouse IL-1 receptor antagonist	CCTCGGGATGGAAATCTGCT	CCAGATTCTGAAGGCTTGCAT

3) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1×10^5 cells/㎖) 하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 導痰湯合聰明湯 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 48시간 동안 CO_2 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 각 well에 배양상층액을 100 ㎕(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) BV2 microglial cell 배양액 내 NO 생성량 측정

BV2 microglial cell을 96 wells plate에 2×10^4 cells로 분주하였다. 여기에 導痰湯合聰明湯 추출물(100, 50, 10 ㎍/㎖)을 처리하고 1 시간 후 LPS (0.1 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2 % naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2 % sulfonylamide in 5 % H_3PO_4)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 ㎕를 96 wells plate에 분주하고 혼합 용액 100 ㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) BV2 microglial cell 내 ROS의 분석

BV2 microglial cell 내 ROS를 측정하기 위하여 24 wells plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 첨가하고, 導痰湯合聰明湯 추출물(100, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(1 ㎍/㎖)를 처리한 후 37℃에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 처리하고 5 분간 배양하고 2 회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다. 이 때 Cyclosporine A를 처리한 군을 만들어 양성대조군으로 사용하였다.

6) PC-12 cell에서 AChE activity 측정

(1) 세포

PC-12 cell line은 rat의 adrenal pheochromocytoma로 DMEM에 10% horse serum과 5% FBS, penicilin(100 U/㎖), streptomycin(100 ㎍/㎖), 10 ㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액을 넣고 배양시켰다.

(2) AChE activity 측정

PC-12 cell에 導痰湯合聰明湯 추출물(100, 50, 10 ㎍/㎖)과 NGF를 처리하여 24 시간 배양한 후 50 ㎕의 cell lysate lysis buffer{Tris-HCL(200 mM; pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 ㎍/㎖ leupetin}을 혼합하여 얼음에서 30 분간 반응하였다. 그리고 5 분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. Cell lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2 ㎖와 혼합하였고 각 tube에 3.0 ㎖ water, nitrophenol solution 2 ㎖, acetylcholine chloride solution 0.2 ㎖를 첨가하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ water bath에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Moris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

선별된 ICR계 생쥐에 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90 ㎝이고 높이가 약 30 ㎝인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 ㎝인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습 시 ICR계 생쥐 중 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐 6마리를 한 군으로 하여 대조군, galanthamine(3 ㎎/㎏, *i.p*) 투여군, 導痰湯合聰明湯 열수추출물(400 ㎎/㎏ *p.o*) 실험군, 초미세분말(400 ㎎/㎏ *p.o*) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1 ㎎/㎏)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하고, 이를 videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard deviation으로 기록하였다. 모든 실험의 유의성은 독립표본 T-검정(Independent T-test)으로 평가하였고 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 결정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 導痰湯合聰明湯에 대한 세포독성

導痰湯合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 1 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 각각 97.8±0.8(%), 94.8±1.2(%), 90.6±1.4(%), 84.8±1.7(%), 75.8±2.5(%)로 나타냈다(Fig. 1).

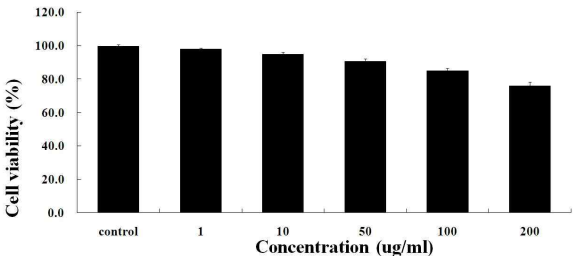


Fig. 1. Cytotoxicity of DDTCMT hot water extract on mLFCs.
mLFCs were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract.
Data represent means±S.D.

2. BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II, IL-10, IL-1 receptor antagonist mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-1β

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 0.992±0.012%로 기준하였을 때, 정상군은 0.278±0.082%(RQ)로 나타났으며, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.509±0.134%(RQ), 0.753±0.134%(RQ)로 나타났다(Fig. 2).

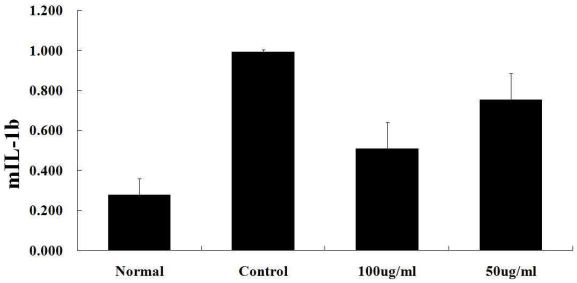


Fig. 2. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on IL-1β mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. Il-1β mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.

2) IL-6

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 0.995±0.008%로 기준하였을 때, 정상군이 0.006±0.001%(RQ), 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.409±0.066%(RQ), 0.609±0.071%(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

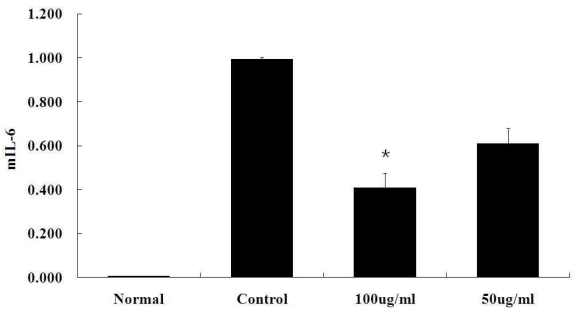


Fig. 3. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on IL-6 mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. IL-6 mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : p<0.05).

3) TNF-α

BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 대조군의 relative quantitativ(RQ)값을 1.052±0.074%로 기준하였을 때, 정상군이 0.027±.006%(RQ), 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.195±0.060%(RQ), 0.515±.047%(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 모두 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4).

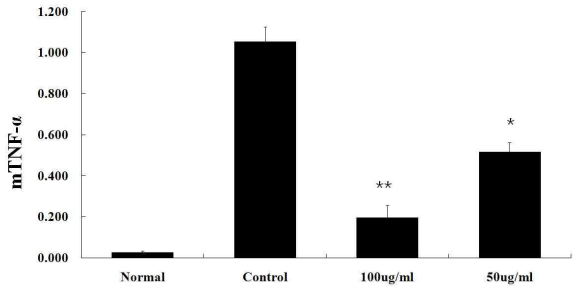


Fig. 4. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on TNF-α mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. TNF-α mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$).

4) COX-2

BV2 microglial cell line에서 COX-2 mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 1.058±0.081%로 기준하였을 때, 정상군이 0.028±0.004%(RQ), 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.500±0.002%(RQ), 0.607±0.030%(RQ)로 나타났다(Fig. 5).

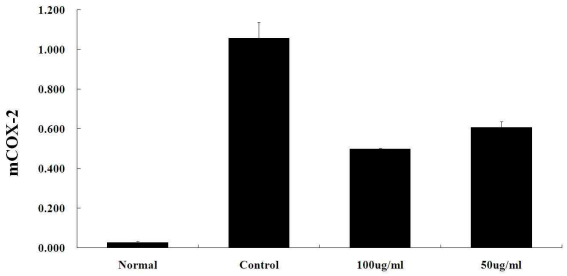


Fig. 5. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on COX-2 mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. COX-2 mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.

5) NOS-II

BV2 microglial cell line에서 NOS-Ⅱ mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 1.012±0.017%로 기준하였을 때, 정상군에서 0.029±0.009% RQ)로, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 0.496±0.069%(RQ), 0.628±0.042%(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 모두에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 6).

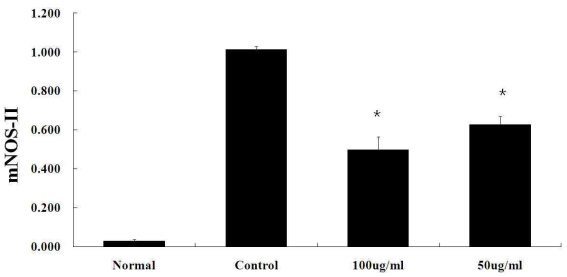


Fig. 6. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on NOS-Ⅱ mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. NOS-Ⅱ mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : $p<0.05$).

6) IL-10

BV2 microglial cell line에서 IL-10 mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 1.007±0.009%로 기준하였을 때, 정상군에서 0.203±0.126%(RQ)로, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 2.509±0.134%(RQ), 2.021±0.120%(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 7).

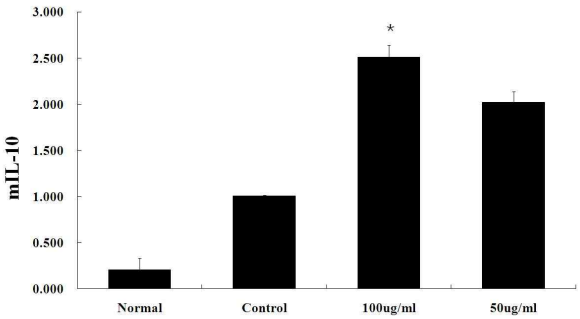


Fig. 7. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on IL-10 mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. IL-10 mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : p<0.05).

7) IL-1 receptor antagonist

BV2 microglial cell line에서 IL-10 mRNA 발현은 대조군의 relative quantitative(RQ)값을 0.999±0.002%로 기준하였을 때, 정상군에서 0.174±0.036%(RQ)로, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 실험군은 각각 2.225±0.098%(RQ), 1.499±0.226%(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 8).

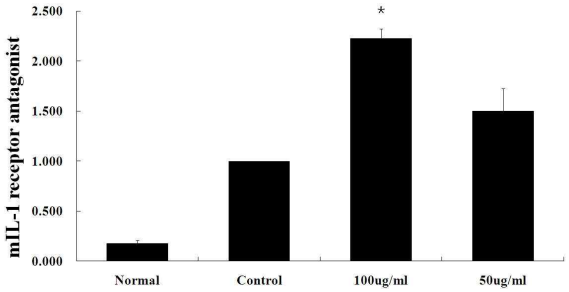


Fig. 8. Inhibitory effects of DDTCMT hot water extract on IL-1 receptor antagonist mRNA expression in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. IL-1 receptor antagonist mRNA expression were measured real-time PCR.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : p<0.05).

3. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군이 34.5±18.8(pg/㎖), 대조군은 813.0±63.1(pg/㎖)이었다. 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 실험군은 각각 310.2±31.5(pg/㎖), 494.0±128.0(pg/㎖)로 100 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9).

2) IL-6

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 447.0±96.7(pg/㎖), 대조군은 7291.0±794.8(pg/㎖)이었으며, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 실험군은 각각 3061.5±1211.3(pg/㎖), 4189.5±369.8(pg/㎖)로 나타났다(Fig. 10).

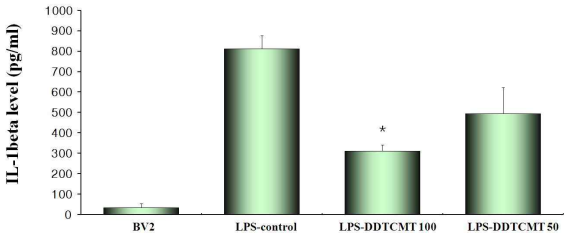


Fig. 9. Inhibitory effect of DDTCMT hot water extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract(100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : $p<0.05$).

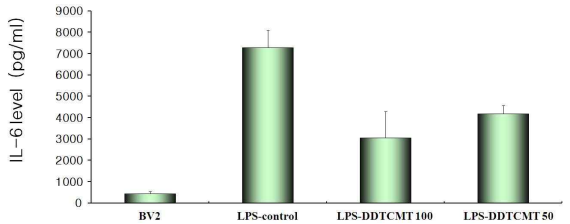


Fig. 10. Inhibitory effect of DDTCMT hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract (100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data represent means±S.D.

3) TNF-α

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군이 548.0±94.8(pg/㎖), 대조군이 2274.0±321.0(pg/㎖)이었으며, 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 실험군은 각각 1525.0±141.4(pg/㎖), 1806.0±82.0(pg/㎖)로 나타났다(Fig. 11).

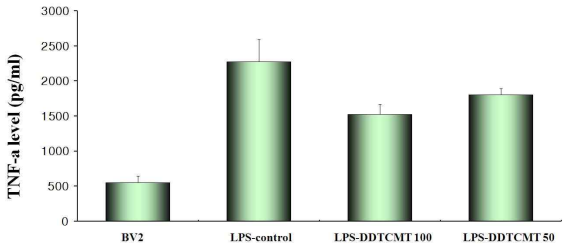


Fig. 11. Inhibitory effect of DDTCMT hot water extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.
BV2 microglial cells were treated with various concentrations of DDTCMT hot water extract (100, 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysaccharide(LPS; 0.1 ㎍/㎖) for 6 hrs. Total TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.
Data represent means±S.D.

4. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO 생성량은 정상군은 19.6±4.5, 대조군은 466.3±56.0, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 70.4±30.7, 111.6±34.7, 247.0±63.9(mM)로 나타나 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군 모두에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 12).

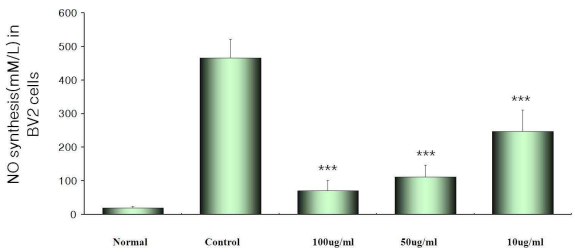


Fig. 12. Inhibitory effect of DDTCMT extract on the NO production BV2 microglial cell line.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(*** : $p<0.001$).

5. BV2 microglial cell 배양 상층액에서 ROS 생성에 미치는 영향

BV2 microglial cell의 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 導痰湯合聰明湯 실험군에서는 농도의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 13).

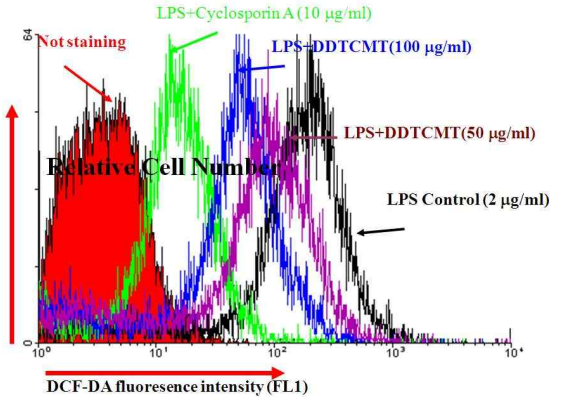


Fig. 13. Inhibitory effect of DDTCMT extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

6. PC-12 cell line에서 AChE activity 억제 효과

PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과, 정상군은 6.4±1.7, 대조군은 46.2±2.4, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 ㎍/㎖ 실험군은 각각 16.0±6.2, 26.4±11.1, 33.0±4.7(nM/mg/min)로 나타나 導痰湯合聰明湯 100, 50 ㎍/㎖ 실험군에서 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 14).

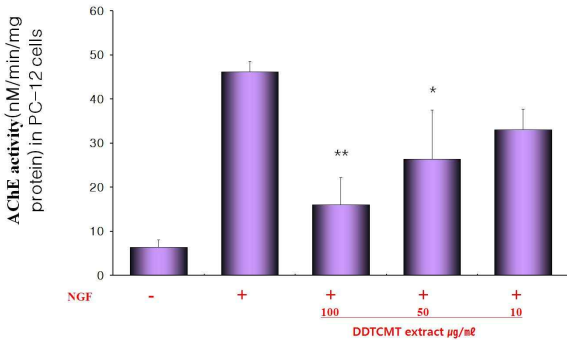


Fig. 14. Inhibitory effect of DDTCMT extract on AChE activity in PC-12 cell line.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(* : p<0.05, ** : p<0.01).

7. Immunoblotting을 통한 anti-AChE의 억제 효과

PC-12 cell line에서의 anti-AChE를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 대조군에 비해 100, 50 ㎍/㎖의 DDTCMT 실험군에서 anti-AChE 발현이 억제되었다(Fig. 15).

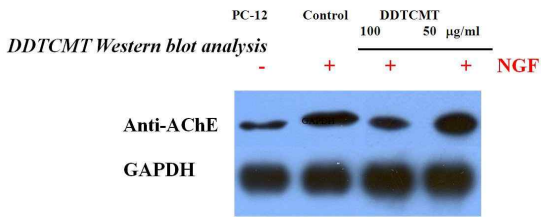


Fig. 15. Suppression effect of DDTCMT extract on anti-AChE in PC-12 stimulated NGF by Western blot analysis.

8. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Step-through latency 측정

Step-through latency 측정에서, 정상군은 10.2±4.1(sec), 대조군은 74.5±18.3(sec)이었으며, Galanthamine 투여군, 導痰湯合聰明湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 18.6±5.4(sec), 32.4±18.3(sec), 20.2

±10.8(sec)로 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나 열수추출물과 초미세분말 실험군간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 16).

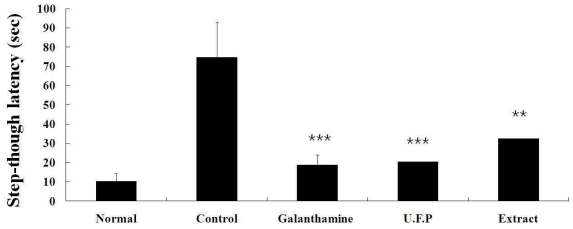


Fig. 16. Effects of DDTCMT scopolamine-induced memory deficit mice in the step-through type Morris water maze test.
Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine (1 ㎎/㎏ i.p) and galanthamine(3 ㎎/㎏ i.p).
U.F.P : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p) and DDTCMT ultra-fine powder(400 ㎎/㎏ p.o).
Extract : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p) and DDTCMT hot water extract(400 ㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of DDTCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1 ㎎/㎏) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(** : p<0.01, *** : p<0.001).

2) Distance movement-through latency 측정

Distance movement-through latency 측정에서, 정상군은 246.9±114.8(㎝), 대조군은 1572.1±396.8(㎝)이었으며, Galanthamine 투여군, 導痰湯合聰明湯 열수추출물, 초미세분말 실험군은 각각 450.1±213.1(㎝), 501.3±361.3(㎝), 483.9±165.5(㎝)로 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였으나 열수추출물과 초미세분말 실험군간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 17).

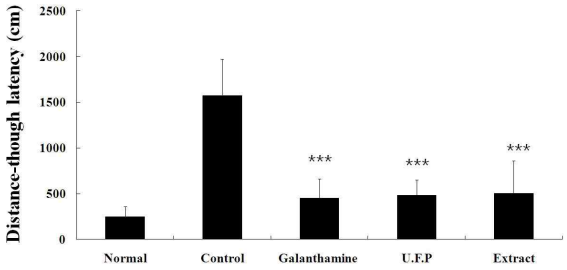


Fig. 17. Effects of DDTCMT on scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.
Normal : Non-treatment group.
Contro : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine (1 ㎎/㎏ i.p) and galanthamine(3 ㎎/㎏ i.p).
U.F.P : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p) and DDTCMT ultra-fine powder(400 ㎎/㎏ p.o).
Extract : Group treated with scopolamine(1 ㎎/㎏ i.p) and DDTCMT hot water extract(400 ㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of DDTCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine (1 ㎎/㎏) continued once a day for 7 days.
Data represent means±S.D.
Statistically significant value compared with control group by independent T Test(*** : p<0.001).

Ⅳ. 고 찰

전반적인 인지기능의 장애를 주 증상으로 하며, 만성 또는 진행성 뇌질환과 같은 병적인 노화인 痴呆는[37] AD와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매, 두 가지가 혼재된 혼합형 치매 등이 있고 이 중 가장 많은 비율을 차지하는 것은 AD이다[1]. 심장병, 암, 뇌졸중과 함께 4대 주요 사인으로 언급되는 중요한 기질성 장애로 65세 이상의 인구에서 유병률이 2.2%~8.8%에 이르는 장애이다[1]. 痴呆는 최근 생활수준의 향상, 의학의 발달로 노년층 인구가 늘어 점차 증가 추세에 있으며 향후 커다란 사회문제로 대두될 것으로 보인다[38].

AD는 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장

애가 발생하는 노년기 대표적 퇴행성 중추신경계 질환으로[39], AD 유발에는 microglial cell과 astrocyte에서 분비되는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine[40], AChE[41], free radicals[42], Aβ[43] 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.

이중 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가[44,45]와 같은 콜린계의 기능장애는 기억력과 많은 연관이 있다[46]. 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물인 galanthamine은 AChE의 저해제로 잠복기의 AD에 효과가 있는 것으로 알려져 있는데[44] scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 학습과 단기기억력을 개선시킨다고 한다[45].

또한 신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이 되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질로 NO와 ROS가 있다. NO는 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다[47]. 그리고 ROS는 세포막의 지질, 조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 이들 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다[48].

痴呆는 『景岳全書』[12]에서 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 "痴獃症, …… 言辭顚倒, 擧動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常……"이라 하여 최초로 언급 된 이후 '痴獃[12]', '呆病[49,50]', '健忘[14]' 등의 범주에 속하며 기술되어져 왔다.

痴呆의 病機는 稟賦不足, 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이고 治法으로는 補腎益精, 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[51].

導痰湯合聰明湯은 導痰湯과 聰明湯을 合方한 處方으로 導痰湯은 嚴의 『濟生方』[22]에 최초로 기재된 처방으로 二陳湯에 南星과 枳殼을 加味하여 半夏, 南星, 枳殼, 赤茯苓, 橘紅, 甘草, 生薑으로 구성되어 있고 明代 薛[52]은 "痰涎壅盛, 胸膈痞塞, 或咳嗽惡心, 飮食少思를 다스린다"라고 한 것을 비롯해 頑痰이 膠固하여 二陳湯으로 제거하지 못할 때, 痰迷心竅로 인한 神志錯亂, 意識不明, 言語不利에 응용되어 왔다.

導痰湯을 構成하는 藥物의 效能을 살펴보면 半夏[53]는 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫하고, 南星[53]은 祛風解痙, 燥濕化痰한다. 橘紅[53]는 理氣健脾, 燥濕化痰하고, 枳殼[53]은 破氣行痰, 消積하고, 赤茯苓[53]은 通利濕熱, 利竅行水, 破結氣하고, 甘草[53]는 補裨益氣, 淸熱解毒, 潤肺止咳하고, 生薑[53]은 發汗解表, 溫中止嘔한다.

聰明湯은 『東醫寶鑑』[14]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술된 이래 , 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있고[1] 최근 聰明湯 및 聰明湯加味方이 痴呆에 효과적인 치료제로 활용 될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[16-18,20,21,32,33]가 진행되었다.

따라서 導痰湯에 健忘의 代表的 處方인 聰明湯을 合方한 導痰湯合聰明湯이 痴呆의 증상개선에 응용될 수 있을 것으로 사료되어 導痰湯合聰明湯을 본 실험약물로 선택하여 본 硏究를 시행하였다.

한의학에서 현재 가장 많이 응용되는 제형인 탕제와 열수추출물제제는 탕제의 경우 달이는 시간이 소요됨, 휴대가 불편함, 기미가 불쾌함 등이, 열수추출물 제제의 경우 약효가 떨어지거나 효과가 느릴 것 같다는 선입견과 복용시에 물이 필요하다는 것이 단점으로 지적 된다[28]. 이

런 단점을 보완하며 잘 녹지 않는 약물의 생물학적 유용성을 개선하기 위하여 연구되는 방법 중 약물을 분자크기로 축소하는 방법인 초미세분말은 약물의 표면영역의 증가를 가져와 흡수성을 높이게 되므로[54] 우수한 효과를 보인다[55]. 이러한 장점 때문에 한약제형에 초미세분말을 응용한 연구도 활발히 진행되고 있다[18-21,29-35].

이제 저자는 導痰湯合聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD 및 기억력 감퇴에 대한 효과를 실험적으로 규명하고자, *in vitro* 실험에서 열수추출물을 시료로 LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II, IL-10, IL-I receptor antagonist의 mRNA 발현과 배양상층액에서 proinflammatory cytokine의 생성량을 관찰하였다. 또한 NO, ROS 생성을 측정하였고 NGF를 처리한 PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정하고 immunoblotting을 통하여 anti-AChE의 발현을 관찰하였다. *In vivo* 실험에서는 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐의 기억과 관련된 행동변화를 Morris water maze에서 VIDEOTRACK으로 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

정상 생쥐의 mLFC에서 導痰湯合聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존율은 대조군에 비해 導痰湯合聰明湯 1 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 실험군에서 감소하였으나, 200 ㎍/㎖ 실험군을 제외한 실험군에서 80% 이상으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과로 이후의 실험에서는 100 ㎍/㎖이하의 導痰湯合聰明湯을 사용하였다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌손상 및 외부로부터 이물질의 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형되는데, microglial cell의 활성화는 AD와 파킨슨병과 같은 신경사멸질환의 개시와 진행에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다[56]. 이 세포를 활성화시키는 가장 효과적인 물질로는 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소 LPS가 있는데, LPS는 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시켜 IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine과 NO 등의 oxidants를 생산, 분비하도록 하고 염증 및 면역반응을 일으킨다[57,58].

CNS 염증시 microglial cell에서 생산되는 주요 proinflammatory cytokine인 IL-1, TNF-α는 배양된 microglial cell이나 LPS 주사된 쥐에서 LPS와 같은 독소나 독성화합물에 의해 유도된다. IL-1과 TNF-α는 BBB의 붕괴로 astrocyte와 상피세포로부터 CNS로 백혈구 침윤을 촉진시키는 부착분자와 화학역동현상을 유도하여 CNS 염증의 발전과 연관된 것으로 알려져 있다[59].

COX-2는 arachidonic acid가 prostanoide로 전환될 때 촉매작용을 하며 prostaglandine(PGs)을 형성하는 중요한 효소로[60] PGs는 과량이 존재할 경우 자가 독성을 나타내며 신경변성에 관여한다[61]. COX-2의 발현이 증가하면 유해한 prostanoide와 자유기들의 생성이 과잉되어 신경손상을 매개하며, AD 질환의 뇌에서도 COX-2 mRNA와 단백질의 발현 상승이 보고되었다[60].

NOS-Ⅱ(inducible NOS ; iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소로 LPS, TNF-α, IL-1β 등에 의해 자극받은 대식세포, 간세포, 신장세포 등에서 생성된다. iNOS는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장기간 다량의 NO를 생성하며, 필요이상으로 생성된 NO는 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있

다[47]. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[62].

IL-10은 Microglial cell의 활성화로 생성이 촉진되는데 이는 단핵구에서 MHC Ⅱ를 하향 조절하여 항원 특이성 T세포의 증식을 억제, 면역과 염증반응에서 억제 인자로 작용하는 anti-inflammatory cytokine으로 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 proinflammatory cytokine의 생성을 억제함으로써 AD의 진행을 조절하는데 관여한다[63].

IL-1은 감염 시 면역반응에 관여하는 중요한 proinflammatory cytokine 중 하나로 IL-1 시스템은 IL-1α와 IL-1β의 작용제, IL-1 receptor antagonist(IL-1ra)와 같은 내인성 수용체 길항제와 같은 3개의 주요 리간드로 구성된다. 세포내 반응은 IL-1α 또는 IL-1β가 1형 IL-1 신호 수용체에 결합하여 IL-1R accessory protein(IL-1RAcp)에 관계됨으로써 시작된다. IL-1ra는 선택적이고 경쟁적인 IL-1RAcp에 대한 길항제로서 IL-1RAcp가 IL-1 receptor Ⅰ(IL-1RI)에 붙지 못하게 자신이 신호 IL-1RI에 결합하며 IL-1 신호를 조절한다고 알려져 있다[64].

이와 같은 사실에 근거하여 BV2 microglial cell line에 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 導痰湯合聰明湯의 열수추출물(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-Ⅱ, IL-10, IL-1 receptor antagonist 의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-Ⅱ의 mRNA의 발현이 억제되었고, anti-inflammatory cytokine인 IL-10과 IL-1 receptor antagonist의 mRNA의 발현은 증가하였다. 특히 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖ 실험군에서 IL-6, NOS-Ⅱ, IL-10, TNF-α, IL-1 receptor antagonist와 導痰湯合聰明湯 50 ㎍/㎖ 실험군에서 NOS-Ⅱ, TNF-α에서 유의성 있는 변화를 보였다(Fig. 2-8).

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 모두 감소를 보였고 특히 IL-1β 생성량은 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9-11).

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO 생성량을 관찰한 결과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 12).

또한 BV2 microglial cell에서 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 導痰湯合聰明湯 실험군에서는 농도의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 13).

PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과 導痰湯合聰明湯 실험군은 모두 감소를 보였고 導痰湯合聰明湯 100, 50 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 14).

PC-12 cell line에서 anti-AChE를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 대조군에 비해 100, 50 ㎍/㎖의 DDTCMT 실험군에서 anti-AChE 발현이 억제되었다(Fig. 15).

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되는 것으로 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하며[65], 이 방법을 이용하여 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델에 대한 導痰湯合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 step-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, step-through latency와 distance

movement-through latency 모두에서 導痰湯合聰明湯 열수추출물 및 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 보였다(Fig. 16, 17).

이상의 결과를 총괄해 보면 導痰湯合聰明湯은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, NOS-II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하였고 IL-1 receptor antagonis와 IL-10의 mRNA는 발현을 증가시켰으며, BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 감소시켰다. BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO와 ROS의 생성을 억제하였으며 PC-12 cell line에서 AChE activity를 억제하였고 Western blot을 통해 관찰한 결과 anti-AChE 발현이 억제되었다. Scopolamine으로 유도된 AD 병태 모델 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈다.

導痰湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델에 대해 Morris water maze를 통한 step-through latency와 distance movement-through latency에서 기억력 감퇴개선효과에 있어 모두 효과가 있었으나 제형에 따른 유의한 차이는 없었다.

따라서 導痰湯合聰明湯은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현, 산화적 스트레스 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대해 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

導痰湯合聰明湯이 LPS로 처리된 microglia 및 기억력 감퇴 생쥐 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 導痰湯合聰明湯의 열수추출물 100 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 mIL-6, mNOS-II, mTNF-α는 감소하였고 mIL-10, mIL-1 receptor antagonist는 증가하였다. 導痰湯合聰明湯 50 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 mNOS-II, mTNF-α가 감소하였다.
2. BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 모두 감소를 보였고 특히 IL-1β 생성량은 導痰湯合聰明湯 100 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다.
3. BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO, ROS 생성량을 관찰한 결과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 유의성 있는 감소를 보였다.
4. NGF를 처리한 PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과 導痰湯合聰明湯 실험군은 모두 감소를 보였고 특히 導痰湯合聰明湯 100, 50 ㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다.
5. NGF를 처리한 PC-12 cell line에서 anti-AChE를 Western blot을 통해 관찰한 결과 DDTCMT 실험군에서 anti-AChE 발현이 억제되었다.
6. 導痰湯合聰明湯 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 step-through latency, distance movement-through latency 측정에서 모두 유의성 있는 기억력 개선 효

과를 나타냈으나 두 군간 유의성 있는 차이는 없었다.

이상의 결과로 미루어 보아 導痰湯合聰明湯은 기억력 감퇴 및 AD 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 제형에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(과제고유번호: B090020)

참고문헌

1. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기:집문당. 2007:324-33.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2004:189-200, 611-2.
3. 이광우. 임상신경학. 서울:고려의학. 2002:203-8.
4. Cummings JL. Frontal-subcortical circuits and human behavior. Arch Neurol. 1993;50:873-80.
5. Oide, T, Kinoshita, T, Arima, K. Regression stage senile plaques in the natural course of alzheimer's disease. Neuropathology appl neurobiology. 2006;32(5):539-56.
6. David, S. Treatment guidelines for alzheimer's disease - redefinding perceptions in primary care. Primary care companion J clinic psychiatry. 2007;9(2):113-21.
7. McGrath LT. Increased oxidative stress in alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. Q J medicin. 2001;94:485-90.
8. Ramazan O, Namik D. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. Clinical sciences. 2002;43(1):28-32.
9. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:행림출판사. 1982:129-35, 534, 545, 550.
10. 王肯堂. 證治準繩. 서울:翰成社. 1982:306-7.
11. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:洋醫學硏究院. 1985:37, 124, 196, 217-8, 229.
12. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
13. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:793-5.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:동의보감출판사. 2005:98-100.
15. 李尙仁. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
16. 박지운, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):37-5.
17. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):59-78.
18. 최강욱, 이상룡, 정인철. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(5):1200-10.
19. 徐承浩, 鄭仁哲, 李相龍. 聰明湯和山查聰明湯熱水提取物, 超微細粉末劑型對microglia及記憶力減退病態模型的影響. 第5會天津國際中醫藥學術硏討會議論文集. 2006;325-7.
20. 임정화, 정인철, 이상룡. 총명탕과 파극천총

명탕 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):997-1008.
21. 오영진, 김보경. 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물, 나노분말 제형을 이용한 치매에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):79-105.
22. 嚴用和. 中訂嚴氏濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1987:79.
23. 전국 한의과대학 심계내과학교실. 心系內科學. 서원당. 1999:73, 77, 277-9, 420-2.
24. 李仲梓. 醫宗必讀. 台北:文光圖書公司. 1976:217.
25. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京:人民衛生出版社. 1982:1036-7.
26. 김연두, 문병순, 박영순, 김세길. 導痰湯이 家兎의 高脂血症 및 血栓症에 미치는 영향. 한국전통의학지. 1994:85-128.
27. 조현경, 임승민, 안정조, 최영, 김용진, 유호룡, 박양춘, 설인찬, 황치원. 導痰湯이 뇌손상 및 고혈압에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(4):503-12.
28. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사. 경희의학. 2004;20(1):356-67.
29. 김현수, 이상룡, 정인철. 세심탕 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):688-99.
30. 최강욱, 정인철. 동의신경정신과학회지. 천왕보심단 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 2008;19(2):77-93.
31. 서승호, 정인철, 이상룡. 가미보양환오탕 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2008;29(3):69-84.
32. 이승희, 이상룡, 정인철. 귀비총명탕 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):921-33.
33. 임정화, 이상룡. 팔미합총명탕 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2008;21(4):95-110.
34. 민경직, 이상룡, 정인철. 성심지황탕 열수추출물과 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2008;22(5):1178-91.
35. 최보윤, 이상룡, 정인철. 각병연수장합증손백출산 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2007;28(2):137-54.
36. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. Journal of the National Cancer Institute. 1990;82(13):1107-12.
37. 이부영 역. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:일조각. 1994:63-6.
38. 서무규. 성인병 · 노인병학. 서울:고려의학. 1986:225-67.
39. 한일우. Alzheimer병의 증상. 계명의대논문집. 1997;16(3):339-47.
40. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets. 2004;5(6):529-34.
41. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. *In vivo* mapping of cerebral

acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology. 1999;52(4):691-9.

42. Mhatre M, Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. Journal of Alzheimers disease. 2004;6(2):147-57.
43. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지. 2001;21(1):11-6.
44. Kasa P, Papp H, Torok I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinoceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain. Neuroscience. 2000;101(1):89-100.
45. Spassov A, Getova DP, Dimitrova DS. P4.025 Study of ancholinesterase drugs galanthamine and donepezil on scopolamine-induced amnesia in rats. European Neuropsychopharmacology. 2004;14:333.
46. Summers WK. Tacrine (THA, cognex). Journal of alzheimer. 2000;2(2):85-93.
47. Yen GC , Lai HH Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Uraria crinita root. Food Chemistry. 2001;74:471-8.
48. Mates, JM. Antioxidant enzymes and human disease. Clinical Biochemistry. 1999;32:595.
49. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:125.
50. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
51. 許沛虎. 中醫腦病學. 北京:中醫醫藥科技出版社. 1998:464-5.
52. 薛己. 校注婦人良方 (卷三). 서울:金泳出版社. 1962:1-13.
53. 全國韓醫科大學本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1991:136-7, 302-4, 350-1, 400-1, 419-20, 448-51, 466-7, 509-10, 523-4, 531-3, 540-1.
54. Moschwitzer J, Muller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. J Nanosci Nanotechnol. 2006;6(9,10):3145-53.
55. Qiu RL, Li L, Li X, Zhang HX, Chen JW. Effect of ultra-fine powder technique on dissolution rates of andrographolide and dehydroandrographolide in Andrographis paniculata. Journal of chinese intergrative medicine. 2004;2(6):456-8.
56. Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder?. Int Rev Neurobiol. 2007;82:235-46.
57. Nick JA, Avdi NJ, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. J Immunol. 1996;156(12):4867-75.
58. Woo MS. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. Molecular Brain Research. 2003;113(1,2):86-96.
59. Kim YS. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. Experimental and molecular medicine. 2006;38(4):333-47.

60. Pasinatti GM, Alsen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. Neuroscience. 1998;87(2):319-24.
61. Marcheselli VL, Bazan NG. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide-2 by seizure in hippocampus. The Journal of biological chemistry. 1997;271:24794-9.
62. Fernández-Vizarra P. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. Neurobiology of Disease. 2004;15(2):287-305.
63. Culpan D, Prince JA, Matthews S, Palmer L, Hughes A, Love S, Kehoe PG, Wilcock GK. Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2006;13;408(2):141-5.
64. Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci. 2000;23:618-25.
65. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. J Phamacol Exp Ther. 1995; 272(1):256-63.