J of Oriental Neuropsychiatry 2012:23(1):145-161
Original article
http://dx.doi.org/10.7231/JON.2012.23.1.145

豬苓車前子湯이 βA와 LPS로 처리된 BV2 microglial cell에 미치는 영향

류창희, 정인철, 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of Jeoreongchajeonja-tang(Zhulingjuqianzi-tang) on the βA and LPS Induced BV2 microglial cell

Chang-Hee Ryu, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Abstract

Objectives :

This research investigates the effect of the JCT extract regarding Alzheimer's disease.

Methods :

The effects of the JCT extract on IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II mRNA, APP mRNA, BACE mRNA, Nitric oxide(NO), and βA protein production in the BV2 microglia cell lines treated with LPS and βA were investigated.

Results :

1. The JCT extract suppressed the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and NOS-II mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS and βA.
2. The JCT extract suppressed the expression of BACE and APP mRNA in BV2 microglial cell line treated with LPS and βA.
3. The JCT extract suppressed the expression of Nitric oxide(NO) in BV2 microglial cell line treated with LPS and βA.
4. The JCT extract suppressed the expression of βA protein production in BV2 microglial cell line treated with LPS and βA.

Conclusions :

These results suggest that the JCT group may be effective for the treatment of Alzheimer's disease. Thus, JCT could be considered among the future therapeutic drugs indicated for the treatment of Alzheimer's disease.

Key Words :

alzheimer's disease, *Jeoreongchajeonja-tang(Zhulingjuqianzi-tang)*, lipopolysacchride(LPS), β-amyloid(βA)

투고일 : 2011.10.22 수정일 : 2011.11.15 채택일 : 2012.03.05

1) 교신저자 : 이상룡, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel : 043-229-3726, Fax : 043-253-8757, E-mail : 7575np@dju.kr

이 논문은 2011년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

I. 서론

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말한다. 좀 더 넓은 의미로는 지적 황폐화뿐만 아니라 행동 이상 및 인격변화를 초래하며, 정서적 기능상실과 진행성인 지적 황폐화가 사회적 혹은 직업적 기능의 장애를 초래하게 되는 상태이다[1].

치매 환자 중 50%가 알츠하이머형이며, 혈관성이 22%, 두 가지가 동시에 오는 경우가 14%이며, 나머지 14%가 원인적 치료가 가능한 우울성 가성치매와 수두종, 경막하혈종, 신경매독, 대사성및 내분비질환으로 유발된다[2]. Alzheimer's disease(AD)는 50세 이전에 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하기 때문에, 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[3]. 한국의 경우 1990년 65세 이상 노인인구는 약 5.0%이며 2000년에는 약 6.8%, 2020년에는 거의 12% 수준에 이를 것으로 추산 된다[4].

AD를 유발하는 원인은, βA, estrogen, apolipoprotein E, presenilin(PS), 산화제, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질의 감소, 신경영양인자 등의 다양한 인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며[5-6],여러 가지 요인에 의하여 신경섬유매듭(neurofibrillary tangles)과 신경반(neuritic plaque)과 같은 독특한 병리학적 소견을 나타낸다[6].

한의학에서는 치매를 呆病, 健忘, 癲狂의 범주에서 辨證施治를 하고 있다. 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[1].

본 실험에서 사용된 猪苓車前子湯은 猪苓湯에 阿膠와 滑石을 去하고 羌活, 獨活, 荊芥, 防風, 石膏, 知母를 加한 처방으로 『東醫壽世保元』에 기재되어 있다[7].

최근 치매에 대한 한의학적 연구동향을 살펴보면 임상에서 활용되는 여러 단미제 중심의 연구[8-10], 복합처방 중심의 연구[11-13], 한약제 이외의 치료기술 연구[14-16] 등이 이루어 졌으나 猪苓車前子湯의 AD와 관련된 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 猪苓車前子湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자, *in vitro* 실험으로 lipopolysacchride(LPS)와 β-amyloid(βA)를 처리한 BV-2 microglial cell line에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II mRNA 유전자 발현을 관찰하였으며, AD 관련 유전자인 BACE와 APP mRNA 유전자 발현 및 βA protein 생산량 및 NO 분비량을 관찰하였고, APP 발현량을 western blot으로 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 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, antibiotics, lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma사(USA) 제품을, calpain protease inhibitor MDL 28170은 Biomol사(USA) 제품을, residues 25-35는 Abcam사(France) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 은 Hyclone사(USA) 제품을, Taq. polymerase, DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRas사(Japan) 제품을, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)

와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNAzol[B]는 Tel-Test사(USA) 제품을, 그리고, Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, β A(USA), anti-mouse IgG-bead(USA), anti-IL-1β와 anti-TNF-α(USA), 그리고 anti-CD44-PE(USA), anti-CD68-FITC(USA), anti-CD11b-FITC(USA), anti-GFAP-FITC(USA), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(USA)와 ECL-Hybond film(USA), anti-mouse GFAP mAb와 anti-mouse Tau mAb는 Santa-Cruz 사(USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사(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) 약물

(1) 豬苓車前子湯

본 실험에 사용한 豬苓車前子湯의 구성은 『東醫壽世保元』[17]에 준하였으며, 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 사용하였고 1첩의 내용과 구성은 다음과 같다(Table I).

Table I. Composition of Jeoreongchajeonja-tang (Zhulingjuqianzi-tang, 이하 JCT)

Herb	Scientific Name	Dose (g)
澤瀉	*Alismatis Rhizoma*	8
茯苓	*Poria*	8
豬苓	*Grifola umbellata*	6
車前子	*Psyllium*	6
知母	*Anemarrhena asphodeloides Bunge*	4
石膏	*Gypsum Fibrosum*	4
羌活	*Ostericum koreanum*	4
獨活	*Aralia continentalis Kitagawa*	4
荊芥	*Nepeta japoica Maximowicz*	4
防風	*Ledebouriellae Radix*	4
	Total amount	52

(2) 豬苓車前子湯 투여군 분리

豬苓車前子湯 3첩 분량(156 g)에 증류수 2,000 ml를 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 豬苓車前子湯 추출물 19.0 g을 냉동 보관(-84℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) BV-2 세포 배양

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[18]. 동결된 BV-2 세포를 해동하여 10% FBS-DMEM(USA) 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS-DMEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV-2 세포

의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS-DMEM 배지에서 안정화시킨 BV-2 세포를 *in vitro* 모델로 사용하였다[19].

2) 배양 조건 및 猪苓車前子湯 처리

猪苓車前子湯을 처리하기 전 BV-2세포를 24시간 동안 serum-free DMEM으로 배양한 후 10 ㎍/㎖ lipopolysaccharide(LPS; Sigma)와 25 ㎛M synthetic βA fragment, residues 25-35(USA), LPS와 βA 25 ㎛M에 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 ㎛M, MDL 28170)을 처리하고, 6시간을 배양하였다[20].

3) BV2 microglial cell line에서 pro-inflammatory 및 anti-proinflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 Real time quantitative PCR 분석

(1) βA

βA는 AD 환자의 뇌에서 senile plaques 와 diffuse deposits를 주로 유도하는 것으로 알려졌다. Calbiochem 회사에서 공급받았고 아미노산 배열은 Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met이다.

(2) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 猪苓車前子湯 투여군을 100 ㎍/㎖과 50 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고 1시간 후 lipopolysacchride(LPS) 10 ㎍/㎖와 βA 25 ㎛M를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(3) BV2 microglial cell line에서 RNA 분리

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 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 수세하고 3 분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(4) 역전사-중합효소 연쇄반응

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[21].

(5) Real Time Quantitative PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(USA)를 이용하여 수행하였다.

사용된 primers는 다음과 같다(Table II, III).

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

	Forward Primer	Reverse Primer
mouse G3PDH	5' TGAAGCAGGCATCT GAGGG 3'	5' CGAAGGTGGAAGA GTGGGAG 3'
mouse IL-1β	CAACCAACAAGTGA TATTCTCCATG	GATCCACACTCTCC AGCTGCA
mouse IL-6	5' TCCAGTTGCCTTCT TGGGAC 3'	5' GTGTAATTAAGCCT CCGACTTG 3'
mouse TNF-α	5' CTGTCTACTGAACT TCGGGGTGATCGG TCC 3'	5'ATGAGATAGCAAA TCGGCTGACGGTG TGGG 3'
mouse COX-2	5' TCAAGTGGCATAGA TGTGGAAGAA 3'	5' TGGCTCTGCAGGAT TTTCATG 3'
mouse NOS-II	GGCAGCCTGTGAG ACCTTTG	GCATTGGAAGTGA AGCGTTTC

Table III. Alzheimer Mouse Gene Expression Information

mouse App	Mm01344172_m1(FAM)	ATCATGGCGTGG TGGAGGTCGAC GC
mouse Bace	Mm00517133_m1(FAM)	GCTTTGGCCAAG CCATCAAGCTCT C

염증 cytokine 및 항염증 cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2분간 50℃에서, 10분간 94℃에서, 그리고 40 cycles을 0.15분간 95℃에서, 1분간 60℃에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

y = x(1+e)n

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ(relative quantitative)을 측정하였다.

4) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

BV2 microglial cell line를 96 well plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 猪苓車前子湯 투여군(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(10 ㎍/㎖)와 25 ㎛M synthetic βA fragment, residues 25-35(βA; Bachem California, USA), 그리고 LPS와 βA 25 ㎛M에 양성대조군으로 calpain protease inhibitor MDL 28170(35 ㎛M, MDL 28170)을 처리하고 각각의 well에 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonylamide in 5% H3PO4)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 또한 배양 상층액 100 ㎕를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100 ㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다[22].

5) BV2 microglial cell line 배양상층액내 βA protein 생성량 측정

BV2 microglia 세포주를 실험 3일전에 subculture(1×10^5cells/㎖) 하여 96 well plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 猪苓車前子湯(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(10 ㎍/㎖)와 βA 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 猪苓車前子湯(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 40시

간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 βA protein 생성량을 ELISA(Code No. 27720, Mouse/Rat Amyloidβ (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 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다[23].

6) β-APP activity 측정 및 western blot

(1) 세포성 단백질 추출

BV2 microglia 세포주를 실험 3일전에 subculture($1x10^5$cells/㎖) 하여 96 well plate에 $2x10^5$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시킨다. 豬苓車前子湯(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 豬苓車前子湯(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 처리하고 40시간 동안 CO_2 조직배양기에서 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 β-APP activity를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50 n㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200 mM; pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 ㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법[24]으로 단백질을 정량하여 50 ㎍으로 조정하였다.

(2) β-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 immunoblotting 하여 분석하였다.

III. 성적

1. 豬苓車前子湯의 염증유전자 발현 억제 효과

1) IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 IL-1β mRNA 유전자 발현의 상대정량 값은 0.038±0.004이었고, 豬苓車前子湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군은 각각 0.545 ± 0.148($p<0.01$)과 0.708 ± 0.103 (RQ)($p<0.05$)로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1).

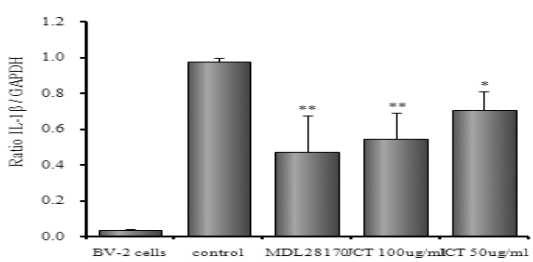


Fig. 1. Inhibitory effects of JCT extract on IL-1β mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA

fragment(25 μM), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 6 hrs. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(*p〈0.05, **p〈0.01).

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 IL-6 mRNA 유전자 발현의 상대정량 값은 0.011±0.003이었고, 양성대조군(MDL28170) 35 μM처리군은 0.330±0.086(RQ)로 나타났으며, 猪苓車前子湯 100 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$ 투여군은 각각 0.617 ± 0.053 (p〈0.001)과 0.908 ± 0.011(RQ)(p〈0.05)로 나타나 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2).

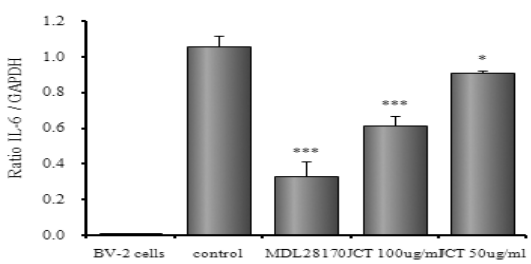


Fig. 2. Inhibitory effects of JCT extract on IL-6 mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 $\mu g/ml$) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 $\mu g/ml$) plus βA fragment(25 μM), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 6 hrs. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(*p〈0.05, ***p〈0.001).

3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 TNF-α mRNA 유전자 발현의 상대정량 값은 0.059±0.047 이었고, 양성대조군(MDL28170) 35 μM처리군은 0.274±0.024(RQ)로 나타났으며, 猪苓車前子湯 100 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$ 투여군은 각각 0.696 ±0.121(p〈0.01)과 0.844 ±0.099(RQ)로 나타나 100 $\mu g/ml$ 투여군에서만 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

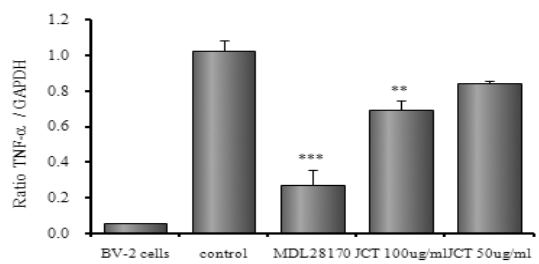


Fig. 3. Inhibitory effects of JCT extract on TNF-α mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 $\mu g/ml$) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 $\mu g/ml$) plus βA fragment(25 μM), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 6 hr. TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TNF-α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(**p〈0.01, ***p〈0.001).

4) COX-2와 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준할 때, 정상군의 COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 각각 0.020±0.016와 0.015±0.010(RQ)로 나타났고, 양성대조군(MDL28170) 에서는 각각 0.332±0.038과 0.390±0.006(RQ)로 나타났다. COX-2와 NOS-II mRNA 발현은 猪苓車前子湯 100 ㎍/㎖ 처리군에서는 0.576 ±0.097(p〈0.001) 과 0.574 ±0.090(RQ)(p〈0.001)로 나타났고, 猪苓車前子湯 추출물 50 ㎍/㎖ 처리군에서는 0.620 ±0.057(p〈0.001)과 0.734 ±0.136(RQ)로 나타났다(Fig. 4, 5).

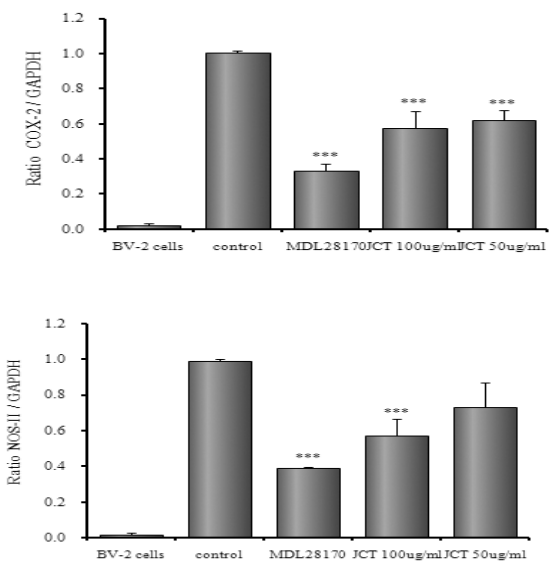


Fig. 4, 5. Inhibitory effects of JCT extract on COX-2 and NOS-II mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA fragment(25 ㎛), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 6 hr. COX-2 mRNA(A) and NOS-II(B) synthesized by real-time PCR was analyzed. COX-2 mRNA and NOS-II express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(***p〈0.001).

2. 猪苓車前子湯의 AD 유전자 발현 억제 효과

1) BACE 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 BACE mRNA 유전자 발현의 상대정량 값은 0.191±0.088 이었고, 양성대조군(MDL28170) 35 ㎛M처리군에서는 0.341±0.143(RQ)로 나타났고, 猪苓車前子湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군에서는 각각 0.584±0.191(p〈0.05)과 0.851±0.195(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖ 투여군에서 유의한 억제를 보였다(Fig. 6).

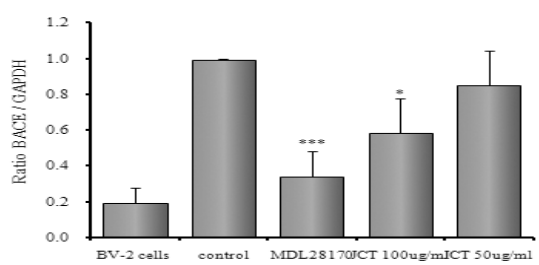


Fig. 6. Inhibitory effects of JCT extract on BACE mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA fragment(25 ㎛), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 40 hr. BACE mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. BACE mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each

point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(*p〈0.05 ***p〈0.001).

2) APP 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 RQ값이 1 일 때 정상군의 APP mRNA 유전자 발현의 상대정량 값은 0.574±0.225이었고, 양성대조군(MDL28170) 35 ㎛M 처리군에서는 0.773 ±0.032(RQ)로 나타났고, 猪苓車前子湯 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 투여군에서는 각각 0.779±0.011 (p〈0.001)와 0.895±0.052(RQ)로 나타나 100 ㎍/㎖ 투여군에서만 유의한 억제를 보였다(Fig. 7).

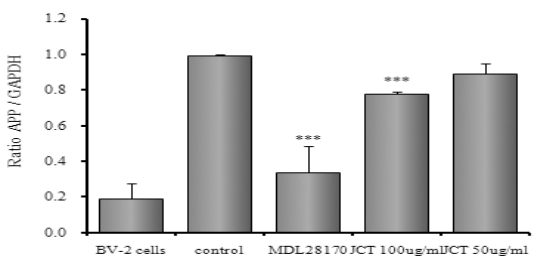


Fig. 7 Inhibitory effects of JCT extract on APP mRNA expression in BV2 cell line.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA fragment(25 ㎛M), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 40 hr. APP mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. APP mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±SE of two times.
Statistically significant value compared with control group data by T test(***p〈0.001).

3. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line 정상군의 NO 생성량은 8.8±2.5(㎛M)이었고, 대조군의 NO 생성량은 302.9±18.4(㎛M)로 나타났다. 양성대조군(MDL28170) 35 ㎛M처리군에서는 39.8±9.5(㎍/㎖)로 나타났으며, 猪苓車前子湯 100, 50 ㎍/㎖ 투여군에서 NO 생성량은 각각 155.5±27(p〈0.001), 그리고 164.4 ±24.4(p〈0.001)(㎛M)로 나타나 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 8).

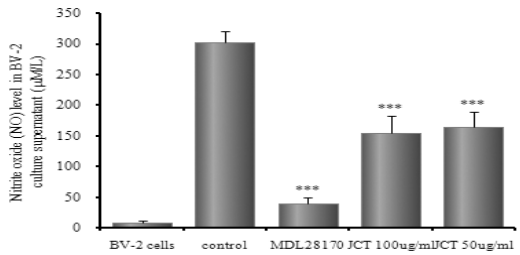


Fig. 8. The effect of JCT extract on the nitric oxide release in culture supernatant sera following LPS plus βA co-treatment.
BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA fragment(25 ㎛M), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 40 hr. The culture supernatant was collected 40 hr later and NO(nitric oxide) concentration in the supernatant was assayed(Cat. No. KGE001: R&D systems, Inc, USA). The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher(***p〈 0.001).

4. 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. 猪苓車前子湯 투여군은 100 ㎍/㎖에서 14.2±8.1(pg/㎖)으로 50 ㎍/㎖에서는 21.5±12.3(pg/㎖)로 대조군에 비하여 감소되었으나 유의성은 없었다.(Fig. 9).

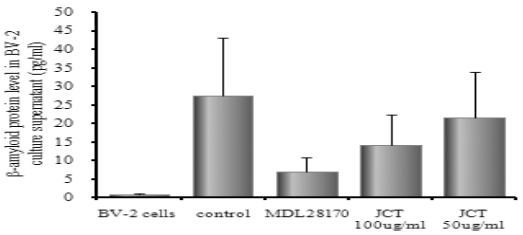


Fig. 9. The effect of JCT extract on βA protein level in culture supernatant sera following LPS plus βA co-treatment.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎍/㎖) plus βA fragment(25 ㎛M), or 35 mM calpain protease inhibitor MDL 28170 plus LPS plus βA for 40 hr. Total βA protein levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit(Code No. 27720, Mouse/Rat Amyloidβ(1-40) High Specific Assay Kit-IBL, USA). The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test(**p〈0.01).

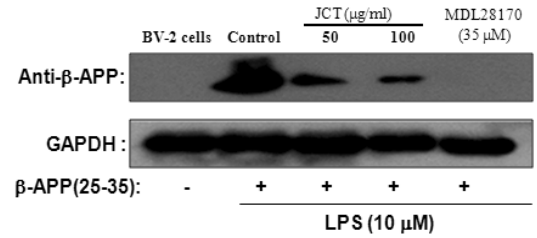


Fig. 10. Suppression effect of JCT extract on the APP in BV-2 stimulated LPS plus βA co-treatment by Western blot analysis.

BV2 cells were pretreated with various concentrations of JCT extract(100 and 50 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 10 ㎛M) plus β-APP(25-35) fragment(25 ㎛M), or 35 ㎛M 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. 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 豬苓車前子湯 투여군을 함께 처리한 실험군에서 β-APP 단백질 발현이 억제되었다(Fig. 10).

IV. 고찰

인간이 점점 여러 질환을 극복하고 인간의 수명이 크게 연장됨에 따라, 인구증가로 인한 노령화 사회에서 노화에 의한 질환 특히 치매는 가장 중요하게 문제시 되는 질환 중의 하나이다[25].

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타내는 질환이다[26].

Alzhiemer형 치매는 1906년 Alzhiemer가 처음 기술한 병으로서 치매의 원인질병으로[27] 전체의 반 이상을 차지한다. 발병률은 나이와 밀접하게 연결되어 있다. 65세 이전의 발병률은 많아야 1~2%인 반면 85세 이상에서는 10%이상이다. 여성이 남성에 비해 2배정도 발병률이 높다. AD대다수의 경우는 산발성이며 가족성 변형이 확인되고 있다[28].

생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고되고 있으며, 우리나라 65세 이상 노인인구의 약 8.3%인 31만명 정도가 치매노인으로 추정되고 있으며, 80세 이상 노인인구에서는 약 1/4 정도를 차지한다[29].

AD의 병리학적 특징 중 검시해부 소견에서 나타나는 주요병변으로는 대뇌 겉질(cerebral cortex)

과 해마(hippocampus)에서 발견되는 것으로 비정상적으로 과인산화 되어 나타나 있는 신경세포의 세포체 내에서 엉켜진 실 뭉치처럼 보이는 tau 단백질이 주성분인 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle)와 신경 세포밖에 축적되는 아밀로이드 베타 단백질(amyloid beta peptide/βA)이 주성분인 노인반(senile plaque)이 있다[30-32].

AD의 발병기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않고 여러 가지 가설이 제시 되어 왔으나 최근에는 뇌병변에 침착하는 신경독성단백질의 독성이 가장 중요한 원인으로 제시되고 있다. 이 물질은 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; APP)의 잘못된 대사로 인해 생성되는 것으로 알려져 있고, APP의 정상 대사물은 신경세포 보호작용이 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 정상적으로 뇌신경세포막을 구성하는 물질의 변형이 초래되어 이것이 과다하게 뇌 속에 축적됨으로써 점차 뇌신경세포를 파괴하는 것으로 생각되고 있다[33].

APP는 21번 염색체에 encord되어 있으며[34], AD환자의 기저 전뇌와 해마의, 노화된 섬유아세포에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고, βA를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 죽는다는 보고로 볼 때 APP가 노화와 치매 형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다[35].

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 βA의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 βA가 신경세포를 손상시켜 결국 치매의 증상이 나타나게 된다고 한다[36].

정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 미세아교세포는 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 미세아교세포로 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF-α를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고[37] 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF(colony-stimulating factor), IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다[38]. 또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 미세아교세포의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 염증반응 cytokine이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다[39]. 특히 βA가 침적된 노인반 주변의 미세아교세포는 βA에 의해 활성화되어 IL-1, TNF-α 등의 염증반응 cytokine을 생성하므로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다[40].

이전의 βA로 유도된 치매 모델에 대한 윤 등의 荊防瀉白散[41]의 연구를 살펴보면 荊防瀉白散 투여군은 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 NOS-II 유전자 발현을 억제하였고 APP 유전자 발현을 억제하였으며 βAPP 단백질 발현을 억제하였다. Morris water maze를 통한 Step-through latency, distance movement through latency 측정에서 기억력 개선 효과를 나타냈었고 AD 병변 뇌조직에서의 세포내 IL-1β, TNF-α의 발현 측정에서 양성세 포수를 억제하였으며 MDA와 CD68+, CD11b+의 세포수를 억제하였다. 뇌조직의 허혈 상태를 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였으며 tau단백질과 GFAP의 발현을 억제하였다.

AD의 유전적, 신경병리적, 신경화학적 기전이 여러 측면에서 밝혀지고 있으며, 그에 따른 치료법도 다각적으로 연구되고 있으나, 아직까지 치매를 완치시킬 수 있는 치료방법은 개발되지 못한 실정이다[42].

韓醫學的으로 痴呆는 痴獃[43], 呆病[44], 健忘[45] 등의 범주에 속하며, 明代 張의 『景岳全書·癲狂痴獃』[43]에서는 "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 痴呆와 유사한 痴獃에 대해 최초로 기술하고 있다[1].

猪苓車前子湯은 四象體質醫學에서 少陽人 亡陰證에서 나타나는 身熱, 頭痛, 泄瀉와 膀胱燥에 사용되는 處方으로 傷寒論의 猪苓湯에서 유래되어 草本券의 五苓散을 거쳐 만들어진 처방으로 소양인 表證의 身熱, 頭痛, 泄瀉, 亡陰證과 陽明症, 三陽合病, 頭痛腹痛證 등의 증상이 있을 때 사용한다[7].

윤 등[41]이 四象體質醫學에서 少陽人 亡陰證에서 나타나는 身熱, 頭痛, 泄瀉와 膀胱燥에 사용되는 處方인 荊防瀉白散이 心熱을 瀉하고 腎臟을 補하는 효과를 가지고 있어 肝腎不足, 熱毒熾盛으로 인한 치매에 활용될 수 있을 것이라 기대되어 실행한 연구에서 βA로 유도된 치매 모델에 일정한 효과가 있음을 밝힌 바 있다. 따라서 荊防瀉白散에 生地黃을 去하고 猪苓, 車前子를 加한 猪苓車前子湯 또한 熱毒熾盛으로 인한 치매에 활용할 수 있을 것으로 사료되어 본 연구를 진행하였다.

猪苓車前子湯이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, LPS와 βA를 처리한 BV2 microglial cell line에서 염증반응 cytokine의 유전자 발현[46]을 관찰하였다. 본 실험에서 사용한 BV2 microglial cell line은 생쥐의 소신경교세포(미세아교세포)로 primary 미세아교세포 모델을 제공하며[18], LPS와 βA를 동시처리한 BV2 microglial cell line에서 염증반응 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II 유전자 발현 증가된다고 보고가 있어[20] BV2 microglial cell line에 LPS와 βA을 처리하여 염증반응 cytokine을 유발시킨 뒤 서로 다른 농도의 猪苓車前子湯(100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)을 6시간 동안 처리하여 이를 관찰함으로써, 猪苓車前子湯이 소신경교세포의 염증반응 cytokine 유전자 발현에 미치는 억제효과를 평가하기로 하였다. 그리고 양성대조군으로 *in vivo*에서 빠르게 blood-brain barrier를 통과하여 neuroprotective 효과를 나타내는 calpain protease inhibitor MDL28170(MDL 28170)을 사용하였다[47].

BV2 cell에서 발현된 염증반응 cytokine 중, IL-1β 유전자는 LPS와 βA만을 투여한 대조군에 비해 猪苓車前子湯을 투여한 실험군 모두에서 발현이 억제되었고, IL-6 유전자는 LPS와 βA만을 투여한 실험군에 비해 猪苓車前子湯을 투여한 실험군 모두에서 IL-6 유전자 발현이 억제되었으며, TNF-α 유전자 역시 LPS와 βA만을 투여한 대조군보다 猪苓車前子湯을 투여한 실험군의 발현이 억제되었다. 이것으로 猪苓車前子湯이 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 과잉발현을 감소시켰음을 알 수 있었고 이는 荊防瀉白散의 연구[41] 결과와 비슷하였다. 이러한 결과는 猪苓車前子湯이 AD의 원인 중 하나로 알려진 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 사료된다. 그 외에 COX-2와 NOS-II 유전자 발현도 猪苓車前子湯 투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 억제되어 나타났다. 즉, pro-inflammatory cytokine과 더불어 COX-2와 NO는 신경계 염증 및 퇴행 과정의 주요 매개 인자로 iNOS에 의해 양적 증가가 일어나며, 고농도의 COX-2와 NO가 존재할 때 만성염증 및 신경세포 파괴가 일어나게 된다[48]. 따라서 AD와 같은 질환에서 microglia에 의한 COX-2와 NO의 억제가 요구된다. 본 실험에서는 猪苓車前子湯 투여군에서 COX-2와 NOS-II의 유의한 억제를 보였고 NOS-II의 경우 荊防瀉白散의 연구[41] 결과와 비슷하였다. 이러한 결과는 gene expression 및 protein analysis에서 보다 구체적인 비교를 실시하였으며, 결과적으로 COX-2 및 iNOS gene expression은 猪苓車前子湯에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다. 특히 猪苓車前子湯 100 ㎍/㎖에서 가장 효과적인 억제가 관찰되었다.

BV-2 microglial cell line에서 β-secretase (BACE)에 의해 APP가 amyloidogenic fragment(β-APP)로 분할되어 microglia 세포내에 고농도로 존재한다. 이러한 AD환자에서 β-APP의 축적은 neuritic plaques을 유발하여 AD의 pathological 반응을 촉진한다[49]. 본 실험에서는 BV2 microglial cell line에서 LPS와 βA의 자극으로 유도된 BACE와 APP

유전자 발현을 관찰한 바 豬苓車前子湯 처리군에서 BACE와 APP 유전자 발현이 억제되었고 β-APP의 발현량을 조절하는지를 Western blot으로 분석한 결과 대조군에 비하여 β-APP 발현량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. APP 유전자 발현이 억제되는 것과 β-APP 발현량이 감소하는 것은 荊防瀉白散의 연구[41] 결과와 동일하였다.

뇌 조직에서 NO의 생성 증가는 superoxide radical의 작용을 억제시켜 뇌세포 손상을 억제하여 뇌기능을 개선시킬 수 있다[50]. 이 실험에서 BV2 microglial cell line에서 LPS와 βA로 유도된 NO 생성량을 관찰한 바 NO의 생성량은 豬苓車前子湯 처리군에서 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

이상을 종합하면 豬苓車前子湯은 LPS와 βA를 처리한 BV2 microglial cell line에서 염증발현 유전자인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 억제하였고 이는 소신경교세포의 활성화를 효과적으로 억제했기 때문이라고 사료된다. COX-2 및 NOS-II를 억제하였고 이는 COX-2 및 iNOS gene expression을 조절하였기 때문이라고 사료된다. 또한 AD관련 유전자인 BACE와 APP, 그리고 NO, β-APP 모두에서 유의한 결과를 얻었다.

따라서 豬苓車前子湯은 AD에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결론

豬苓車前子湯이 βA로 유도된 BV2 microglial cell line에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 豬苓車前子湯은 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 및 NOS-II 유전자 발현을 억제하였다.
2. 豬苓車前子湯은 BACE와 APP 유전자 발현을 억제하였다.
3. 豬苓車前子湯은 Nitric oxide(NO) 유전자 발현을 억제하였다.
4. 豬苓車前子湯은 β-APP 단백질 발현을 억제하였다.

References

1. The Korean society of oriental neuropsychiatry. Oriental neuropsychiatry. Seoul:Jipmundang. 2005: 311-6.
2. Weiner MF. The dementias, diagnosis and management. Washington:American Psychiatric Press. 1991:77-166,227-48.
3. Lee KW, Jung HW. Clinical neurology. Seoul :Goryeo Medicine. 1997:199-210.
4. Department of health and welfare. Statistical annual report of health and social. Seoul: Department of Health and Welfare. 1991: 236-9, 302-9.
5. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez 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 βA 42 deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med. 1996;2 (10):1146-50.
6. Mcgeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanism in alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
7. Department of the national association of Sasang typology. Sasang typology. Seoul: Jipmundang. 2005;492-3.
8. Chae JG, Jung IC, Lee SR. The effects of crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR(CPVM) extract on the alzheimer's disease model induced by CT105. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2002;13(1): 1-24.
9. Choi H, Kim SH, Lee DY, Ahn DJ, Kang HW, Lyu YS. The effects of rhizoma acori graminei water extract in alzheimer's disease model induced by pCT105. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2002;13(2):279 -88.
10. Kim MJ, Jung IC, Lee SR. The effects of chaeno-

melis fructus(CMF) extract on the alzheimer's disease model induced by CT- 105 and βA. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2005;16(1):97-117.
11. Kim TH, Kim JH, Kang HW, Lyu YS. Studies on inhibitory effect of inflammatory cytokines secretion from brain astrocytes by Sesim-Tang. Journal of Oriental Neuropsy- chiatry. 2001;12(1):137-50.
12. Ha SY, Jung IC, Lee SR. Effects of Kakamgobon -Hwan(KGBH) on inhibition of impairment of learning and memory, and acetylcholinesterase in amnesia mice. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2002;13(1):1-22.
13. Eom HS. Effects of Gamisinsunbulo-Dan on learning and memory function in the dementia rat by ibotenic acid damage. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology . 2002;16(6): 1151-6.
14. Park WS, Lee TY, Kim SY, Lee KK, Yuk SW, Lee CH, Lee SR. The immediate effect of electroacupuncture at the B62(Shinmaek) K6(Chohae) on the KKG of vascular dementia. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2001;18(2):67-78.
15. Kim JH, Kim TH, Park JS, Lyu YS. Inhibitory effect of lemon oil on apoptosis in astrocytes. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2000;11(1): 37-46.
16. Lee CH, Kim TH, Lee SR, Yook TH. Neuroanatomical studies on acupoints(SJ5, PE6, SP6 and GB39) projecting to the brain area related to dimentia using neural tracer, pseudorabies virus in mouse. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003;20(6): 168-81.
17. Lee JM. Dong ui su se bo wen. Seoul:Haengrim Publisher. 1986:102.
18. 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.
19. 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.
20. Louise B, Asha N, Barbara C, Greer M. Murphy, Jr. 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.
21. 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.
22. Griess, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." Chem. Ber. 1979;12:426-8.
23. Suzuki N, Cheung T, Cai X, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde T, Younkin S. Science. 1994; 264,1336-40.
24. 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.
25. Lee KH.. The latest clinical psychiatry. Seoul:Hana Medicine Publisher. 1998:138
26. Lee KW. Clinical neurology. Seoul:Beommunsa. 2003:203-15.
27. Min SK. The latest psychiatry Seoul:Iljogak. 2009: 679-81.
28. Rubin E. Essential pathology. 3rd edition. Seoul: Gunja Publisher. 2005.777-8.
29. Byeon YC. The mapping development research of dementia management. Korea Institute for Health and Social Affairs. 1997.
30. Soto C, Barnes MC, Alzarez J, Inestrosa NC. Structural determinants of the alzheimer's amyloid β-peptide. J Neurochem. 1994;63:1191-8.
31. Forloni G, Tagliavini F, Bugiani O, Salmona M. Amyloid in alzheimer's disease and prion-related encephalopathies: Studies with synthetic peptides. Prog Neurobiol. 1996;49:287-315.
32. Selkoe DJ. Amyloid beta-protein and the genetics of alzheimer's disease. J Biol Chem. 1996;271: 18295-8.
33. Krul KG. "Alzheimer's disease: selections from the world market for neurotherapeutic drugs". Kalorama Information. 2002.
34. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S, Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or

three copies of the amyloid precursor protein(APP) gene. Biochem J. 1999;338:777-82.
35. Breakefield XO, Geller AI. Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1987;1(4):339-71.
36. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD. Secreted form of amyloid precursor against basal glucose and glutamate transport and protcts in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. J Neurochem. 1999;73(2):532-7.
37. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity ; role of oxidative stress. J Neurochem, 2001;78(2):249-53.
38. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S. Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein(APP) gene. Biochem J. 1999;338:777-82.
39. Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine ; relevance to parkinson's and alzheimer's diseases. Biochim Biophys Acta. 1999; 1454(2):143-52.
40. Foster NL, Petersen RC, Gracon SI, Lewis K. An enriched-population, double-blind, placebo-controlled, crossover study of tacrine and lecithin in Alzheimer's disease. Dementia. 1996;7(5):260-6.
41. Yoon JC, Lee SR, Jung IC. The effects of Hyungbangsabaek-San(Jingfangxiebai-San) on the alzheimer's disease model induced by βA. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2010;21(2): 171-89.
42. Yeon BK. Pharmacotherapy of dementia. Journal of the Korean Medical Association. 1999;42(10): 1010-4.
43. Zhang JB. Zhang jing yue quan shu. Seoul: Hanseongsa. 1978;610-1.
44. Chen SD. Shishi balam. Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine. 1991:125.
45. Qian KW. Bian zheng qi wen quan shu. Taipei: Gandhi Publisher. 1990;222-5,233-5.
46. 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.
47. Ping AL, Wendy H, Qing PH, Hiro M, Muzaffar S, Ashfaq S. Postischemic treatment with a calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia. Neurosci Lett. 1998;247(1):17-20.
48. Kim WK, Jang PG, Woo MS, Han IO, Piao HZ, Lee K, Lee H, Joh TH, Kim HS: A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase(iNOS) gene expression in activated microglia. Neuropharmacology. 2004;47:243-52.
49. Bocchini, V, Mazzolla, R, Barluzzi, R, Blasi, E, Sick, P, and Kettermann, H. J. Neurosci. Res. 1991;1:616-21.
50. Bredt, DS, Hwang, PM, Snyder, SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature. 1990;347:768-70.