

# 木瓜의 $\beta$ A로 誘導된 Alzheimer's Disease 생쥐 모델에 미치는 영향

정인철 · 이상룡\*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## Effects of Chaenomelis Fructus Extract on the Alzheimer's Disease Mice Model Induced by $\beta$ A

In Chul Jung, Sang Ryong Lee\*

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This research investigated the effect of the Chaenomelis fructus(CMF) on Alzheimer's disease. The effects of the CMF extract on the behavior in the Morris water maze experiment; the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ROS on the microglial cell; IL-1 $\beta$  mRNA, TNF- $\alpha$  mRNA, CD68/GFAP and MDA on the brain tissue; the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in the mice with Alzheimer's disease induced by  $\beta$ A were investigated. The CMF extract group showed a significant inhibitory effect on the memory deficit on the mice with Alzheimer's disease induced by  $\beta$ A in the Morris water maze experiment. The CMF extract group suppressed the over-expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA, ROS, MDA, CD68/GFAP in the mice with Alzheimer's disease induced by  $\beta$ A. The CMF extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by  $\beta$ A. This study suggest that CMF may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : Chaenomelis fructus(CMF), Dementia, Alzheimer's disease,  $\beta$ A, cytokine

### 서론

Alzheimer's Disease(AD)는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며, 증상으로서는 기억력 저하, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제장애 또는 인격의 변화 등을 보인다<sup>1,2</sup>. AD 유발기전에 대한 대표적인 가설 중 하나가 APP (amyloid precursor proteins)의 과다생성으로 인한  $\beta$ A의 과다 침적이 노인반을 유발하고 이로 인한 신경독성이 신경세포의 파괴를 일으킨다는 것이다<sup>3,4</sup>. 또한, 물리적인 뇌손상, 감염 등에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 proinflammatory cytokines을 과다하게 생성하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 가설도 강

력하게 제기되고 있다<sup>5,6</sup>.

한의학에서 癡呆는 《石室秘錄》<sup>7)</sup>, 《辨證奇門》<sup>8)</sup>에 “呆病”으로, 《景岳全書·癡狂癡獸》<sup>9)</sup>에서 “癡獸”으로 언급되었으며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻礙, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있다<sup>7,10</sup>. 木瓜는 性味는 酸, 溫, 無毒하고 舒筋活絡, 和胃化濕, 降痰利水, 調和氣滯의 효능<sup>11,12)</sup>이 있어 痰濁이 원인인 AD에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

최근 들어 한의학계에는 癡呆와 관련된 다수의 실험적 연구<sup>13-18)</sup>가 보고되었고 木瓜에 대해서는 김<sup>19)</sup>의 항균작용에 대한 研究가 있었으나, 木瓜의 AD의 기전과 관련된 각종 생화학적 변화 및 행동 양태에 미치는 영향에 대한 연구는 접하지 못하였다. 이에 저자는 木瓜의 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木瓜를 투여하여  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였고, 역시  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 proinflammatory cytokines, 지질과산화도(MDA), CD68/GFAP의 발현, ROS(reactive oxygen species)의 생성을 관찰하였

\* 교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : 7575np@dju.ac.kr, · Tel : 041-560-8780

· 접수 : 2004/09/16 · 수정 : 2004/10/28 · 채택 : 2004/11/19

으며, 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

시약중 Tris-HCl, NaCl, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, chloroform, DL-dithiothreitol(DTT), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Agarose는 FMC사(U.S.A.)제품을 사용하였고,  $\beta$ -amyloid peptide(Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1 $\beta$ 와 anti-TNF- $\alpha$  (Pharmingen, U.S.A.), 그리고 anti-CD44-PE(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD68-FITC(Pharmingen, U.S.A.), anti-CD11b-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-GFAP-FITC (Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.), 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), stereotaxic frame(Adamec, U.S.A.), CELlection Pan anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), brain matrix(ASI instruments, Warren, MI, U.S.A.), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, U.S.A.), CO<sub>2</sub> incubator(Lepco, U.S.A.), Cytometry(BD, U.S.A.), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., U.S.A.), VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A.) 등의 것을 사용하였다.

#### 2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6 생쥐와 BALB/c 생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 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 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 약재

본 실험에 사용한木瓜(Chaenomeles fructus, CMF)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 4) 검액의 조제

木瓜 200g에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류 장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer 냉동고(-84℃)에 보관한 뒤, 실

험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) $\beta$ A에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

##### (1) $\beta$ A(1~40)

$\beta$ A는 AD 질환자의 뇌에서 senile plaques와 diffuse deposits를 주로 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>3,4</sup>. Calbiochem사에서 공급받아 AD 병태 생쥐모델을 만들었고, 그 아미노산 배열은 다음과 같다(Fig. 1).

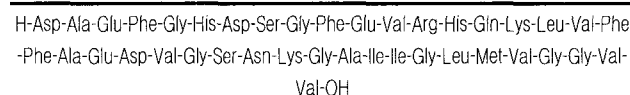


Fig. 1. Sequence of  $\beta$ A(1~40).

#### (2) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

##### ① C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 $\beta$ A 주입

$\beta$ A(10 $\mu$ M)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정한 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여  $\beta$ A(10 $\mu$ M)를 Hippocampus에 주입하는 데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점에서 caudal(꼬리쪽) 1.2mm, midline에서 right로 0.7mm, 그리고 표면에서 깊이 1.1mm로 microinjector의 injection speed 0.1  $\mu$ l/min와 total volume 0.5 $\mu$ l의 조건으로 수행하였다.  $\beta$ A 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2주 후, tacrine 투여군(10mg/kg)과 실험군(284mg/kg)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

##### ② AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주간木瓜를 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, tacrine 투여군, 실험군(284mg/kg)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다. 훈련과木瓜를 투여후 4주와 8주 후에 AD 유발생쥐를 Morris water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 관찰하고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2).

#### 2) $\beta$ A에 의한 AD병태 생쥐의 뇌세포 분석

##### (1) Anti-CD14 단일항체를 이용한 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의木瓜 추출물(284mg/kg) 투여가 종료된 AD 병태 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약

2회 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 CELlection™ Pan anti-mouse IgG-beads로 CD14<sup>+</sup> cell을 분리한 후 cell release buffer로 microglial cell만 포집하였다.

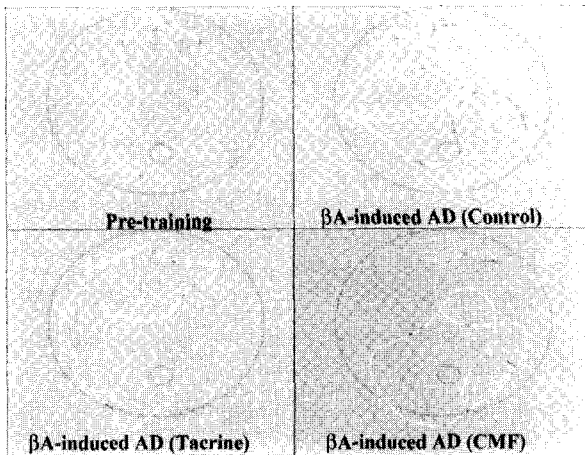


Fig. 2. Photograph of water maze of  $\beta$ A-induced AD model.

(2) Microglial cell내 pro-inflammatory cytokines 분석

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 284 $\mu$ l와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1 $\beta$ 와 FITC-anti-TNF- $\alpha$ 를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 씻은 후 microglial cell내 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 유세포형광 분석기로 CellQuest 프로그램을 이용하여 분석하였다.

(3) Microglial cell내 뇌조직의 ROS 분석

Microglial cell에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 50 $\mu$ M을 처리한 후 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 cell내 형광 ROS를 측정하였다.

(4) 뇌조직내 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법<sup>20)</sup>에 따라 clean test tube에 뇌조직 현탁액 200 $\mu$ l를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 $\mu$ l를 가하여 5초 동안 vortex mixer로 mixing했다. 20% acetic acid 1.5ml를 가하고 그리고 75 $\mu$ l 증류수를 넣고 5sec. 동안 vortex mixer로 mixing했다. 1.2% thiobarbituric acid solution을 각각의 1ml씩 tube에 더하고, clean dry marble로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 532nm에서 흡광도를 측정한다

(5) 뇌조직내 CD68/GFAP 분석

AD 유발 생쥐의 뇌조직을 잘게 chopping한 후 collagenase

1mg/ml(in 2% FBS+RPMI1640)을 넣고 37 $^{\circ}$ C shaker (1800rpm, 20) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복한다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 $^{\circ}$ C에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD44, FITC-anti-GFAP, FITC-anti-CD68, FITC-anti-CD11b을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD68/GFAP 세포수를 분석하였다.

(6) 뇌조직내 RT-PCR

AD 유발 생쥐의 적출한 뇌조직을 조직분쇄기로 우측 뇌조직(1g)과 RNAzolB 1000 $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl<sub>3</sub>) 100 $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 300 $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 300 $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

① Mouse IL-1 $\beta$

sence oligonucleotide : 5'-GCAACTGTTCTGAACTCA-3'  
antisense oligonucleotide : 5'-CTCGGAGCCTGTAGTCAG-3'

② Mouse TNF- $\alpha$

sence oligonucleotide : 5'-GCCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'  
antisense oligonucleotide : 5'-ACATTTCGAGCTCCAGTGAATTCGG-3'

③ Mouse  $\beta$ -actin

sence oligonucleotide : 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'  
antisense oligonucleotide : 5'-CICCTTAATGTCACCGCAGATTTC-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height : Ht)으로 측정하였다.

3)  $\beta$ A에 의한 AD 병태 생쥐모델의 뇌조직 허혈 및 손상 측정

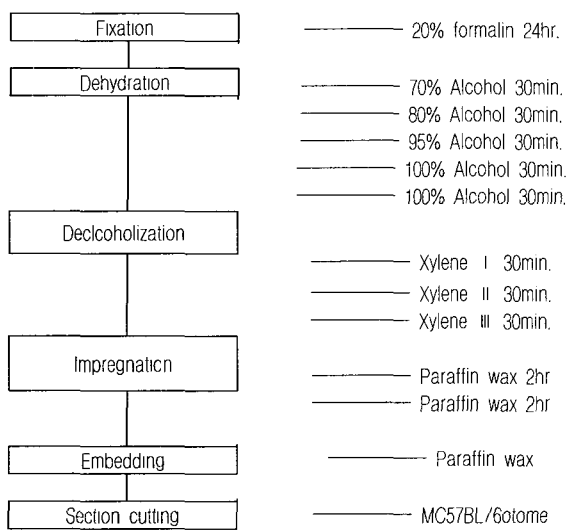
(1) 뇌조직의 허혈 크기 측정

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은후 brain matrix를 이용하여 2mm의 두께로 자르고 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법<sup>21)</sup>으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2mm)의 전체 면적. BH는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다.

(2) 병리조직 관찰

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정하여 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의

scheme 1과 같은 과정을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.



Scheme 1. Tissue processing

4) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, Student's t-test 분석 방법을 이용하여 통계처리하였고, p<0.05수 준에서 유의성을 검증하였다.

성 적

1. βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

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

木瓜 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.4±6.9(sec.), 31.3±6.5(sec.)로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 3).

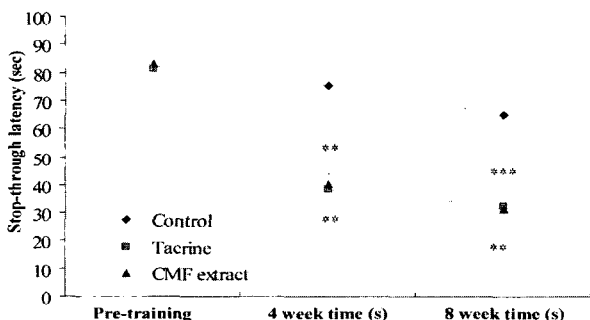
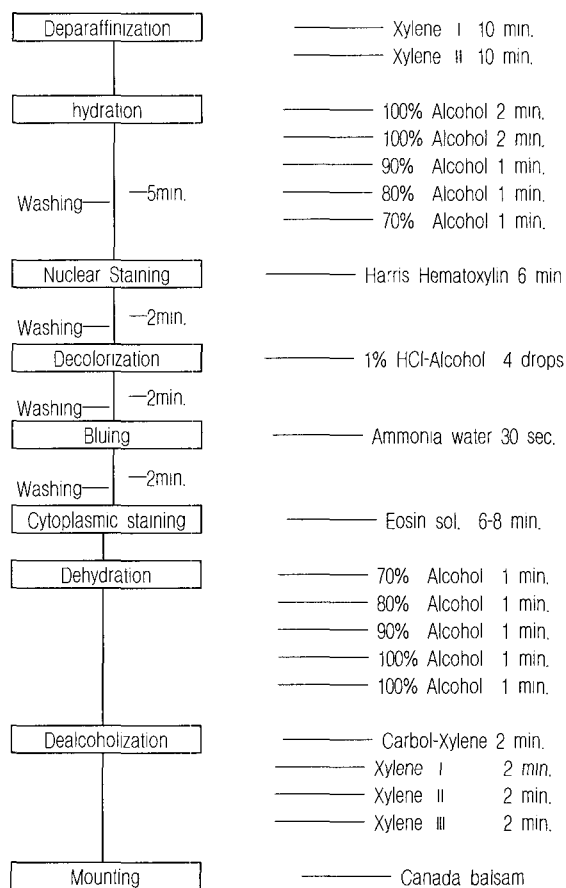


Fig. 3. Effects of CMF extract on the βA-induced Alzheimer's disease mice of impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test. Data represent means±S.E. Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10mg/kg, p.o); CMF(284mg/kg, p.o). Stop-through latency, each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제 효과

약물 투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과 실험군은 4주 후 705±114(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 378±59(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 4).

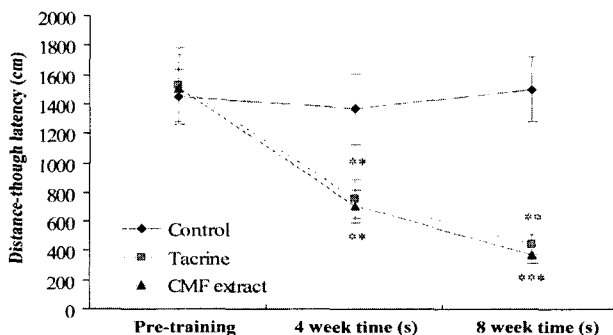


Fig. 4. Effects of CMF extract on the βA-induced Alzheimer's disease mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test. Data represent means±S.E. Control, βA-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10 mg/kg, p.o); CMF(284mg/kg, p.o). Lardist, this is the total distance(in cm) covered by the animal in large movement, and Smlidist, this is total distance covered by the animal in small movement. Data(Lardist plus Smlidist) represent means±S.E. Statistically significant value compared with βA-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2.  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 미치는 효과

1) Microglial cell에서의 IL-1 $\beta$  발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1 $\beta$  발현을 관찰한 결과, 대조군이 78.4 $\pm$ 6.5(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 59.4 $\pm$ 4.3(%), 실험군은 34.6 $\pm$ 4.0(%)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 5).

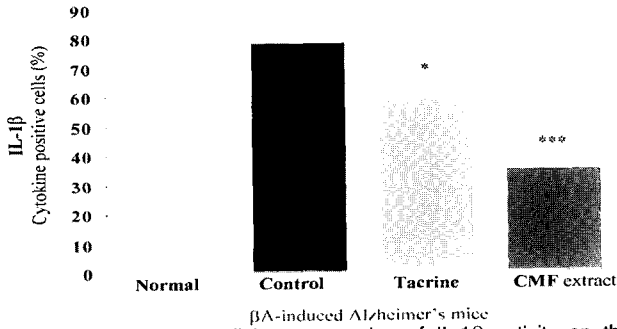


Fig. 5. Effect of intracellular suppressing of IL-1 $\beta$  activity on the brain CD14+ cells in  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice model with or without by the administration of CMF extract. Data represent means $\pm$ S.E. Statistically significant value compared with  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2) Microglial cell에서의 TNF- $\alpha$  발현 억제 효과

Microglial cell에서의 TNF- $\alpha$  발현을 관찰한 결과, 대조군이 94.5 $\pm$ 6.7(%), Tacrine을 투여한 양성대조군이 80.5 $\pm$ 5.2(%), 실험군은 70.5 $\pm$ 5.7(%)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 6).

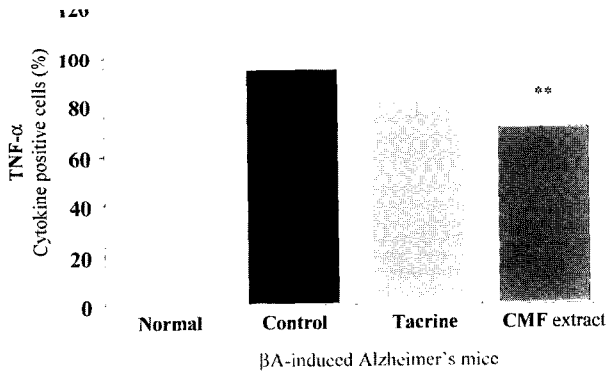


Fig. 6. Effect of intracellular suppressing of TNF- $\alpha$  activity on the brain CD14+cells in  $\beta$ A-Alzheimer disease mice model with or without by the administration of CMF extract. Data represent means $\pm$ S.E. Statistically significant value compared with  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

3) Microglial cell에서의 ROS 발현 억제 효과

Microglial cell에서 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 실험군에서는 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 7).

4) 뇌조직에서의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  유전자 발현 억제 효과

생쥐의 병변 뇌조직에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 관찰한 결과, IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현은 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 감소했고, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 실험군은 발현이 감소했다(Fig. 8).

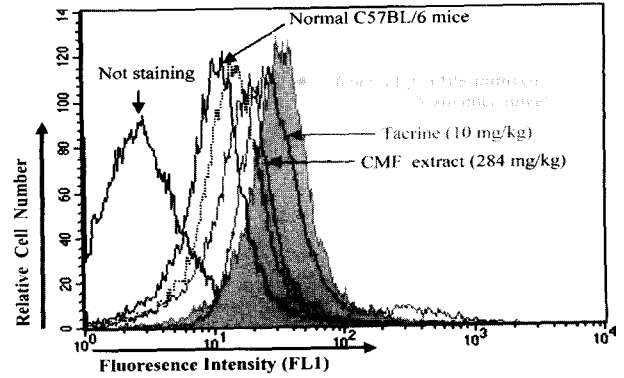


Fig. 7. Inhibitory effect of CMF extract on the ROS production in  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice model with or without by the administration of CMF extract.

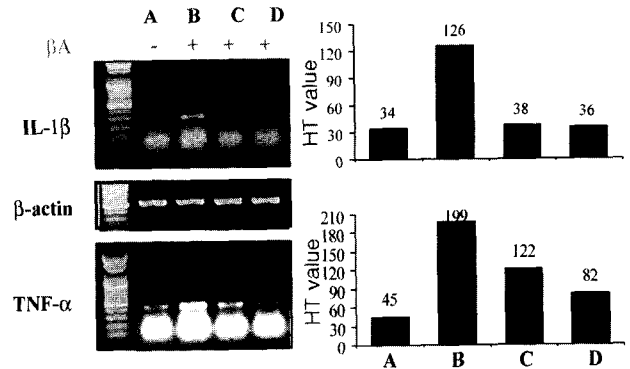


Fig. 8. Effects of CMF extract on the pro-inflammatory mRNA gene expression in brain tissue in normal and  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice. Normal brain tissue : A, none-treated group.  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice brain tissue : B, control.  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice brain tissue+ tacrine(10mg/kg, p.o) : C, Tacrine.  $\beta$ A-induced Alzheimer's disease mice brain tissue+ CMF(284mg/kg, p.o) : D, CMF.

5) 뇌조직에서의 MDA 양에 미치는 영향

생쥐의 병변 뇌조직에서의 MDA의 양을 관찰한 결과, 대조군이 56.8 $\pm$ 6.77(pg/mg), Tacrine을 투여한 양성대조군이 25.1 $\pm$ 3.8(pg/mg), 실험군은 28.8 $\pm$ 5.2(pg/mg)로 나타나 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 9).

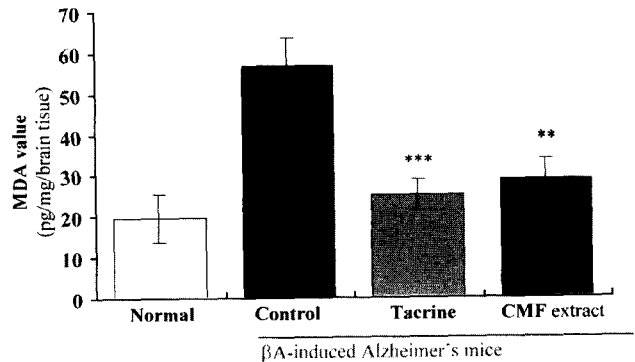


Fig. 9. Effect of CMF extract on the MDA value in the brain tissue in  $\beta$ A-induced Alzheimer disease mice model with or without by the administration of CMF extract. Data represent means $\pm$ S.E. Statistically significant value compared with  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

6) 뇌조직에서의 CD68/GFAP 발현 세포수에 미치는 영향

생쥐의 병변 뇌조직에서 CD68/GFAP이 발현된 세포수를 관찰한 결과 정상군은 2.30(%), 대조군은 7.58(%)이었고, 양성대조군인 tacrine 투여군은 4.08(%)이었으며, 실험군은 4.21(%)로 대조군에 비하여 감소한 것으로 나타났다(Fig. 10).

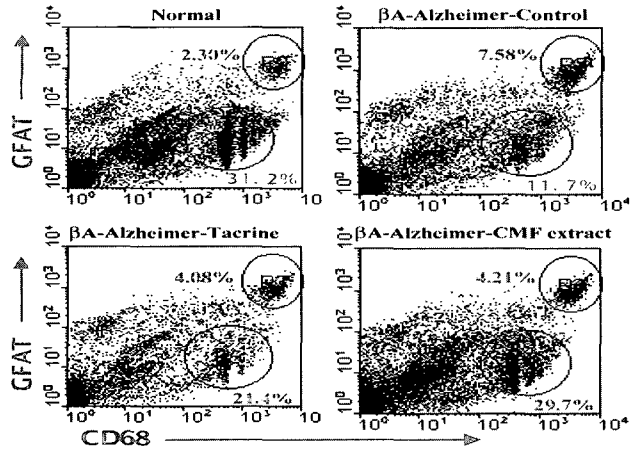


Fig. 10. Effects of CMF extract on the percentage of CD68/GFAT-gated cells in  $\beta$ A-induced Alzheimer disease mice model.

3.  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 虛血 크기를 관찰한 결과 대조군에서 虛血의 크기가 커진 것에 비해 실험군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11, 12).

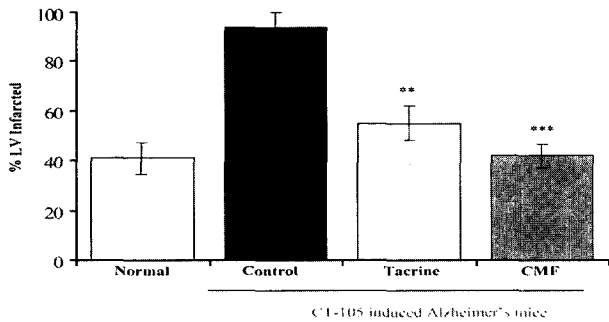


Fig. 11. Effects of CMF extract on the infarct size of  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice. Data represent means $\pm$ SE. Statistically significant value compared with  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

2) 조직손상에 미치는 효과

생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, 대조군에서는 Hippocampus에서의 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum이 유도되고, oligodendrocytes-like cells와 astrocytes-like cells이 강하게 나타남을 볼 수 있었으나,

실험군에서는 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등은 보였지만, 병변 부위에서 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 13, 14).

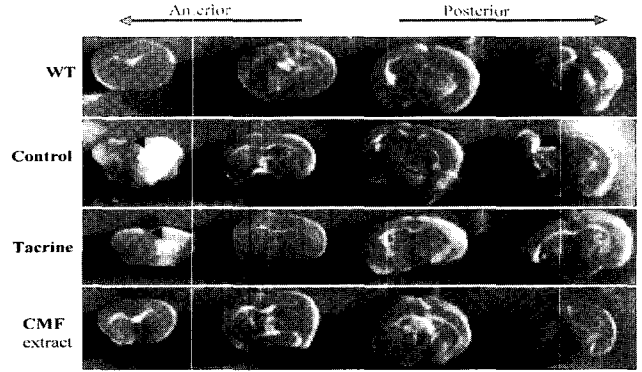


Fig. 12. Effects of CMF extract on the coronal section of  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice.

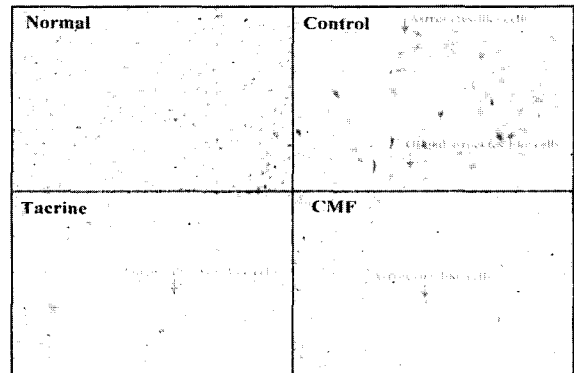


Fig. 13. Histological analysis of brain tissue of  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice(Nikon,  $\times$ 100).

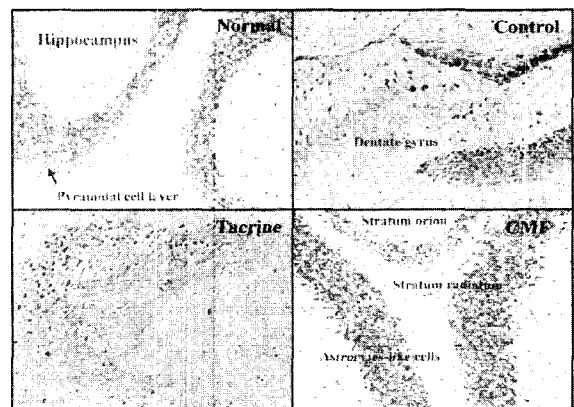


Fig. 14. Histological analysis of brain tissue of  $\beta$ A-induced Alzheimer's mice(Nikon,  $\times$ 40).

고찰

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반 (senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세

포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며, 증상으로는 병의 초기부터 기억력 저하가 나타나며, 최근의 기억에 대한 손상이 더욱 크며, 상대적으로 오래된 기억은 보존되는 경향이 있다. 병이 진행되면서, 점차 기억력의 손실, 추상적 사고장애, 판단 및 충동자제 장애 또는 인격의 변화가 나타나는데<sup>1,2</sup>, 구체적으로 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 지남력 감퇴, 정서불안정, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등의 증상을 보이며<sup>2,22</sup>, 마지막 단계에서 환자들은 침상에서만 생활하다가 폐염, 욕창, 패혈증 등에 의해 생을 마감하게 된다<sup>23,24</sup>.

AD는  $\beta$ A, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발 인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데<sup>25,26</sup>, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해  $\beta$ A가 과량으로 만들어지게 되고, 이  $\beta$ A의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다<sup>3,4</sup>.  $\beta$ A는  $\beta$ -secretase나  $\gamma$ -secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다<sup>27,28</sup>. Amyloid cascade hypothesis에 따르면  $\beta$ A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자<sup>29</sup>,  $\beta$ A의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다<sup>30-32</sup>.

또 다른 AD 기전으로 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokines에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 가설이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 Blood Brain Barrier가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여 활성화된 astrocyte 및 microglial cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 pro-inflammatory cytokines를 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 것으로 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다<sup>5,6,33-36</sup>. 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 microglial cell은 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF- $\alpha$ 를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고<sup>5,34</sup>, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다<sup>35,37,38</sup>. AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 proinflammatory cytokines이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다<sup>38</sup>. 특히  $\beta$ A가 침적된 노인반 주변의 microglial cell은  $\beta$ A에 의해 활성화되어 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 pro-inflammatory cytokines를 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>39</sup>.

한의학에서 癡呆는 《石室秘錄》<sup>7</sup>, 《辨證奇門》<sup>8</sup>에서 “呆病”으로, 《景岳全書·癡狂癡瘖》<sup>9</sup>에 “癡瘖”으로 언급되었으며, 內經<sup>40</sup>과 歷代醫書<sup>10,41,42</sup>에서 기억력저하라는 증상 면에서 健忘과 유사한 점을 찾을 수 있다. 현재 癡呆는 呆病과 健忘을 근거

로 변증되며, 원인으로 稟賦不充, 痰濁阻礙, 肝腎不足, 痰火, 瘀血, 七情傷 등을 들 수 있고<sup>7-10</sup>, 증상은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이고, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다<sup>41,43</sup>. 木瓜는 장미과에 속한 낙엽관목인 모과나무와 명자꽃의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 性味는 酸, 溫, 無毒하고 肺, 脾, 肝, 腎經에 歸하며 舒筋活絡, 和胃化濕, 降痰利水, 調和氣滯의 효능<sup>11,12</sup>이 있어 痰濁으로 인한 AD에 응용할 수 있을 것으로 思料된다. 이에 저자는 木瓜가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木瓜를 투여하여  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 pro-inflammatory cytokines와 CD68/GFAP의 발현, ROS의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈 상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다. 먼저 Morris water maze를 이용하여  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 木瓜의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였는데,  $\beta$ A는 완전 정제 순수단백질로 hippocampus 주위에 만들어지는 허혈과 plaque, tangle 등이 사람 AD 환자의 그것과 유사하게 만들어지므로 이를 이용하여 in vivo AD 생쥐모델을 만들었다. 木瓜 투여 4주 후와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.4±6.9(sec), 31.3±6.5(sec)로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여, 기억력 감퇴에 대한 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었고(Fig. 3), 다음으로 관찰한 distance movement-through latency는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smlldist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 실험군은 4주후 705±114(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 378±59(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 유의한 운동량 감퇴 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 결국 Morris water maze의 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 실험군이 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타내 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 木瓜를 사용해 볼 수 있다고 판단된다.

다음으로  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌내 microglial cell에서의 pro-inflammatory cytokines, ROS 발현과 뇌조직에서의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  유전자 발현, MDA량, CD68/GFAP 발현 세포수를 관찰하였다. Microglial cell에서의 IL-1 $\beta$  발현과 IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군은 그 발현이 현저히 감소했고(Fig. 5, 8), Microglial cell에서의 TNF- $\alpha$  발현과 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현 역시 대조군에 비해 실험군에서 현저히 감소했음을 볼 수 있다(Fig. 6, 8). 이는 木瓜가 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포내에서의 염증반응과 관련된 cytokine의 활성화를 효과적으로 억제한 것으로, 木瓜의 투여를 통해 과잉 생산된 pro-inflammatory cytokines로 초래되는 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

Microglial cell 내에서의 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 실험군에서는

ROS의 생산이 현저히 억제되었음을 알 수 있는데(Fig. 7), 이것으로부터 木瓜가 ROS로 매개되는 microglial cell의 활성화를 억제하고 세포내의 과산화 과정을 감소시켜 AD에 대해 예방적 효과가 있으리라 예측된다. 인체 조직의 산화적 손상과정은 세포막에서 지질의 과산화가 일어나 막의 투과도 및 유동성에 변화가 일어남으로써 진행되는 것으로 알려져 있다<sup>44)</sup>. Superoxide Dismutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione Peroxidase(GPX), Glutathione Reductase(GRD) 등 산화스트레스에 대한 항산화효소들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 자유라디칼에 대해 어느 정도의 방어력을 유지하고 있고, 비정상적으로 증가하는 산소 자유라디칼이나 ROS의 제거를 위하여 그 생성이 증가하거나 활성도가 높아지는 기전을 통해 항상 손상을 입지는 않는다. 그러나 생체막에서 과도하게 생성된 활성산소는 막 성분들을 비특이적으로 공격, 변경시키고 공간 배열을 변화시킴으로써 생체막의 생물학적 기능을 상실하고 지질과산화의 최종 산물인 lipofuscin 축적, 세포 구성성분의 손상을 가져오게 되며, 결국은 세포를 죽게 만든다<sup>45)</sup>. 산소 자유라디칼과 ROS는 생체 내 여러 가지 분자를 산화시키지만, 이 중에서 세포막 지방질에 가장 예민하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 지질 과산화(malonaldehyde, MDA)의 과정은 메틸기(CH<sub>2</sub>)의 수소 원자 1개를 추출할 만큼 충분한 에너지를 갖는 ROS가 PUFA와 반응할 때 시작된다. 이런 배경에서 AD 병태 생쥐 뇌조직에서의 MDA의 양을 측정할 결과 대조군에 비해 실험군에서 MDA의 양이 유의하게 감소하였음을 볼 수 있다(Fig. 9).

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 병변 부위는 plaques와 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 microtubule-associated protein 2(MAP2), GFAP, CD68,  $\beta$ A-protein 또는 tau 단백질 등이 고밀도로 분포하게 된다. 이들 astrocyte, macrophage 그리고 microglial cell 등은 표지인자(MAP2, GFAP, CD68)를 사용하여 확인될 수 있다<sup>46,47)</sup>. 이러한 배경으로 AD 유발 생쥐의 병변부분의 astrocyte와 microglial cell 양을 측정하기 위하여 두 세포의 표면 표지인자인 CD68/GFAP를 관찰한 바 대조군에 비하여 실험군에서 현저하게 CD68/GFAP 세포수 감소된 결과를 얻었는데(Fig. 10), 이는 木瓜가 AD 유발 생쥐의 뇌 병변부위에 존재했던 염증세포수를 크게 감소시켜 뇌세포를 정상으로 회복하도록 한 것으로 사료된다. AD 병태 생쥐모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과  $\beta$ A를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 11, 12), 木瓜가  $\beta$ A로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났고, 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며,  $\beta$ A로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 Hippocampus 주위에 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 현저히 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes-like cells와 astrocytes-like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 실험군은 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells,

astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 13, 14), 이는 木瓜가 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 기전을 억제할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다.

이상의 결과를 종합해 보면 木瓜는  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고, 또한  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐모델의 뇌내 microglial cell에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ROS의 발현, 뇌조직에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  유전자 발현, MDA량, CD68/GFAP의 발현을 억제하였으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 木瓜는  $\beta$ A의 과다 생성, pro-inflammatory cytokines의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 보다 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 木瓜의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결론

木瓜의  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 木瓜는  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈고, 또한  $\beta$ A로 유도된 AD 병태 생쥐모델의 뇌내 microglial cell에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ROS의 발현, 뇌조직에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  유전자 발현, MDA량, CD68/GFAP의 발현을 억제하였으며, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하였다.

## 참고문헌

1. 郭隆燦 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.27~31, 1992.
2. 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp. 216~228, 1988.
3. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P : Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res, 593(2):299~303, 1992.
4. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK : Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience, 95(1):1~4, 2000.
5. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem, 274(49):34584~34589, 1999.



6. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC : Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28(2):114~127, 1999.
7. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
8. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990.
9. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610~611, 1978.
10. 黃大東 외 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378~381, 1989.
11. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, p.649, 650, 1991.
12. 박종철 외 : 모과의 성분에 관한 연구, *생약학회지*, 20(1):10~12, 1989.
13. 황의완 : 사향소합원이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 10(1):1~16, 1999.
14. 흥대성 외 : 사향소합원이 정서반응성과 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 10(1):17~38, 1999.
15. 강현근 외 : 향부자팔물탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 10(1):39~52, 1999.
16. 김보경 : 안신청뇌탕이 Alzheimer's Disease 병태 모델의 생화學的 변화 및 기억에 미치는 영향, 大田大學校大學院. 2001.
17. 정인철, 이상룡 : 도담익기활혈탕이 Alzheimer's Disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향, *동의생리병리학회지*, 15(2):260~276, 2001.
18. 채종걸, 정인철, 이상룡 : 산사육이 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향, *동의생리병리학회지*, 16(2):279~288, 2002.
19. 김수경 : 산두근, 천오, 목과 및 그 혼합물이 족부백선균에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구, 경산대학교 석사 학위논문, 2000.
20. Suematsu, T, Kamada, T, Abe, H, Kikuchi, S, Yagi, K : Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. *Clin Chim Acta*, 79:267~770, 1977.
21. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM : Myocardial ischemia and reperfusion; a murine model. *Am J Physiol*, 269:2147~2154, 1995.
22. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.87~88, 465~467, 514~518, p.600, 1995.
23. 박영춘 : 정신과 영역에서의 치매, *대한신경과학회지*, 3(1):17~22, 1985.
24. Swash M, Oxbury J : *Clinical Neurology*, NewYork, 1:120~129, 1991.
25. 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 A $\beta$  42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med*, 2(10):1146~1150, 1996.
26. McGeer EG, McGeer PL : The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol*, 33(5):371~378, 1998.
27. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT : Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16(14):4491~4500, 1996.
28. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutunian V, DeMarco L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E : Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brains. *J Neurogenet*, 12(1):55~65, 1998.
29. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD : Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem*, 73(2):532~537, 1999.
30. Kontush A : Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1120~1131, 2001.
31. Kourie JI : Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 21(3):173~213, 2001.
32. 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*, 78(2):249~253, 2001.
33. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A : On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, 19(4):689~694, 1989.
34. Aloisi F, Car'e A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C : Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 149(7):2358~2366, 1992.
35. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC : FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*,

- 19(9):3440~3447, 1999.
36. Simmons ML, Murphy S : Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur J Neurosci*, 5(7):825~31, 1993.
  37. Simmons ML, Murphy S : Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*, 59(3):897~905, 1992.
  38. Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT, Brosnan CF : Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem*, 57(3):823~830, 1991.
  39. Stephen LY, Loyd HB, June KA, Joyce MA, Michael DD, Paula BE, Anthony MP, Piorkowski, Kurt RB : Amyloid  $\beta$  and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 74(3):1017~1025, 2000.
  40. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院, pp.68~70, 79~96, 134~137, p.174, 175, pp.217~218, p.229, pp.241~243, p.342, 1985.
  41. 陳輝 외 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp.242~251, 784~791, 1993.
  42. 朱震亨 : 金匱鉤玄, 서울, 鼎談出版社, pp.306~307, 1992.
  43. 徐浩 외 : 從痰瘀論治老年期痴呆研究進展, 浙江中醫雜誌, 31(10):474~475, 1996.
  44. Nakaya H, Tohse N, Nanno M. : Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue, *Am J Physiol*, 253:1089~1097, 1987.
  45. Tappel AL : Lipid Peroxidation Damage to Cell Components, *Fed*, 1973.
  46. Love S, Barber R, Wilcock GK : Increased poly(ADP-ribose) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*, 122:247~253, 1999.
  47. Zhao ML, Judy SH, Liu, Deke He, Dennis W, Dickson, Sunhee C : Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Research*, 813:402~405, 1998.