

木槿皮가 β A로 유도된 Alzheimer's Disease 생쥐 모델에 미치는 영향

이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of Hibiscus Syriacus Extract on the Alzheimer's Disease Mice Model Induced by β A

Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

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

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

Key words : Hibiscus syriacus(HSS), Dementia, Alzheimer's disease, β A, cytokine.

서론

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며^{1,3)}, 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래한다⁴⁾.

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 치매의 중요한 원인질환으로서⁵⁾, 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며, 발병은 서서히, 경과는 점진적인 것이 특징이다^{1,2)}. 증상은 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등이다^{1,3)}. AD의 유발 기전은 매우 다양한데^{6,7)}, 이 중 대표적인 것이 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 침적된 β amyloid peptide(β A)에 의해 유발된 노인반의 신경독성으로 인해 신경세

포의 파괴가 일어난다는 가설과⁸⁾, 물리적인 뇌손상, 감염 등에 의해 활성화된 microglial cell와 astrocyte가 염증반응 사이토카인을 과다하게 생성하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다는 설이다^{9,10)}.

韓醫學에서 痴呆는 《景岳全書》¹¹⁾에 의해 처음으로 기재된 이후, 역대의서에는 주요한 原因을 痰火, 瘀血, 七情所傷, 心腎不交, 肝腎不足 등¹¹⁻¹⁵⁾으로 언급하고 있다. 木槿皮는 錦葵科에 속한 落葉灌木인 무궁화의 莖皮 혹은 根皮로 清熱利濕, 活血의 효능¹⁶⁻¹⁷⁾이 있어 痰火와 瘀血로 인한 痴呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 들어 韓醫學界에는 痴呆, 기억장애 등과 관련된 다수의 文獻的¹⁸⁻¹⁹⁾, 臨床的²⁰⁻²⁴⁾, 實驗的 研究²⁵⁻³²⁾가 보고되었고 木槿皮에 대해서도 김³³⁾의 연구가 있었으나, 木槿皮의 AD 기전과 관련된 생화학적 연구 및 행동양태에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 木槿皮가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 木槿皮를 투여하여 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였고 역시 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 사이토카인과 CD68/GFAP의 발현, reactive oxygen

* 교신저자 : 정인철, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대정주한방병원
· E-mail : npjeong@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3727
· 접수 : 2004/03/09 · 수정 : 2004/04/13 · 채택 : 2004/05/19

species(ROS)의 생성을 관찰하였으며 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에서 사용된 압컷 C5 7BL/6생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험 당일까지 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 °C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 木槿皮(Hibiscus syriacus, HSS)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

3) 검액의 조제

木槿皮 200 g에 증류수 1,300 ml를 가하여 열탕추출기에서 3 시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 1회 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 한약추출물을 deep-freezer 냉동고(-84 °C)에 보관한 뒤, 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

4) 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(MgCl₂)는 Sigma사(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Agarose는 FMC사(U.S.A.)제품을 사용하였고, β-amyloid peptide(Calbiochem, U.S.A.), anti-CD14(Pharmingen, U.S.A.), anti-mouse IgG-bead(Dynal, U.S.A.), anti-IL-1β와 anti-TNF-α(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(대웅, DWT-1800T, 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 leader(Molecular device, U.S.A.), CO₂ 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. 실험 방법

1) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정과 microglial cell의 분석 (1) βA(1~40)

βA는 Calbiochem 회사에서 공급받아 AD 병태 생쥐모델을 만드는데 사용하였는데, 그 아미노산 배열은 다음과 같다(Fig. 1).

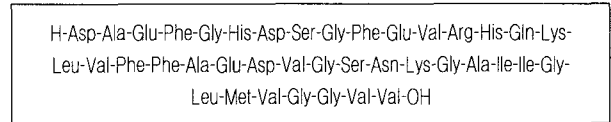


Fig. 1. Sequence of βA(1~40).

(2) AD 병태 생쥐 모델 제조 및 기억력 측정

① C57BL/6 생쥐 뇌의 hippocampus에 βA 주입

βA(10 μM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정된 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA(10 μM)를 hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽)으로 1.2 mm, midline에서 right로 0.7 mm, 그리고 표면에서 깊이 1.1 mm로 microinjector의 injection speed 0.1 μl/min와 total volume 0.5μl의 조건으로 수행하였다. βA 주입이 끝난 생쥐는 피부를 봉합한 뒤 2일 후, 양성대조군인 tacrine 투여군(10 mg/kg)과 木槿皮 투여군(250 mg/kg)으로 구분하여 1일 1회 8주 동안 경구투여하였다.

② AD 병태 생쥐의 기억력 측정

AD 병태 생쥐는 8주일간 木槿皮를 경구투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복학습훈련을 실시하였다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine), 木槿皮 투여군(250 mg/kg)으로 분류하였고, 계속 60일간 1일 1회 약물투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

③ 행동관찰

훈련과 木槿皮 투여를 실시한 4주와 8주 후에 AD 병태 생쥐를 Morris water maze에 한마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다(Fig. 2).

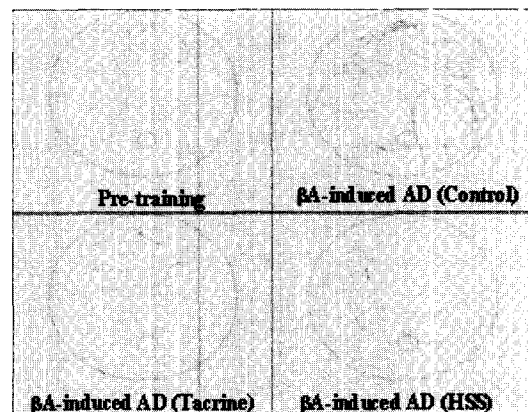


Fig. 2. Photograph of water maze of βA-induced AD

(3) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

① Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 木樨皮 추출물(250 mg/kg) 투여가 종료된 생쥐의 두 개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640을 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 CELlection Pan anti-mouse IgG-bead로 microglial cell를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-CD14⁺ 세포만 포집하였다.

② microglial cell내 염증반응 사이토카인 염색법

포집한 microglial cell를 ice-cold FACS 완충용액(0.05 % BSA, 0.02 % sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 250 μ l와 동량의 인산완충용액(2 % paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정된 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1 % saponin, 0.05 % sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1 β 와 FITC-anti-TNF- α 를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 발현된 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

③ AD 병태 생쥐의 뇌세포 형광 유세포 분석

AD 유발 생쥐에서 허혈이 일어난 뇌조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml(in 2 % FBS+RPMI 1640)을 넣고 37 °C shaker (1800 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복한다. 얻어진 뇌세포 부유액을 1 % FBS의 FACS 완충용액에 넣어 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK 용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 °C에서 면역형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD44, FITC-anti- GFAP, FITC-anti-CD68, FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD44, 그리고 CD68/GFAP 세포수를 분석하였다.

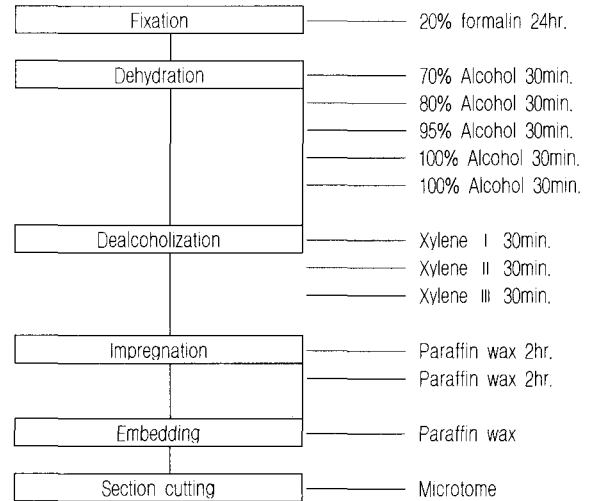
④ AD 병태 생쥐 뇌조직의 ROS 분석

AD 병태 생쥐의 뇌에서 분리한 CD14⁺인 microglial cell에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 50 μ M을 처리한 5분 후에 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

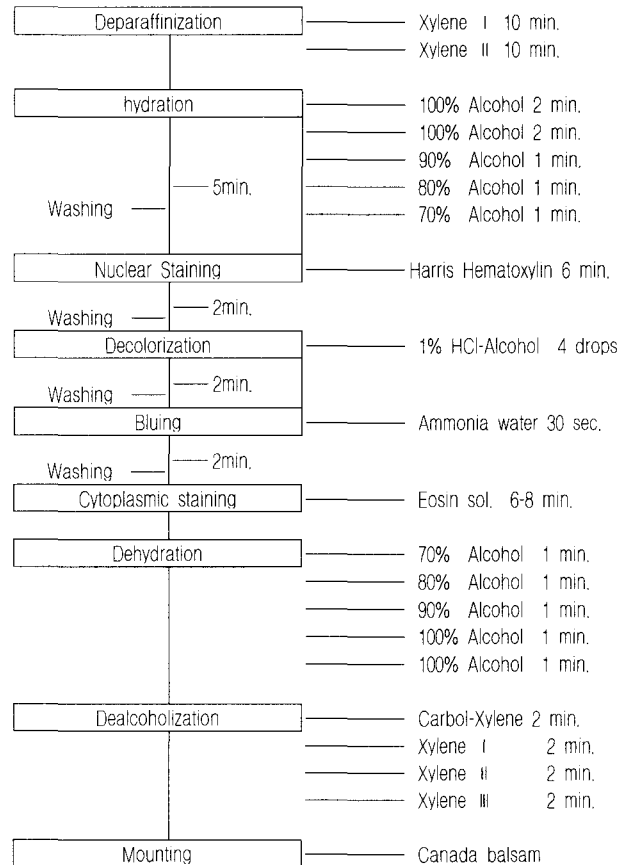
⑤ AD 병태 생쥐 뇌조직의 RT-PCR

적절한 뇌조직을 조직분쇄기로 우측 뇌조직(1g)과 RNazol^B 1000 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 100 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리, 약 300 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 300 μ l와 동량혼합한 뒤 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum

pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.



Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

(4) AD 병태 생쥐 뇌조직에서 허혈 및 조직손상 측정

① 뇌조직의 허혈시기 측정

AD 병태 생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 頭蓋를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2 mm의 두께로 자르고 2 % TTC 용액을 가하여

20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈크기의 측정에는 Michael의 방법³⁴⁾으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 $[(A_1/ST_1)+(A_2/ST_2)+(A_3/ST_3)+(A_4/ST_4)]$ 이고, A는 사진상에 나타난 허혈면적, ST는 각각 section(2 mm)의 전체면적. BH(brain hippocampus)는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈크기는 전체면적의 percent로 표현하였다. 즉, BH부위의 허혈면적(LV)은 $(AT \text{ of area at risk}/ST \text{ of BH}) \times 100$ 으로 분석하였다.

② 병리조직검사

분리된 AD 병태 생쥐의 뇌를 10 % formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의 scheme 1과 같은 과정을 시행하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & eosin 염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

2) 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법³⁵⁾을 이용하여 결정하였다.

성 적

1. AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 기억력 감퇴 억제효과

木樨皮 투여 4주와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 木樨皮 투여군은 각각 40.7±5.7(sec), 35.1±7.8(sec)로 모두 양성대조군에 비해서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 3).

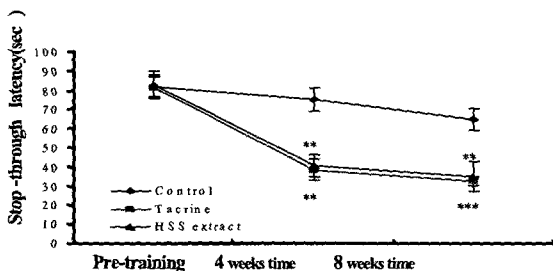


Fig. 3. Effects of HSS extract on the β A-induced Alzheimer's mice with impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test. Data represent means±S.E.(N=10). Control, β A-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10mg/kg p.o.); HSS(250 mg/kg p.o.). Stop-through latency: each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

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

약물투여 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과 木樨皮 투여군은 4주 후 639±152(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 451±182(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내었으나, 양성대조군과는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4).

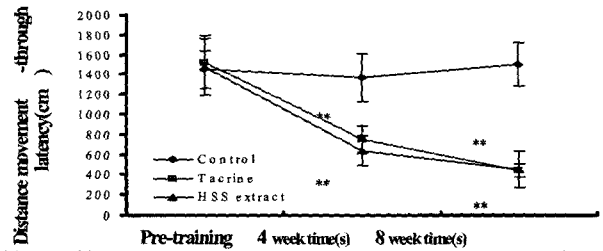


Fig. 4. Effects of HSS extract on the β A-induced Alzheimer's mice of spatial working memory deficits in the distance movement-through type Morris water maze test. Data represent means±S.E.(N=10) Control, β A-induced Alzheimer's mice; Tacrine(10mg/kg p.o.); HSS(250mg/kg p.o.). Lardist: this is the total 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.(N=10). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석 결과

1) AD 병태 생쥐의 microglial cell에서의 염증반응 싸이토카인 및 CD68/GFAP, ROS 발현 억제 효과

(1) 세포내 IL-1 β 발현 억제효과

microglial cell에서의 IL-1 β 발현을 관찰한 결과, β A를 뇌에 주입한 대조군이 78.4±6.5(%), tacrine을 투여한 양성대조군이 59.4±4.3(%), 木樨皮 투여군은 46.5±5.3(%)로 나타나 대조군에 비해 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 5).

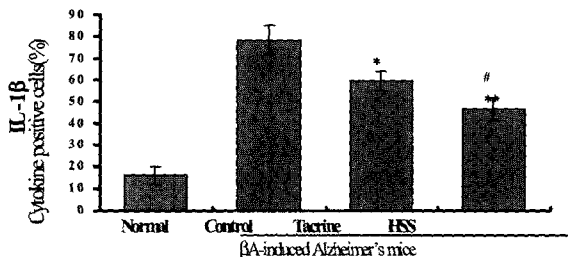


Fig. 5. Intracellular staining of IL-1 β activity on the brain CD14+cells in β A-Alzheimer's disease mouse model with or without the administration of HSS extract. Data represent means±S.E.(N=3). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Tacrine) data by T test(#p<0.05).

(2) 세포내 TNF- α 발현 억제효과

microglial cell에서의 TNF- α 발현을 관찰한 결과, β A를 뇌에 주입한 대조군이 94.5±6.7(%), tacrine을 투여한 양성대조군이 80.5±5.2(%), 木樨皮 투여군은 72.5±4.5(%)로 나타나 대조군에 비해 木樨皮를 함께 투여한 실험군에서 유의성 있게 발현이 억제되었다(Fig. 6).

2) AD 병태 생쥐의 뇌조직에서 IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 억제효과

microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 의 유전자 발현을 관찰한 결과 IL-1 β 의 유전자 발현은 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 木樨皮 투여군은 발현이 감소했고, TNF- α 의 유전자 발현 역시 정상군에 비해 대조군은 증가하였으나 木樨皮 투여군은 발현이 감소했다(Fig. 7).

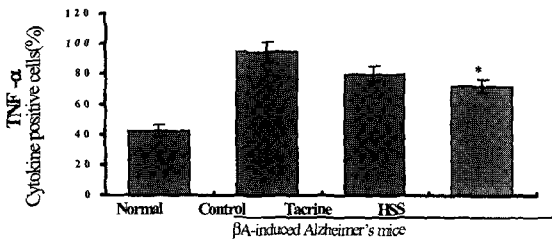


Fig. 6. Intracellular staining of TNF- α activity on the brain CD14+ cells in β A-Alzheimer's disease mouse model with or without by the administration of HSS extract. Data represent means \pm S.E.(N=3). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

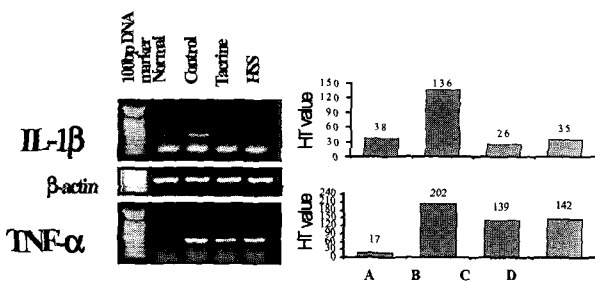


Fig. 7. Effects of HSS extract on the proinflammatory mRNA gene expression in brain tissue in normal and β A-Alzheimer's disease mice. Normal(A, not treated group). β A-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue(B, Control). β A-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue + tacrine(10mg/kg p.o.; C, Tacrine treated). β A-induced Alzheimer's disease mouse brain tissue + HSS(250mg/kg p.o.; D, HSS). Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β -actin) and the analysis(HI) was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

3) AD 병태 생쥐의 CD68/GFAP 발현 세포수 분석 결과

Microglial cell에서의 CD68/GFAP의 발현이 증가한 부분을 관찰한 결과 정상군은 2.30%, 대조군은 7.58%, 양성대조군인 tacrine 투여군은 4.08%이었고, 木樨皮 투여군은 4.86%로 대조군에 비하여 CD68/GFAP의 발현이 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 8).

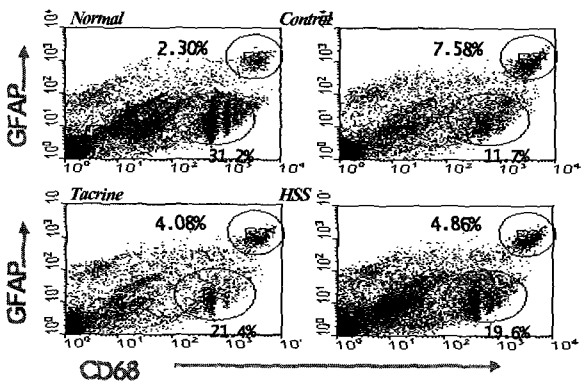


Fig. 8. Effects of HSS extract on the percentage of CD68/GFAP-gated cells in β A-Alzheimer's disease mouse model. Data represent means \pm S.E.(N=3). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4) AD 병태 생쥐의 ROS 발현 억제효과

microglial cell내에서의 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 木樨皮 투여군에서는 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 9).

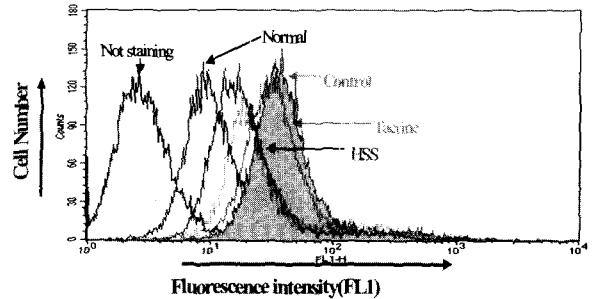


Fig. 9. Inhibitory effects of HSS extract on the ROS production in β A-Alzheimer's disease mouse model with or without by the administration of HSS extract.

2. AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 병태 생쥐의 허혈상태에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 대조군 94 \pm 5.8(%), 양성대조군 55 \pm 6.8(%), 木樨皮 투여군 47 \pm 7.4%로 대조군에 비해서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 10, 11).

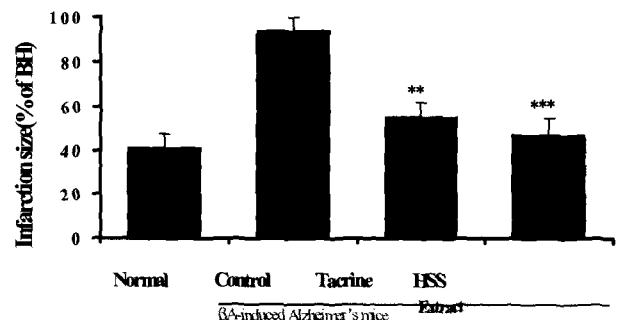


Fig. 10. Effects of HSS extract on the infarct size of β A-induced Alzheimer's mice. Data represent means \pm S.E.(N=3). Statistically significant value compared with β A-induced Alzheimer's mice group(Control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

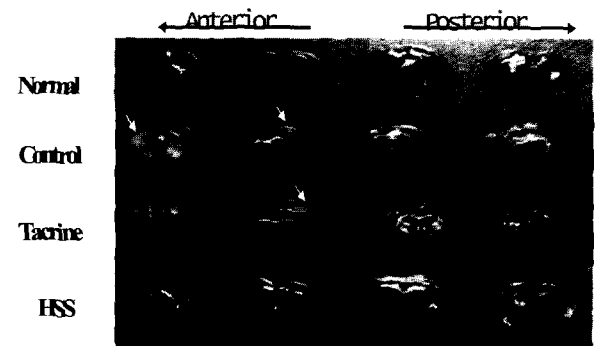


Fig. 11. Effects of HSS extract on the coronal section of β A-induced Alzheimer's mice.

2) AD 병태 생쥐의 조직손상에 미치는 효과

AD 병태 생쥐 뇌조직의 손상을 관찰한 결과, 정상군은

pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고, dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, β A로 유발된 허혈상태로 hippocampus에서의 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 이 유도되고, oligodendrocytes-like cells와 astrocytes-like cells가 강하게 나타남을 볼 수 있었으나, 木樨皮 투여군에서는 대조군에서 뇌의 허혈상태로 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cells 등은 보였지만, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 12, 13).

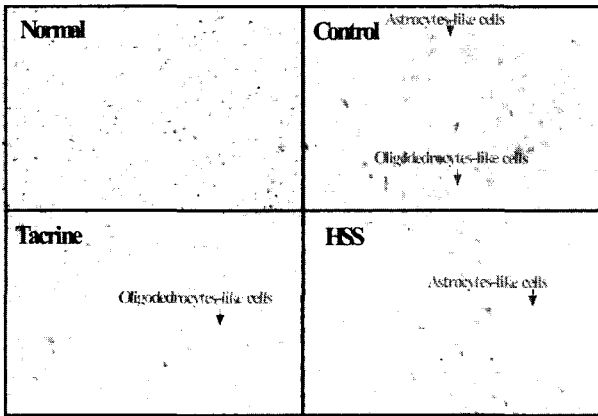


Fig. 12. Histological analysis of brain tissue of β A-induced Alzheimer's mice.(Nikon, x100).

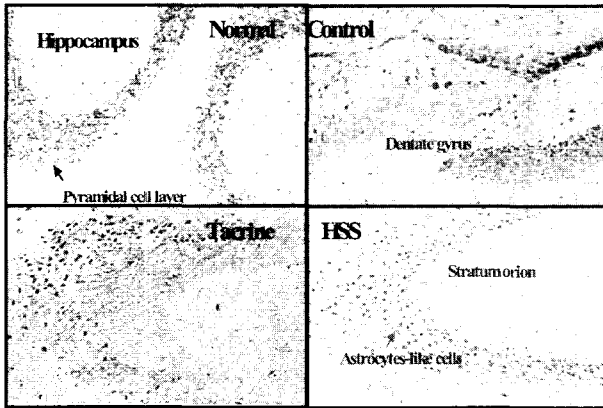


Fig. 13. Histological analysis of brain tissue of β A-induced Alzheimer's mice.(Nikon, x40).

고찰

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며¹⁻³⁾, 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래된다⁴⁾. 痴呆에는 AD, 뇌혈관성치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50 % 이상을 차지하고 있는 질환으로⁵⁾, 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견을 나타내며, 발병은 서서히, 경과를 점진적인 것이 특

징이다^{1,2)}. 증상으로는 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등을 보인다^{1,3)}. 생존율은 발병 후 약 5~12년 정도로 보고 되고 있고, 보편적으로 동양보다 서양에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높으며, 65세 이상에서 빈발하여 85세 이후에는 절반에 가까운 인구가 이 질환에 이환되는 것으로 알려져 있다³⁶⁻³⁷⁾. AD는 β A, estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidants, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데⁶⁻⁷⁾, 이 중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS 유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 β A가 과량으로 만들어지게 되고, 이 β A의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다⁸⁾.

β A는 β -secretase나 v-secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로^{10,38)}, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다³⁹⁻⁴⁰⁾.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 β A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로 amyloid의 축적이 점차 커지면서 β A가 신경세포를 손상시켜 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다고 한다. 그러나 β A는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉽게 만들어 痴呆의 증상을 유발시키는 것이다⁴¹⁻⁴²⁾. β A의 과잉이 뇌 안에서의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 세포내 Ca 항상성의 파괴를 초래함으로써 노인반을 형성하고 신경독성을 나타내는 것으로 판단되고 있다⁴³⁻⁴⁵⁾. 또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 염증반응 사이토카인에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglia cell이 IL-1, IL-6, TNF 등의 염증반응 사이토카인을 과다하게 분비하여 뇌에서의 사이토카인 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어난다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다^{9-10,46-47)}.

정상상태의 뇌에서 신경교세포인 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서, 사이토카인들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 microglial cell로 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1 및 TNF- α 를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고^{9,48)}, 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF- α , IL-5 등의 사이토카인을 생성시키고 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다^{47,49)}.

또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 사이토카인 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 염증반응 사이토카인이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관

심이 집중되고 있다⁵⁰). 특히 β A가 침적된 노인반 주변의 microglial cell은 β A에 의해 활성화되어 IL-1, TNF- α 등의 염증반응 사이토카인을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다⁵¹).

뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서 GFAP를 들 수 있으며, astrocyte는 신경교세포로서 microglial cell 등과 함께 생성하는 염증반응 사이토카인에 의해 신경세포의 사멸을 촉진시키므로 AD 환자에서는 GFAP가 증가하는 경향을 보이는데, 이는 신경교세포인 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 노인반 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF- α 의 과다 발현과 관련이 많은 것으로 알려져 있다⁵²⁻⁵⁴).

한편, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostatin, dopamine, serotonin, GABA 등의 수준이 병적으로 낮아지며³⁶), AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고⁵⁵⁻⁵⁶), 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine를 측정하여 AD 환자의 임상적 경과를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다⁵⁷⁻⁵⁸). 비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등^{46,59})과, acetylcholine 분해억제제로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등이 있는데, 이들은 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 독성이 있는 것으로 사용상에 여러가지 문제점과 단점을 가지고 있지만 현재까지의 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다⁶⁰⁻⁶¹).

韓醫學的으로 痴呆는 '痴呆¹¹', '呆病¹²⁻¹³', '健忘⁶²⁻⁶⁴' 등의 범주에 속하며, 《景岳全書·癡狂痴狀》¹¹)에서 최초로 언급이 되었다.

痴呆의 症狀은 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 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다¹¹⁻¹⁵).

原因에 대해서는 역대 문헌에서 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 제시되고 있는데¹¹⁻¹⁵), 현재 中醫學^{14-15,65})에서는 비록 일관된 치료는 아니지만, AD와 VD로 구분하고, AD를 다시 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 주로 肝腎陰虛 心脾兩傷 腎精虧虛 脾腎陽虛로 辨證하여 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 益氣補血 補益腎精 溫補脾腎 등의 治法을 응용하며, 實證으로는 痰火와 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內低 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 등의 治法을 응용하고 있다. 木樨皮는 錦葵科에 속한 落葉灌木인 木樨의 莖皮 혹은 根皮로 性味는 甘·苦, 涼 無毒하고 大腸, 肝, 脾經에 歸하며 清熱利濕, 活血의 效능¹⁶⁻¹⁷)이 있어 痰火와 瘀血로 인한 痴呆에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 木樨皮가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규

명하고자 木樨皮를 투여하여 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 측정하였으며, 역시 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포를 분석하여 염증반응 사이토카인과 CD68/GFAP의 발현, ROS의 생성을 관찰하였고 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상의 변화를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

먼저 Morris water maze를 이용하여 β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 木樨皮의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였는데, β A는 완전 정제 순수단백질로 hippocampus 주위에 만들어지는 허혈과 plaque, tangle 등이 사람 AD 환자의 그것과 유사하게 만들어지므로 이를 이용하여 in vivo AD 생쥐모델을 만들었다.

木樨皮 투여 4주와 8주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 실험군은 각각 40.7±5.7(sec), 35.1±7.8(sec)로 양성대조군에 비해서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, 대조군에 비해 유의성 있는 시간의 단축을 보여(Fig. 3), 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있었고, 다음으로 관찰한 distance movement-through latency는 반복학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량(small movement; Smdist)과 많은 운동량(large movement; Lardist)의 합을 분석한 것으로, 실험군은 4주 후 639±152(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 보였고, 8주 후 역시 451±182(cm)로 대조군에 비해 유의성 있는 거리의 단축을 나타내 운동량 감퇴효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

결국 Morris water maze의 stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 실험군은 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 나타내 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 木樨皮를 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있었다.

β A로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial cell에서의 염증반응 사이토카인, CD68/GFAP 및 ROS 발현을 관찰하였는데, 먼저 microglial cell에서의 염증반응 사이토카인의 일종인 IL-1 β 발현과 IL-1 β 의 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서는 그 발현이 감소했고(Fig. 5, 7), TNF- α 와 TNF- α 의 유전자 발현 역시 대조군에 비해 실험군의 발현이 감소했음을 볼 수 있었는데(Fig. 6, 7) 이는 木樨皮가 AD의 원인 중 하나로 알려진 세포 내에서의 염증반응과 관련된 사이토카인의 활성화를 효과적으로 억제한 것으로, 木樨皮의 투여를 통해 염증반응 사이토카인으로 인한 신경세포 사멸을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

AD는 뇌의 특정 부위에 neuron의 소실로 유발되는데, 이러한 환자의 뇌 부분에는 neuron, oligodendrocytes, astrocytes, 그리고 microglia 등이 많이 침적된 특징을 나타낸다⁶⁶⁻⁶⁷). 이러한 병변 부위는 plaques과 neurofibrillary tangles 등이 축적되어 있는데 이를 이루는 세포들 속에는 microtubule-associated protein 2(MAP2), GFAP, CD68, β A-protein 또는 tau 단백질 등이 고밀도로 발현되어 분포하게 된다. 이들 neuron, astrocyte, macrophage 그리고 microglial 등의 세포들의 분화를 나타내는 표지인자(MAP2, GFAP, CD68)를 사용하여 확인되었고 또한, 염증유발 사이토카인(IL-1 β , TNF- α) 그리고 ROS도 높은 농도로 축적되어 있다⁶⁸⁻⁶⁹).

이 점에서 AD 유발 생쥐의 병변부분의 CD68 /GFAP를 유세포 형광분석기로 관찰하였는데, 이는 astrocyte와 microglia 세포의 표면표지자인 CD68/GFAP를 관찰하여 astrocyte와 microglia 세포수를 알아본 것으로 대조군에 비하여 실험군에서 CD68/GFAP 세포수가 감소하는 결과를 얻었다(Fig. 8). 이는 木槿皮 성분이 BBB막을 통과하였는지 아니면 다른 활성인자로 기인된 것인지는 확인할 수 없었지만 AD 유발 동물의 뇌 병변부위를 이루고 있는 염증세포수가 크게 감소한 결과이고 또한 신경과 뇌세포가 정상으로 회복되었음을 의미하는 것이기도 하다. 또한 염증반응 사이토카인은 astrocyte를 활성화시켜 일산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하고 있는 ROS의 일종인 peroxynitrite (ONOO)을 유도하여 신경세포의 사멸을 야기하는 것으로 알려져 있어⁷⁰⁾, βA와 염증반응 사이토카인의 상관성이 주목되고 있다^{51,71)}.

이에 microglial cell내에서의 ROS 발현을 관찰하기 위하여 AD 병태 생쥐의 뇌에서 분리한 microglial cell을 flow cytometer로 형광 ROS를 측정하고, βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군에서는 ROS의 생산이 억제되었는데(Fig. 9), 이것으로 木槿皮가 ROS로 매개되는 microglial cell의 활성화를 억제하고 세포내의 과산화 과정을 감소시켜 AD에 대해 예방적 효과를 나타낸 것으로 추측된다.

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과 양성대조군에 비하여는 유의성 있는 감소를 나타내지 못했으나, βA를 뇌에 주입한 대조군에 비해 실험군은 유의성 있게 허혈의 크기가 작아져(Fig. 10, 11), 木槿皮가 βA로 유발된 뇌조직의 허혈상태를 개선하는 것으로 나타났다. 또 뇌조직의 손상을 관찰한 결과 정상군의 hippocampus 주위에서는 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으며, βA로 유발된 AD 생쥐의 뇌에서는 hippocampus 주위에서 정상군과 비교할 때 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 사라지고 stratum orion과 stratum radiatum 등이 유도되는 것으로 나타났고, oligodendrocytes-like cells과 astrocytes-like cells 등은 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 실험군은 대조군에서 뇌의 hippocampus 주위에 유도된 stratum orion, stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell 등이 약하게 나타났고, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 12, 13), 이는 木槿皮가 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 木槿皮는 βA로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈고 βA로 유도된 AD 병태 생쥐의 microglial cell에서 염증반응 사이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현과 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현을 모두 억제하였으며, CD68/GFAP와 ROS의 발현 또한 유의성 있는 억제효과를 나타냈고, 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈상태로 인한 뇌조직의 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 木槿皮는 βA의 과다

생성, microglial cell의 염증반응 사이토카인의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 木槿皮의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

木槿皮의 βA로 유도된 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

木槿皮는 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다. 또한 microglial cell에서의 IL-1β, TNF-α의 발현과 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현, CD68/GFAP의 발현과 ROS의 생산을 억제하였고, 뇌조직의 허혈상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

참고문헌

1. 金知赫, 黃義完, 東醫精神醫學, 서울:現代醫學書籍社, 256-71, 327-30, 1992.
2. 李定均, 精神醫學, 서울:一潮閣, 87-8, 465-7, 514-8, 600, 1995.
3. 이광우, 정희원, 임상신경학, 서울:고려의학, 199-210, 1997.
4. 이가옥, 노인생활실태 분석 및 정책과제, 한국보건사회연구원, 114-32, 1994.
5. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ₁₋₄₂/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron. 17:1005-13, 1996.
6. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβ₄₂ deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med. 2(10):1146-50, 1996.
7. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 33(5):371-8, 1998.
8. 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.
9. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 274(49):34584-9, 1999.
10. 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):114-27, 1999.
11. 張介賓, 張氏景岳全書, 서울:翰成社, 610-611, 1978.
 12. 陳士澤, 國譯石室秘錄, 서울:書苑堂, 102, 1984.
 13. 錢鏡湖, 辨證奇問全書, 台北:甘地出版社, 222-5, 233-5, 1990.
 14. 陳輝 외, 實用中醫腦病學, 北京:學苑出版社, 242-51, 784-91, 1993.
 15. 黃大東 외, 實用中醫內科學, 上海:上海科學技術出版社, 378-381, 1989.
 16. 康秉秀 외, 本草學, 서울:永林社, 649, 650, 1991.
 17. 錢超塵 외, 本草綱目譯釋, 山西:山西科學技術出版社, 1663, 1664, 1999.
 18. 鄭仁哲, 李相龍, 痴呆에 對한 文獻的 考察, 동의신경정신과학회지, (1):77-94, 1996.
 19. 나창수 외, 치매에 관한 최근의 연구 동향, 大韓韓方內科學會誌, 19(1) :291-317, 1998.
 20. 이승기 외, 치매에 대한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 7(1):1-14, 1996.
 21. 金保岡 외, Alzheimer型 痴呆患者 2例에 對한 臨床的 考察, 동의신경정신과학회지, 8(2):97-106, 1997.
 22. 김보균 외, Dementia of Alzheimer Type에 관한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 9(1):25-44, 1998.
 23. 鄭仁哲, 李相龍. 痴呆患者 20例에 對한 臨床的 考察, 志山國際東洋醫學 symposium. 4:169-91, 1998.
 24. 현경철, 김종우, 황의완, Vascular Dementia에 關한 韓醫學的 臨床研究, 동의신경정신과학회지, 10(1):147-58, 1999.
 25. 채종걸, 이상용, 拱滿丸이 老化 白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 9(2):71-86, 1998.
 26. 황의완, 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 10(1):1-16, 1999.
 27. 흥대성, 김종우, 황의완, 麝香蘇合元이 情緒反應性과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 10(1):17-38, 1999.
 28. 강현근, 김종우, 황의완, 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지, 10(1):39-52, 1999.
 29. 김명진, 이상룡, 醒心地黃湯이 老化白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗酸化物活性에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 10(2):71-84, 1999.
 30. 김보경. 安神清腦湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 2001.
 31. 정인철, 이상룡, 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2001;15(2):260-76.
 32. 채종걸, 이상룡. 山查肉이 CT-105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279-88.
 33. 김수경. 山豆根, 川烏, 木樨皮 및 그 혼합물이 족부백선균에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. 경산대학교대학원. 2000.
 34. 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*. 269:2147-54, 1995.
 35. 金宇哲 외, 統計學概論, 서울:英志文化社, 177-79, 1990.
 36. 우종인 외, 한국의 한 농촌 지역에 거주하는 老人에서의 치매의 유병율, 신경정신의학, 36(1):92-101, 1997.
 37. Chui H, Zhang Q. Evaluation of dementia. A systematic study of the usefulness of the American Academy of Neurology's Practice Parameters. *Neurology*. 49:925-35, 1997.
 38. Miyazaki H, Murayama T, Ono S, Narita H, Nomura Y. Effects of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-N,N-diethylamino) ethoxy]ethanol hydrochloride(T-588), a novel cognitive enhancer, on noradrenaline release in rat cerebral cortical slices. *Biochem Pharmacol*. 53(9):1263-9, 1997.
 39. 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.
 40. Forsell C, Froelich S, Axelman K, Vestling M, Cowburn RF, Lilius L, Johnston JA, Engvall B, Johansson K, Dahlkild A, Ingelsson M, St. George-Hyslop PH, Lannfelt L. A novel pathogenic mutation(Leu262Phe) found in the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 234(1):3-6, 1997.
 41. 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): 532-7, 1999.
 42. Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res*. 778(1):158-65, 1997.
 43. Kontush A. Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 31(9):1120-31, 2001.
 44. Heo HJ, Cho HY, Hong B, Kim HK, Kim EK, Kim BG, Shin DH. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against Aβ-induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid*. 8(3):194-201, 2001.
 45. 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):249-53, 2001.
46. 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*. 7(5):260-6, 1996.
 47. 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):3440-7, 1999.
 48. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*. 150(7):2659-67, 1993.
 49. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*. 59(3):897-905, 1992.
 50. 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):823-30, 1991.
 51. Stephen LY, Loyd HB, June KA, Joyce MA, Michael DD, Paula BE, Anthony MP, Piorkowski, Kurt RB. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*. 74(3):1017-25, 2000.
 52. Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur Neurol*. 46(1):35-38, 2001.
 53. Monzon-Mayor M, Alvarez M, Arbelo-Galvan J, Romero-Aleman M, Yanes C, Plaza ML, Rodriguez JR, Rodriguez JJ, Toledano A. Long-term evolution of local, proximal and remote astrocyte responses after diverse nucleus basalis lesioning(an experimental Alzheimer model) ; GFAP immunocytochemical study. *Brain Res*. 865(2):245-58, 2000.
 54. Zhao W, Bing-sheng L, Alkon DL, Barker JL, Chang YH, Wu M, Rubinow DR. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. *Neuroreport*. 11(2):409-12, 2000.
 55. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(1):187-94, 2000.
 56. de Vente J, Markerink-van Ittersum M, van Abeelen J, Emson PC, Axer H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain ; effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci*. 12(2):507-19, 2000.
 57. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 52(4):691-9, 1999.
 58. Kasa P, Papp H, Torok I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinceptive enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience*. 101(1):89-100, 2000.
 59. 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*. 1454(2):143-52, 1999.
 60. Raskind MA, Sadowsky CH, Sigmund WR, Beitler PJ, Auster SB. Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 54(7):836-40, 1997.
 61. Wu DC, Xiao XQ, Ng AK, Chen PM, Chung W, Lee NT, Carlier PR, Pang YP, Yu AC, Han YF. Protection against ischemic injury in primary cultured mouse astrocytes by bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Neurosci Lett*. 288(2):95-8, 2000.
 62. 洪元植, 精校黃帝內經素問, 서울:東洋醫學研究院, 217-8, 229, 1985.
 63. 洪元植, 精校黃帝內經靈樞, 서울:東洋醫學研究院, 68, 342, 1985.
 64. 孫思邈, 備急千金要方, 서울:杏林出版社, 129-35, 534, 545, 550, 1982.
 65. 楊思澎 외, 中醫臨床大全, 北京:北京科學技術出版社, 224-30, 1991.
 66. Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol(Berl)*. 89:35-41, 1995.
 67. Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease ; correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55:1134-42, 1996.
 68. Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*. 122:247-53, 1999.
 69. Zhao ML, Liu JS, He D, Dickson DW Lee SC. Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Research*. 813(2):402-5, 1998.

70. Pandiella A, Massague J. Multiple signals activate cleavage of membrane transforming growth factor- α precursor. *J Biol Chem.* 266:5766-73, 1991.
71. Kang J, Park EJ, Jou I, Kim JH, Joe EH. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *Neuroreport.* 12(7):1449-52, 2001.