

聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향

최강욱 · 이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of ChongMyung-Tang and ChongMyung-Tang added *Hibiscus syriacus* Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model

Kang Wook Choi, Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

Department of Oriental Neuropsychiatry, Oriental Medicine, Daejeon University

This experiment was designed to investigate the effect of the CMT and MCMT hot water extract & ultra-fine powder on microglia and memory deficit model. The effects of the CMT and MCMT hot water extract on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2, IL-10, TGF- β 1 mRNA and production of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS in BV2 microglial cell line treated by lipopolysacchaide(LPS) ; serum glucose, uric acid, AChE activity of the memory deficit mice induced by scopolamine ; behavior of the memory deficit mice induced by scopolamine and were investigated, respectively. The CMT and MCMT hot water extract suppressed the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2 mRNA, production of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS and increased the expression of IL-10, TGF- β 1 mRNA in BV2 microglial cell line treated by LPS. The MCMT hot water extract & ultra-fine powder increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine. The CMT and MCMT hot water extract & ultra-fine powder groups showed significantly inhibitory effect on the scopolamine-induced impairment of memory in the experiment of Morris water maze. According to the above result, it is suggested that the CMT and MCMT hot water extract & ultra-fine powder might be usefully applied for prevention and treatment of dementia.

Key words : Microglia, Dementia, ChongMyung-Tang(CMT), ChongMyung-Tang added *Hibiscus syriacus*(MCMT), Hot water extract & Ultra-fine powder

서론

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말한다¹⁾. Alzheimer's disease(AD)는 어떤 원인에 의해서 뇌신경세포가 변성, 탈락하여 전반적인 뇌위축을 보이는데²⁾, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine의 과잉³⁾, acetylcholine의 감소 및 acetylcholinesterase (AChE)의 증가⁴⁾, oxidants(free radicals)⁵⁾, amyloid β protein(A β)⁶⁾등이 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.

韓醫學의으로 痴呆는 明代 張⁷⁾의 《景岳全書·癡狂癡瘖》에서는 “癡呆症, …… 言辭顛倒, 舉動不經, 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 癡瘖에 대해 최초로 기술하고 있으며 清代의 陳⁸⁾ 등은 치매와 유사한 개념으로 ‘呆病’에 대해 상세히 서술하고 있다.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》¹⁰⁾에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있으며¹¹⁾, 崔 등¹²⁾은 木槿皮는 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있다 하였고, 朴 등¹³⁾은 총명탕에 木槿皮를 가한 木槿皮聰明湯이 cytokine 과잉 발현으로 인한 AD와 choline성 신경세포의 퇴화로 인한 기

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

· E-mail : npjeong@hanmail.net, · Tel : 043-229-3726

· 접수 : 2006/06/11 · 수정 : 2006/08/28 · 채택 : 2006/09/18

억력 감퇴에 응용할 수 있다는 것을 실험적으로 입증하였다.

한편, 현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 湯劑이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데¹⁴⁾, 특히 초미세 분말은 약재를 수십 μ m로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구¹⁵⁾결과로 볼 때, 한약에서도 초미세 분말 제형에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 열수추출물과 초미세 분말 제형에 따른 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향을 비교 검토하고자 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물을 시료로 mouse lung fibroblast cells(mLFC)에서 세포독성을, BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)에서 세포생존율을 관찰하였고, BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2, IL-10, TGF- β 1의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS의 생성을 관찰하였으며, 또한 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고, Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정할 바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit(420-MC), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether), N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluo ride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly acrylamide, magnesium chloride(MgCl₂)은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moleoy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(USA) 제품을 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer(shimazue, Japan), rotary vaccum evaporator(Büchi, B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, USA), bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker (Lab-Line, USA), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(molecular devices, USA), 및 homogenizer(OMNI, USA), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning Co., USA), VIDEOTRACK (Animal and human

being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy(Nikon, Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), Pin mill(대성제약기계제작소, Korea), Turbo mill(air-flow type mill, ATM-100, 부성분체, Korea), 공기분급장치(air classification system, ATM-100, 부성분체, Korea), Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA), 자동생화학분석기(Biochemical analyzer, Express 550) 등이다.

2) 동물

평균체중 약 24g의 8주령 雌性 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명공학연구원에서 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 실온 22 \pm 2 $^{\circ}$ C을 유지하고, 1일 중 12시간은 200~300Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하였다.

3) 약제

처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of ChongMyung-Tang(CMT) & MokGuenPICheonChongMiChongMyung-Tang(MCMT)

韓藥名	生藥名	CMT(g)	MCMT(g)
白茯苓	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
木槿皮	Hibiscus syriacus	0	12
Total amount		36g	48g

4) 검액의 조제

(1) 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 열수추출물 분리 및 검액의 조제
 聰明湯 3첩 분량(108g)과 木槿皮聰明湯 3첩 분량(144g)에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 聰明湯 열수추출물 15.3g, 木槿皮聰明湯 열수추출물 23.1g을 얻었으며, 얻어진 열수추출물을 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 초미세분말 제작 및 검액의 조제
 초미세 분말은 (주)허브월드에서 제작·협조하였으며, 白茯苓, 遠志, 石菖蒲, 木槿皮 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(air classifying wheel speed; ACWS) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하였다. 입도분석은 한국콜마(주)(GMP 인증업체)에서 실시·협조하였다. 이와 같이 얻은 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 초미세분말을 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 400mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA), DNase type I (0.15mg/ml, Sigma, USA), antibiotics(penicillinm 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25μg/ml)을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다. BV2 microglial cell line(The immortalized murine BV2 cell line)는 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, NY, USA)으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법¹⁶⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10⁴개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물(최종 농도 200μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10⁵ cells/24 wells plate)에 lipopolysaccharide(LPS)(0.1μg/ml), 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물(100μg/ml)을 처리하고 72시간 동안 동시 배양하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA) 50μl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100μl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. BV2 microglial cell line의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell line(1×10⁵cells/24 wells plate)에 LPS(0.1μg/ml), 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물(100μg/ml)을 처리하여, 6시간과 72시간 동안 동시 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

2) BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine 및 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 Real Time Quantitative PCR 분석

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10⁵세포를 각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물(100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml)을 첨가하고 1시간 후 LPS(0.1μg/ml)를 처리하여, 6시간

동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol[®] 500μl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 50μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200μl와 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 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20μl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3μg을 DNase I (10U/μl) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5μl 10mM dNTPs mix, 1μl random sequence hexanucleotides(25pmole/25μl), RNA inhibitor로서 1μl RNase inhibitor(20U/μl), 1μl 100mM DTT, 4.5μl 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1μl의 M-MLV RT(200U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20μl가 되도록 하였다. 이 20μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. 염증사이토카인 및 항염증사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 94°C 10분, 50°C 2분에서 pre-denaturation 후, 95°C 9초, 60°C 1분을 40 cycles 수행하였다. 실험군과 대조군의 real time quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

$$y = x(1 + e)^n$$

(x=starting quantity, y=yield, n=number of cycles, e=efficiency)

사용된 primers는 다음과 같다.

① mouse G3PDH

Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

② mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
③ mouse IL-6
Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
④ mouse TNF-α
Forward Primer: 5' CTGTCTACTGAACITCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer: 5' ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
⑤ mouse IL-10
Forward Primer: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
Reverse Primer: ACCTGTCTCCACTGCCTTGCT
⑥ mouse TGF-β1
Forward Primer: TGACGTCCTGAGTGTACGG
Reverse Primer: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC
⑦ mouse COX-2
Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
⑧ mouse NOS-II
Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

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

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture (1×10^5 cells/ml)하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후 LPS($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 48시간 동안 CO₂ 조적 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 $100 \mu\text{l}$ (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotin conjugated $100 \mu\text{l}$ 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated $100 \mu\text{l}$ 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 $100 \mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 NO 생성량 측정

BV2 microglial cell line을 96 wells plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후 LPS($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5%

H₃PO₄)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 $100 \mu\text{l}$ 를 96 wells plate에 분주하고 혼합 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 ROS의 분석

BV2 microglial cell line 내의 ROS를 측정하기 위하여 24 wells plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 첨가하고, 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA $50 \mu\text{M}$ 을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈액분석

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

10주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, galanthamine($3 \text{mg}/\text{kg}$, *i.p*) 투여군, 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 열수추출물($400 \text{mg}/\text{kg}$, *p.o*) 실험군 그리고 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 초미세분말($400 \text{mg}/\text{kg}$, *p.o*) 실험군으로 나누고, 4주간 약물을 투여하였다. 약물 투여 22일째부터 scopolamine($1 \text{mg}/\text{kg}$)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) AChE 활성도 측정

AChE 활성도는 cholinesterase kit로 측정하였다. 혈청 중 AChE 활성도를 측정하기 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution(cat. no. 150-3) 0.2ml 와 serum 0.2ml 를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2ml , acetylcholine chloride solution 0.2ml 을 첨가한다. acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25°C 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 $\Delta A = \text{ABLANK} - \text{ATEST}$ 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

7) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

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

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine($1 \text{mg}/\text{kg}$)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하고, 이를

videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 각 군의 유의성은 일원배치분산분석(ANOVA test)로 평가하였고, p<0.05 수준에서 Duncan test로 사후 검정하였다.

성 적

1. 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성

1) mLFC에 대한 세포독성

聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 세포독성을 측정 한 결과, mLFC의 생존율은 대조군에 비해 聰明湯 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml 실험군은 93.1±1.8(%), 90.6±1.6(%), 88.1±1.7(%)로, 木槿皮聰明湯 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml 실험군은 각각 91.0±1.2(%), 85.2±1.5(%), 79.8±2.3(%)로 대조군에 비해 감소되었으나, 100µg/ml이하에서는 80% 이상의 생존율을 나타냈다.

2) BV2 microglial cell line의 형태학적 변화와 세포 생존율

BV2 microglial cell line에 LPS를 처리하여 6시간이 경과하면 대조군은 구형인 세포가 넓게 퍼지면서 세포가 활성화된 형태적 변화를 보였고 72시간 경과 시, 세포 중 절반 이상이 사멸되었음을 관찰할 수 있다. 그에 비하여 木槿皮聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 잘 유지됨을 볼 수 있다(표는 생략). BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정 한 결과, 대조군 52.3±5.8(%), 聰明湯 실험군 877±1.9(%), 木槿皮聰明湯 실험군 92.7±1.2(%)로, 대조군에 비해 聰明湯과 木槿皮聰明湯 실험군 모두 유의성 있게 높았다.

2. BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II, IL-10, TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.078(RQ)로 나타났으며, 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.748(RQ), 0.874(RQ), 0.975(RQ), 木槿皮聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.598(RQ), 0.698(RQ), 0.887(RQ)로 나타났다(Fig. 1).

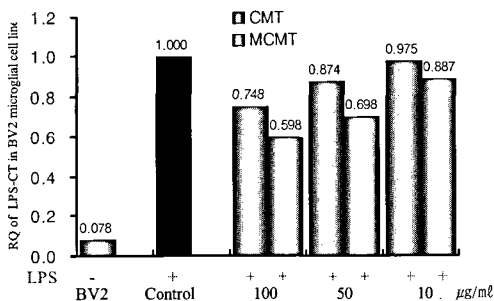


Fig. 1. Inhibitory effects of CMT and MCMT hot water extract on IL-1β mRNA expression in BV2 microglial cell line.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.141(RQ), 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.688(RQ), 0.815(RQ), 0.968(RQ), 木槿皮聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.478(RQ), 0.684(RQ), 0.835(RQ)로 나타났다(Fig. 2).

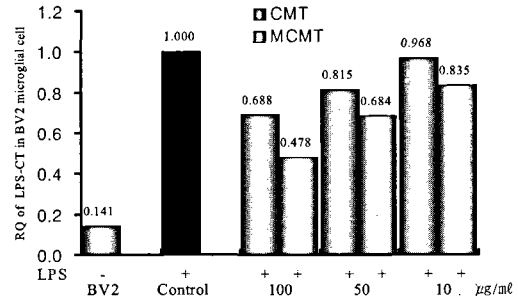


Fig. 2. Inhibitory effects of CMT and MCMT hot water extract on IL-6 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

3) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TNF-α mRNA 발현은 정상군이 0.245(RQ), 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.827(RQ), 0.895(RQ), 0.911(RQ), 木槿皮聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.868(RQ), 0.958(RQ), 0.987(RQ)로 나타났다(Fig. 3).

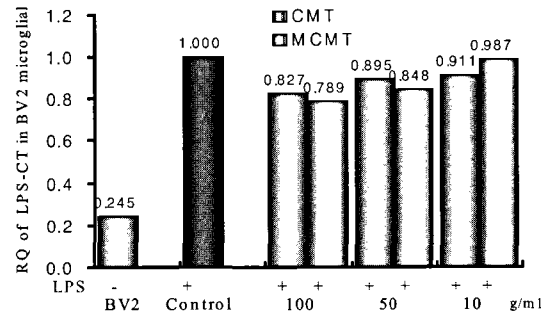


Fig. 3. Inhibitory effects of CMT and MCMT hot water extract on TNF-α mRNA expression in BV2 microglial cell line.

4) COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 COX-2 mRNA 발현은 정상군이 0.322(RQ), 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.744(RQ), 0.865(RQ), 0.991(RQ), 木槿皮聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.665(RQ), 0.745(RQ), 0.821(RQ)로 나타났다.

5) NOS-II mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 NOS-II mRNA 발현은 정상군에서 0.103(RQ)로, 聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.623(RQ), 0.744(RQ), 0.865(RQ), 木槿皮聰明湯 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 실험군은 각각 0.486(RQ), 0.584(RQ),

0.788(RQ)로 나타났다.

6) IL-10 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-10 유전자 mRNA 발현은 정상군이 0.747(RQ)로, 聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 1.345(RQ), 1.140(RQ), 0.985(RQ), 木槿皮聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 1.695(RQ), 1.251(RQ), 1.125(RQ)로 나타났다.

7) TGF- β 1 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 TGF- β 1 mRNA 발현은 정상군이 0.564(RQ), 聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 1.442(RQ), 1.105(RQ), 0.988(RQ), 木槿皮聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 1.996(RQ), 1.424(RQ), 1.002(RQ)로 나타났다(Fig. 4).

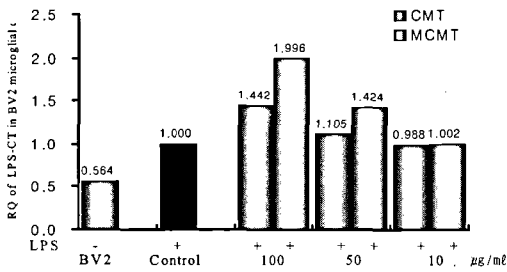


Fig. 4. Inhibitory effects of CMT and MCMT hot water extract on TGF- β 1 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

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

1) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β 생성량은 정상군이 31.3 \pm 8.8pg/ml, 대조군이 633 \pm 35.3pg/ml, 木槿皮聰明湯 실험군은 455 \pm 55.4pg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 168 \pm 44.6pg/ml, 대조군이 5896 \pm 742.3pg/ml, 聰明湯 실험군과 木槿皮聰明湯 실험군은 각각 4586 \pm 275.0, 4586 \pm 1203.5pg/ml로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(표는 생략).

3) TNF- α 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF- α 생성량은 정상군이 455 \pm 105.8pg/ml, 대조군이 2664 \pm 295.9pg/ml, 聰明湯 실험군과 木槿皮聰明湯 실험군에서는 각각 2465 \pm 185.9, 2252 \pm 221.2pg/ml로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

4. BV2 microglial cell line 배양상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 NO생성량은 정상군이 9.4 \pm 3.1(mM), 대조군이 65.4 \pm 13.6(mM)로, 聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 52.3 \pm 10.2(mM), 57.6 \pm 11.7(mM), 63.2 \pm 10.5(mM), 木槿皮聰明湯 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 437.6 \pm 13.7(mM), 46.2 \pm 8.8(mM), 53.1 \pm 6.3(mM)로 나타나 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

5. BV2 microglial cell line에서 ROS의 분석

BV2 microglial cell line 배양상층액에서 ROS를 발현하는 염증세포의 수를 분석한 결과, 정상군에서 3.2(%), 대조군은 46.9(%), 木槿皮聰明湯 100 μ g/ml 실험군(C)은 22.1(%), 木槿皮聰明湯 10 μ g/ml 실험군(D)은 33.7%로 나타났다(Fig. 5).

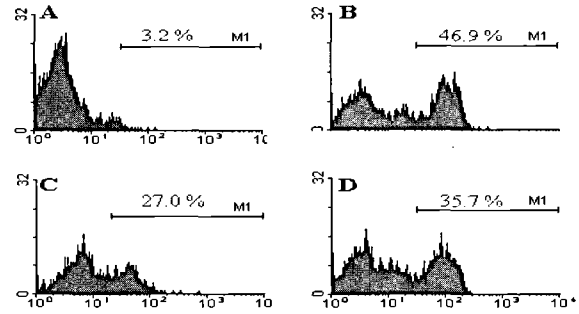


Fig. 5. Inhibitory effect of CMT and MCMT hot water extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

6. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 AChE에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는 정상군이 25.3 \pm 5.4(U/ml)이었고, scopolamine을 투여한 건망증 생쥐 대조군은 100.0 \pm 7.6(U/ml)로, 기억력 감퇴 생쥐 모델에 2주간 聰明湯 열수추출물과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 聰明湯 초미세분말과 木槿皮聰明湯 초미세분말을 투여한 실험군은 각각 69.0 \pm 9.3(U/ml), 54.3 \pm 12.8(U/ml), 54.3 \pm 6.5(U/ml), 57.0 \pm 4.9(U/ml)로 나타났다. 모든 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

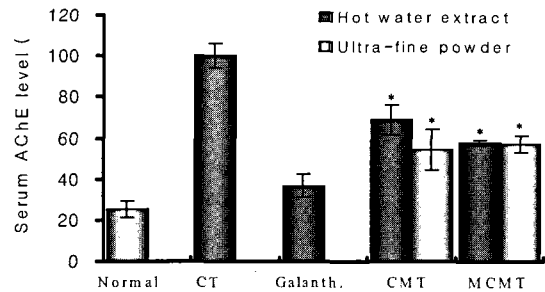


Fig. 6. Effects of CMT and MCMT on serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice. Normal : Non-treatment group. CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*). Galanth. : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*). CMT and MCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT hot water extract(400mg/kg *p.o.*). CMT and MCMT ultra-fine powder: Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). After ICR mice were administered of CMT and MCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1mg/kg) continued once a day for 7 days. Data represent means \pm S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

7. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과 scopolamine을 처리한 대조군이 66.5 \pm 5.9(sec) 聰明湯, 木槿皮聰明湯의 열수추출물, 聰明湯, 木槿皮聰明湯의 초미세분말 실험군은 각각 31.7 \pm 3.4(sec),

23.1±9.0(sec), 25.2±11.9(sec), 18.4±10.1(sec)로 나타났다. 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의한 시간 단축을 보였으며, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 7).

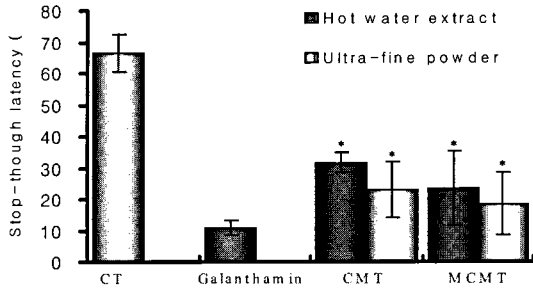


Fig. 7. Effects of CMT and MCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test. CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*). Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*). CMT and MCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT hot water extract(400mg/kg *p.o.*). CMT and MCMT(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). ICR mice were administered of CMT and MCMT orally or injected galanthamine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Distance movement latency를 관찰한 결과 scopolamine을 처리한 대조군이 113.8±123.7(cm) 聰明湯, 木槿皮聰明湯 열수추출물, 聰明湯, 木槿皮聰明湯 초미세분말 실험군은 각각 835.0±210.9(cm), 539.8±224.8(cm), 717.4±232.2(cm), 391.5±184.7(cm)로 거리가 단축되었으나 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성이 없었다(Fig. 8).

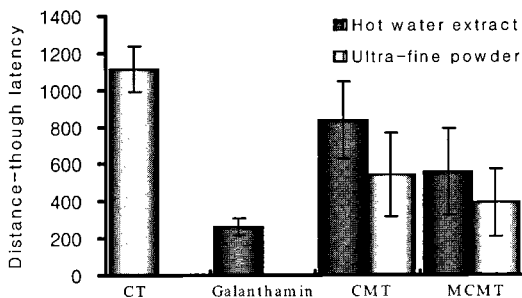


Fig. 8. Effects of CMT and MCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test. CT : Control, Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*). Galanthamine : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and galanthamine(3mg/kg *i.p.*). CMT and MCMT : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT hot water extract (400mg/kg *p.o.*). CMT and MCMT(ultra-fine powder): Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CMT and MCMT ultra-fine powder(400mg/kg *p.o.*). ICR mice were administered of CMT and MCMT orally or injected galanthamine and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The videotracking was initiated at 30 minutes after the injection of scopolamine intra peritoneal cavity. Data represent means±S.E. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test.

고찰

치매는 65세 이상의 노년인구에서 유병률이 2.2~8.8%에 이르며 미국의 경우 AD가 전체 치매환자의 50~60%, 혈관성 치매가 15~20%, AD와 혈관성 치매를 함께 15~20%, 기타가 약 10~20%가되는 것으로 추정되고 있다¹⁾. AD는 많은 원인에 의해서 유발되지만 베타아밀로이드 단백질(β -amyloid)의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 신경세포사가 일으키는 것과 과인산화 타우 단백질(hyperphosphorylation tau protein)의 침적에 의한 NFTs의 작용으로 신경퇴행을 일으키는 것이 대표적이다¹⁷⁾. 또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다¹⁸⁾. AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 질병과 proinflammatory cytokine이 밀접한 관계가 있으리라는 가설에 관심이 집중되고 있다¹⁹⁾. 특히 β A가 침적된 노인반 주변의 microglial cell은 β A에 의해 활성화되어 IL-1, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. Microglial cell에 의해 분비된 TNF- α 와 IL-1 β 는 astrocyte를 활성화시키며 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apolipoprotein E를 분비하여 염증 및 β A에 의한 신경세포독성을 촉진시킨다¹⁹⁾. IL-1 β 는 A β 에 의하여 분비가 증가되며 인간 혈관계에서의 실험에서 CD40의 표현을 촉진시켜 A β 가 AD에 영향을 미치는 데 중요한 과정 물질이 된다²⁰⁾. AD에서 IL-6은 amyloid 침착과 노인반 형성과 관련이 깊다²¹⁾.

Microglial cell의 활성화로 anti-inflammatory cytokine도 생성된다. IL-10은 T세포, B세포, 단핵구 등에 의해 생성되어 단핵구, macrophage계 세포의 IL-1, IL-6, TNF- α 생산을 억제하여 anti-inflammatory cytokine으로서 주목되고 있다²²⁾.

TGF- β 은 조직 손상 후 재생과정에서 나타나는 cytokine의 하나로 혈소판 및 내피세포, 대식세포 등에서 생산되며 대식세포에서 생성되는 NO를 불활성화시킨다²³⁾. 최근 이들 anti-inflammatory cytokine이 AD의 병리기전을 저해한다는 연구가 보고되고 있다²⁴⁾.

한편 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데²⁵⁾, AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다²⁶⁾.

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물에는 AChE의 저해제로 잠복기의 AD에 효과가 있는 것으로 알려진 것은 galanthamine²⁷⁾이 있다. Microglial cell은 A β 에 의해 과잉 생산된 ROS 등이 매개되어 활성화되고 proinflammatory cytokine을 과다 발현함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있어 A β 와 ROS의 상관성이 주목되고 있다²⁸⁾. A β 와 활성화된 microglial cell은 iNOS를 활성화시켜 NO를 과량으로 생성시키며 A β 의 독성은 부분적이나

마 NO에 의해 매개되는 것으로 알려져 있는데, 실험적으로 NO의 양을 조절하거나 항산화물질을 사용하는 것이 AD 치료에 도움을 줄 수 있음이 밝혀지고 있다²⁹⁾.

韓醫學의 癡呆의 病因은 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷 등이 있고 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등으로 辨證하여 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血의 治法을 應用한다³¹⁾.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》¹⁰⁾에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 癡呆 등의 병증에 활용되고 있으며¹¹⁾, 木槿皮는 錦葵科에 속한 落葉灌木인 무궁화의 莖皮 혹은 根皮로 性味는 甘·苦, 涼 無毒하며, 清熱利濕, 活血의 효능이 있는데³⁰⁾, 최근 실험적으로 AD의 치료와 예방에 효과가 있다는 연구와¹²⁾, 聰明湯에 木槿皮를 加한 木槿皮聰明湯 역시 치매에 대한 유의한 효과가 있다는 연구가 발표된 바 있다¹³⁾.

현재 약물의 제형에 있어서는 당제와 열수추출물 제제를 주로 이용하고 있는데, 한 설문결과에서 당제는 약을 달이는 것과 휴대하기 불편하다는 점, 당제의 기미가 불쾌할 수 있다는 점이 단점이고 열수추출물 제제는 약효가 낮은 것 같다는 점과 효과가 느리다는 점이 단점으로 지적되고 있다¹⁴⁾.

최근 초미세 분쇄 기술이 한약제형에 응용하여 활용되고 있으며 초미세 분말 제형이 약물생체 이용률, 약리 기작, 약의 경량화 등에서 우수하다는 연구결과¹⁵⁾가 있으나 국내의 연구는 미비한 실정이다.

이에 저자는 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고, 열수추출물과 초미세분말 제형에 따른 효과를 비교 검토하고자 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물을 시료로 하여 mLFC에서 세포독성을 관찰하고 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율을 관찰하였다. LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA, NOS-II, COX-2의 mRNA와 anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF- β 1의 mRNA 발현을 관찰하고, BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS의 생성을 관찰하였다. 또한 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 변화를 관찰하였고 Morris water maze에서 생쥐의 행동 변화를 VIDEOTRACK으로 측정하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비해 聰明湯 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 실험군과 木槿皮 聰明湯 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 실험군에서 감소되었으나, 100 μ g/ml 이하의 농도에서 80%이상의 생존율을 나타내었다. 또한 LPS로 처리한 BV2 microglial cell의 생존율을 측정한 결과, 聰明湯 실험군은 87.6 \pm 7.8(%), 木槿皮 聰明湯 실험군은 81.2 \pm 8.8(%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

이러한 결과로 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물은 100 μ g/ml 이하의 농도에서 정상세포에 대한 세포독성을 나타내지 않으며, AD 병태에서 나타나는 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다고

판단된다. 100 μ g/ml 이하의 농도로 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 BV2 microglial cell line에서 생존율이 80% 이상이 될을 나타내는 것이므로, 이후 실험실에서는 100 μ g/ml 이하의 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 실험군을 사용하였다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌 손상 및 외부로부터 이물질의 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형되는데, microglial cell은 뇌의 손상에 대한 반응으로 활성화되는데, microglial cell의 활성화는 AD와 파킨슨병과 같은 신경사멸질환의 개시와 진행에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹⁾.

지금까지 microglial cell을 활성화시키는 가장 효과적인 물질은 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)로, 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시켜 각종 cytokine을 분비하도록 하고 염증 및 면역반응을 일으킨다³²⁾.

COX-2는 arachidonic acid가 prostanoid로 전환될 때 촉매 작용을 하며 prostaglandine(PGs)을 형성하는 중요한 효소이다³³⁾. PGs는 과량이 존재할 경우 자가 독성을 나타내며 신경변성에 관여한다. COX-2의 발현증가는 유해한 prostanoid와 자유기들의 과잉생성을 유도하여 신경손상을 매개하며, AD 질환의 뇌에서도 COX-2 mRNA와 단백질의 발현 상승이 보고되었다³⁴⁾.

NOS-II(inducible NOS ; iNOS)는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소로 LPS, TNF- α , IL-1 β 또는 IFL- γ 에 의해 자극받은 대식세포, 간세포, 신장세포 등에서 생성된다. iNOS는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장기간 다량의 NO를 생성하며, 필요이상으로 생성된 NO는 shock에 의한 혈관 확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다³⁵⁾.

Microglial cell의 활성화로 생성되는 anti-inflammatory cytokine 중 IL-10은 사람의 대식세포나 단핵세포에서 가장 많이 생성되며 T림프구에 작용하여 Th1 림프구의 세포면역을 억제하고, IL-1 β 와 TNF- α 를 생성하는 대식세포의 생성을 억제한다. TGF- β 1은 조직 손상 후 재생과정에서 나타나는 cytokine의 하나로 혈소판 및 내피세포, 대식세포 등에서 생산되며 대식세포에서 생성되는 NO를 불활성화 시킨다³⁶⁾.

이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line을 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 열수추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml)를 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2, IL-10, TGF- β 1의 mRNA 발현을 관찰하였다.

그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA와 COX-2, NOS-II의 mRNA의 발현이 억제되었고, anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF- β 1의 mRNA의 발현은 증가하였다(Fig. 1-4).

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정한 결과, 모든 실험군에서 생산량이 다소 감소하였으나 IL-1 β 의 생성량에 있어서 木槿皮聰明湯 실험군에서만 유의성 있게 감소하였다.

신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이

되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질로 NO와 ROS가 있다. NO는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 무기저분자 라디칼로서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절, 중앙세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능에 관여하고 있으나, 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다³⁵. OH, O₂, H₂O₂를 포함하는 반응성이 매우 큰 ROS는 호기성 대사과정의 정상적인 생산물이다. ROS는 방사선, 염증, 공기오염물질, 허혈 등과 같은 비정상적인 조건에서 과도하게 생산되고, 이로 인해 세포막의 지질, 조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 이들 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다³⁷.

이러한 관점에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 NO와 ROS의 생성을 관찰한 결과, NO의 생성량은 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 감소하였지만 그 중 木槿皮聰明湯 100 μ g/ml 실험군에서 유의성이 나타났고, ROS의 생성은 대조군에 비해 木槿皮聰明湯 실험군에서 모두 감소하였다(Fig. 5). 이로써 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 산화적 손상을 유발하는 NO, ROS의 생성을 억제함으로써 AD의 예방에 활용될 수 있음을 알 수 있다.

일반적으로 기억력 감퇴와 인지기능의 손상은 choline계 작용의 감소로 나타나는데, scopolamine은 절후 부교감 신경이 분포된 표적장기에서의 acetylcholine의 작용, 무스카린성 수용체 흥분효과를 봉쇄하는 항무스카린성 약물로, 다양한 인지기능 중 기억력 감퇴에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁸.

scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 감소되었으나 실험군 간의 유의한 차이는 없었다. 이로써 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력 감퇴를 개선시키리라 판단된다(Fig. 6).

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 열수추출물과 초미세분말을 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였고(Fig. 7), Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 거리의 단축을 보였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 8).

이상의 결과로 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있어 기억력 감퇴에 대한 치료제로 활용할 수 있다고 판단된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 聰明湯과 木槿皮聰明湯은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2의 proinflammatory cytokine의 mRNA 발현을 억제하고 IL-10, TGF- β 1의 anti-inflammatory cytokine의 mRNA 발현을 증가시켰으며, IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS의 생성량을 감소시켰다. Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청내

AChE의 활성을 억제 하였다. Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력 감퇴를 개선시켰다.

본 실험에서 聰明湯과 木槿皮聰明湯의 효과를 비교하여 보면, BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine mRNA 발현의 억제와 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현의 증가, proinflammatory cytokine 및 NO 생성량의 감소 및 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 AChE의 활성 억제 효과 그리고 Morris water maze 실험을 통한 stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 개선 효과에 대해 두 실험군 간 유의한 차이는 없었다. 또한 열수추출물 및 초미세분말을 비교하면 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 AChE의 활성 억제 효과 그리고 Morris water maze 실험을 통한 stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 개선 효과에 있어 유의한 차이는 없었다.

결과적으로 聰明湯 및 木槿皮聰明湯은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현, 산화적 스트레스 등으로 인해 야기될 수 있는 AD와choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 초미세분말의 정확한 기전과 치매에 대한 임상적 활용에 대한 연구, 새로운 제형의 개발 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 모델에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰한 결과 聰明湯 및 木槿皮聰明湯 열수추출물은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS-II, COX-2의 mRNA 발현을 억제하고, IL-10, TGF- β 1의 mRNA의 발현을 증가시켰고, BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, ROS의 생성을 감소시켰고, Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐의 혈청 내 AChE 활성은 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 실험군 모두에서 유의성 있게 억제되었다. Morris water maze를 통한 stop-through latency 측정에서 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 열수추출물과 초미세분말 실험군이 유의성 있는 기억력 개선효과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯 및 木槿皮聰明湯의 열수추출물 및 초미세분말은 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학, 서울, 집문당, pp 311-316, 2005.
2. 조추용, 최현자. 치매 예방과 케어, 서울, 창지사, p 49, 2002.
3. Cacquevel, M., Lebourrier, N., Cheenne, S., Vivien, D.

- Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease, *Current Drug Targets*, 5(6):529-534, 2004.
4. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficaró, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease, *Neurology*, 52(4):691-699, 1999.
 5. Mhatre, M., Floyd, R.A., Hensley, K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets, *Journal of Alzheimers disease*, 6(2):147-157, 2004.
 6. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학, *한양의대학술지*, 21(1):11-16, 2001.
 7. 張介賓. 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
 8. 錢鏡湖. 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
 9. 洪元植. 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, pp 37, 124, 196, 229, 217-218, 229, 1985.
 10. 許 浚. 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp 55-56, 1996.
 11. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp 151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
 12. 최병란, 정인철, 이상룡. 木槿皮가 CT-105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지*, 15(2):119-139, 2004.
 13. 박지운. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 β A로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향. *박사학위논문*, 2004.
 14. 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하. 한약제형 선호도에 관한 설문조사, *경희의학*, 20(1):356-367, 2004.
 15. Song, L.L., Du, G.J., Fan, B.Y., Zhang, D.L. Study on pharmacology of ultra-fine particles compound Rehmannia, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 27(6):436-439, 2002.
 16. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, D., Warren, J.T., Kennedy, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13):1107-1112, 1990.
 17. Diez, M., Koistinaho, J., Kahn, K., Games, D., Hokfelt, T. Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein-initial observations, *Neuroscience*, 100(2):259-286, 2000.
 18. Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., Hirsch, E.C. FcepsilonR II/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.
 19. Tuppo, E., Arias, H. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2):289-305, 2005.
 20. Zhiming Suo, Jun Tan, Andon Placzek, Fiona Crawford, Chunhong Fang and Michael Mullan. Alzheimer's β -amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40, *Brain Research*, 807(1-2):110-117, 1998.
 21. Peskind, E.R., Griffin, W.S., Akama, K.T., Raskind, M.A., Van Eldik, L.J. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 39(5-6):409-413, 2001.
 22. 이귀녕, 권오현. *임상병리과일*, 서울, 의학문화사, pp 169-173, 2000.
 23. 대한병리학회. *병리학*, 서울, 고문사, pp 87-88, 1263-1264, 1994.
 24. Foster, N.L., Petersen, R.C., Gracon, S.I., Lewis, K. An enriched-population, double-blind, placebo-controlled, crossover study of tacrine and lecithin in Alzheimer's disease, *Dementia*, 7(5):260-266, 1996.
 25. Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine, *Expert Opin Investig Drugs*, 9(10):2393-2402, 2000.
 26. Trabace, L., Cassano, T., Steardo, L., Pietra, C., Villetti, G., Kendrick, K.M., Cuomo, V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease, *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1):187-194, 2000.
 27. Geerts H. Indicators of neuroprotection with galantamine, *Brain Research Bulletin*, 64(60):519-524, 2005.
 28. Kang, J., Park, E.J., Jou, I., Kim, J.H., Joe, E.H. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia, *Neuroreport*, 12(7):1449-1452, 2001.
 29. Chang, J.W., Young, D.A., Coleman, P.D., O'Banion, M.K. Two-dimensional gel analysis of secreted proteins induced by interleukin-1beta in rat astrocytes, *Neurochem Int*, 39(5-6):349-359, 2001.
 30. 康秉秀 외. *本草學*, 서울, 永林社, p 649, 650, 1991. surface corrugation is sufficient to improve aerosol performance of powders, *Pharm Res Jan*, 22(1):148-152, 2005.
 31. Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 150(7):2659-2667, 1993.
 32. Nick, J.A., Avdi, N.J., Gerwins, P., Johnson, G.L., Worthen, G.S. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 156(12):4867-4875, 1996.
 33. Marcheselli, V.L., Bazan, N.G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide-2 by seizure in hippocampus, *The Journal of biological chemistry*, 271:24794-24799, 1997.

34. Pasinatti, G.M., Alsen, P.S. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain, *Neuroscience*, 87(2):319-324, 1998.
35. Yen, G.C., Lai, H.H. et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root, *Food Chemistry*, 74:471-478, 2001.
36. 하대유 외. 면역학, 서울, 고문사, pp 100-105, 1994.
37. Mates, J.M., Perez-Gomez, C. et al. Antioxidant enzymes and human disease, *Clinical Biochemistry*, 32:595, 1999.
38. Ebert, U., Kirch, W. Scopolamine model of dementia ; electroencephalogram findings and cognitive performance, *European Journal of Clinical Investigation*, 28(11):944-949, 1998.