

원 저

却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물, 초미세분말제형이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

최보윤, 정인철, 이상룡
대전대학교 신경정신과학교실

The Effects of *Gagbunyunsoo-tanghap Zeungsonbakchul-san* (GYZB) Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model

Bo-yoon Choi, In-chul Jung, Sang-ryong Lee

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

Objective : This experiment was designed to investigate the effect of the GYZB hot water extract & ultra-fine powder on the Alzheimer's disease model induced by amyloid β protein (β A).

Method : We measured the effects of the GYZB hot water extract on expression of IL-1 β , IL-6 mRNA and production of IL-6, TNF- α in the BV2 microglial cell line treated with lipopolysaccharide (LPS).

The effects of the GYZB hot water extract & ultra-fine powder on (1) the behavior, (2) expression of IL-1 β and TNF- α , (3) glucose in serum, (4) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in mice induced with Alzheimer's disease by β A were investigated.

Results : The GYZB hot water extract suppressed the expression of IL-1 β and IL-6 mRNA and significantly suppressed the production of IL-6 and TNF- α in the BV2 microglial cell line treated with LPS.

The GYZB hot water extract & ultra-fine powder showed a significant inhibitory effect on the memory deficit of the mice with Alzheimer's disease induced by β A in the Morris water maze experiment, which measured stop-through latency and distance movement-through latency.

The GYZB ultra-fine powder significantly suppressed the expression of IL-1 β and TNF- α protein, and the GYZB hot water extract significantly suppressed the expression of TNF- α protein in the microglial cell of mice with Alzheimer's disease induced by β A.

The GYZB hot water extract & ultra-fine powder reduced the infarction area of hippocampus in the mice with Alzheimer's disease induced by β A.

Conclusions : These results suggest that GYZB hot water extract & ultra-fine powder may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Investigation into the clinical use of GYZB for Alzheimer's disease is suggested for future research.

Key Words : Alzheimer's disease, *Gagbunyunsoo-tanghap Zeungsonbakchul-san* (GYZB), hot water extract, ultra-fine powder

· 접수 : 2007년 5월 6일 · 논문심사 : 2007년 5월 7일
· 채택 : 2007년 5월 29일
· 교신저자 : 정인철, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9,
대전대청주한방병원 한방신경정신과
(Tel : 043-229-3727, Fax : 043-253-8757,
E-mail : npjeong@dju.ac.kr

緒 論

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해
흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나

는 임상증후군으로, 특히 치매의 중요한 유형인 Alzheimer's disease(AD)는 유병률이 1.6~15.3%로 보고되고 있고, 적절한 관리의 부재로 여러 가지 사회적 문제를 초래하는 질환이다¹⁾.

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반, 신경섬유다발 및 신경세포의 과립 공포변성 등을 특징으로 하며, 증상으로는 기억력 저하, 추상적 사고장애, 판단 및 충동조절장애 또는 인격의 변화 등을 보인다²⁾.

AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 amyloid β peptide(β A)의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것인데, β A는 amyloid precursor protein(APP)의 과다 생성으로 인해 APP 일부가 잘라져서 생성된다³⁾.

韓醫學的으로 痴呆는 ‘痴獸⁴⁾’, ‘呆病⁵⁾’, ‘健忘⁶⁾’ 등의 범주에 속하며, 明代 張⁴⁾의 《景岳全書·癡狂痴獸》에서는 “痴獸症, …… 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痴獸에 대해 최초로 기술되고 있으며 淸代의 陳⁷⁾ 등은痴呆와 유사한 개념으로 ‘呆病’에 대해 상세히 서술하고 있다.痴呆의 原因은 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷 등으로, 治法은 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다¹⁾.

却病延壽湯은 《醫學入門》⁸⁾에 “三子養親延壽加味補陰扶下弱”라고 처음으로 기술된 이래 《東醫寶鑑》⁹⁾에서는 노인 보양의 목적으로 却病延壽湯을 사용한다고 하였다. 增損白朮散 역시 《東醫寶鑑》⁹⁾에 却病延壽湯과 나란히 “保養衰老”에 사용할 수 있는 처방으로 제시되어 있다.

현재 가장 널리 사용되는 한약 제형은 탕제이지만 복용과 저장, 보관상의 불편함이 많아 새로운 제형의 개발이 요구되고 있는데¹⁰⁾, 특히 초미세 분말은 약제를 수십 μ m로 분쇄하여 분말로 만든 것으로, 약물의 흡수성, 안정성, 편리성 등에서 기존 제형에 비해 우수한 효과를 보였다는 연구¹¹⁾와

한약의 열수추출물과 초미세분말 제형이 choline 성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 연구¹²⁾가 보고 된 바 있다. 또한 AD에 효과를 보이는 약물 및 처방에 대한 실험적 연구^{13~17)}가 있었으나 却病延壽湯 및 增損白朮散에 대한 연구는 이루어 지지 않았다.

이에 저자는 補益精氣의 효능이 있는 却病延壽湯合增損白朮散은 年老體虛로 인한 치매에 효과가 있으리라 기대되어 열수추출물과 초미세분말 제형이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 lipopolysacchride(LPS)를 처리한 BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine mRNA 발현과 배양상층액에서 proinflammatory cytokine의 생성량을 관찰하였다. 또한 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 AD 병태 생쥐의 microglial cell에서의 IL-1 β , Tumor necrosis factor(TNF)- α 발현 및 뇌조직의 허혈상태 등을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

시약 중 Cholinesterase kit, Tris-HCl, NaCl, LPS, triphenyltetrazolium chloride(TTC), Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether), leupetin, N,N,N,N-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL- dithiothreito (DTT), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq. polymerase,

DNase, RNase, 그리고 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) 와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(USA) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품을 사용하였고, β -amyloid peptide(Calbiochem, USA), anti-CD14 (Pharmingen, USA), anti-mouse IgG-bead (Dyna, USA), anti-IL-1 β 와 anti-TNF- α (Pharmingen, USA), 그리고 anti-CD44-PE (Pharmingen, USA), anti-CD68-FITC (Pharmingen, USA), anti-CD11b-FITC (Pharmingen, USA), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab (1:4000, Amersham, USA)와 ECL-Hybond film (Amersham, USA) 및 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), 원심분리기(한일과학, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), histidin affinity column(Invitrogen, USA), Windows 1D main program (AAB, USA), stereotaxic frame(Adamec, USA), CELLection Pan anti-mouse IgG-bead (Dyna, USA), brain matrix(ASI instruments, Warren, USA), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(Molecular device, USA), CO2 incubator(Lepco, USA), Cytometry(BD, USA), Microscope(Nikon, Japan), Cooling microtome (Serotec., USA), VIDEOTRACK (animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France) 및 homogenizer(OMNI, USA) 등의 것을 사용하였다.

2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 암컷 C57BL/6생쥐와 BALB/c생쥐는 한국생명과학연구원에서 분양받

아 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 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 却病延壽湯合增損白朮散 (Gagbunyunsoo-tanghap zeungsonbakchul-san, GYZB)은 《東醫寶鑑》⁸⁾을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

4) 검액의 조제

(1) 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 분리 및 검액의 조제

却病延壽湯合增損白朮散 1첩 분량(34.4g)에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물(11.5g)을 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 575mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 제작 및 검액의 조제

초미세 분말의 제작과 입도분석은 (주)허브월드에서 실시·협조하였으며, 人參, 白朮, 白茯苓, 牛膝, 白芍藥, 陳皮, 藿香, 乾葛, 山查肉, 當歸, 甘草, 木香, 乾生薑 적당량을 세척 건조한 후, Pin mill을 이용하여 직경 1mm내외로 조분쇄한 다음, Turbo mill에서 비터(beater)회전속도 6,750rpm으로 분쇄하였다. 미분쇄된 시료를 공기분급장치에서 분급휠 속도(ACWS, air classifying wheel speed) 5,000~7,500rpm으로 공기 분급을 실시하

Table 1. Prescription of *Gagbunyunsoo-tanghap Zeungsonbakchul-san*(GYZB)

한약명	생 약 명	용 량(g)
人參	<i>Ginseng Radix</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	3
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	3
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	3
陳皮	<i>Aurantii Nobiliis Pericarpium</i>	3
藿香	<i>Pogostemonis Herba</i>	3
乾葛	<i>Puerariae Radix</i>	3
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhiae Radix</i>	2
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	1.2
乾生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	1.2
Total amount		34.4g

였다. 이와 같이 얻은 초미세분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 처방용량에 따라 혼합하여 575mg/kg의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) BV2 microglial cell line에서 Proinflammatory cytokine mRNA 발현에 대한 real time quantitative PCR 분석

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아, 24 wells plate에 2×10⁵세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM에서 배양한 후 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물(100 μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1μg/ml를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 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 혼합한 다음 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20μl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

Reverse transcription(RT) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10U/ μ l) 2U/tube를 37 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 반응한 후 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 가한 다음 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성 한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 Polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ Real Time Quantitative PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Proinflammatory cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time Quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2min 50 $^{\circ}$ C, 10min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles는 0.15min 95 $^{\circ}$ C, 1min 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 각 군의 Quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다.

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

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

사용된 primers는 다음과 같다.

① mouse G3PDH

Forward Primer:
5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'

Reverse Primer:
5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

② mouse IL-1 β

Forward Primer:
CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG

Reverse Primer:
GATCCACACTCTCCAGCTGCA

③ mouse IL-6

Forward Primer:
5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'

Reverse Primer:
5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

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

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1 \times 10⁵cells/ml) 하여 96 wells plate에 2 \times 10⁵ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 48시간 동안 CO₂ 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-6 생성량을 ELISA reader로 측정하였다. 각 well에 배양상층액을 100 μ l(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분

주하고 암소에서 30분간 방치한 후 $100\mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) βA 에 의한 AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

(1) AD 병태 생쥐 모델 제조

① βA (1~40)

βA 는 Calbiochem 회사에서 공급받아 AD 병태 생쥐모델을 만들었다.

② C57BL/6 생쥐 뇌의 Hippocampus에 βA 주입

βA ($10\mu\text{M}$)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정된 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. 그 다음 AD 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 βA ($10\mu\text{M}$)를 Hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽) 방향으로 1.2mm, midline에서 right로 0.7mm, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1mm로 microinjector의 injection speed $0.1\mu\text{l}/\text{min}$ 와 total volume $0.5\mu\text{l}$ 의 조건으로 수행하였다.

(2) AD 병태 생쥐 모델의 기억력 측정

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28°C 인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 일주일간 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하고, 선별된 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(cognex), 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 실험군($575\text{mg}/\text{kg}$)과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군($575\text{mg}/\text{kg}$)으로 분류하고, βA 를 주입한 다음 일주일간 1일 1회 platform에 오르는 훈련을 지속하였다. 그 후 8주간 1일 1회 해당 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

훈련과 약물투여 완료 후, 각 군의 생쥐를 water maze에 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 videotrack software로 분석하였다

4) AD 병태 생쥐의 뇌세포 분석

(1) Anti-CD14 단일항체로 생쥐 뇌의 microglial cell 분리

8주간의 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물($575\text{mg}/\text{kg}$)과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말($575\text{mg}/\text{kg}$) 투여가 종료된 생쥐의 두개골을 열고 뇌를 꺼낸 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. Brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640을 넣고 37°C CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리하여 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 PBS로 세척한 후 CELlection Pan anti-mouse IgG-bead로 미세아교세포를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-CD14+ 세포만 포집하였다.

(2) Microglial cell 내 proinflammatory cytokines 분석

포집한 미세아교세포를 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 $284\mu\text{l}$ 와 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- 1β 와 FITC-anti-TNF- α 를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell 내 IL- 1β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

(3) 뇌조직 내 CD68과 CD11b 세포수 분석

AD 유발 생쥐의 뇌조직을 잘게 chopping한 후 cell strainer(BD, Falcon)에 넣고 3ml syringe

rubber로 잘 문질러 뇌세포 부유액을 회수했다. Hypaque-1077 5ml과 뇌세포 부유액 5ml gradient를 만든 다음 2000rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 buffy coat 부분을 분리하여 2회 D-PBS로 세척하였다. 얻어진 부유액을 1% FBS의 FACS 완충용액에 넣어 뇌세포를 분리하였다. 분리된 뇌세포에 ACK용액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD68, FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b/CD68 세포수를 분석하였다.

5) β A에 의한 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직에서의 허혈상태 분석

AD 유발생쥐를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼내어 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2mm의 두께로 자른 후 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael의 방법¹⁸⁾으로 수행하였다. 허혈의 크기(AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진 상에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2mm)의 전체 면적. BH(brain hippocampus)는 뇌의 hippocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 %로 표현하였다. 즉 BH부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다.

3. 통계 분석

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

成績

1. BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-1 β mRNA 발현은 대조군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 정상군은 0.047(RQ)로 나타났으며, 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 0.747(RQ), 0.858(RQ), 0.894(RQ)로 나타났다(Fig 1).

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

BV2 microglial cell line에서 IL-6 mRNA 발현은 정상군이 0.202(RQ), 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 실험군은 각각 0.626(RQ), 0.704(RQ), 0.924(RQ)로 나타났다(Fig 2).

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

1) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 149.5±38.9(pg/ml), 대조군은 6283.0±1128.5(pg/ml)이었으며, 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 실험군은 각각 3931.5±316.1(pg/ml), 5993±657.6(pg/ml)로, 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig 3)

2) TNF- α 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 TNF- α 생성량은 정상군이 594.5±112.4(pg/ml), 대조군이 2850.5±447.6(pg/ml)이었으며, 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 실험군은 각각 1840.5±135.1(pg/ml), 2107±513.4(pg/ml)로, 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

3. β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 기억력 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Stop-through latency 측정에서, 정상군은 9.9 ± 5 (sec), 대조군은 62.9 ± 25.1 (sec)이었으며, cognex 투여군, 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물, 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군은 각각 25.3 ± 3.5 (sec), 23.5 ± 15.6 (sec), 15.5 ± 8.0 (sec)로 대조군에 비해 유의한 시간 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

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

Distance movement-through latency 측정에서, 정상군은 156.5 ± 133.8 (cm), 대조군은 706.8 ± 232.8 (cm)이었으며, cognex 투여군, 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물, 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군은 각각 233.9 ± 84.5 (cm), 336.2 ± 200.4

(cm), 200.5 ± 115.8 (cm)로 대조군에 비해 유의한 거리 단축을 보였으나, 각 실험군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

4. β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌세포에 대한 영향

1) Microglial cell에서의 IL-1 β 발현 억제 효과
microglial cell에서의 IL-1 β 의 발현을 관찰한 결과, 대조군에서 75.3 ± 10.5 (%), cognex 투여군에서 51.0 ± 9.3 (%), 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군에서 각각 57.0 ± 9.3 (%)와 41.4 ± 7.2 (%)로 대조군에 비하여 cognex 투여군과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군에서 유의한 감소를 보였다(Fig 7).

2) Microglial cell에서의 TNF- α 발현 억제 효과
microglial cell내에서의 TNF- α 의 발현을 관찰

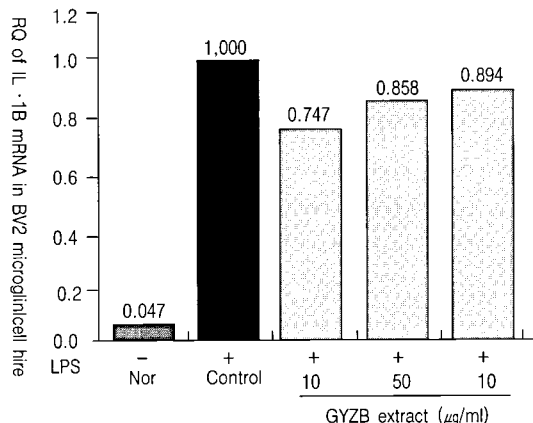


Fig. 1. Inhibitory effects of GYZB hot water extract on IL-1 β mRNA expression in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of GYZB hot water extract(100, 50, and 10μ g/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1μ g/ml) for 6hrs. IL-1 β mRNA synthesized was analyzed by real-time PCR. IL-1 β mRNA expression were measured real-time PCR. The amount of SYBR green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a applied biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

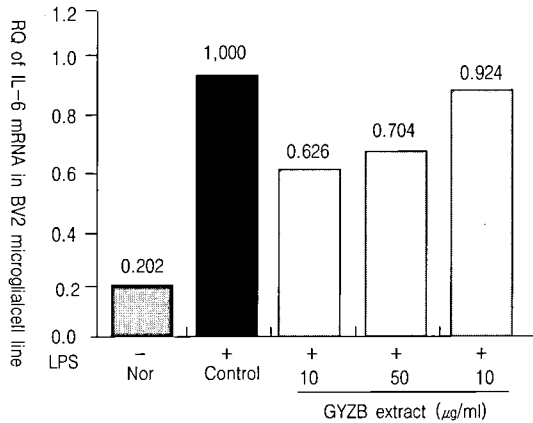


Fig. 2. Inhibitory effects of GYZB hot water extract on IL-6 mRNA expression in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of GYZB hot water extract(100, 50, and 10μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1μg/ml) for 6hrs. IL-6 mRNA synthesized was analyzed by real-time PCR. IL-1β mRNA expression were measured real-time PCR. The amount of SYBR green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a applied biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

한 결과, 대조군에서 86.8±6.5(%)이었고, cognex 투여군은 56.5±10.9(%) , 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분

말 실험군에서 각각 61.9±9.2(%)와 52.6±8.4(%)로 대조군에 비하여 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig 8).

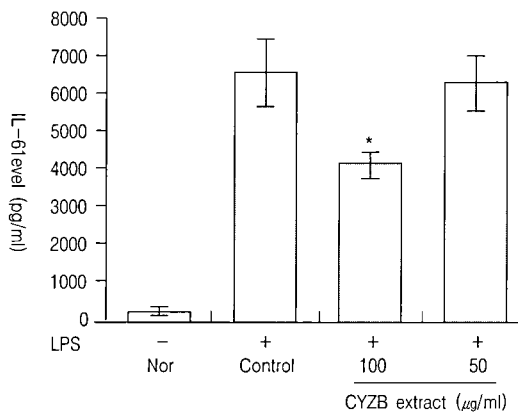


Fig. 3. Inhibitory effect of GYZB hot water extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of GYZB hot water extract(100, 50μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1μg/ml) for 6hrs. Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Data are represented as means±S.D. * Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and buncan's method(p<0.05).

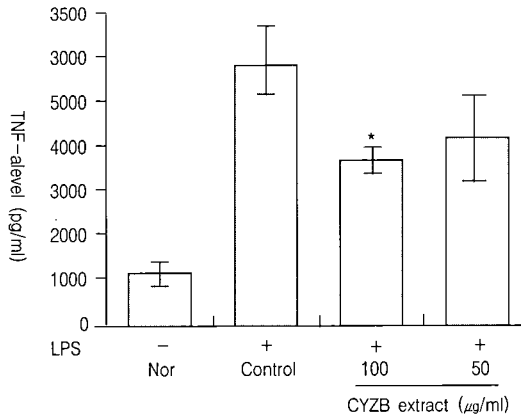


Fig. 4. Inhibitory effect of GYZB hot water extract on the TNF- α production in BV2 microglial cell line. BV2 microglial cells were treated with various concentrations of GYZB hot water extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hrs. Total TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Data are represented as means \pm S.D.
* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method($p < 0.05$).

3) 뇌조직에서의 CD68과 CD11b 발현 세포수에 미치는 영향
 생쥐의 뇌조직에서 CD68+/CD11b+가 발현되는 세포수를 관찰한 결과, 정상군은 3.3 \pm 1.1(%)이었고, 대조군은 44.0 \pm 6.7(%)였으나, cognex 투여군은 7.4 \pm 2.4(%)였고 却病延壽湯合增損白朮散 열수

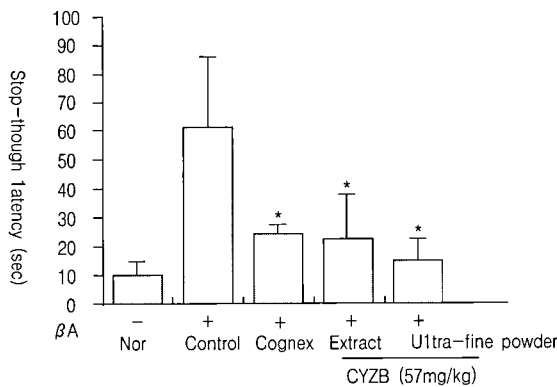


Fig. 5. Effects of GYZB hot water extract & ultra-fine powder on the memory Impairment of βA -induced alzheimer's mice in the stop-through type of Morris water maze test. C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk, then they were divided into each group and treated by βA . And the retention training was carried out once a day for 1wk. And then they were orally administered of GYZB hot water extract, GYZB ultra-fine powder or cognex. And the acquisition training trial was continued once a day for 8wks. When 8 weeks passed, the Stop-VIDEOTRACKING was initiated. Control, βA -induced alzheimer's mice; cognex(10mg/kg, p.o); GYZB hot water extract, and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o). Data represent means \pm S.D.

추출물 실험군은 28.7±5.7(%), 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군은 17.7±4.3(%로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 감소되었다(Fig 9).

5. β A로 유도된 AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈상태 및 조직손상에 미치는 효과

1) AD 병태 생쥐 모델의 허혈에 미치는 효과
AD 병태 생쥐 모델 뇌조직의 허혈 크기를 관찰한 결과, 대조군에서 허혈의 크기가 79.6±2.9 (%) 이었고, cognex 투여군은 45.7±20.1(%)였고, 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물, 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군은 각각 53.5±15.8 (%), 46.1±12.0(%)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig 10).

考 察

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해

흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군이다. 심장병, 암, 뇌졸중과 함께 4대 주요 사인으로 언급되는 중요한 기질성 장애로서 유병률이 65세 이상의 노년 인구에서 2.2~8.8%에 이르고 있다. 특히 치매의 중요한 유형인 Alzheimer's disease(AD)의 경우는 유병률이 1.6~15.3%로 보고되고 있고, 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되며 가족과 치매 환자와의 갈등 혹은 적절한 관리의 부재로 인하여 여러 가지 사회적 문제를 초래하는 질환이다¹⁾.

AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하며²⁾, 증상은 서서히 나타나며 경과가 일정하게 점진적으로 진행되는데, 초기에는 기억력 장애가 주증상이나 이후에는 주의력 결여, 지적 능력의 상실, 특히 기억력, 판단력, 추상적 사고, 기타 고유 피질기능의 장애와 인격 및 행동의 변화가

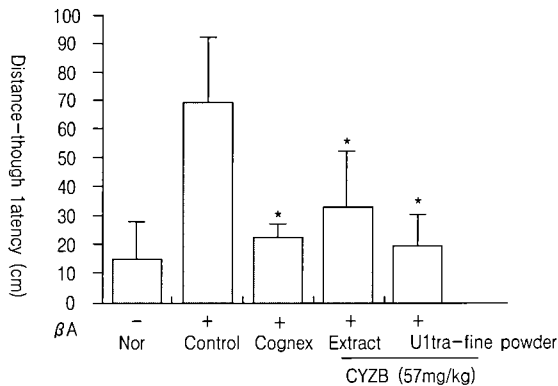


Fig. 6. Effects of GYZB hot water extract & ultra-fine powder on the memory Impairment of βA-induced Alzheimer's mice in the distance movement-through type of Morris water maze test.

C57BL/6 mice were trained once a day for 1wk, then they were divided into each group and treated by βA. And the retention training was carried out once a day for 1wk. And then they were orally administered of GYZB hot water extract, GYZB ultra-fine powder or cognex. And the acquisition training trial was continued once a day for 8wks. When 8 weeks passed, the distance movement-VIDEOTRACKING was initiated.

Control, βA-induced Alzheimer's mice; cognex(10mg/kg, p.o); GYZB hot water extract, and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o).

Data represent means±S.D.

* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

나타난다¹⁹⁾.

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 것이다³⁾.

큰 분자량의 APP가 잘라져서 β A가 생성되는데, APP는 다양한 molecular weight form이 있어, β A sequence를 포함한 amino acid의 수에 따라 APP695, APP751, APP770 등으로 나뉜다. 결국 β A는 β -secretase나 γ -secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로²⁰⁾ 일부가 잘라져서 비정상적인 공정과정을 거쳐 β A를 만드는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다²¹⁾.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 β A의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로, amyloid의 축적이 점차 커지면서 β A가 신경세포를 손상시켜 결국 치매의 증상이 나타나게 된다고 한다. β A는

그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉬운 상태가 됨으로써 치매의 증상이 유발되는 것이다²²⁾.

또 다른 AD의 원인에 대한 가설에는 뇌의 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이 있다²³⁾. 이는 물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응 등으로 인하여 blood-brain barrier(BBB)가 손상되면 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하여, 활성화된 astrocyte 및 microglial cell이 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 분비하여 뇌에서의 cytokine 항상성이 파괴되고, 중추신경계에 염증반응이 일어나며, 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다는 가설로, 최근 활발한 연구가 이루어지고 있다²⁴⁾.

특히 β A가 침적된 노인반 주변의 microglial cell은 β A에 의해 활성화되어 IL-1 β , TNF- α 등의

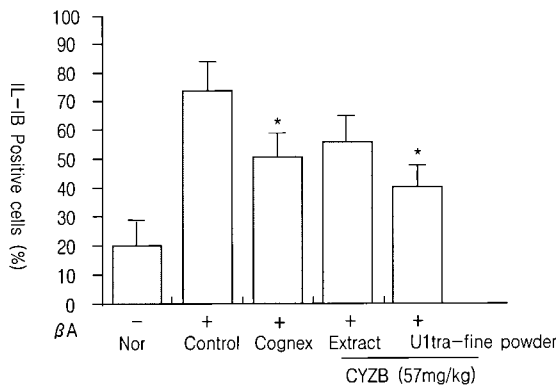


Fig. 7. Effects of GYZB hot water extract & ultra-fine powder on IL-1 β activity on the microglial cell in β A-induced Alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were orally administered of GYZB hot water extract, and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o) and cognex(10mg/kg, p.o) for 8wks. IL-1 β activity measured by FACS calibur, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to β A-induced Alzheimer's disease model.

Data represent means \pm S.D.

* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

proinflammatory cytokine을 생성함으로써 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾.

또한 뇌의 허혈상태 역시 AD의 원인도 될 수 있다는 연구결과가 있다. 즉 AD의 신경병리적 발생은 β A 펩타이드에 대한 신경학적 취약성을 증가시키는 최초의 허혈성 신경변화와 혈청 매개의 β A 펩타이드가 뇌 조직으로의 누출되는 것을 동반한 BBB의 허혈성 붕괴, 결국 아밀로이드 판의 형성이 되는 β A 펩타이드 의존성 독성의 활성을 수반하여 결국에는 AD가 발생하게 된다고 한다²⁶⁾.

한편, microglial cell의 가장 특징적인 표식자로 CD68, CD11b가 있는데, AD 환자에서는 GFAP, CD68, CD11b가 증가하는 경향을 보인다. 이는 신경교세포인 astrocyte나 microglial cell이 활성화된다는 것을 의미하고 이는 노인반 형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다²⁷⁾.

韓醫學的으로 痴呆는 ‘痴獸⁴⁾’, ‘呆病⁵⁾’, ‘健忘⁶⁾’ 등의 범주에 속하며, 明代 張⁴⁾의 《景岳全書·癡狂痴獸》에서는 “痴獸症, …… 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 痴獸에 대해 최초로 기술하고 있으며 清代의 陳⁷⁾ 등은 치매와 유사한 개념으로 ‘呆病’에 대해 상세히 서술하고 있다. 痴呆의 原因으로는 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷 등이 주로 거론되며, 治法으로는 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 清熱解毒, 益氣養血 등으로 구분할 수 있다¹⁾.

却病延壽湯은 《醫學入門·雜病分類(下)·虛類》⁸⁾에 “三子養親延壽加味補陰扶下弱”라고 처음으로 기술된 이래 《東醫寶鑑·內經篇·身形門》⁹⁾에서도 노인 보양의 목적으로 却病延壽湯을 사용한다고 하였다. 增損白朮散 역시 《東醫寶鑑·內經篇·身形門》⁹⁾에 却病延壽湯과 나란히 “保養衰老”라 하여 노인 보양의 목적으로 소개되고 있다. 따라서 益氣養血의 효과가 뛰어난 却病延壽湯合增損白朮散은 氣血虧虛로 인한 치매에 효과가 있으리라 기대되어 본 실험을 구성하게 되었다.

현재 약물의 제형에 있어서는 탕제와 열수추출물 제제를 주로 이용하고 있는데, 탕제는 약을 달

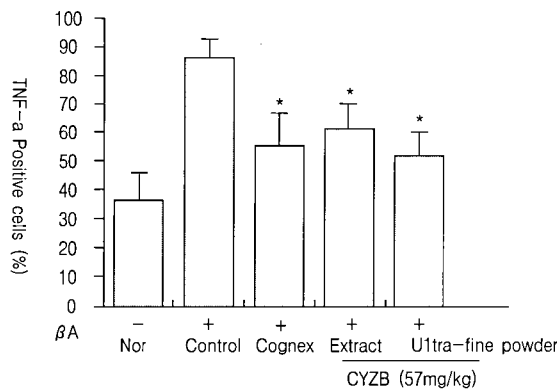


Fig. 8. Effects of GYZB hot water extract & ultra-fine powder on TNF- α activity on the microglial cell in β A-induced Alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were orally administered of GYZB hot water extract, and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o) and cognex(10mg/kg, p.o) for 8wks. TNF- α activity measured by FACS calibur, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to β A-induced Alzheimer's disease model.

Data represent means \pm S.D.

* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

이는 것과 휴대하기 불편하다는 점, 당제의 기미가 불쾌할 수 있다는 점이 단점이고, 열수추출물 제제는 약효가 낮을 것 같다는 점과 효과가 느리다는 점이 단점으로 지적되고 있다¹⁰⁾.

한편, 최근 초미세 분쇄 기술이 한약제형에 응용하여 활용되고 있으며 초미세 분말 제형이 약물 생체이용률, 약리 기작, 약의 경량화 등에서 우수하다는 연구결과가 있고¹¹⁾, 한약의 열수추출물과 초미세분말 제형이 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력 감퇴에 대한 예방과 치료제로 응용할 수 있다는 실험 결과¹²⁾가 보고되었으나, 연구 성과는 부족한 실정이다.

이에 저자는 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 초미세분말 제형의 AD에 대한 효과를 실험적으로 규명하고자 LPS를 처리한 BV2 microglial cell에서 IL-1 β , IL-6 의 mRNA 발현과 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6, TNF- α 의 생성을 관찰하였다. 또한 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 및 초미세분말을 시료로 β A로

유도된 AD 病態 생쥐의 행동변화를 Morris water maze를 통해 측정하였으며, 역시 β A로 유도된 AD 病態 생쥐의 뇌세포를 분석하여 microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 발현과 뇌조직에서의 CD68과 CD11b의 발현 세포수와 뇌조직의 허혈 상태를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Microglial cell은 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌손상 및 외부로부터 이물질의 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형되는데, microglial cell의 활성화는 AD와 파킨슨병과 같은 신경사멸 질환의 개시와 진행에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

Microglial cell을 활성화시키는 가장 효과적인 물질로는 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소 LPS가 있는데, LPS는 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시켜 IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine

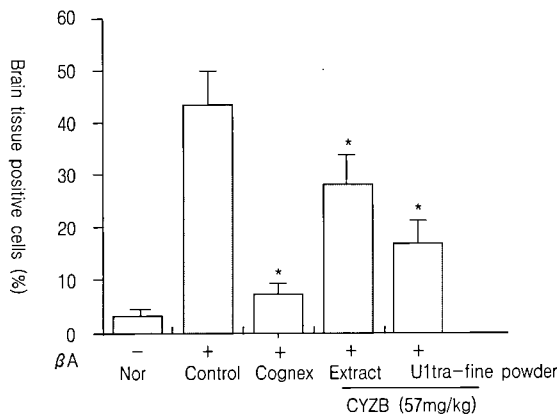


Fig. 9. Effects of GYZB hot water extract & ultra-fine powder on the CD68 and CD11b gated cells on the brain tissue in β A-induced Alzheimer disease mouse model.

C57BL/6 mice were orally administered of GYZB hot water extract and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o) and cognex(10mg/kg, p.o) for 8wks. Number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the other groups were submitted during the stereotaxic procedures to β A-induced Alzheimer's disease model. CD68/CD11b cell population(%) were measured by analyzed by flow cytometer.

Data represent means \pm S.D.

* Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(p<0.05).

과 NO 등의 oxidants를 생산, 분비하도록 하고 염증 및 면역반응을 일으킨다²⁹⁾.

이와 같은 관점에서 BV2 microglial cell line에 LPS를 처리한 후, 각각 다른 농도의 却病延壽湯合增損白朮散의 열수추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6의 mRNA의 발현이 억제되었다(Fig 1, 2).

또한 BV2 microglial cell line의 배양상층액에서 IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정된 결과 IL-6와 TNF- α 의 생성량은 却病延壽湯合增損白朮散 100 μ g/ml 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3, 4).

이상의 결과로 却病延壽湯合增損白朮散은 proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 판단된다.

Morris water maze 과제는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물

이 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것으로³⁰⁾, 이 방법을 이용하여 β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대한 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 및 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말의 기억력 감퇴 억제효과를 측정하였다.

Morris water maze를 이용하여 stop-through latency와 distance movement-through latency를 관찰하였는데, stop-through latency와 distance movement-through latency 모두에서 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 및 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군이 모두 대조군에 비해 유의성 있는 시간과 거리의 단축을 보였으나, 각 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 5, 6).

이상의 결과로 却病延壽湯合增損白朮散은 기억력 감퇴에 대한 억제효과가 있어 AD의 기억력 감퇴에 대한 치료제로써 활용할 수 있다고 판단된다.

β A로 유도된 AD 병태 생쥐 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine의 일종인 IL-1 β , TNF- α 발현을 관찰한 결과, 정상군에 대해 β A를 뇌에 주입한 대조군에서는 발현이 증가되었으나 실

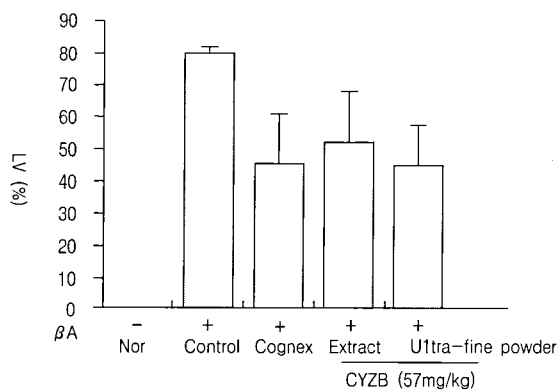


Fig. 10. Effects of GYZB hot water extract and GYZB ultra-fine powder on the infarct size of β A-induced Alzheimer's mice brain.

C57BL/6 mice were orally administered of GYZB hot water extract and GYZB ultra-fine powder(575mg/kg, p.o) and cognex(10mg/kg, p.o) for 8wks. Cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride and then expressed as the LV myocardium that was at risk(a percentage of the total area). Data represent means \pm S.D.

혈군 모두에서 발현이 감소했고, 특히 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 실험군에서는 TNF- α 의 발현이 유의성 있게 억제되었고, 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군에서는 IL-1 β 와 TNF- α 발현이 모두 유의성 있게 억제되었다(Fig 7, 8).

본 실험에서는 AD 유발 생쥐의 병변부분을 생검하여 뇌세포를 단일세포로 분리한 후 유세포 형광분석기로 CD68과 CD11b를 관찰하였는데, 대조군의 CD68+/CD11b+의 세포수는 44.0 \pm 6.7(%), cognex 실험군은 7.4 \pm 3.3(%)였고 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물 실험군의 CD68+/CD11b+의 세포수는 28.7 \pm 5.7(%), 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군의 CD68+/CD11b+의 세포수는 17.71 \pm 4.3(%)로 열수추출물, 초미세분말 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보여 却病延壽湯合增損白朮散의 투여로 microglial cell 이 감소했음을 알 수 있다(Fig 9).

AD 병태 생쥐 뇌조직의 허혈크기를 관찰한 결과, 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물, 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말 실험군은 대조군에 비하여 허혈의 크기가 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig 10).

이는 却病延壽湯合增損白朮散이 뇌 허혈로 인한 신경세포와 조직의 손상을 억제하는 효과가 있어 허혈과 관련된 AD의 기전을 억제할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있겠다.

이상의 내용을 총괄해 보면 却病延壽湯合增損白朮散은 BV2 microglial cell line에서 IL-1 β , IL-6의 proinflammatory cytokine의 mRNA 발현을 억제하고, BV2 microglial cell line 세포배양액에서 IL-6, TNF- α 의 생성량을 감소시켰으며, β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency에서 기억력 개선효과를 나타냈고, β A로 유도된 AD 병태 생쥐의 microglial cell에서 IL-1 β , TNF- α 의 발현을 억제하였고, 뇌조직에서의 CD68

과 CD11b 발현 세포수를 감소시켰으며, 뇌조직의 허혈상태를 감소시키는 것으로 나타났다.

却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 초미세분말의 효과를 비교해 보면, β A로 유도된 AD 병태 생쥐에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency 및 distance-through latency에서 기억력 감퇴개선효과, microglial cell에서 TNF- α 의 발현 억제, 뇌조직에서의 CD68과 CD11b 발현 세포수 감소에 있어 모두 유의한 효과를 나타냈으나 제형별 차이는 없었다. 다만 대부분의 결과에서 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물에 비해 초미세분말이 더 좋은 효과를 보였다.

따라서 却病延壽湯合增損白朮散은 microglial cell의 proinflammatory cytokines의 과잉 발현과 β A 과잉으로 유발된 AD에 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 초미세분말 제형의 정확한 기전과 새로운 제형의 개발 및 치매에 대한 임상 연구 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

結 論

却病延壽湯合增損白朮散이 β A로 유도된 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물은 BV2 microglial cell line의 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 억제시켰다.

2. 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물은 100 μ g/ml 실험군에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 IL-6, TNF- α 의 생성을 유의성있게 감소시켰다.

3. 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 초미세분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다.

4. 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말은 β A

로 유도된 AD 병태 생쥐의 뇌조직에서의 세포 내 IL-1 β , TNF- α 의 발현을 유의성 있게 억제하였고, 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물은 TNF- α 의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

5. 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 초미세분말은 AD 병변 뇌조직의 허혈 상태를 유의성 있게 개선하였고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 却病延壽湯合增損白朮散 열수추출물과 却病延壽湯合增損白朮散 초미세분말은 AD 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 제형에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

- 대한한방신경정신과학회편 : 한방신경정신의학, 서울, 집문당, pp.311~316, 2005.
- 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216~228, 1988.
- 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.
- 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610~611, 1978.
- 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990.
- 洪元植 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, p.37, 124, 196, 229, pp.217~218, p.229, 1985.
- 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
- 李梴 : 原本編註醫學入門(下), 서울, 南山堂, p.2105, 1991.
- 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, p.23, 1992.
- 최현정, 방나영, 송보완, 김남재, 류봉하 : 한약제형 선호도에 관한 설문조사, *경희의학*, 20(1):356~367, 2004.
- Song LL, Du GJ, Fan BY, Zhang DL : Study on pharmacology of ultra-fine particles compound *Rehmannia*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 27(6):436~439, 2002.
- 최강욱, 이상룡, 정인철 : 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향, *동의생리병리학회지*, 20(5):1200~1210, 2006.
- 배재용, 정인철, 이상룡 : 馬尾連이 Alzheimer Disease 病態 모델에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 18(1):63~78, 2007.
- 박지운, 정인철, 이상룡 : 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT 105와 β A로 유도된 Alzheimer Disease 病態 모델에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 17(1):37~58, 2006.
- 하수영, 정인철, 이상룡 : 聰明湯과 山查聰明湯이 Alzheimer Disease 病態 모델에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 17(1):59~78, 2006.
- 김명진, 정인철, 이상룡 : 木瓜가 CT105와 β A로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響, *동의신경정신과학회지*, 16(1):97~117, 2005.
- 최병만, 정인철, 이상룡 : 木槿皮가 CT105와 β A로 유도된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 15(1):119~139, 2004.
- 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.
- 민성길 : 최신정신의학, 일조각, pp.189~200, 611~612, 2004.
- 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*, 274(49):34584~34589, 1999.
 24. 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.
 25. 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):1017~1025, 2000.
 26. Pluta R.: Is the ischemic blood-brain barrier insufficiency responsible for full-blown Alzheimer's disease, *Neurol Res*, 28(6):665~671, 2006.
 27. 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.
 28. 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):2659~2667, 1993.
 29. Woo MS et al. : Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyl-cAMP in BV2 microglial cells, *Molecular Brain Research*, 113(1~2):86~96, 2003.
 30. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I : FR121196, a potential antimentia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1):256~263, 1995.