

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 13 No. 1, 2002

山査肉이 CT105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響

채종걸 · 정인철 · 이상룡
대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effects of *Crataegus pinnatifida* BGE. var. *major* N.E. BR(CPVM) Extract on the the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105

Jonggul Chae, Inchul Jung, Sangryong Lee

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

Abstract

This research investigates the effect of the *Crataegus pinnatifida* BGE. var. *major* N.E. BR(CPVM) on Alzheimer's disease.

Specifically, the effects of the DYHT extract on (1) IL-1 β , IL-6, amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), and glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cells treated with CT105; (2) the AChE activity and the APP production of PC-12 cell treated with CT105; (3) the behavior; and (4) expression of IL-1 β , TNF- α , reactive oxygen species(ROS), nitrite oxide(NO); and (5) the infarction area of the hippocampus, and brain tissue injury in Alzheimer's diseased mice induced with CT105 were investigated.

The results are as follow.

1. The CPVM extract suppressed the expression of IL-1 β , IL-6, APP, AChE, and GFAP mRNA in PC-12 cells treated with CT105.
2. The CPVM extract suppressed the AChE activity and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT105.
3. The CPVM extract group showed a significant inhibitory effect on the memory deficit for the mice with Alzheimer's disease induced by CT105 in the Morris water maze experiment.
4. The CPVM extract suppressed the over-expression of IL-1 β , TNF- α , ROS and NO in the mice with Alzheimer's disease induced by CT105.
5. The CPVM extract reduced the infarction area of hippocampus, and controlled the injury of brain tissue in the mice with Alzheimer's disease induced by CT105.

These results suggest that the CPVM extract may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key word : CT105, *Crataegus pinnatifida* BGE. var. *major* N.E. BR(CPVM ; 山査肉), Alzheimer's disease, amyloid precursor proteins(APP), cytokine, acetylcholinesterase(AChE).

緒 論

Alzheimer's disease(AD)는 痴呆의 원인질환 중 높은 비율을 차지하는 질환으로^{1,2)}, 腦의 全般의 萎縮, 特有的 組織學的 所見과 함께^{1,3)}, 주위에 대한 無關心, 自發性 缺如, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緒 不安定, 無言, 無反應, 大小便失禁 등의 症狀를 보인다^{1,2,4)}.

다양하게 제기되고 있는 AD의 유발 기전 중, 대표적인 것으로 amyloid precursor proteins (APP)의 과다로 인한 amyloid β protein(A β)의 과량 침적으로 생기는 老人癥(senile plaques)이 神經細胞에 神經毒性을 나타냄으로써 神經細胞의 破壞가 일어난다는 가설과^{5,6)}, 물리적인 腦損傷, 感染 및 기타 炎症反應에 의해 활성화된 腦內的 神經膠細胞인 microglial cell과 astrocyte들이 IL-1, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine을 과다하게 발현하여 中樞神經系의 炎症反應을 유발되고 이것이 細胞毒性을 일으킨다는 가설 등이 있다^{7,8)}.

한편, AD의 主症狀 중 하나인 記憶力 감퇴는 choline성 神經細胞의 퇴화에 의한 acetylcholine의 부족 때문에 생각되고 있으며 이 과정은 acetylcholine의 分解酵素인 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 더욱 심화된다^{9,10)}.

韓醫學의 으로 痴呆는 痴呆¹¹⁾, 呆病^{12,13)}, 健忘¹⁴⁾ 등의 範疇에 屬하고 原因은 痰飲, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등^{11-13,15,16)}인데, 특히 現代 中醫學에서도 氣滯血瘀와 痰飲停滯를 痴呆의 重要한 原因 중 하나로 보고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

山査肉은 薔薇科에 속한 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로, 健脾行氣, 化痰化瘀, 消食積, 瘀血로 인한 痛症 치료에 效能이 있어^{18,19)}, 氣滯血瘀, 痰飲停滯 등의 原因으로 惹起되는 痴呆에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

최근 들어 韓醫學界에는 痴呆, 記憶障礙 등과 關聯된 多數의 研究²⁰⁻²⁹⁾와 山査肉에 대한 研究^{30,31)}가 發表되었으나 아직 山査肉이 AD의 機轉과 關聯된 各種 生化學的 變化 및 行動 樣態에 미치는 影響에 대한 研究는 接하지 못하였다.

이에 저자는 山査肉이 AD에 미치는 影響을 실험적으로 규명하고자 山査肉을 試料로 하여 mouse lung fibroblast cells(mLFC)와 PC-12 cell에 대한 細胞毒性을 측정한 후 carboxyl terminal fragment(CT105)를 處理한 PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6, APP, AChE, glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA 발현과 PC-12 cell에서의 AChE의 활성, APP의 발현을 관찰하였고, CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 行動變化를 측정하였으며, 역시 CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 proinflammatory cytokine의 발현, reactive oxygen species(ROS), 血清內 nitric oxide(NO)의 생성을 관찰하였고 또한 腦組織의 虛血狀態 및 組織損傷의 變化를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

1) 動物

180~300g Sprague Dawley(SD)계 雌性白鼠를 대한실험동물센터에서 공급받아 사용하였고, 6주령의 International Cancer Research(ICR)계 생쥐와 20g, 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 동물은 실험실 환경(온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux)에 2주일간 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 사료는 고탄사료(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 Co., Korea)를, 식수는 정제수를 자유로이 섭취케 하였다.

2) 藥 材

실험에 사용된 藥材는 山査肉(*Crataegus pinnatifida* BGE. var. *major* N.E. BR ; CPVM)으로, 大田大學校韓方病院에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 檢液의 調製

山査肉 200g을 깨끗이 씻어 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 첨가하였다. 3시간 가열 추출하고 여과지를 이용하여 침전물을 여과한 후, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -84℃ deep freezer(Sanyo Co., Japan)에서 4시간 동안 방치하고 24시간 동안 freeze dryer(Eyela Co., Japan)로 동결건조하여 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

4) 試藥 및 機器

시약 중 AChE diagnostic kits, scopolamine, Tris-HCl, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol (DTT), leupetin, diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, Hank's balance salt solution(HBSS), triphenyltetrazolium chloride는 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 Takaras사(Japan) 제품을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzol^B는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, rIL-1 β (Pharmingen, U.S.A.), anti-human APP N-terminal antibody(Boehringer Mannheim, Canada), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab(Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

기기는 원심분리기 (한일과학, Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator(녹십자, Korea), Minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.),

rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Swiss), Bio-freezer(Sanyo Co., Japan), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama Co., Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), roller mixer(Gowon Scientific Technology Co., Korea), vortex(비전과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.), Windows ID main program(AAB, U.S.A.), VIDEOTRACK (Viewpoint, France), stereotaxic frame(Stoelting Co., U.S.A.), histidin affinity column(Invitrogen, U.S.A.), Primus 96 Legal PCR system(MWG, Germany), 자동생화학분석기(Ciba-Corning Co., U.S.A.), brain matrix (ASI instruments, Warren, ML, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 方 法

1) PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

(1) mLFC와 PC-12 cell의 배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1400rpm으로 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37℃, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm으로 원심분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분이하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12 cell(ATCC, CRL1721)은 白鼠의 pheochromocytoma로부터 유래된 cell로, DMEM에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin(100U/ml), streptomycin(100 μ g/ml) 그리고 gentamycin(10 μ g/ml)이 함유된 배양액을 넣어 37℃, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양하였다.

(2) Recombinant carboxyl-terminal fragment (CT105) 複製

CT105를 *E. coli*에서 발현 정제하기 위해 APP 105 amino acid를 coding하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 *Bam* HI site를 넣어주었다. PC-12 cell을 lipopolysaccharide(LPS)로 자극하고 mRNA를 추출하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다(Fig. 1). 증폭된 절편을 *Bam* HI로 절단하여 insert를 취해 6×his·tag을 갖는 pRSET B vector의 *Bam* HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 *E. coli* BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 *E. coli*를 획득하였다. 이 *E. coli*는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터뜨린 후 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질에서 histidin affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT105를 얻었다.

(3) 細胞毒性(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정은 SRB assay를 약간 변형하여 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell을 2.0×10^4 개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37°C, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 山査肉 추출물(최종농도 400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)과 CT105(최종농도 80µM, 40µM, 20µM, 10µM, 5µM, 1µM)를 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid 50µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음, well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음, 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate

shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) PC-12 cell의 proinflammatory cytokine 및 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 측정

(1) mRNA 추출

PC-12 cell을 24 wells plate에 1×10^6 세포로 각 well에 분주하고, 山査肉 추출물(100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 처리하고 1시간 후 CT105(20µM)와 rIL-1β(100ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 배양하고 2000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. RNAzol^B를 이용하여 PC-12 cell 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 mRNA는 DEPC를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(2) cDNA 제조

Reverse transcription 반응은 준비된 total mRNA 3µg을 75°C에서 5분 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(200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC가 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20µl가 되도록 하였다. 이 20µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction에 사용하였다.

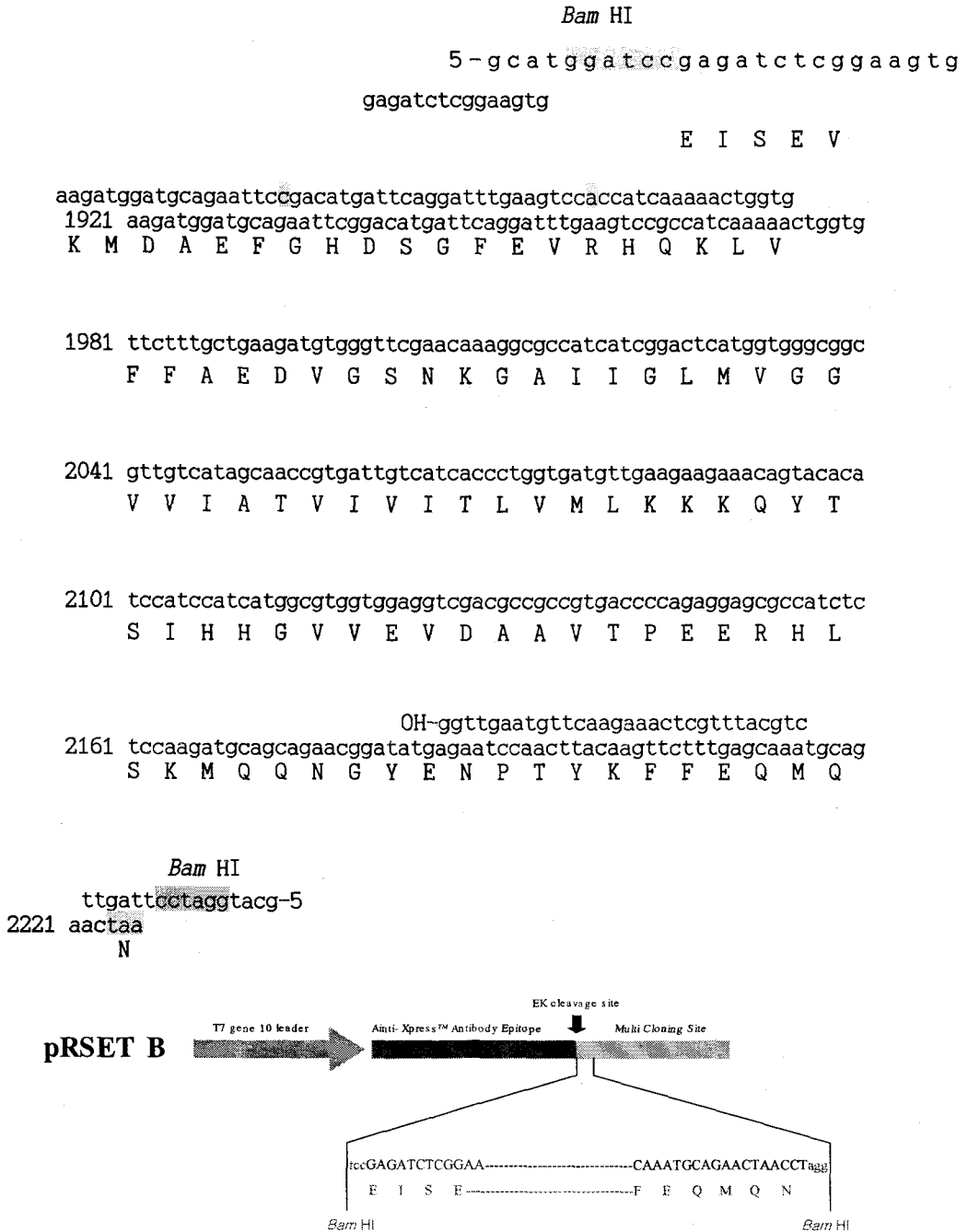


Fig. 1. Construction of pRSET-CT105.

(3) cDNA PCR

PCR은 항온 수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1 β , IL-6, APP, AChE, GFAP 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/ μ l)와 antisense primer(20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq. polymerase(5U/ μ l)를 첨가한 다음, 최종부피가 30 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95 $^{\circ}$ C, 5분), denaturation(95 $^{\circ}$ C), annealing(55 $^{\circ}$ C, 1분), elongation(72 $^{\circ}$ C, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기配列은 다음과 같다.

Ⓐ rat IL-1 β

sence oligonucleotide :

5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'

antisense oligonucleotide :

5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3'

Ⓑ rat IL-6

sence oligonucleotide :

5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTG-3'

antisense oligonucleotide :

5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

Ⓒ rat APP

sence oligonucleotide :

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisense oligonucleotide :

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

Ⓓ rat AChE

sence oligonucleotide :

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisense oligonucleotide :

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

Ⓔ rat GFAP

sence oligonucleotide :

5'-GAGCAGCTGGCCCAGCAGCAG-3'

antisense oligonucleotide :

5'-CTTGAGGTGGCCTTCTGACAC-3'

Ⓕ rat G3PDH

sence oligonucleotide :

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisense oligonucleotide :

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

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

3) PC-12 cell에서의 AChE activity와 APP 발현 측정

(1) 단백질 추출

PC-12 cell에 山査肉 추출물(100 μ g/ml)과 CT105, rIL-1 β 를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 山査肉 추출물(100 μ g/ml)과 CT105, rIL-1 β 를 동시 배양한 후 3회 D-PBS로 세포를 수세한 후 세포 lysate를 얻어 Western blot 실험에 사용하였다.

세포 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 완충용액(Tris-HCl(200mM; pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 μ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포 lysate를 얻어 Bradford법으로 단백질을 정량하여 50 μ g로 조정하였다.

(2) AChE activity 측정

細胞 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml와 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml

water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Western blot을 통한 APP 분석

세포 lysate(50µg)를 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동 분리한 후 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking한 후, anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4℃에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

4) AD 病態 생쥐모델에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과 측정

(1) 생쥐 腦內 CT105 투여

재조합 CT105(10µM)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame에 고정된 후 생쥐 뇌의 피부를 박리하였다. AD 病態 생쥐 모델을 만들기 위하여 재조합 CT105(10µM)를 Hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma에서 caudal로 1.2mm, midline에서 right로 0.7mm, 그리고 표면에서 깊이 1.1mm로, microinjector의 injection speed 0.1µl/min와 total volume 0.5µl의 조건으로 수행하였다. CT105 투여가 끝난 생쥐 모델은 피부를 봉합하고 2주일 후, tacrine 投與群(10mg/kg)과 山査肉 投與群(500mg/kg)으로 구분하여 30일 동안 1일 1회 경구투여를 실시하였다.

(2) AD 病態 생쥐모델의 記憶力 측정

AD 病態 생쥐모델을 4주일간 山査肉을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1일 1회 반복 학습 훈련을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온

이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 群으로 하여 對照群, tacrine 投與群(10mg/kg), 山査肉 投與群(500mg/kg)으로 분류하고 계속 30일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

훈련과 약물 투여가 종료되고 2주와 4주후 AD 病態 생쥐모델 한 마리씩을 Morris water maze에 넣고 VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system)으로 행동을 관찰하였고 그 결과를 videotrack software로 분석하였다.

5) AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS, NO 분석

(1) Anti-CD14 單一抗體를 이용한 생쥐 腦內 microglial cell 분리

30일간의 山査肉(500mg/kg) 투여가 종료된 생쥐 모델의 두개골을 열고 뇌를 적출한 다음 2회 D-PBS로 세척하였다. 뇌를 작은 조각으로 절단한 후 conical tube에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37℃, 5% 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. 다시 3회 D-PBS로 세척하고 CELlection™ Pan Mouse IgG Dynabeads로 CD14⁺ cell을 분리하고 cell release buffer로 microglial cell만 포집하였다.

(2) Microglial cell내 inflammatory cytokine의 염색과 측정

포집한 microglial cell을 ice-cold FACS 완충 용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)

으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 250 μ l와 동량의 인산 완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 cell을 다시 ice-cold FACS 완충용액으로 水洗하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1 β 와 FITC-anti-TNF- α 와 함께 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 다시 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 cell을 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포형광분석기로 microglial cell내 발현된 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

(3) ROS 분석

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

(4) NO 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A(0.2% Naphthyl ethylene diamine dihydrochloride in D.W)와 용액 B(2% Sulfonylamide in 5% H₃PO₄)를 미리 제조하고 냉암소에 보관하였다가 사용 직전에 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 30일간 山査肉(500mg/kg)을 투여하고 AD 病態 생쥐모델을 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 분리된 血清 100 μ l를 96 wells plate에 분주하고, Griess 시약 100 μ l를 가한 후 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) AD 病態 생쥐모델 腦組織에서 虛血狀態 및 組織損傷에 미치는 영향 측정

(1) 腦組織의 虛血 면적 측정

AD 病態 생쥐모델을 마취시키고 후두부에서

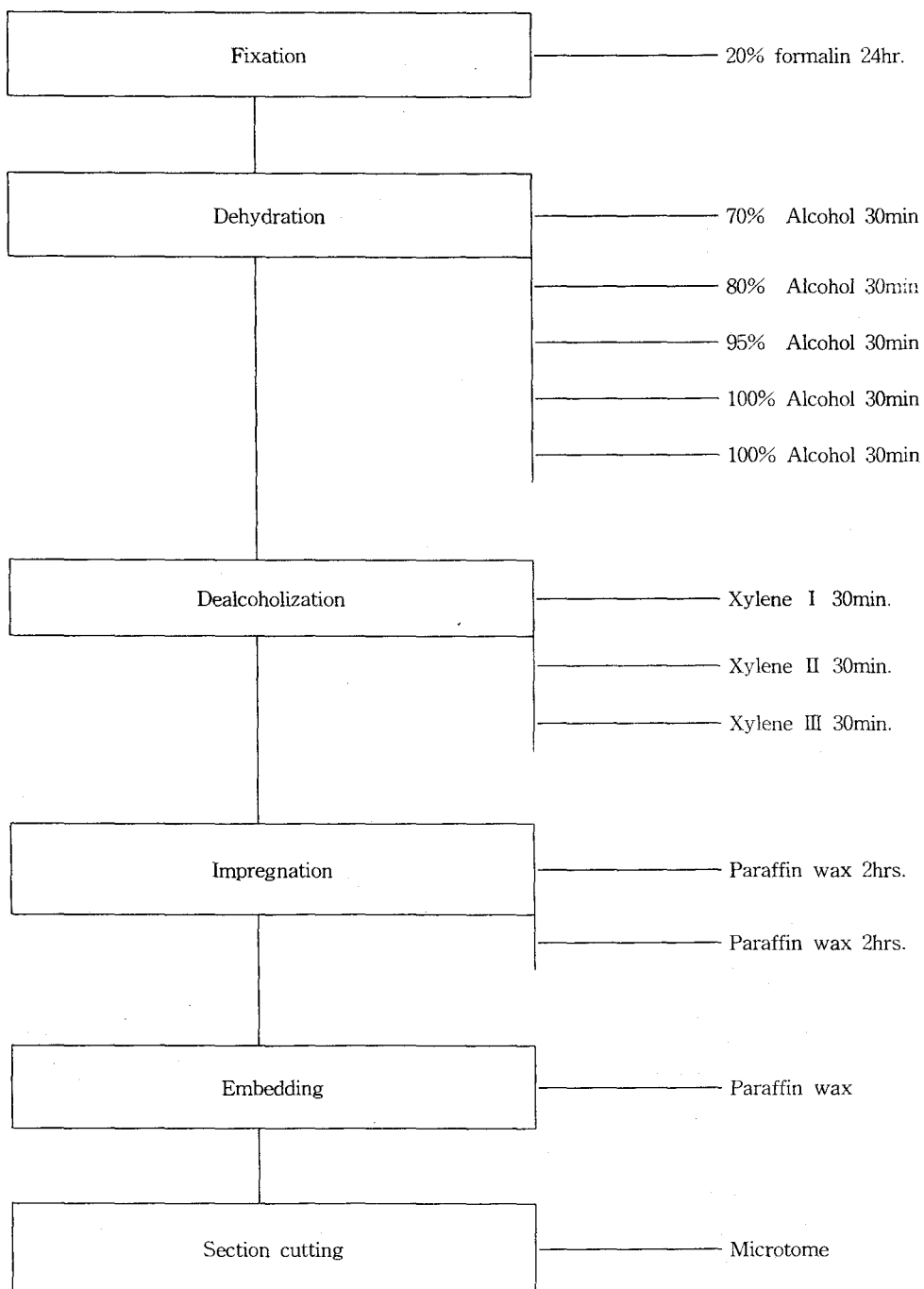
전두부 방향으로 두개를 열어 뇌를 꺼내어 생리 식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2mm의 두께로 자르고 2% triphenyltetrazolium chloride(TTC) 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈상태의 조직은 염색이 되지 않는다. 허혈 크기의 측정은 Michael³²⁾의 방법으로 수행하였다. A는 사진상에 나타난 허혈 면적, ST는 section(2mm)의 전체 면적, BH는 뇌의 hippocampus 부분이고, 허혈의 면적(AT)은 [(A₁ × ST₁)+(A₂ × ST₂)+(A₃ × ST₃)+(A₄ × ST₄)]이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 risk 부위의 면적에 대한 percent로 하였다.

즉 BH(brain Hippocampus) 부위의 허혈 면적은 (AT of area at risk/ST of BH)×100으로 분석하였다.

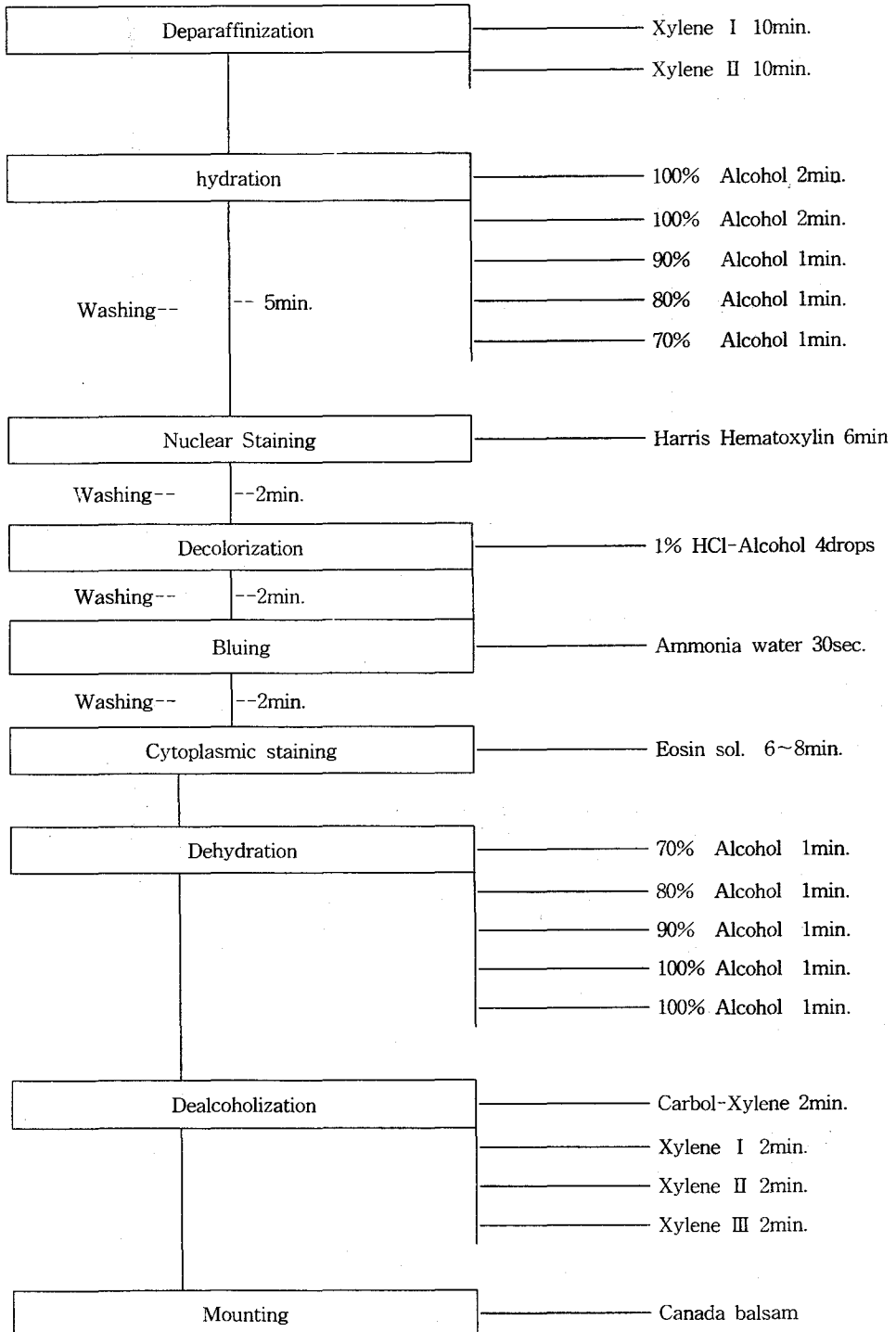
(2) 病理組織 관찰

분리된 AD 病態 생쥐모델의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정하여 세절하고 흐르는 물에 8시간 동안 수세한 다음, 아래의 Scheme 1과 같은 과정을 시행하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxyline & eosin 일반염색을 실시하고 광학현미경상에서 관찰하였다.

Scheme 1. Tissue Processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining



7) 統計 분석

실험에서 얻은 결과는 student's t-test³³⁾를 이용하여 통계 처리하였고, p<0.05 수준에서 有意性を 검정하였다.

成績

1. PC-12 cell에 대한 細胞毒性

1) mLFC과 PC-12 cell에 대한 山査肉의 細胞毒性

山査肉의 細胞毒性을 관찰한 결과, mLFC의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 이하의 山査肉 投與群은 變化가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 85 \pm 3.9(%), 88 \pm 2.8(%로 감소되었으며, PC-12 cell의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 이하의 山査肉 投與群은 變化가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 81 \pm 3.4(%), 85 \pm 5.2(%로 감소되었다(Fig. 2).

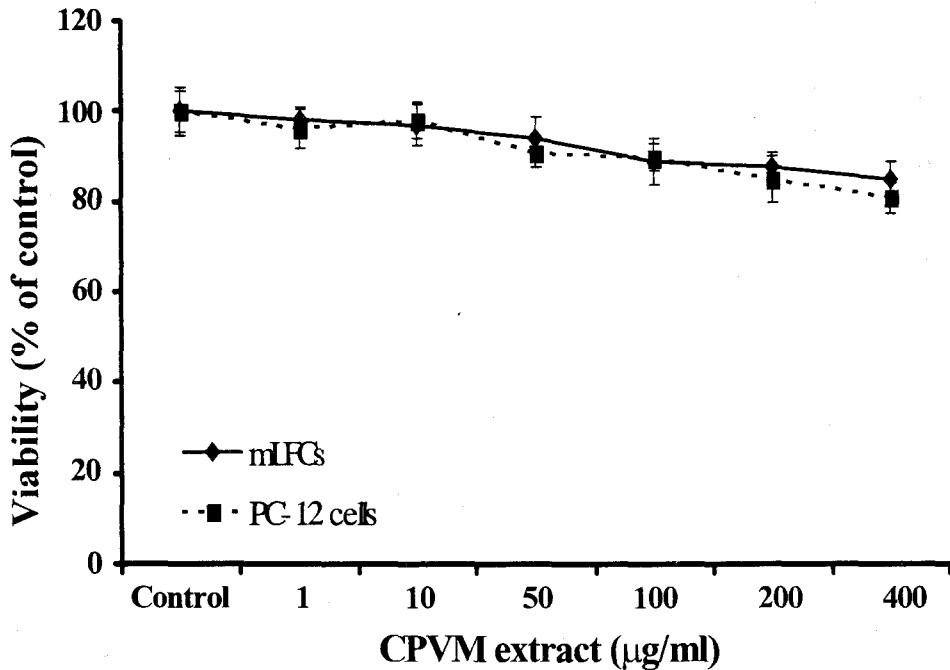


Fig. 2. Cytotoxicity of CPVM extract on mLFC and PC-12 cell.

Control : Non-treatment group.

CPVM : Group treated with various concentration (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml) CPVM extract for 72 hours.

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01,

*** : p<0.001).

2) PC-12 cell에 대한 CT105의 細胞毒性
PC-12 cell에 CT105를 처리한 후의 生存率을 관찰한 결과, 對照群에 비해 5 μ M, 1 μ M의 CT105 投與群은 變化가 없었고, 80 μ M, 40 μ M,

20 μ M, 10 μ M 投與群은 각각 40.0 \pm 1.4(%) 79.5 \pm 3.7(%), 83.1 \pm 2.7(%), 92.4 \pm 3.4(%)로 감소되어 濃度依存的으로 細胞毒性을 나타냈다.(Fig. 3).

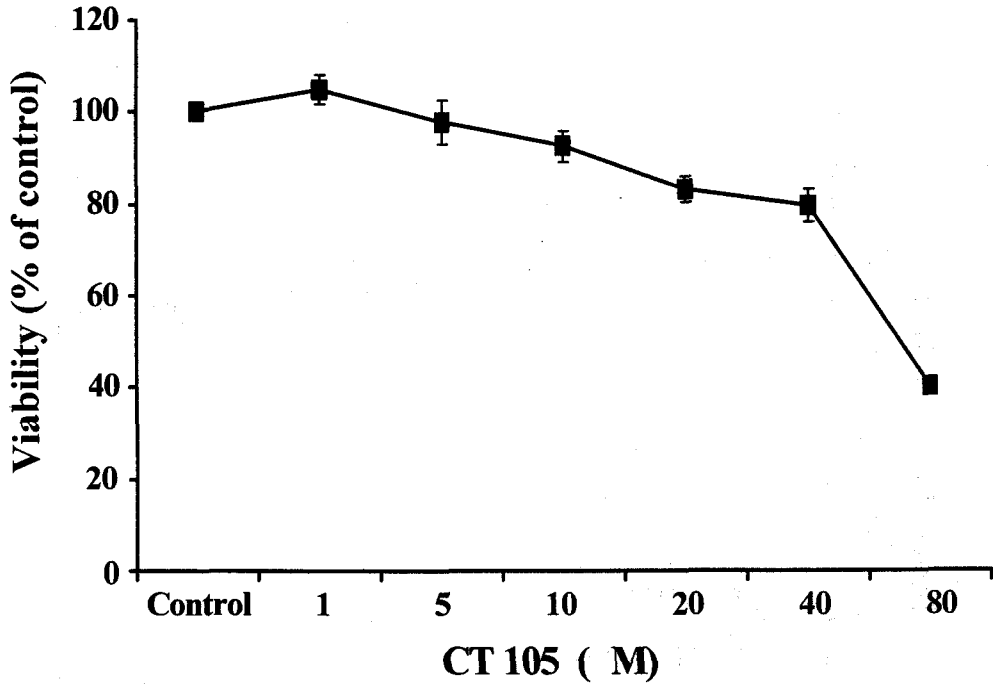


Fig. 3. Cytotoxicity of CT105 in PC-12 cell.

Control : Non-treatment group.

CT105 : Group treated with various concentration (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) CT105 for 72 hours.

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

2. PC-12 cell의 proinflammatory cytokine과 APP, AChE, GFAP mRNA에 대한 효과

1) PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현 억제 효과

PC-12 cell의 IL-1 β mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을

처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 발현이 억제되었고(Fig. 4), IL-6 mRNA 발현 역시 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 投與한 實驗群에서 발현이 억제되었다(Fig. 5).

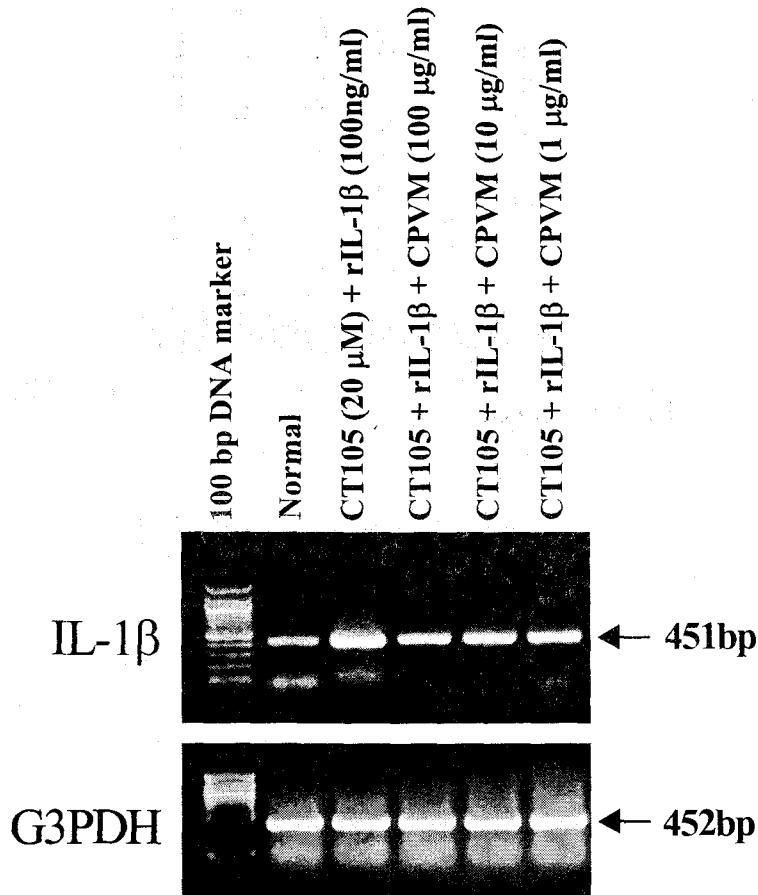


Fig. 4. Inhibitory effects of CPVM extract on IL-1 β mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours and various concentration(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) CPVM extract for 1 hour.

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1 β . Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to Windows 1D main program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

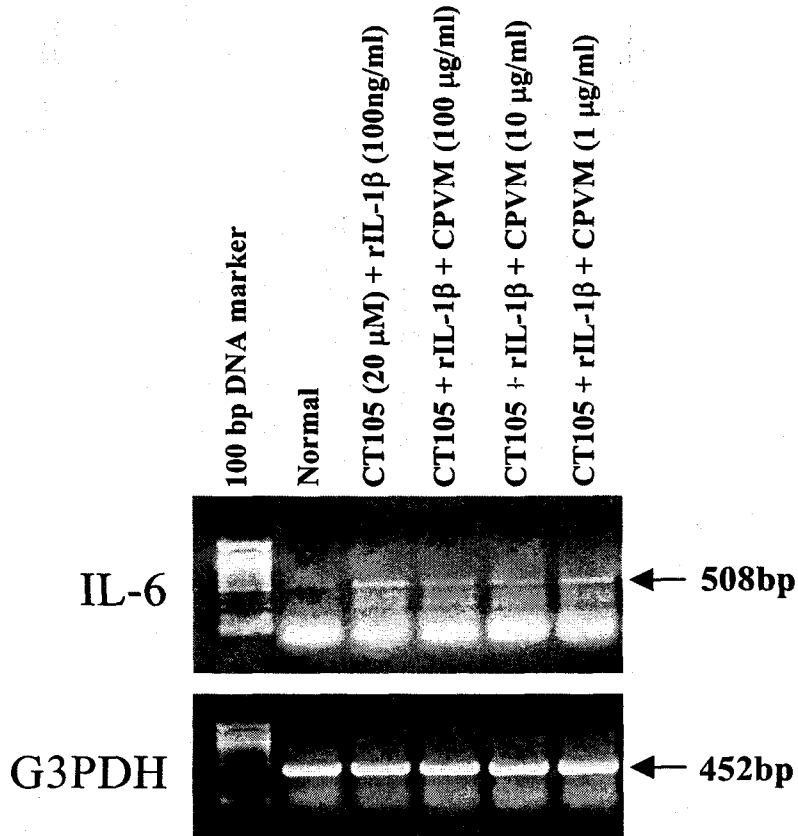


Fig. 5. Inhibitory effects of CPVM extract on IL-6 mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours and various concentration(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml) CPVM extract for 1 hour.

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1β. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to Windows 1D main program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

2) PC-12 cell의 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과

PC-12 cell의 APP mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml,

10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 발현이 억제되었고(Fig. 6), AChE와 GFAP mRNA 발현 역시 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 그 발현이 억제되었다(Fig. 7, 8).

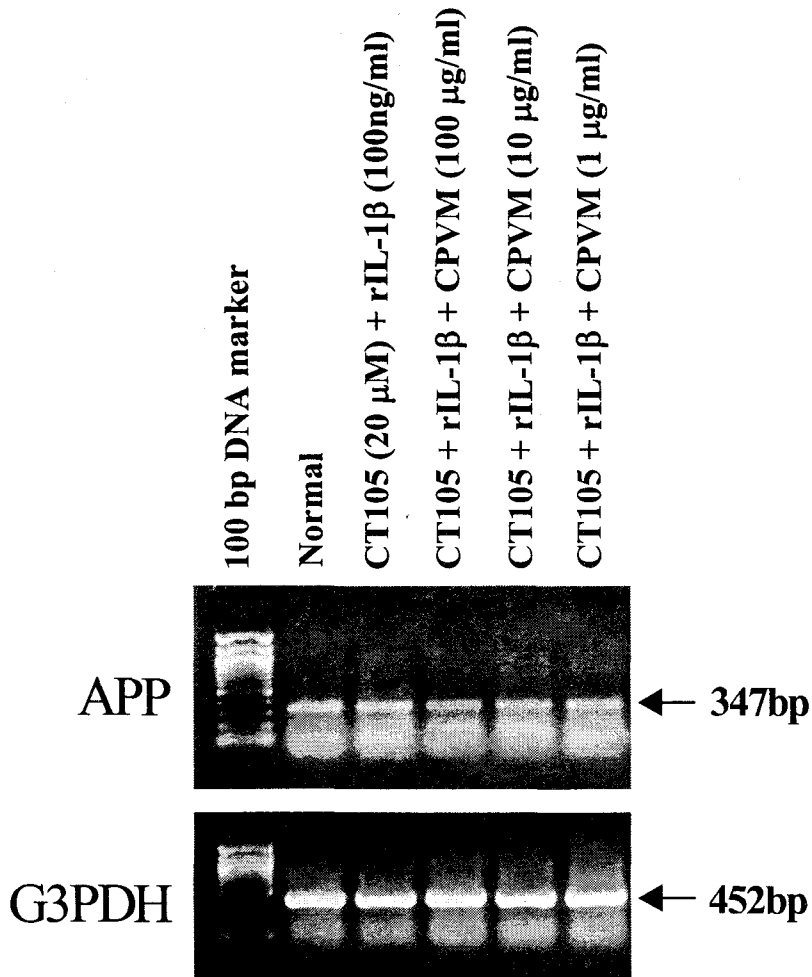


Fig. 6. Inhibitory effects of CPVM extract on APP mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours and various concentration(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) CPVM extract for 1 hour.

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1 β . Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to Windows 1D main program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

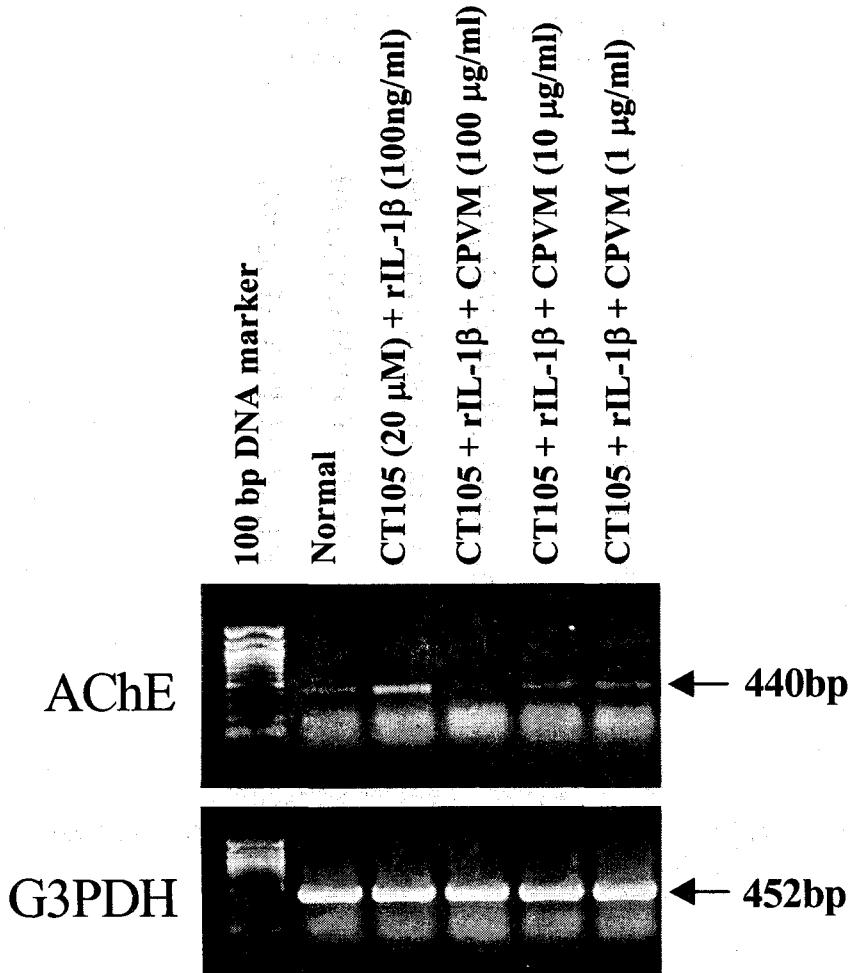


Fig. 7. Inhibitory effects of CPVM extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours and various concentration(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) CPVM extract for 1 hour.

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1 β . Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to Windows 1D main program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

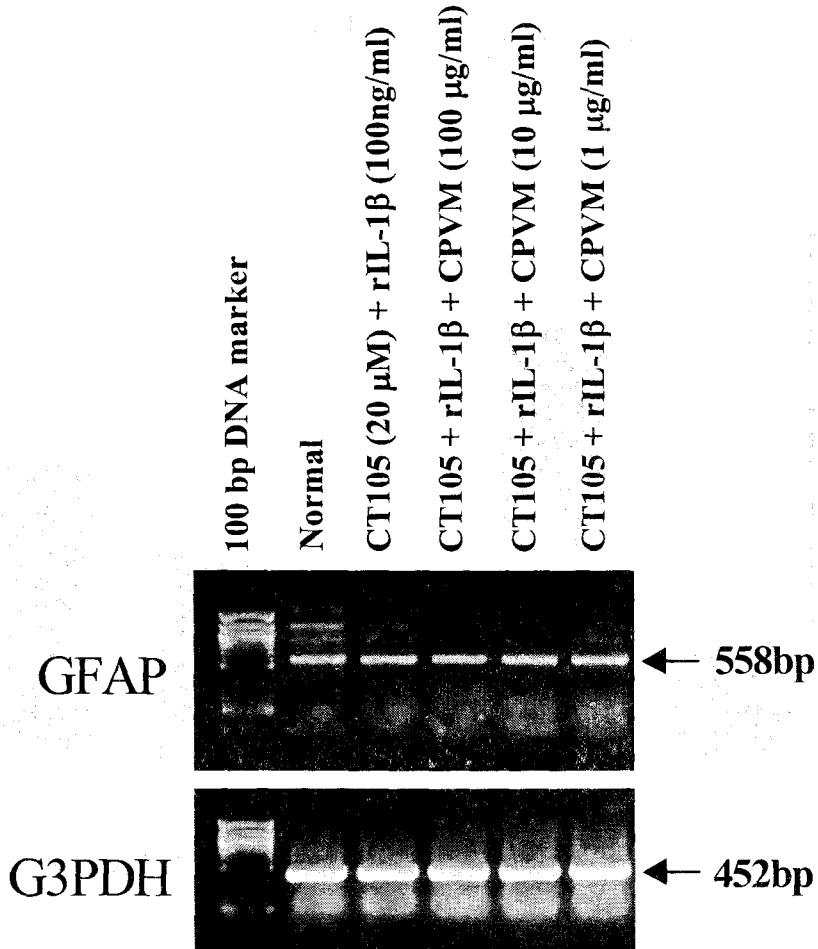


Fig. 8. Inhibitory effects of CPVM extract on GFAP mRNA expression in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours and various concentration(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml) CPVM extract for 1 hour.

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1β. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to Windows 1D main program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

3. PC-12 cell에서의 AChE activity와 APP 발현 억제 효과

1) PC-12 cell에서의 AChE activity 억제 효과
PC-12 cell에서의 AChE activity를 측정할 결

과, 對照群에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 山查肉 投與群은 각각 34 \pm 3.1(%), 47 \pm 4.6(%), 68 \pm 3.8(%로 나타나 有意性 있는 억제 효과를 보였다(Fig. 9).

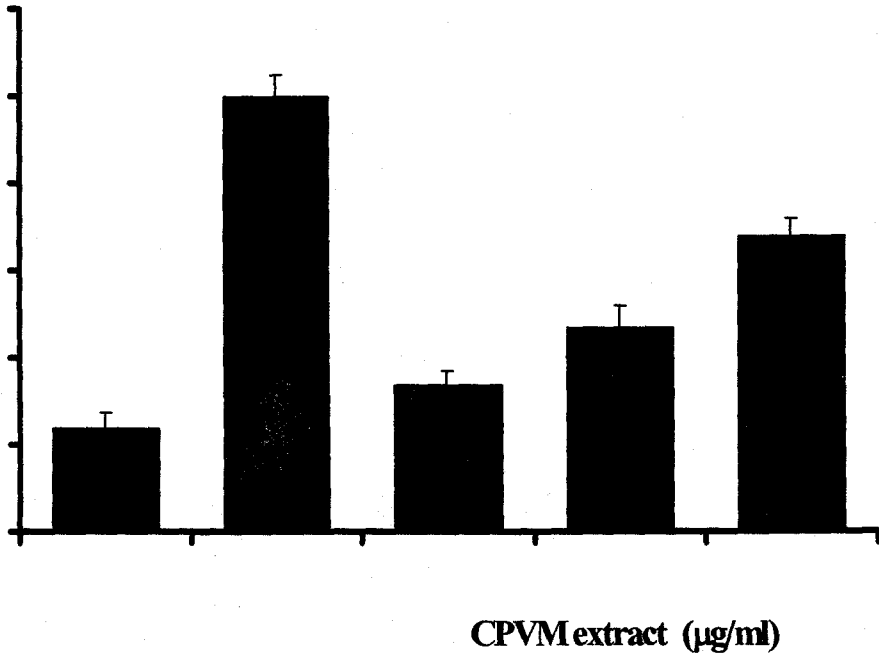


Fig. 9. Inhibitory effects of CPVM extract on the AChE activity in PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours.

CPVM : Group treated with 20 μM CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β and various concentration (100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$) CPVM extract for 24 hours.

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105 plus rIL-1 β . Cell lysate were measured using AChE diagnostic kits. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

2) PC-12 cell에서의 APP 발현 억제 효과
 PC-12 cell에서의 APP를 Western blot을 통해
 관찰한 결과, 正常群에 비해 對照群은 현저하게

발현되었으나, 山査肉 投與群에서는 발현이 감
 소되었다(Fig. 10).

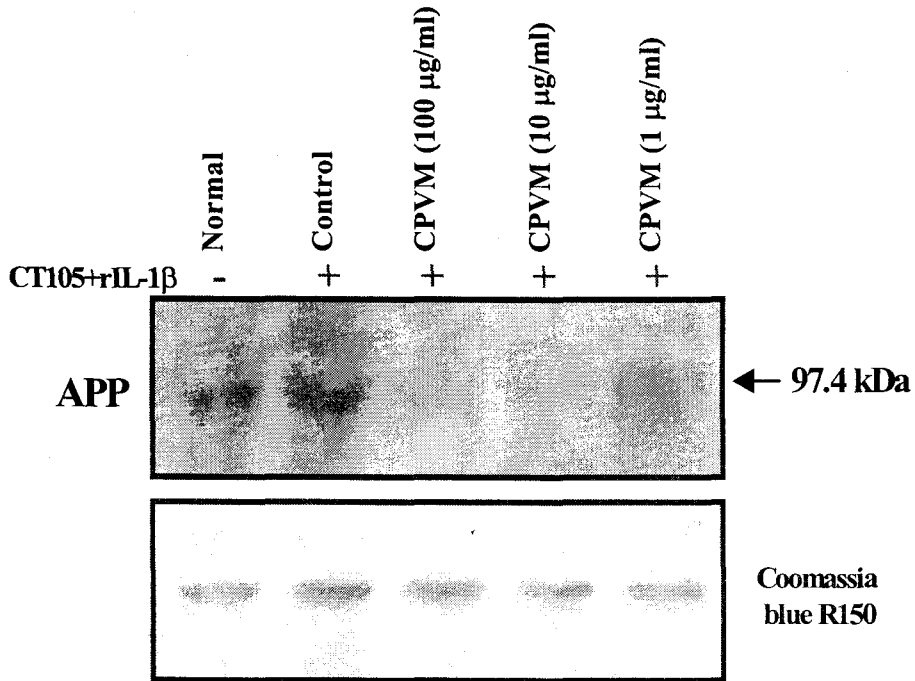


Fig. 10. Suppression effects of CPVM on APP in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment

Lane 2 : CT105(20 µM) plus rIL-1 β (100ng/ml)

Lane 3 : CT105(20 µM) plus rIL-1 β (100ng/ml) + CPVM(100µg/ml)

Lane 4 : CT105(20 µM) plus rIL-1 β (100ng/ml) + CPVM(10µg/ml)

Lane 5 : CT105(20 µM) plus rIL-1 β (100ng/ml) + CPVM(1µg/ml)

PC-12 cell were treated with various concentration CPVM extract in the presence or absence CT105(40 µM) for 24 hours. APP expression was measured by immune Western blot assay. Cell lysate(50µg/lane) were separated by 12% SDS-PAGE gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes.

4. AD 病態 생쥐모델에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과

藥物 投與 2주 후와 4주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 山查肉 投與群은 각각 $20.4 \pm 4.1(\text{sec})$, $13.6 \pm 3.0(\text{sec})$ 으로 모두 對照群에 비해 有意性 있는 시간의 단축을 보였다(Fig.11).

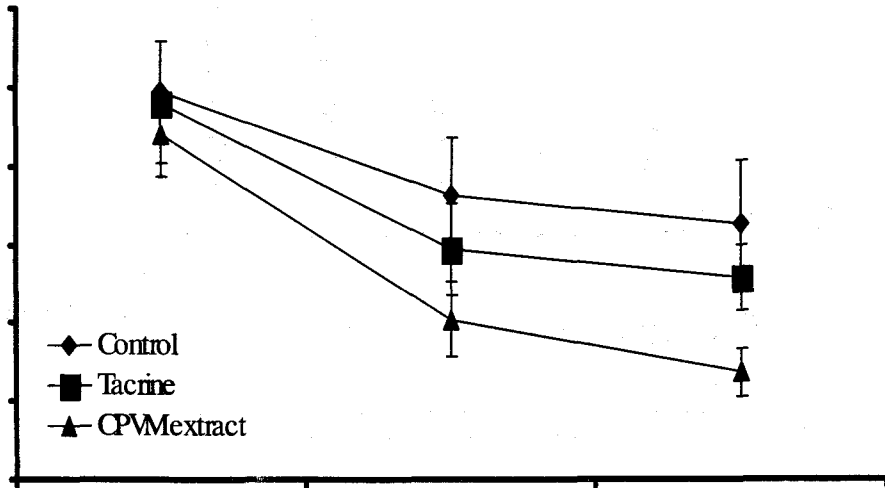


Fig. 11. Effects of CPVM on the Alzheimer's disease mice induced by CT105 in the stop-through type Morris water maze test.

Control : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$).

Tacrine : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and tacrine (10mg/kg p.o.).

CPVM : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and CPVM extract(500mg/kg p.o.).

Stop-through latency : Each time the animal moves from entry to platform.

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

ICR mice were orally administered of CPVM or Tacrine · HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. The videotacking was initiated at 2 weeks and 4 weeks after orally administered of CPVM and the retention trial was carried out after 14 days after the acquisition training trial.

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과
 藥物 투여 2주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 山査肉 投與群은 477±69(cm)로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단

축을 보였고, 4주 후 distance movement-through latency에서 tacrine 投與群과 山査肉 投與群은 각각 544±56(cm), 328±46(cm)으로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 12).

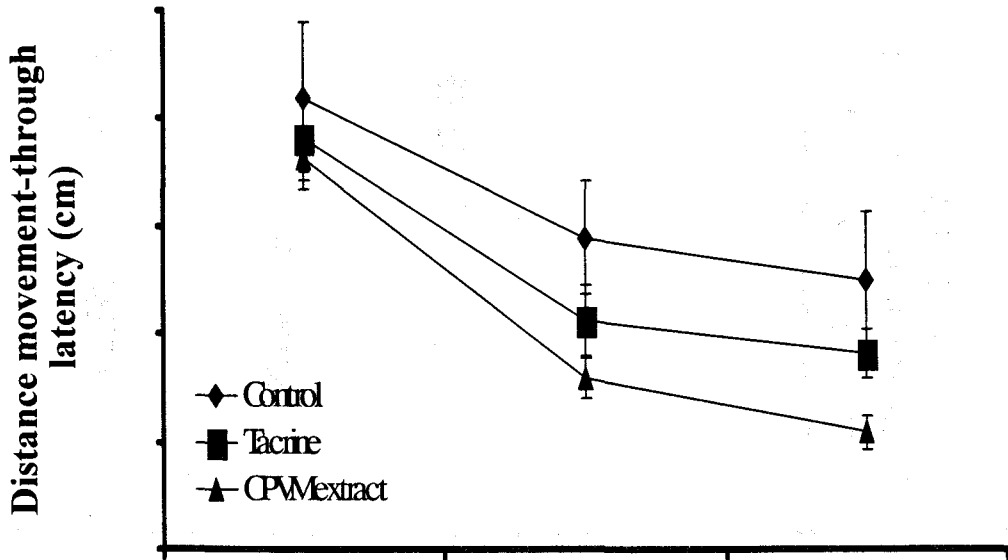


Fig. 12. Effects of CPVM on the Alzheimer's disease mice induced by CT105 in the distance movement-through type Morris water maze test.

Control : Group treated with CT105(10 μM).

Tacrine : Group treated with CT105(10 μM) and tacrine(10mg/kg p.o).

CPVM : Group treated with CT105(10 μM) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

Lardist : The total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : The total distance covered by the animal in small movement.

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

ICR mice were orally administered of CPVM or Tacrine · HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. The videotacking was initiated at 2 weeks and 4 weeks after orally administered of CPVM and the retention trial was carried out after 14 days after the acquisition training trial.

5. AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS, NO 발현 억제 효과

1) IL-1 β 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1 β 발현을 관찰한

결과, 正常群은 14.5 \pm 4.4(%), CT105만을 투여한 對照群은 76.3 \pm 9.3(%), 陽性對照群인 tacrine 投與群은 40.3 \pm 10.5(%), 山查肉 投與群은 38.3 \pm 5.4(%), 對照群에 비하여 IL-1 β 의 발현이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 13).

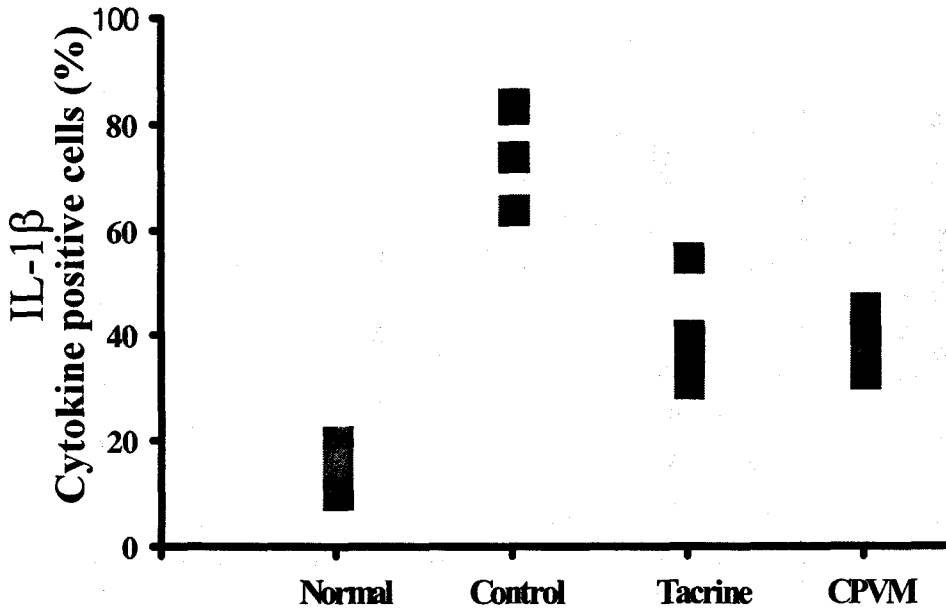


Fig. 13. Effects of CPVM on IL-1 β activity in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105(10 μ M).

Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o).

CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

2) TNF- α 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 TNF- α 발현을 관찰한 결과, 正常群은 $44.8 \pm 9.8(\%)$, CT105만을 투여한 對照群은 $77.8 \pm 5.6(\%)$ 이었고, 陽性對照群인

tacrine 投與群은 $65.3 \pm 7.8(\%)$ 이었고, 山査肉 投與群은 $47.3 \pm 8.7(\%)$ 로 對照群에 비하여 TNF- α 의 발현이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 14).

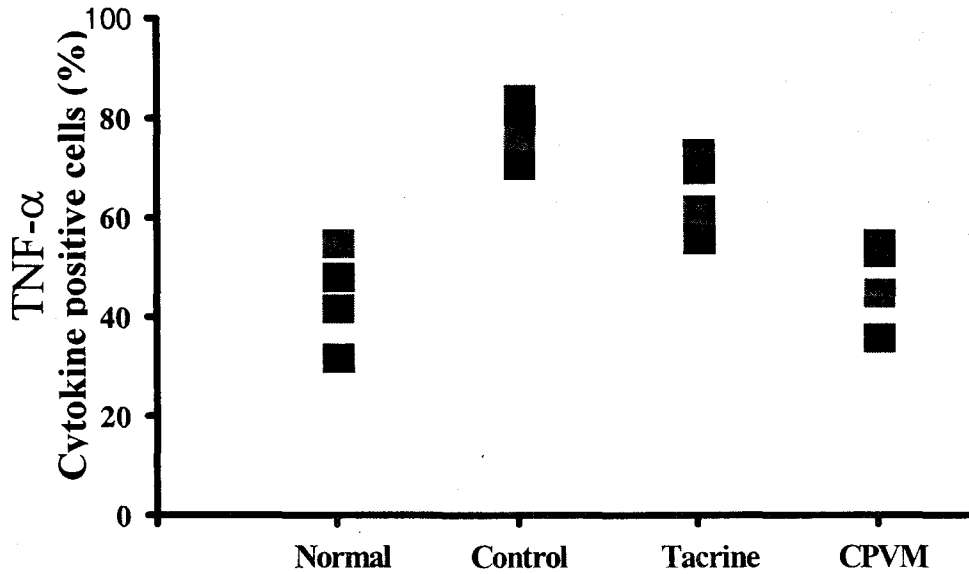


Fig. 14. Effects of CPVM on TNF- α activity in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$).

Tacrine : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and tacrine(10mg/kg p.o).

CPVM : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

3) ROS 발현 억제 효과

Microglial cell내의 ROS 발현을 관찰한 결과, 정상群에 비해 CT105를 투여한 對照群에서 ROS

의 발현이 증가하였고 山査肉 投與群에서는 ROS의 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 15).

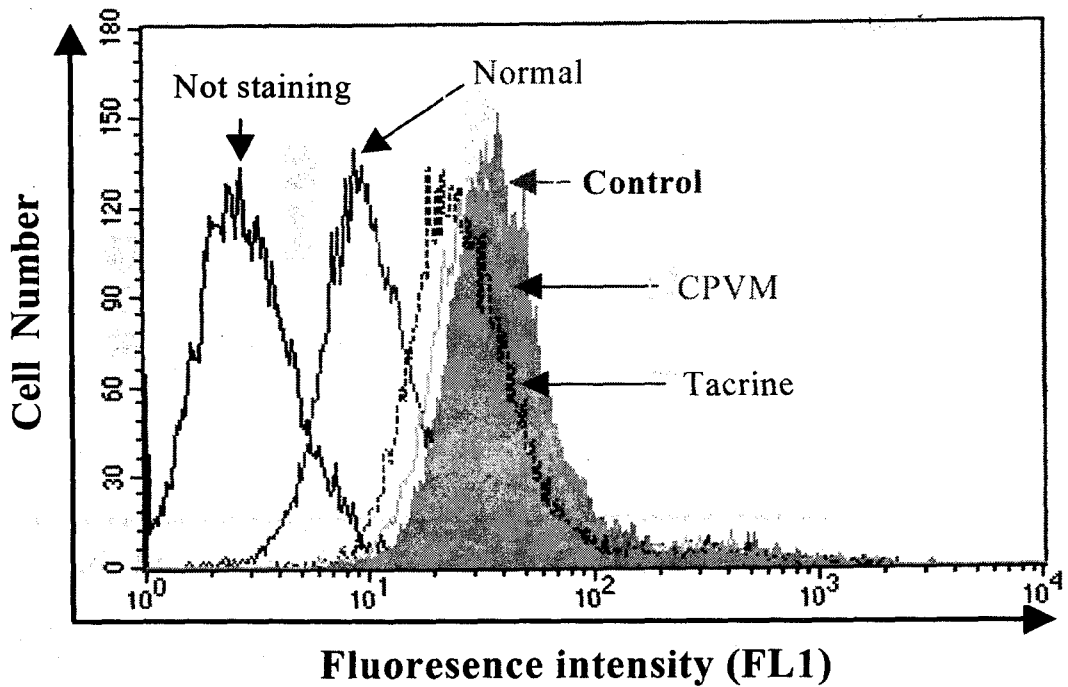


Fig. 15. Inhibitory effect of CPVM on the ROS production in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105(10 μ M).

Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg *p.o.*).

CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg *p.o.*).

4) NO 생성 억제 효과
 血清内 NO 생성량을 관찰한 결과, 正常群에 비해 CT105를 투여한 對照群은 NO의 생성이 增

加되었으나 山査肉 投與群에서는 0.56 ± 0.12 (O.D at 490nm)로 對照群에 비해 有意性 있게 NO의 생성이 억제되었다(Fig. 16).

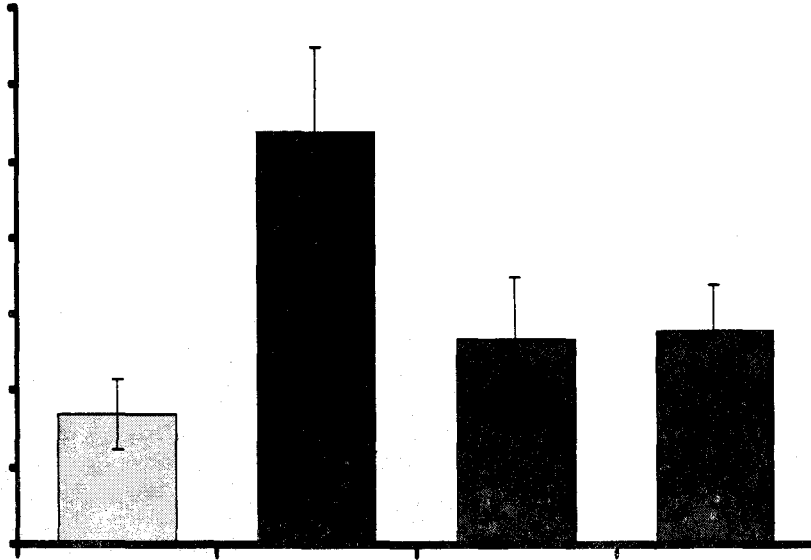


Fig. 16. Inhibitory effect of CPVM extract on the NO release in the serum of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105(10 μM).

Tacrine : Group treated with CT105(10 μM) and tacrine(10mg/kg p.o).

CPVM : Group treated with CT105(10 μM) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

ICR mice were orally administered of CPVM or Tacrine · HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. The blood were collected after 30 days and NO concentration in the serum was assay, and the other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

6. AD 病態 생쥐모델 腦組織의 虛血狀態 및 組織損傷에 미치는 효과

1) 虛血狀態에 미치는 효과

腦組織의 虛血 크기를 관찰한 결과, CT105를

투여한 對照群이 $85 \pm 6.1(\%)$ 로 커진 것에 비해 山査肉 投與群은 $57 \pm 4.7(\%)$ 로 有意性 있게 虛血의 크기가 작아졌다(Fig. 17, 18).

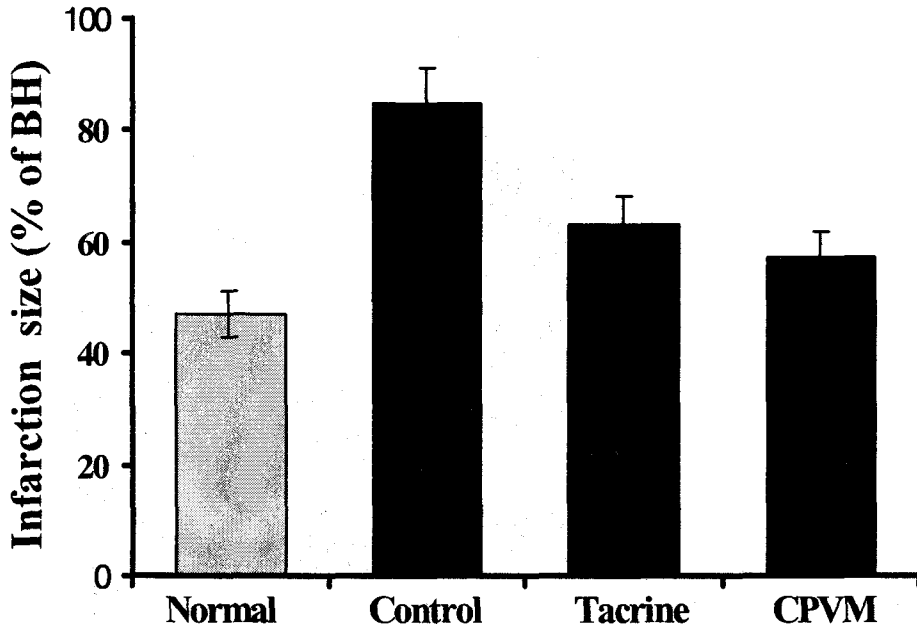


Fig. 17. Effects of CPVM extract on the hippocampus infarction size of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$).

Tacrine : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and tacrine(10mg/kg p.o.).

CPVM : Group treated with CT105($10 \mu\text{M}$) and CPVM extract(500mg/kg p.o.).

* : Statistically significant value compared with control data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

ICR mice were orally administered of CPVM or Tacrine · HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. Infarction is visualized by triphenyltetrazolium chloride then expressed as a percentage of the total area of the hippocampus that was at risk.

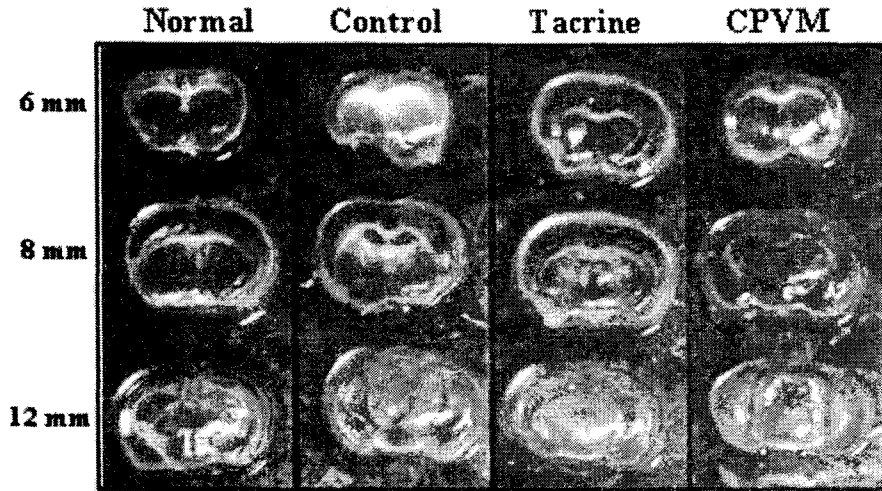


Fig. 18. Effects of CPVM extract on the hippocampus infarction area of Alzheimer's disease mice induced by CT105.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$).

Tacrine : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$) and tacrine($10\text{mg}/\text{kg p.o}$).

CPVM : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$) and CPVM extract($500\text{mg}/\text{kg p.o}$).

ICR mice were orally administered of CPVM or Tacrine · HCl and the acquisition training trial continued once a day for 30 days. Infarction is visualized by triphenyltetrazolium chloride. Normal tissues are stained as strong red color. Infarction area is not stained as white color which localizes at cerebral cortices and caudoputamen. Infarction is widely distributed through 6~12mm from frontal pole.

2) 組織損傷에 미치는 효과

腦組織의 損傷을 관찰한 결과, 正常群은 pyramidal cell layer, neurons, oligodendrocytes 그리고 dentate gyrus 등이 뚜렷이 보였으나 CT105로 처리된 對照群은 뇌의 虛血狀態로 말미암아 pyramidal cell layer, neurons, dentate gyrus 등이 사라지고

oligodendrocytes가 증가되었고 stratum orion과 stratum radiatum이 유도N에 비해, 山査肉 投與群에서는 oligodendrocytes, stratum orion, stratum radiatum, astrocytes-like cell 등은 보였지만 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등이 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 19, 20).

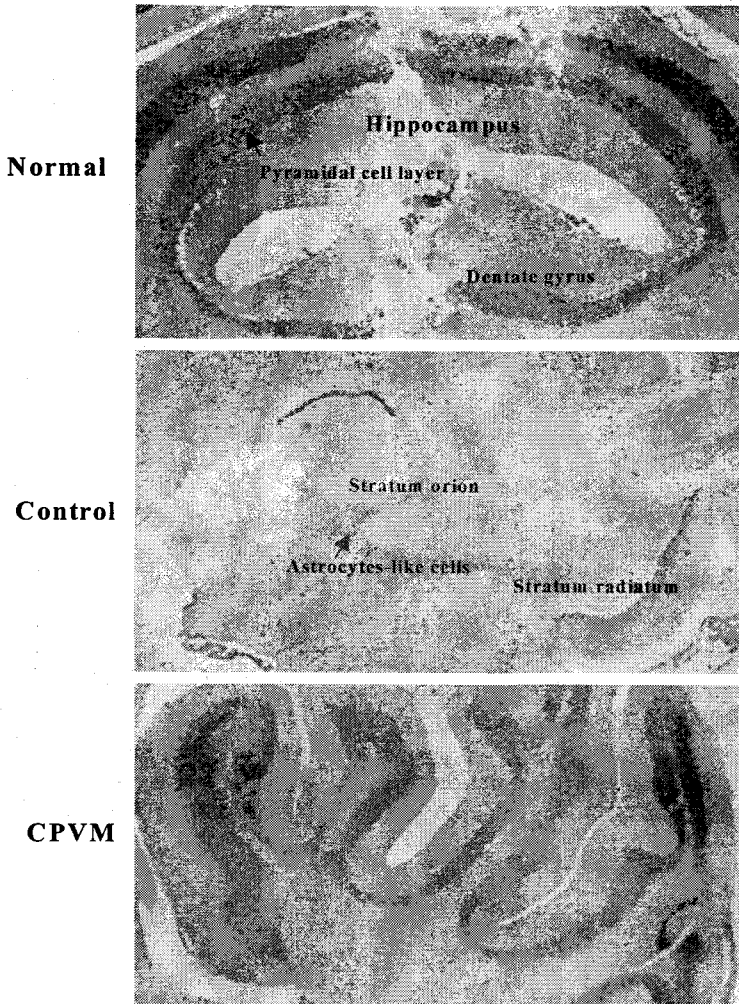


Fig. 19. Histological analysis of brain tissue of Alzheimer's disease mice induced by CT105(Nikon, $\times 20$).

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$).

CPVM : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$) and CPVM extract($500\text{mg}/\text{kg p.o}$).

ICR mice's brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxyline & eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope.

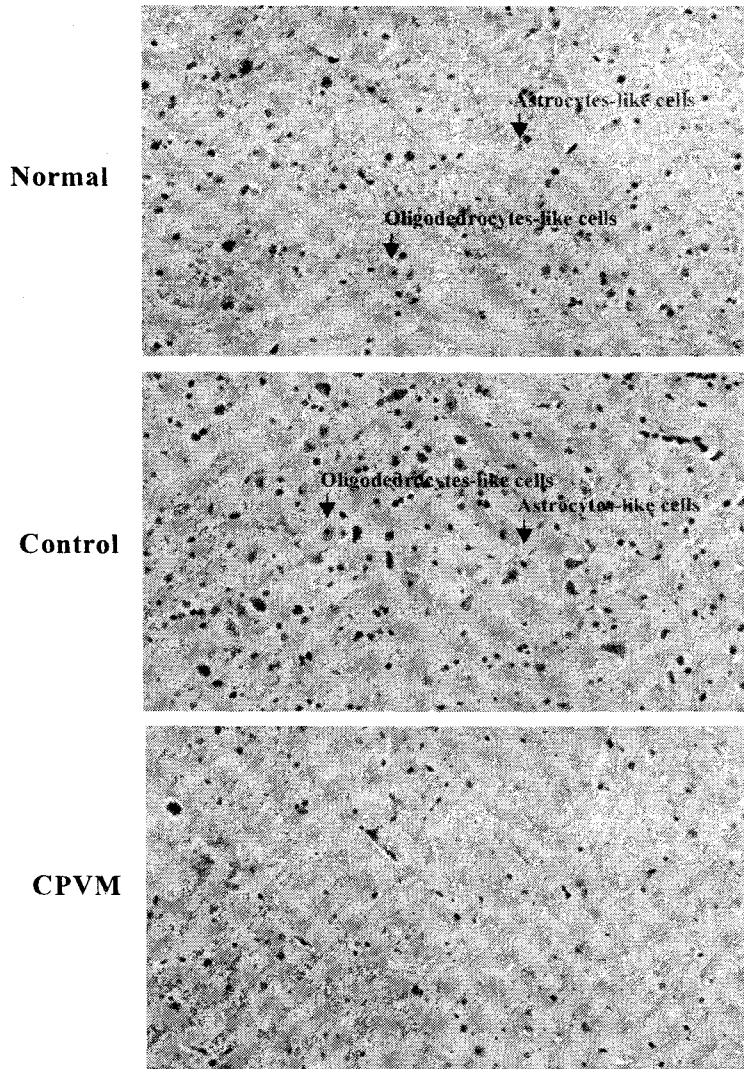


Fig. 20. Histological analysis of brain tissue of Alzheimer's disease mice induced by CT105(Nikon, $\times 200$).

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$).

CPVM : Group treated with CT105($10\mu\text{M}$) and CPVM extract($500\text{mg}/\text{kg p.o}$).

ICR mice's brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxyline & eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope.

考 察

痴呆는 여러 가지 原因疾患에 의해 惹起되는 知能低下를 특징으로 하는 症候群으로, 대개 慢性的으로 진행하여 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등을 包含하는 高度의 大脳機能의 障礙를 나타낸다¹⁾.

痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 退行性變化, 腦血管障礙, 腦의 炎症性障礙, 代謝性疾患, 內分泌疾患, 外傷, 中毒 등이며⁴⁾ 이 중 腦의 退行性變化에 의한 AD와 腦硬塞 등으로 유발된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 혼재된 混合型 痴呆가 많은 비율을 차지하고 있다^{1,2)}.

AD는 腦의 全般的 萎縮과 특유의 組織學的 所見, 즉 老人癡(senile plaque), 神經纖維다발(neurofibrillary tangles) 및 神經細胞의 顆粒空胞變成 등을 특징으로 하며, 症狀으로는 記憶力の 損失, 抽象的 思考障礙, 判斷 및 衝動自制障礙 또는 人格의 變化가 나타난다. 發病은 서서히, 經過는 漸進的인 것이 특징이다³⁾.

AD 유발에는 A β , estrogen, apolipoprotein E, PS, free radicals, 炎症, 事故에 의한 損傷, 神經傳達物質의 不均衡 등의 많은 因子가 參與하는 것으로 알려져 있다. 이 중 A β 의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 神經細胞의 파괴가 일어난다는 것이 대표적인 AD 機轉에 대한 가설이다⁶⁾. A β 는 β -secretase나 γ -secretase에 의해 큰 分子量의 APP 一部分이 잘라져서 생성되는데, 이 蛋白質은 疏水性 殘基가 대부분인 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다^{34,35)}. Amyloid cascade hypothesis에 따르면 A β 의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로 amyloid의 축적이 점차 커지면서 A β 가 神經細胞를 손상시켜 結局 痴呆의 症狀이 나타나게 된다고 하는데, A β 그 자체의 神經毒性 뿐만 아니라 이차적으로 iNOS를 자극하여 NO를 생성하거나, glucose의 부족이나 amino toxicity를 유발하여 神經細胞를 손상시키는 것으로 생각되고 있다^{36,37)}. 또한 최근에는 A β 를 포함하는 APP의 c말단 부위인 c단 蛋白質(carboxyl-terminal fragment protein)이 A β 보다 더 毒性이 있다고 알려지고

있다^{38~40)}. A β 와 c단 蛋白質의 毒性機轉에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데, A β 의 과잉이 뇌 안에서의 抗酸化作用을 억제하고 ROS의 생산을 증가시키며 細胞內 Ca 恒常性的 파괴를 초래함으로써 老人癡를 形成하고 神經毒性을 나타내는 것으로 판단되고 있다^{41~43)}.

APP는 21번 染色體의 single gene에 존재하는 蛋白質이다⁴⁴⁾. 21번 染色體가 3개인 다운증후군 환자의 경우 早期痴呆 현상이 잘 나타나고 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 老人癡과 神經纖維다발이 형성되는데, 이러한 病變은 遺傳子 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있으며³⁵⁾, AD 患者의 基底 前腦와 海馬 부위에서 APP의 遺傳子 발현이 증가되고 老化된 纖維亞細胞에서 APP 遺傳子 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 痴呆形成 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론할 수 있다⁴⁵⁾.

AD 機轉과 관련된 다른 중요한 이론으로 astrocyte와 microglial cell 등의 神經膠細胞에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 cytokine의 恒常성이 파괴됨으로써 神經細胞의 死滅이 촉진된다는 가설이 있다. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 神經細胞의 분화에 필요한 營養因子로서, cytokine들을 微量分泌함으로써 腦의 生體 恒常성을 유지하는데 기여하지만, 일단 물리적인 腦損傷, 感染 및 炎症反應 등의 자극에 의해 손상된 腦血管障壁을 통하여 免疫系 細胞들이 中樞神經系로 침입하면, 이것으로부터 활성화되어 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하게 되고 腦에서의 cytokine 恒常성이 破壞됨으로써, 中樞神經系의 炎症反應을 일으킨다는 가설이 최근 많은 연구 결과들에 의하여 입증되고 있다^{7,8)}. 腦損傷에서 제일 먼저 病變 부위에 나타나는 神經膠細胞는 microglial cell로, astrocyte의 主要刺戟因子인 IL-1 및 TNF- α 를 과잉유도하여 中樞神經系의 炎症反應을 개시하는 중요한 역할을 갖고 있다고 생각된다. 中樞神經系의 炎症反應은 일련의 단계로 진행되는데, microglial cell에서 유도발현된 IL-1 및 TNF- α 는

astrocyte를 활성화시켜 IL-6, IL-8 등을 발현시키고 活性酸素의 일종인 peroxynitrite 등을 유도함으로써 神經細胞의 사멸을 야기하게 된다^{46,47}.

또한 AD, Parkinson's disease 등의 退行性 腦疾患 病變 부위에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써, 이들 疾病과 proinflammatory cytokine이 밀접한 관계가 있으리라는 가설이 설득력을 얻고 있다. A β 가 침적된 老人癡 주변에서는 활성화된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 이들 神經膠細胞들은 A β 에 의해 과잉 생산된 ROS 등이 매개되어 활성화되고 proinflammatory cytokine을 과다 발현함으로써 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있어 A β 와 proinflammatory cytokine의 상관성이 주목되고 있다^{37,48,49}. A β 와 활성화된 microglial cell은 iNOS를 활성화시켜 NO를 과량으로 생성시키며 A β 의 毒性은 부분적이거나 NO에 의해 매개되는 것으로 알려져 있는데, 실험적으로 NO의 양을 조절하거나 抗酸化物質을 사용하는 것이 AD 치료에 도움을 줄 수 있음이 밝혀지고 있다⁵⁰.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 神經傳達物質은 노화에 따라 감소하는데, AD의 主症狀인 記憶力 障礙가 choline성 神經系와 밀접한 관계가 있다는 증거들이 다양하게 제시되고 있다⁵¹. 특히 AD 환자에게서 나타나는 記憶力 감퇴는 acetylcholine을 만들어 내는 神經細胞의 退化 때문이며 이 現象은 acetylcholine을 분해하는 酵素인 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다^{9,10}. 감퇴된 choline성 神經系를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 藥物들로 acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성화제(receptor agonist)인 RS-86, nicotine 등과⁵², acetylcholine 분해억제제(AChE inhibitor)로 FDA의 승인을 받은 tacrine 등이 있는데^{53,54}, 이들은 비록 효과가 일시적이고 毒性이 있어 사용상 문제점이 있지만 현재까지 어떤 腦機能 改善 劑들보다 AD의 記憶力 감퇴 증상의 治療劑로서 효과가 우수한 것으로 알려져 있다⁵³.

韓醫學으로 痴呆는 ‘痴呆¹¹⁾’, ‘呆病^{12,13)}’, ‘健忘

¹⁴⁾ 등의 範疇에 속하며, 痴呆에 대한 最初의 記述은 明代 張¹¹⁾의 《景岳全書·癲狂痴呆》에서 보이며 “痴呆症, 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.....”라 되어 있다.

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 등이고, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다^{11~13,15,16)}.

原因에 대해서는 歷代 文獻에서 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 提示되고 있는데^{11~13,15,16)}, 특히 現代 中醫學에서는 氣滯瘀血과 痰飲停滯를 痴呆의 重要한 原因 중 하나로 다루고 있으며 이에 대한 多方面의 研究가 진행되고 있다^{15~17)}.

山査肉은 山楂, 山楂子 등으로도 불리며 薔薇科에 속한 落葉喬木인 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로, 구형 또는 배형으로 직경은 2.5cm 정도이고 표면은 深紅色으로 光澤이 있으며 灰白色의 작은 斑點이 많다. Hyperoside, quercetin, anthocyanidin, oleanol acid, tartaric acid, citric acid, crataegolic acid와 糖類, vitamin C, tannin 등을 함유하고 있는데, 실험적으로 血管을 擴張시킴으로써 장기간 지속되는 高血壓작용이 있고 특히 crataegolic acid 성분은 胃液의 분비를 증가시켜 消化를 촉진한다고 한다. 性味는 微溫 無毒, 酸甘하고 脾, 胃, 肝經에 歸하며 健脾行氣, 化痰化瘀, 消食積의 效能이 있어 肉積, 痞滿, 吞酸, 瀉利 등의 疾患 뿐 아니라^{18,19)} 그 效能으로 보아 氣滯瘀血, 痰飲停滯 등의 原因으로 야기되는 痴呆에도 응용될 수 있겠다.

PC-12 cell을 이용한 실험에서는 먼저 적당한 處理物質과 實驗藥物의 농도를 정하기 위해 細胞 毒性을 측정하였는데, mLFC, PC-12 cell에 대한 山査肉의 細胞毒性을 관찰한 결과, mLFC의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 以下の 山査肉 投與群은 變化가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 85 \pm 3.9(%), 88 \pm 2.8(%로 감소하였으며, PC-12 cell의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 以下の 山

山査肉 投與群은 변화가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 81 \pm 3.4(%), 85 \pm 5.2(%)로 減少되었다(Fig. 2). 100 μ g/ml의 以下の 농도로 山査肉을 PC-12 cell에 처리하였을 때는 mLFC와 PC-12 cell의 生存率에 有意性 있는 변화가 없었으므로 이후의 以後의 PC-12 cell을 재료로 한 실험에서는 주로 100 μ g/ml 以下の 山査肉을 사용하기로 하였다.

CT105는 A β 를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로, 實驗的으로 PC-12 cell과 cortical neuron에 毒性을 나타내고, 생쥐에 대해 記憶力을 감퇴시키고 神經變成을 招來하며 칼슘의 恒상성을 파괴하는 작용을 하며, 배양된 microglial cell에서 IL-1, IL-6 mRNA를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있어⁵⁵⁾, 본 실험에는 CT105를 처리하여 인위적인 AD의 모델을 만들기 하고 CT105를 RT-PCR로 재조합하여 사용하였다.

CT105를 PC-12 cell에 처리한 후의 生存率을 관찰한 결과, 對照群에 비해 5 μ M, 1 μ M의 CT105 投與群은 변화가 없었고, 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M 投與群은 각각 40.0 \pm 1.4(%), 79.5 \pm 3.7(%), 83.1 \pm 2.7(%), 92.4 \pm 3.4(%)로 감소되어 濃度依存的으로 細胞毒性을 나타냈는데(Fig. 3), 이후 PC-12 cell을 재료로 한 실험에서는 약 80% 以上の 生存率을 나타낸 20 μ M의 농도로 CT105를 사용하기로 하고, 보다 효과적으로 AD 모델을 만들기 위해 rIL-1 β 를 함께 처리하였다.

PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 관찰한 결과, 200 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 모두 발현이 억제되었다(Fig. 4, 5).

GFAP는 腦損傷, 中樞神經系感染, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서, AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이는데, 이는 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 老人癡 形成과 神經變成 過程을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF- α 의 과다 발현과

관련이 많은 것으로 알려져 있다^{56,57)}.

PC-12 cell의 APP, AChE, GFAP mRNA 발현을 관찰한 결과, 200 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 모두 발현이 억제되었다(Fig. 6~8).

이것은 山査肉이 CT105와 rIL-1 β 로 인해 PC-12 cell에 과도하게 발현된 proinflammatory cytokine인 IL-1 β 와 IL-6을 감소시켰고 老人癡 形成에 관여하는 APP와 記憶力障礙에 중요한 역할을 하는 AChE를 억제함으로써 AD의 예방과 記憶力 감퇴 등의 症狀 治療에 기여할 수 있음을 보여준 것이라 할 수 있다.

PC-12 cell에서의 AChE activity를 측정된 결과, 對照群에 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 34 \pm 3.1(%), 47 \pm 4.6(%), 68 \pm 3.8(%)로 有意性 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 9), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 山査肉의 투여로 PC-12 cell의 遺傳子 水準과 細胞性 蛋白質 水準에서 모두 AChE가 억제되는데, 山査肉의 투여가 acetylcholine의 양이 증가시킴으로써 記憶力의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

PC-12 cell에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 正常群에 비해 對照群은 현저하게 발현되었으나, 山査肉 投與群에서는 그 발현이 감소되었는데(Fig. 10), 이를 遺傳子 水準의 APP mRNA 발현 억제 결과와 함께 보면 山査肉이 A β 의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써, 임상적으로 AD의 예방에 山査肉을 사용해 볼 수 있음을 보여 준 것이라 할 수 있다.

Morris water maze 과제는 동물의 空間學習과 記憶를 검사하기 위해 사용되며, 空間情報 이외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 記憶하는 능력, 즉 空間準據記憶을 측정하는 것이다⁵⁸⁾.

Morris water maze를 이용하여 CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델에 대한 山査肉의 記憶力 감퇴 억제효과를 측정하였다. 먼저 山査肉 투여 2주 후와 4주 후 stop-through latency를 관찰한

결과, 山査肉 投與群은 각각 $20.4 \pm 4.1(\text{sec})$, $13.6 \pm 3.0(\text{sec})$ 으로 모두 對照群에 비해 有意性 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 11). 다음은 distance movement-through latency를 관찰한 것인데, 山査肉 투여 2주 후 관찰 결과, 山査肉 投與群은 $477 \pm 69(\text{cm})$ 로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단축을 보였고, 4주 후 역시 tacrine 投與群과 함께 山査肉 投與群은 $328 \pm 46(\text{cm})$ 으로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 12). stop-through latency, distance movement-through latency에서 山査肉 投與群이 有意性 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로부터 AD에서 나타나는 記憶力 감퇴에 대한 治療劑로써 山査肉을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있다.

CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS 발현을 관찰하였는데, 먼저 microglial cell에서의 IL-1 β 발현을 관찰한 결과, 正常群에 대해 對照群에서는 증가되었으나 山査肉 投與群에서는 그 발현이 현저히 감소했고, TNF- α 에 있어서도 역시 正常群에 비해 對照群은 증가하였으나 山査肉 投與群은 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있는데(Fig. 13, 14), 이는 山査肉이 AD의 原因 중 하나로 알려진 細胞內에서의 炎症反應과 관련된 cytokine의 활성화를 효과적으로 억제한 것으로, 山査肉의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokine으로 초래되는 神經細胞 死滅을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

Microglial cell내에서의 ROS 발현을 관찰한 결과, 正常群에 비해 CT105를 투여한 對照群에서 ROS의 생산이 증가된 것에 반해 山査肉 投與群에서는 ROS의 생산이 현저히 억제되었음을 알 수 있는데(Fig. 15), 이것으로 山査肉이 ROS로 매개되는 microglial cell의 활성화를 억제하고 細胞內의 過酸化 過程을 減少시켜 AD에 대해 豫防의 효과가 있으리라 예측된다.

血清內 NO 생성량을 관찰한 결과, 正常群에 비해 CT105를 투여한 對照群은 NO의 생성이 증가되었으나 山査肉 投與群에서는 $0.56 \pm 0.12(\text{O.D. at } 490\text{nm})$ 로 對照群에 비해 有意性 있게 억제되

어(Fig. 16), 山査肉이 A β 와 活性化된 microglial cell에 의한 NO의 과량 생성을 억제하여 AD 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

한편, AD 病態 생쥐모델 腦組織의 虛血 크기를 관찰한 결과, CT105를 투여한 對照群이 $85 \pm 6.1(\%)$ 인 것에 비해 山査肉 投與群은 $57 \pm 4.7(\%)$ 로 有意性 있게 虛血의 크기가 작아져(Fig. 17, 18), 山査肉이 CT105로 誘發된 腦組織의 虛血狀態를 개선하는 것으로 나타났다.

또한 腦組織의 손상을 관찰한 결과, 山査肉 投與群에서는 對照群에서 뇌의 虛血狀態로 유도된 oligodendrocytes, stratum orion, stratum radiatum, astrocytes-like cell 등은 보였지만, 사라졌던 pyramidal cell layer, neurons 그리고 dentate gyrus 등은 회복된 것을 볼 수 있는데(Fig. 19, 20), 이는 山査肉이 뇌 虛血로 인한 神經細胞와 組織의 손상을 억제하는 효과가 있어 虛血과 관련된 AD의 예방할 수 있음을 시사하는 것이 할 수 있다.

以上の 결과를 종합해 보면 山査肉은 CT105를 처리한 PC-12 cell에서 IL-1 β , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였고, 역시 PC-12 cell에서 AChE의 활성화와 APP의 발현을 억제하였으며, CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델에 대해 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 有意性 있는 記憶力 개선 효과를 나타냈고 또한 CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 microglial cell에서 IL-1 β , TNF- α 등의 proinflammatory cytokine의 발현과 ROS, 血清內 NO의 생산을 억제하였고 腦組織의 虛血狀態를 개선하고 虛血狀態로 인한 腦組織의 손상을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 山査肉은 APP의 과다 생성, microglial cell의 proinflammatory cytokine의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료 및 AChE의 活性化로 야기되는 記憶力 감퇴에 대한 治療劑로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 山査肉의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

結 論

山査肉이 CT105로 誘導된 AD 病態 모델에 미치는 影響을 觀察한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 山査肉은 PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였다.
2. 山査肉은 PC-12 cell에서 AChE의 활성과 APP의 발현을 억제하였다.
3. 山査肉은 Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 有意性 있는 記憶力 개선 효과를 나타냈다.
4. 山査肉은 microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 의 발현과 ROS, NO의 생산을 억제하였다.
5. 山査肉은 腦組織의 虛血 상태를 有意性 있게 개선하였고 虛血로 인한 腦組織 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 山査肉은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 山査肉의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 金知赫·黃義完 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256~271, 327~330, 1992.
2. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.87~88, 465~467, 514~518, p.600, 1995.
3. 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216~228, 1988.
4. 이광우·정희원 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.199~210, 1997.
5. Selkoe DJ : The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol, 8(11):447~453, 1998.
6. 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.
7. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem, 274(49):34584~34589, 1999.
8. 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.
9. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR : In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology, 52(4):691~699, 1999.
10. Almeida OP : Treatment of Alzheimer's disease ; critical evaluation of the use of anticholinesterase. Arq Neuropsiquiatr, 56(3B):688~696, 1998.
11. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.

- 610~611, 1978.
12. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
 13. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書,台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990.
 14. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129~135, p.534, 545, 550, 1982.
 15. 陳 輝 외 : 實用中醫腦病學,北京, 學苑出版社, pp.242~251, 784~791, 1993.
 16. 黃大東 외 : 實用中醫內科學,上海, 上海科學技術出版社, pp.378~381, 1989.
 17. 徐 浩·馬蒼云 : 從痰瘀論治老年期痴呆研究進展, 浙江中醫雜誌, 31(10):474~475, 1996.
 18. 全國韓醫科大學本草學教授 共著: 本草學, 서울, 永林社, pp.369~370, 1991.
 19. 김창민 외 역 : 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, pp.2658~2663, 1998.
 20. 鄭仁哲·李相龍 : 痴呆에 對한 文獻的 考察, 동의신경정신과학회지, 7(1):77~94, 1996.
 21. 이승기 외 : 치매에 대한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 7(1):1~14, 1996.
 22. 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.
 23. 김보균 외 : Dementia of Alzheimer Type 에 관한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 9(1):25~44, 1998.
 24. 현경철·김종우·황의완 : Vascular Dementia 에 關한 韓醫學的 臨床研究, 동의신경정신과학회지 10(1):147~158, 1999.
 25. 조운숙 외 : 형방지황탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 9(1):1~24, 1998.
 26. 박순권 외 : 한약물의 치매 치료에 관한 실험적 연구, 동의신경정신과학회지, 9(2):19~35, 1998.
 27. 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.
 28. 鄭仁哲·李相龍 : 導痰益氣活血湯이 알츠하이머질환 病態 모델의 生化學的 變化 및 行動에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(2):260~276, 2001.
 29. 金保岡 : 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.
 30. 高光宰 : 山査 抽出液이 白鼠의 肥滿模型에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 1998.
 31. 辛東勳 : 위점막 보호효과에 대한 山査의 항산화작용과 SH기의 영향, 동국대학교대학원, 1999.
 32. 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.
 33. 金宇哲 외 : 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp.177~179, 1990.
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
37. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ : Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes ; morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, 785(2):195~206, 1998.
38. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB : Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na^+/Ca^{2+} gradients. *Neuroreport*, 11(15):3357~3360, 2000.
39. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J*, 14(11):1508~1517, 2000.
40. Lee JP, Chang KA, Kim HS, Kim SS, Jeong SJ, Suh YH : APP carboxyl-terminal fragment without or with Abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res*, 60(4):565~570, 2000.
41. Kim HJ, Suh YH, Lee MH, Ryu PD : Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein. *Neuroreport*, 10(7):1427~1431, 1999.
42. 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 Abeta-induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid*, 8(3):194~201, 2001.
43. Kourie JI : Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems ; implications for neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 21(3):173~213, 2001.
44. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S : Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein (APP) gene. *Biochem J*, 338:777~782, 1999.
45. Breakefield XO, Geller AI : Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol*, 1(4):339~371, 1987.
46. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC : FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*, 19(9):3440~3447, 1999.
47. Simmons ML, Murphy S : Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*, 59(3):897~905, 1992.
48. 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.
49. 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):1449~1452, 2001.
50. Anderson I, Adinolfi C, Doctrow S,

- Huffman K, Joy KA, Malfroy B, Soden P, Rupniak HT, Barnes JC : Oxidative signalling and inflammatory pathways in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp*, 67:141~149, 2001.
51. 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):187~194, 2000.
52. 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):143~152, 1999.
53. 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):836~840, 1997.
54. Cheng DH, Tang XC : Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacol Biochem Behav*, 60(2):377~386, 1998.
55. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee SW, Kim YM, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *J FASEB*, 14:1508~1517, 2000.
56. 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.
57. 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):409~412, 2000.
58. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I : FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Phamacol Exp Ther*, 272(1):256~263, 1995.