

# 黃柏이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

김영표 · 정인철 · 이상룡\*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## Effects of Phellodendron amurense Extract on the Alzheimer's Disease Model

Young Pyo Kim, In Chul Jung, Sang Ryong Lee\*

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

This experiment was designed to investigate the effect of Phellodendron amurense(PLDA) on the Alzheimer's disease. The effects of PLDA extract on IL-1 $\beta$ , IL-6, amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$  and AChE activity of PC-12 cell lysate treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$  and behavior of memory deficit mice induced by scopolamine and mice glucose, uric acid, AChE activity of memory deficit rats induced by scopolamine were investigated, respectively. PLDA extract suppressed IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$ ; AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by A $\beta$  plus rIL-1 $\beta$ . PLDA extract increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit rats induced by scopolamine. PLDA extract group showed significantly inhibitory effect on the memory deficit of mice induced by scopolamine in the experiment of Morris water maze. According to the above results, it is suggested that PLDA extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : Phellodendron amurense(PLDA), Dementia, Alzheimer's disease,  $\beta$ A, cytokine

### 서 론

痴呆는 다양한 원인에 의하여 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 나타내는 일종의 증후군<sup>1,2)</sup>으로, 알츠하이머병(Alzheimer's disease ; AD), 혈관성 치매(vascular dementia ; VD), 혼합형 치매, 중독성 치매 등의 유형이 있으며, 우리나라의 경우 전체 치매 환자 중 AD가 60%, VD가 20%를 차지하여<sup>2)</sup> AD가 치매의 중요한 원인질환이 되고 있다.

AD의 유발 기전 중 대표적인 것은 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 amyloid  $\beta$  protein(A $\beta$ )이 과량으로 만들어지게 되고, 이 A $\beta$ 의 침적으로 생기는 노인반(senile plaques)의 신경독성으로 말미암아 신경세포의 파괴가 일어난다는 가설<sup>3)</sup>과, IL-1, IL-6 등의 proinflammatory cytokine을 과다하게 생성하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이

세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있고<sup>4)</sup>, 또한 acetylcholine 등 신경전달 물질의 감소는 기억력을 감소시키며, 이러한 인지장애는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화와 함께 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 더욱 심화된다고 한다<sup>5)</sup>.

韓醫學에서는 痴呆와 관련하여 《景岳全書·癲狂癡呆》<sup>6)</sup>에서 '痴呆'에 대하여 최초로 언급되었고 呆病<sup>7,8)</sup>, 健忘<sup>9-12)</sup>도 치매의 범주로 볼 수 있다. 痴呆의 原因으로는 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이<sup>6,13-16)</sup>, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다<sup>17-18)</sup>.

黃柏은 清熱燥濕藥으로 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱 하는 效能이 있다.<sup>19,20)</sup> 黃柏의 효능에 대해 《本草綱目》<sup>21)</sup>에서는 "補腎水不足, 堅腎壯骨髓, 療下焦虛……療熱"이라 하였는데, 이를 보면 心腎不交, 腎水不足 등의 原因으로 발생하는 痴呆에 黃柏을 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

최근 한의학적 연구동향을 살펴보면 安神清腦湯, 導痰益氣活血湯, 加減固本丸 등이 AD 병태 모델에 미치는 영향<sup>22-24)</sup>, 香附子, 巴戟天, 山查肉 등이 AD 병태 모델에 미치는 영향에 대한 연

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

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

· 접수 : 2004/11/18 · 수정 : 2004/12/20 · 채택 : 2005/01/24

구<sup>25-26</sup>)가 이루어졌으나, 黃柏의 AD와 관련된 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 黃柏이 痴癡에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고, scopolamine을 처리한 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청 내 glucose, uric acid, AChE를 측정하였으며 역시 scopolamine을 처리한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 350~400g 30주령 Sprague Dawley(SD)계 웅성 백서를 대한실험동물센터에서 공급받아 사용하였고, 30g 6주령의 International Cancer Reserch(ICR)계 생쥐와 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 이 중에서 실험실 환경(온도 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 $\pm$ 10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux)에 2주일간 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 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)를, 식수는 정제수를 자유로이 섭취케 하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 黃柏(Phellodendron amurense ; PLDA)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

시약 중 AChE diagnostic kit, scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을, Taq. polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody(Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1(Oncogen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2(Oncogen, U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film(Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다. 기기는 원심 분리기(한일과학, Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), serum separator(녹십자, Korea), 혈액 분석

기(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland), 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 Co., U.S.A.), VIDEOTRACK(Viewpoint Co., France) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

黃柏 200g을 깨끗이 씻어 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 첨가하였다. 3시간 가열 추출하고 여과지를 이용하여 침전물을 3회 여과한 후, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -84 $^{\circ}$ C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 47g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

#### 2) mLFC와 PC-12 cell에 대한 세포독성 측정

(1) Mouse lung fibroblast cells(mLFC)와 pheochromocytoma cell line(PC-12 cell)의 배양

BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하고 conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 동안 배양하였으며 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 다시 D-PBS를 넣어 약 2회 1,500rpm으로 원심 분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 배양 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다.

PC-12(ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로부터 유래된 cell로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin(100U/ml), streptomycin(100 $\mu$ g/ml) 그리고 gentamycin(10 $\mu$ g/ml)이 함유된 배양액에서 배양하였다.

#### (2) 세포독성 측정

세포독성 측정 방법은 SRB assay법<sup>28)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 2.0  $\times$  10<sup>4</sup>개의 세포로 96 wells plate에 나누고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기에서 2시간 배양한 후 黃柏 추출물(최종 농도 400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 $\mu$ l를 가하고 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액 100 $\mu$ l/well을 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 4회 세척한 다음, 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이

plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540nm로 흡광도를 측정하였다.

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

(1) mRNA 추출

PC-12 cell은 24 wells plate에 1 × 10<sup>6</sup> 세포로 각 well에 분주하고, 黃柏 추출물(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)와 rIL-1β(100ng/ml)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 상층액을 회수한 후 RNeasy spin column을 이용하여 PC-12 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 DEPC를 처리한 20μl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(2) RT-PCR

Reverse transcription 반응은 준비된 total mRNA 3μg을 75℃에서 5분 동안 변성시킨 후 2.5μl 10mM dNTPs mix, 1μl random sequence hexanucleotides(25pmole/25μl), RNA inhibitor로써 1μl RNase inhibitor(20U/μl), 1μl 100mM DTT, 4.5μl 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1μl의 M-MLV RT(200U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 최종 부피가 20μl가 되도록 하였다. 이 20μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3μl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOs II와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/μl)와 antisense primer(20pmole/μl)를 혼합하여 1μl를 가하고, 다시 3μl 2.5mM dNTPs, 3μl 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18μl Taq. polymerase(5U/μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30μl가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation(72℃, 1분)을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20μl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 鹽基配列은 다음과 같다.

㉠ rat IL-1β

sence oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGTGAGCTTGCAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCATTAC-3'

㉡ rat IL-6

sence oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTCTGTGACTCTAAC-3'

㉢ rat APP

sence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCAGAGTCTGAGCATCT-3'

㉣ rat AChE

sence oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisence oligonucleotide	5'-GTCACAGGCTGAGCATCT-3'

㉤ rat GFAP

sence oligonucleotide	5'-GAGCAGCTGGCCAGCAGCAG-3'
antisence oligonucleotide	5'-CTTGAGGTGGCTTCTGCAC-3'

㉥ rat G3PDH

sence oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisence oligonucleotide	5'-TCCACCACCTGTGTGCTGA-3'

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

4) PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE activity 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 黃柏 추출물(100μg/ml, 10μg/ml, 10μg/ml)과 Aβ(10μM)와 rIL-1β(100ng/ml)를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다.

세포 용해액을 얻기 위하여 50μl의 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, 10μg/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후, Bradford 염색법<sup>29)</sup>으로 단백질을 정량하였다.

(2) AChE activity 측정

세포 용해액을 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml과 혼합하였다. 각 tube에 water 3.0ml, 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.

5) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 백서 모델의 혈액분석

(1) 약물투여 및 scopolamine 주사

30주령 SD계 白鼠 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, tacrine(10mg/kg p.o)을 경구투여한 tacrine 투여군, 黃柏 추출물(100mg/kg p.o)을 경구투여한 실험군으로 하여 각각 scopolamine(1mg/kg i.p)을 7일간 1일 1회 복강 주사하면서 약물을 함께 투여하였다.

(2) Glucose, uric acid 측정

血清內 glucose, uric acid의 양은 자동생화학분석기를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE activity 측정

AChE activity 측정을 위하여 test tube와 blank tube를 표시하고, test tube에 sodium chloride solution 0.2ml과 serum 0.2ml을 넣고 혼합하였다. Blank tube와 test tube에 3.0ml water,

nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml 을 첨가하였다. 이후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 정확히 30분간 방치시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 바탕으로  $\Delta A = ABLANK - ATEST$  공식에 의해 활성도를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복학습 및 약물투여

ICR계 생쥐 100마리를 1주일간 Morris water maze에서 1회 선별을 실시하고 선별된 ICR계 생쥐를 다시 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복 학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치하고, 1일 1회 학습 시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 군으로 하여 아무런 처치를 하지 않은 대조군, tacrine(10mg/kg p.o)을 경구투여한 tacrine 투여군, 黃柏(250mg/kg p.o)을 경구 투여한 실험군으로 분류하였고 계속 21일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) Morris water maze 실험

훈련과 약물 투여가 종료되고 1주 후 ICR계 생쥐에 scopolamine(1mg/kg i.p)을 복강에 처리한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고 그 결과를 videotrack software로 분석하였다.

7) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고 Student's T-test 분석 방법<sup>30)</sup>을 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

성 적

1. mLFC와 PC-12 cell에 대한 세포독성

mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 200µg/ml 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 400µg/ml의 실험군은 64±3.5(%)로 감소하였으며, PC-12 cell의 생존율은 대조군에 비해 100µg/ml 이하의 실험군에서는 큰 변화가 없었고 200, 400µg/ml의 실험군에서는 36±2.9, 74±3.4(%)로 감소되었다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of PLDA Extract on mLFC and PC-12 Cell

Group	Concentration (µg/ml)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell
Control	0	100±4.2 <sup>d</sup>	100±4.4
	1	98±3.5	96±3.7
	10	95±4.3	91±3.8
PLDA	50	91±4.1	86±2.6**
	100	88±2.7**	83±4.2**
	200	82±3.7**	74±3.4***
	400	64±3.5***	36±2.9***

d: Mean ± Standard error, \*: 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-1β, IL-6 mRNA 발현 억제 효과

IL-1β, IL-6 mRNA 발현에 있어서 대조군에 비하여 실험군은 농도 의존적으로 발현을 억제하였다(Fig. 1, 2)

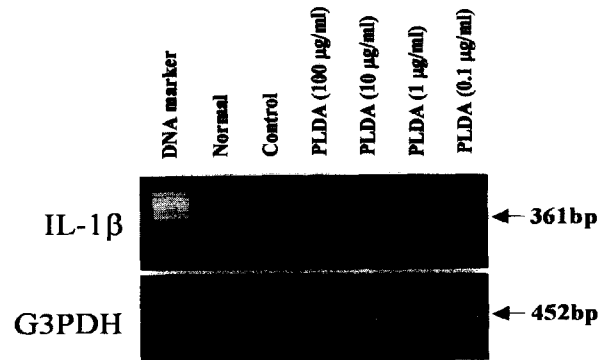


Fig. 1. Inhibitory effects of PLDA extract on IL-1β mRNA expression in PC-12 cell.

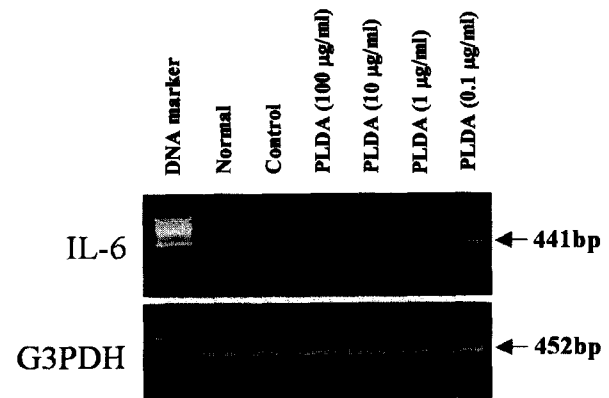


Fig. 2. Inhibitory effects of PLDA extract on IL-6 mRNA expression in PC-12 cell.

2) APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과

APP, AChE, GFAP mRNA 발현에 있어서 대조군에 비하여 실험군은 농도 의존적으로 발현을 억제하였다(Fig. 3-5).

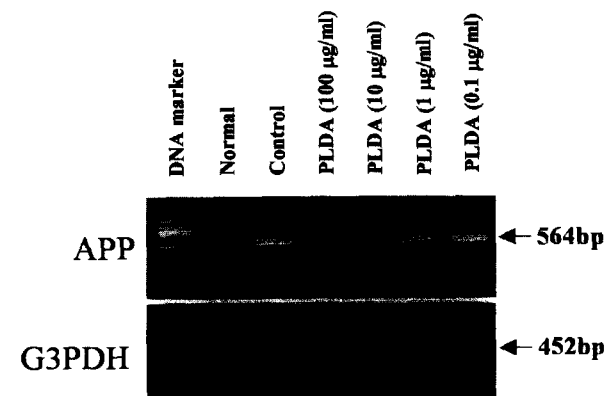


Fig. 3. Inhibitory effects of PLDA extract on APP mRNA expression in PC-12 cell.

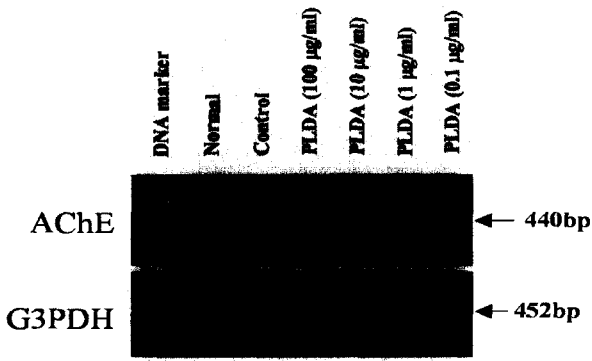


Fig. 4. Inhibitory effects of PLDA extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell.

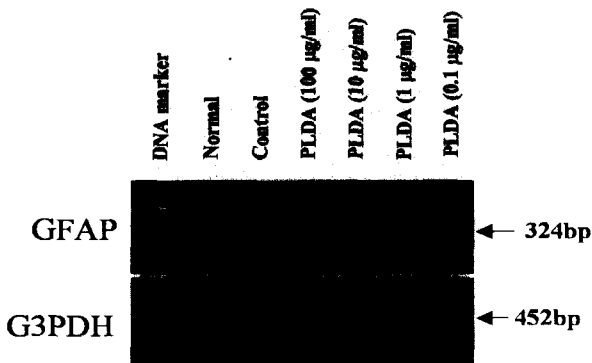


Fig. 5. Inhibitory effects of PLDA extract on GFAP mRNA expression in PC-12 cell.

3. PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE activity 억제 효과

대조군에 비해, 실험군, 즉 PLDA I, II, III는 각각 41.1±5.1, 48.8±4.6, 78.9±8.7(%)로 나타나 유의성 있는 억제효과를 보였고 PLDA IV는 105.5 ± 9.7로 유의성 있는 변화는 없었다(Table 2).

Table 2. Inhibitory Effects of PLDA Extract on the AChE Activity in PC-12 Cell

Group	AB & rIL-1β	AChE activity (% of control)
Normal	-	35.2 ± 3.6 <sup>a)</sup>
Control	+	116.3 ± 7.9
PLDA I	+	41.1 ± 5.1 <sup>***</sup>
PLDA II	+	48.8 ± 4.6 <sup>***</sup>
PLDA III	+	78.9 ± 8.7 <sup>**</sup>
PLDA IV	+	105.5 ± 9.7

<sup>a)</sup> : Mean ± Standard error. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

4. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 백서 모델의 혈청내 glucose, uric acid, AChE에 대한 효과

Glucose는 대조군이 56.5±4.2(mg/dl)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 61.1±4.8, 76.5±3.7(mg/dl)로 상승을 보였으나 유의성은 없었다(Table 3). Uric acid는 대조군이 2.54±0.19(mg/dl)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 2.06±0.17, 1.96±0.14(mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table 3). AChE activity는 대조군이 69.3±5.6(U/ml)인데 비하여,

tacrine 투여군과 실험군은 각각 31.3±7.1, 37.8±6.2(U/ml)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table 3).

Table 3. Effects of PLDA on the Serum Level of Memory Deficit Rats Induced by Scopolamine

Group	Glucose (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)	AChE (U/ml)
Normal	87.8±4.7 <sup>a)</sup>	1.24±0.03	26.7±1.5
Control	56.5±4.2	2.54±0.19	69.3±5.6
Tacrine	61.1±4.8	2.06±0.17*	31.3±7.1 <sup>***</sup>
PLDA	76.5±3.7	1.96±0.14*	37.8±6.2 <sup>**</sup>

<sup>a)</sup> : Mean ± Standard error. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

5. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐 모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과 대조군이 80.6± 13.9(sec)로 나타났고, tacrine 투여군은 15.2±4.0(sec)로 나타났으며, 실험군은 31.7±5.8로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 6).

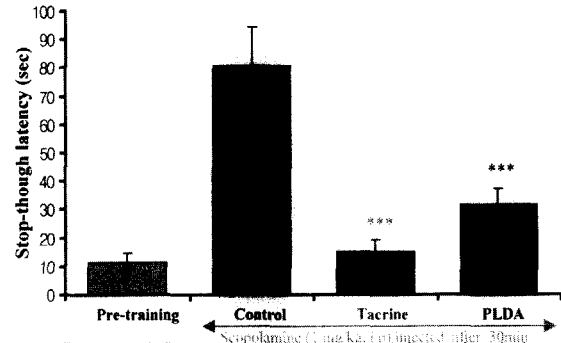


Fig. 6. Effects of PLDA on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type morris water maze test. a) : Mean ± Standard error \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1466±153.4(cm)로 나타났고, tacrine 투여군은 486±34.0(cm)로 나타났으며, 실험군은 502±77.6(cm)으로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 7).

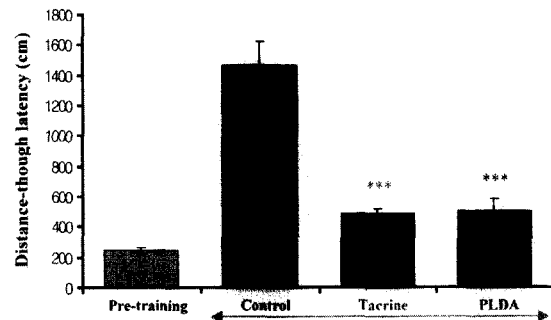


Fig. 7. Effects of PLDA on the the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movemet-through type morris water maze test. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

## 고찰

생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명이 최근 수십년 동안 크게 연장되어 노년층 인구가 늘어남에 따라 여러 가지 의학적 문제점들이 새롭게 부각되고 있는데, 그 중에서도 특히 고등정신기능 및 인격의 황폐화를 나타내는 대표적인 질환인 노년기 치매는 근래 들어 점차 증가 추세에 있어 인류의 커다란 사회문제로 대두될 것으로 보인다<sup>31)</sup>.

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발병되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상을 나타내는 질환이다<sup>2)</sup>.

AD는 1906년 독일의 정신과 의사인 Alzheimer가 초로기 치매에 관하여 보고하면서 처음 알려진 것으로<sup>32)</sup>, 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 망상, 행동장애 등의 증상을 나타내는<sup>33)</sup> 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다<sup>34)</sup>.

AD 유발에는 뇌의 전반적인 위축 이외에도 Aβ, estrogen, apolipoprotein E, presenilin, free radicals, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질의 불균형 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 대표적인 가설이다<sup>4)</sup>.

Aβ는 β-secretase나 γ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되는데<sup>35,36)</sup>, APP의 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 세포·세포간, 세포·간질간의 유착에 관여하며 구리, 아연 등 각종 이온의 세포내 유입에 관여할 것으로 생각되는 단백질로<sup>37)</sup>, APP의 유전자는 21번 염색체에 위치하고 있으며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30대와 40대에 AD 환자의 뇌에서 발견되는 똑같은 신경섬유 덩어리와 노인반이 나타난다. 이러한 병변은 유전자 증가에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 추측되고 있다<sup>36)</sup>.

한편 AD 환자의 기저 전뇌(basal forebrain)와 해마에서 APP의 유전자 발현이 증가되었다고 보고 되었고, 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고와 아밀로이드 베타 펩티드를 직접 뇌에 주사하면 주사부위의 신경세포가 사멸된다는 보고로 볼 때 APP가 노화과정, 특히 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다<sup>38)</sup>.

AD 기전과 관련된 다른 중요한 이론은 면역계에서만 생산될 수 있다고 믿어져 왔던 많은 cytokine들이 병원균의 침입 또는 물리적 뇌손상 등에 의해 손상된 brain blood barrier(BBB)를 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포가 활성화되어 proinflammatory cytokine들이 과다하게 생성되고 이로 인하여 사이토카인 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다는 가설이다<sup>39)</sup>.

이러한 가설은 AD, 파킨슨병, 다발성경화증 같은 퇴행성 뇌

질환의 병변부위에서 proinflammatory cytokine의 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써 많은 관심이 집중되고 있다<sup>40)</sup>.

이러한 proinflammatory cytokine의 작용과정은 뇌손상 등의 외부자극인자들에 의하여 microglial cell이 활성화 되어 IL-1β 및 TNF-α를 생산하며, 이들 염증반응 사이토카인들은 astrocyte를 활성화시켜 이산화질소(nitric oxide ; NO)를 생산하고 있는 활성산소종(reactive oxygen species ; ROS)의 일종인 peroxynitrite(OXOO) 등을 유도하여 신경세포의 사멸을 야기시키게 된다<sup>41)</sup>.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는데<sup>42)</sup>, AD의 주증상인 기억력장애가 해마 및 측두엽의 변연계에서 콜린성 신경전달 물질이 소실되어 생긴다고 알려져 있다<sup>43)</sup>. 특히 AD 환자에게서 나타나는 기억력감퇴는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이며 이 현상은 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다<sup>44)</sup>. 이처럼 AD는 뇌조직 내에서 choline계 활성이 감소되어 기억력의 감퇴를 일으키기 때문에 신경접합부에 작용하는 acetylcholine의 양을 증가시키거나, acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 약물들이 개발중인데 대표적으로 FDA의 승인을 받은 acetylcholinesterase의 활성을 억제하는 tacrine 등이 있다<sup>45)</sup>. 그러나 이들은 약물의 작용시간이 짧아 1일 4회나 복용하여야 하며 간독성이 많이 나타나는 단점이 있으며, 환자의 20~40%에서만 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>46)</sup>.

痴呆는 韓醫學의 癡呆<sup>6)</sup>, '呆病'<sup>7,8)</sup>, '健忘'<sup>9-12)</sup> 등의 範疇에 속하며, 癡呆에 대한 最初의 韓醫學의 記載는 明代 張6)의 《景岳全書·癡狂癡呆》중에 “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……”이다.

清代의 陳<sup>7,8)</sup> 등은 서양의학의 치매와 類似한 概念으로 '呆病'에 대해 詳細히 敘述하고 있다. 또한 《黃帝內經》<sup>9,10)</sup>을 비롯하여 많은 歷代醫書<sup>11,12)</sup>에서도 '癡呆'나 '呆病'의 명칭은 없으나 '健忘' 등의 언급에서 유사한 症狀를 제시하고 있다.

痴呆의 症狀는 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<sup>6,8,16-18)</sup> 등이며, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다<sup>6,8,16-18)</sup>. 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다<sup>6,8,16-18)</sup>.

黃柏(Phellodendron amurense)은 清熱燥濕藥으로 蓼香科(Rutaceae)에 속한 황벽나무의 樹皮를 건조한 것으로<sup>19)</sup>, 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱 하는 效能이 있어 黃疸, 帶下, 盜汗, 遺精 등을 治療한다<sup>19,20)</sup> 하였다.

《本草綱目》<sup>35)</sup>에서는 “補腎水不足, 堅腎壯骨髓, 療下焦虛, …… 療熱”이라 하였는데, 이러한 主治, 效能을 통하여 痰火, 心腎不交 등의 原因으로 발생하는 癡呆에 응용될 수 있다고 생각되었다.

최근 癡呆에 대한 연구동향을 살펴보면 安神清腦湯, 導痰益

氣活血湯, 加減固本丸, 香附子, 巴戟天, 山查肉이 痴呆에 미치는 영향에 대한 연구<sup>22-27</sup> 등 여러 실험 논문이 발표되었으나 單味 藥物인 黃柏이 痴呆에 미치는 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者は 黃柏의 痴呆에 대한 효과를 알아보고자, PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고, scopolamine으로 처리한 백서에서의 血清內 glucose, uric acid, AChE를 측정하였으며 역시 scopolamine으로 처리한 생쥐에서 Morris water maze를 통한 행동의 변화를 관찰하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell를 분리하여 黃柏의 세포독성을 측정 한 결과, mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 200 $\mu$ g/ml 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 400 $\mu$ g/ml의 실험군은 64 $\pm$ 3.5(%)로 감소하였으며, PC-12 cell의 생존율은 대조군에 비해 100 $\mu$ g/ml 이하의 실험군에서는 큰 변화가 없었고 200, 400 $\mu$ g/ml의 실험군에서는 36 $\pm$ 2.9, 74 $\pm$ 3.4(%)로 감소되었다 (Table 1). 100 $\mu$ g/ml 이하의 농도로 黃柏을 처리하였을 때 정상세포인 mLFC에서는 세포독성을 나타내지 않았고 병적 상태의 세포인 PC-12 cell에서는 생존율이 약 80%이었으므로 이후의 PC-12 cell을 이용한 실험에서는 주로 100 $\mu$ g/ml 이하의 黃柏을 사용하였다.

PC-12 cell의 IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 발현을 측정 한 결과 IL-1 $\beta$  mRNA 발현에서는 10 $\mu$ M의 A $\beta$ 와 100ng/ml rIL-1 $\beta$ 만을 처리한 대조군에 비해, A $\beta$ , rIL-1 $\beta$ 와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 黃柏을 함께 투여한 실험군에서 발현이 농도 의존적으로 억제되었고 (Fig. 1), IL-6 mRNA 발현에서는 10 $\mu$ M의 A $\beta$ 와 100ng/ml rIL-1 $\beta$ 만을 처리한 대조군에 비해, A $\beta$ , rIL-1 $\beta$ 와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 黃柏을 함께 投與한 실험군에서 농도 의존적으로 발현이 억제되었는데 (Fig. 2), 이를 통하여 黃柏이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

AD를 유발과 관련되어 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 cell에서 관찰한 결과, APP, AChE, GFAP mRNA 발현에 있어서 10 $\mu$ M의 A $\beta$ 와 100ng/ml rIL-1 $\beta$ 만을 처리한 대조군에 비해, A $\beta$ , rIL-1 $\beta$ 와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/ml의 黃柏을 함께 투여한 실험군에서 모두 농도 의존적으로 발현이 억제되었는데 (Fig. 3-5), 이를 통하여 黃柏은 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE activity를 측정 한 결과 대조군에 비해 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 黃柏을 함께 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데 (Table. 2), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 黃柏의 투여로 PC-12 cell의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되어, 黃柏의 투여가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력 감퇴를 회복시키는 역할을 하는 것으로 생각되고 있으며<sup>47</sup>, uric acid는 핵산 중 purine 염기의 최종 대사산물로<sup>48</sup>, AD와 VD에서 增加되

는 것으로 알려져 있다<sup>49</sup>.

이런 관점에서 黃柏이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 혈청 내 glucose, uric acid에 미치는 효과를 분석한 결과, glucose는 대조군에 비하여, 실험군에서 유의성을 없었으나 증가를 보였고, uric acid는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 나타냈는데 (Table 3), 이로써 黃柏이 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켜 기억력 감퇴를 회복시키고 AD 억제에 효과가 있을 것으로 생각된다.

또한 血清內 AChE를 분석한 결과 AChE activity는 대조군에 비하여, tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데 (Table 3), 이로써 黃柏이 PC-12 cell의 유전자, 세포성 단백질뿐만 아니라 白鼠 혈청에서 역시 AChE의 활성을 억제함으로써 (Table 3), AChE의 과다로 인한 acetylcholine의 작용 저하를 개선하여 기억력 감퇴에 대한 치료 효과가 있을 것으로 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 실험군에서 유의성 시간의 단축을 보였고 (Fig. 6), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데 (Fig. 7), 이것으로 黃柏 투여 후 기억력 감퇴가 억제되었음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 黃柏은 PC-12 cell에서 유전자 수준에서 IL-1 $\beta$ , IL-6의 proinflammatory cytokine의 발현과 APP, AChE, GFAP의 발현을 억제하였고, 세포성 단백질 수준에서 AChE의 활성을 감소시켰으며, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 모델의 혈청내 uric acid와 AChE를 減少시켰으며 Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 記憶力減退를 개선시켰다.

따라서 黃柏은 microglial cell의 proinflammatory cytokine의 과다발현, APP의 과다생성, AChE의 과잉 활성화로 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

黃柏이 AD 병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

黃柏은 PC-12 cell에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 發顯을 抑制하였다. 黃柏은 PC-12 cell의 세포성 단백질에서 AChE의 활성을 유의성 있게 抑制하였다. 黃柏은 scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 白鼠의 혈청내에서 유의성 있게 uric acid를 감소, AChE 활성을 억제하였다. 黃柏은 scopolamine으로 誘導된 기억력 감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance movemet-through latency 측정에서 유의성 있는 기억력 감퇴를 개선시켰다.

이상의 결과로 보아 黃柏은 IL-1 $\beta$ , IL-6, APP, AChE, GFAP mRNA의 발현과 AChE의 활성을 억제하여 AD의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

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. 이광우, 정희원 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.199-210, 1997.
3. Selkoe DJ : The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol, 8(11):447-453, 1998.
4. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem, 274(49):34584-34589, 1999.
5. 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.
6. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
7. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
8. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書,台北, 甘地出版社, pp.222-225, 233-235, 1990.
9. 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.
10. 洪元植 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.68, 342, 1985.
11. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129-135, p.534, 545, 550, 1982.
12. 趙 佶 : 聖濟總錄,北京, 人民衛生出版社, pp.822-825, 1987.
13. 朱震亨 : 金匱鉤玄, 서울, 鼎談出版社, p.727, 1992.
14. 王肯堂 : 證治準繩, 서울, 鼎談出版社, pp.306-307, 1992.
15. 龔廷賢 : 壽世保元,江蘇城, 江蘇科學技術出版社, p.43, 1980.
16. 楊思澎 외 : 中醫臨床大全,北京, 北京科學技術出版社, pp.224-230, 1991.
17. 陳 輝 외 : 實用中醫腦病學,北京, 學苑出版社, pp.242-251, 784-791, 1993.
18. 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.
19. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, pp.180-181, 1992.
20. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 薰文社, pp.641-647, 1988.
21. 李時珍 : 本草綱目,山西, 山西科學技術出版社, pp.1545-1547, 1999.
22. 김보경, 이상룡 : 安神清腦湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향, 東醫生理病理學會誌, 15(5):708-722, 2001.
23. 정인철, 이상룡 : 導痰益氣活血湯이 알츠하이머 질환 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, 東醫生理病理學會誌, 15(2):260-276, 2001.
24. 하수영, 이상룡 : 加減固本丸이 치매병태모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 13(1):53-77, 2002.
25. 윤상학 : 香附子가 癡呆病態모델에 미치는 實驗的 研究, 대전 대학교석사학위논문, 2001.
26. 김현수 : 巴戟天이 癡呆病態모델에 미치는 實驗的 研究, 대전 대학교석사학위논문, 2001.
27. 채종걸, 이상룡 : 山查肉이 CT105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 13(1):79-115, 2002.
28. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst, 82(13):1107-1112, 1990.
29. Zor T, Selinger Z : Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem, 236(2):302-308, 1996.
30. 金宇哲 외 : 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp.177-179, 1990.
31. 서무규 : 성인병 · 노인병학, 서울, 高麗醫學, pp.225-267, 1986.
32. 裴旻星 : 老人性 癡呆에 關한 體質學的 研究, 大韓韓醫學會誌, 13(2):101-106, 1992.
33. 이근후 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216-228, 1986.
34. 한일우 외 : Alzheimer병의 증상, 계명의대논문집, 16(3): 339-347, 1997.
35. 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.
36. 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.
37. Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, et al : The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). Science, 271(1):1406-1409, 1996.
38. Breakfield XO and Geller AI : Gene transfer into the nervous system. Mol Neurobiol. 1(4), 339-371, 1989.
39. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E : Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. J Immunol, 129(6):2413-2419, 1983.
40. Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT, Brosnan CF : Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. J Neurochem, 57(3):823-830, 1991.
41. Simmons ML, Murphy S : Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem, 59(3):897-905, 1992.
42. 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.
43. Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH : Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med*, 62(5):405-409, 1996.
44. 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.
45. 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.
46. Rupniak NM, Tye SJ, Field MJ : Enhanced performance of spatial and visual recognition memory tasks by the selective acetylcholinesterase inhibitor E2020 in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 131(4):406-410, 1997.
47. Messier C : The absence of effect of glucose on memory is associated with low susceptibility to the amnesic effects of scopolamine in a strain of mice. *Behav Brain Res*, 96(1-2):47-57, 1998.
48. 이귀녕, 이종순 : 임상병리파일, 서울, 의학문화사, pp.92-96, 1993.
49. Degrell I, Niklasson F : Purine metabolites in the CSF in presenile and senile dementia of Alzheimer type, and in multi infarct dementia. *Arch Gerontol Geriatr*, 7(2):173-178, 1998.