동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 1, 2006

聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물, 나노분말 제형을 이용한 치매에 관한 연구

오영진, 김보경
동의대학교 한의과대학 신경정신과학 교실

A Study of ChongMyungTang(CMT) and HyangbujaChongMyungTang(HCMT) on Dementia - Extract & Nano Powder Drug types

Young-jin Oh, Bo-kyung Kim
Dept. of Neuropsychiatry, college of oriental medicine, dongeui university

Abstract

Objective : This research aims to investigates the effects of CMT and HCMT on Dementia. and we also want to know the different effect of CMT, HCMT by drug types.

Methods : The research is progressed by two types of experiment. one experiment is BV2 microglial cell line treated by LPS in vitro and another experiment is memory deficit mice induced by scopolamine in vivo.

Results : The CMT and HCMT is effective in BV2 microglial cell line treated by LPS in vitro and in the serum of the memory deficit mice induced by scopolamine in vivo. But, there is no significant difference between CMT and HCMT extract&nano powder in experimental conclusion.

Conclusions : These results suggest that the two drug types of CMT and HCMT may be effective for the prevention and treatment of Dementia. Investigation into the further study two drug types of the CMT and HCMT for Dementia is suggested for future research.

Key words : Dementia, ChongMyungTang(CMT), HyangbujaChongMyungTang(HCMT)

◆ 투고 : 2/20, 채택 : 3/8
교신저자 : 김보경, 부산시 진구 양정동 동의으료원 한방신경정신과
Tel. 051-850-8809, Fax. 051-867-5162, E-mail : npjolie@deu.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

痴呆는 전반적인 지능, 학습, 언어 등의 인지기능과 고등정신기능이 감퇴되는 복합적인 이상증후군을 일괄하여 지칭하는 것이다.

痴呆의 유병율은 연령에 따라 증가하여 65세 이상에서 약 5~10%, 80세에는 20~30% 정도로 나타나며, 그 중에서 Alzheimer's Disease(AD)가 차지하는 부분이 50~60%이상으로 가장 크다[1].

AD의 발병에는 β amyloid peptide(Aβ), estrogen, apolipoprotein E, presenilin, oxidants free radicals, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며[2], 뇌의 Microglial cell이 뇌손상 및 외부로부터의 이물질 침입으로 활성화되면, proinflammatory cytokines[3], nitric oxide(NO)[4] 및 prostaglandin을 다량 분비하여 세포독성을 일으킨다는 가설이 제기되고 있다[5].

또한, Microglial cell의 활성화로 anti-inflammatory cytokine도 생성되는데, 이들이 AD의 변이기전을 저해한다는 연구가 보고되고 있다[6].

치매의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계, 특히 acetylcholine과 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다[7,8].

한의학에서 痴呆의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등으로 표현하며, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 제시되고 있다[9,10].

《東醫寶鑑·內景篇》[11]에는 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 하여 健忘 및 痴呆 등의 병증에 聰明湯을 활용할 수 있음이 기재되어 있다.

최근 들어 한의학계에는 痴呆와 관련된 다수의 연구[12-14]가 보고되고 있으며, 김 등[15-17]은 기억력감퇴 유도 생쥐에 대한 聰明湯의 효과를 연구하였고, 윤 등[18-20]은 香附子를 비롯한 單味 本草가 痴呆 病態모델에 미치는 영향을 실험하였다.

현재 한약의 효과를 높이면서 복용의 편리를 추구하는 제형의 변화를 시도하고 있으며[21,22], drug delivery system(DDS) 분야에서 제형을 변화시켜 약물의 흡수율과 효과를 높이는 nanotechnology가 개발되어 다양하게 응용되고 있으나, 한약의 나노 제형에 관한 연구결과는 미흡한 편이다.

이에 著者는 聰明湯과 理氣解鬱의 효과가 있는 香附子를 加味한 香附子聰明湯으로 抗痴呆效果에 관한 실험적 연구를 시도하였다.

in vitro 실험으로 immortalized murine BV2 microglia 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현과 IL-10과 TGF-β1등의 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하고, NO, ROS도 측정하였다. in vivo 실험에서 聰明湯과 香附子聰明湯의 제형변화에 따른 효과의 차이를 검증하고자, 각 처방의 동결 건조한 extract 제형과 나노분말 제형을 사용하여 scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 생쥐모델에서 혈청 내 ALT., total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, uric acid, acetylcholinesterase(AChE)에 미치는 변화를 측정하고, Moris water maze를 이용하여 기억력을 관찰하였다.

이에 약간의 지견을 얻었으므로 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 Cholinesterase kit(420-MC, sigma, U.S.A.), scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluo ride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, poly acrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 제품을, RNAzol[B]는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer (shimazue, Japan), rotary vaccum evaporator(B□chi, B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), centrifuge(sigma, U.S.A.), bio-freezer(sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ice-maker(비전과학, Korea), ELISA reader(molecular devices, U.S.A.), 및 homogenizer(OMNI, U.S.A.), automatic chemical analyzer(Express 550, Ciba-Corning Co., U.S.A.), VIDEOTRACK(Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy(Nikon, Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), Turbo mill(air-flow type mill, ATM-100, 부성분체, Korea), 공기분급장치(air classification system, ATM-100, 부성분체, Korea), Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA), flow cytometer(Becton Dickinson, Co., USA), 자동생화학분석기(Biochemical analyzer, Express 550) 등이다.

2) 동물

8주령의 雌性 International Cancer Research(ICR)계 생쥐를 한국생명공학연구원에서 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일 중 12시간은 200-300Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 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 공급하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 聰明湯(ChongMyungTang, CMT)의 처방구성은 《東醫寶鑑》[18]을 기준으로 하였고, 香附子聰明湯(HyangbujaChongMyung Tang, HCMT)은 聰明湯에 香附子 12g을 가미한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of ChongMyungTang(CMT) & HyangbujaChongMyungTang(HCMT)

韓藥名	生 藥 名	CMT 用量(g)	HCMT 用量(g)
白茯神	Hoelen	12	12
遠志	Polygalae Radix	12	12
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	12	12
香附子	Cyperi Rhizoma	0	12
	Total amount	36g	48g

4) 검액의 조제

(1) 聰明湯 및 香附子聰明湯 추출물 분리 및 검액의 조제

聰明湯 3첩 분량(108g)과 香附子聰明湯 3첩 분량(144g)에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 한약추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

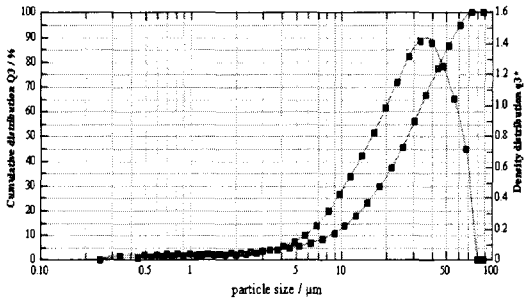
(2) 聰明湯 및 香附子聰明湯 나노분말 및 검액의 조제

나노 분말은 (주)허브월드에서 제작·협조하였으며, 白茯神, 遠志, 石菖蒲, 香附子 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 실시하였다. 입도분석은 한국콜마(주)에서 실시·협조하였다.

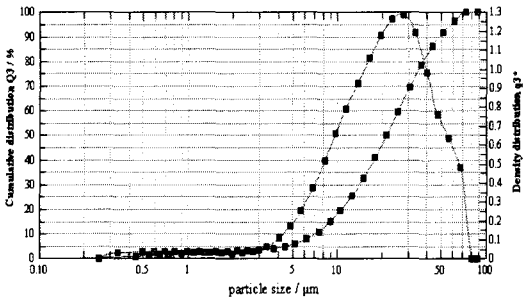
이와 같이 얻은 聰明湯과 香附子聰明湯 나노분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 400㎎/㎏의 농도로 희석하여 사용하였다.

각 약물의 입도를 분석하면 다음과 같다

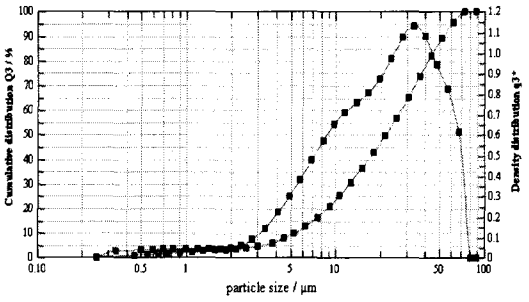
ⓐ 白茯神(x_{50}=27.74㎛)



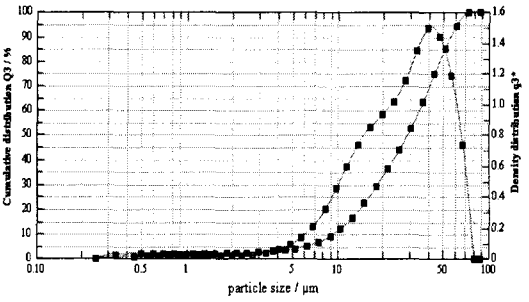
ⓑ 遠志(x_{50}=21.57㎛)



ⓒ 石菖蒲(x_{50}=21.78㎛)



ⓓ 香附子(x_{50}=28.98㎛)



2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15㎖)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium{DMEM ; containing collagenase A(5㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.), DNase type I (0.15㎎/㎖, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillinm 104U/㎖, streptomycin 10㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10^5cells/㎖ 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주하였다.

BV2 microglial cell(The immortalized murine BV2 cell line)는 Tong H. Joh(Burke Institute, Cornell University, NY, USA)으로부터 공급 받아 DMEM에 10% 우태아 혈청으로 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법[23]을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10^4개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양한 후 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(최종 농도 200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24wells plate)에 LPS(0.1㎍/㎖), 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(100㎍/㎖)을 처리하고 72시간 동안 동시 배양하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50㎕를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. BV2 microglial cell line의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell line(1×10^5 cells/24well plate)에 LPS(0.1 ㎍/㎖), 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(100㎍/㎖)을 처리하여, 6시간과 72시간 동안 동시 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

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

(1) 약물처리

BV2 microglial cell line은 24 wells plate에 2×10^5세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10 ㎍/㎖)을 첨가하고 1시간 후 LPS 0.1㎍/㎖를 처리하여, 6시간 동안 동시 배양하였다.

(2) 유전자 발현분석

① RNA 추출

배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^B 500㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유

액에 chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 DNase I (10U/㎕) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1㎕ 100mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. 염증사이토카인 및 항염증사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2min at 50℃, 10min 94℃, 그리고 40 cycles은 0.15min at 95℃, 1min at 60℃에서 수행하였다. 실험군과 대조군의 Quantitative PCR은 다음과 같이 계산하여 RQ(relative quantitative)을 측정하였다.

$y=x(1+e)n$

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

사용된 primers는 다음과 같다.

ⓐ mouse G3PDH

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

ⓑ mouse IL-1β

Forward Primer: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

ⓒ mouse IL-6

Forward Primer: 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
Reverse Primer: 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

ⓓ mouse TNF-α

Forward Primer:5' CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'
Reverse Primer: 5'ATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'

ⓔ mouse COX-2

Forward Primer: 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
Reverse Primer: 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'

ⓕ mouse NOS-II

Forward Primer: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
Reverse Primer: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

ⓖ mouse IL-10

Forward Primer: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
Reverse Primer: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT

ⓗ mouse TGF-β1

Forward Primer: TGACGTCACTGGAGTTGTACGG
Reverse Primer: GGTTCATGTCATGGATGGTGC

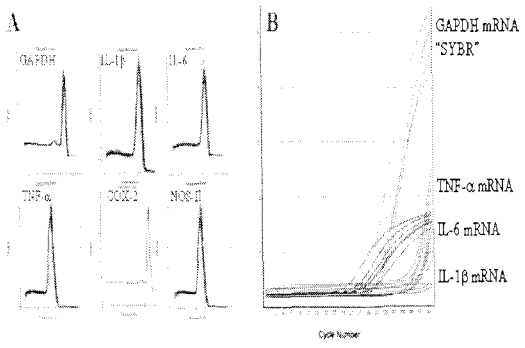


Fig. 1. Dissociation curves(A) and Amplification profiles(B) of inflammatory substance gene expression in BV2 microglial cell line.

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

BV2 microglial cell line을 실험 3일전에 subculture(1×10^5cells/㎖) 하여 96 wells plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 DMEM 배양액으로 overnight 시켰다. 聰明湯과 香附子聰明湯(100㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 LPS(0.1㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 聰明湯과 香附子聰明湯(100㎍/㎖)을 처리하고 48시간 동안 CO_2 조직 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100㎕(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

BV2 microglial cell line을 96 wells plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물을(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖) 처리하고 1시간 후 LPS(0.1㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonylamide in 5% H_3PO_4)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100㎕를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) BV2 microglial cell line의 배양 상층액 내 reactive oxygen species(ROS)의 분석

BV2 microglial cell line 내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5cells씩 첨가하고, 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 10㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 LPS(1㎍/㎖)를 처리한 후 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50㎛M을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

6) PC-12 세포주 세포성 단백질에서의 AChE 활성도 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721) 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청

으로 배양하였다. PC-12 세포주에 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 Aβ(10μM)를 24시간 동시 배양한 후 cell lysate를 얻었다.

세포 용해액을 얻기 위하여 50㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM, pH8.0), 150mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후 Bradford 염색법[24]으로 단백질을 정량하여 50㎍으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

Cell lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2㎖와 혼합하였다. 각 tube에 water 3.0㎖, nitrophenol solution 2.0㎖, acetylcholine chloride solution 0.2㎖을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 혈액분석

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

10주령 ICR계 생쥐 10마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, Galanthamine(3㎎/kg, *i.p*)을 투여한 양성대조군, 聰明湯과 香附子聰明湯 추출물(400㎎/kg) 및 聰明湯과 香附子聰明湯 나노분말(400㎎/kg)을 10일 동안 경구 투여한 실험군으로 나누고, scopolamine(1㎎/kg)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) 혈청 생화학물질의 함량 측정

혈청 중 ALT., total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, uric acid 수치는 자동생화학분석기를 사용하여 측정하였다.

(3) AChE 활성도 측정

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

8) Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

선별된 ICR계 생쥐에 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90㎝이고 높이가 약 30㎝인 수조로 수온이 27℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10㎝인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습 시 ICR계 생쥐가 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, Galanthamine 투여군(Galanthamine(3㎎/kg, *i.p*)), 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물(400㎎/kg p.o), 聰明湯 실험군, 聰明湯과 香附子聰明湯의 나노분말(400㎎/kg p.o) 실험군으로 분류하였고, 21일간 약물을 투여하면서 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1㎎/kg)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩

넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하고, 이를 videotrack software로 분석하였다.

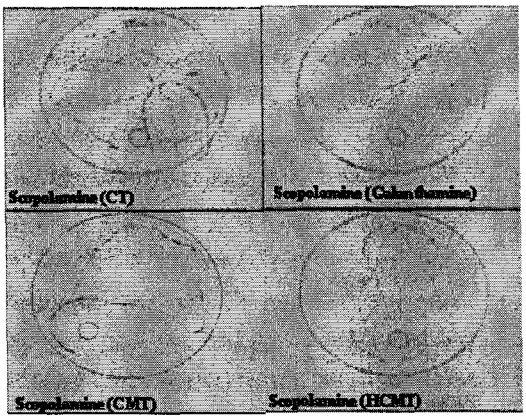


Fig. 2. Movement of the memory deficit mice induced by scopolamine in Morris water maze test.

3. 통계 분석

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

Ⅲ. 成 績

1. 聰明湯 및 香附子聰明湯의 세포독성

1) mLFC에서 聰明湯 및 香附子聰明湯에 대한 세포독성

mLFC에 대한 세포독성 평가에서는 聰明湯 200, 100, 50, 10, 1㎍/㎖ 농도에서 대조군에 비해 각각 88.1±4.6, 90.6±2.6, 93.1±4.6, 97.4±3.5, 98.6±6.5%로 나타났다.

香附子聰明湯 200, 100, 50, 10, 1㎍/㎖ 농도에서 대조군에 비해 각각 72.3±4.8, 82.1±3.8, 86.5±5.6, 93.1±4.1, 94.4±5.1%로 나타났다.

대조군에 비해 聰明湯 200, 100, 50, 10, 1과 香附子聰明湯 100, 50, 10 농도에서 유의성(*$p<0.05$) 있게 감소하였으나, 80% 이상으로 나타났다(Fig. 3).

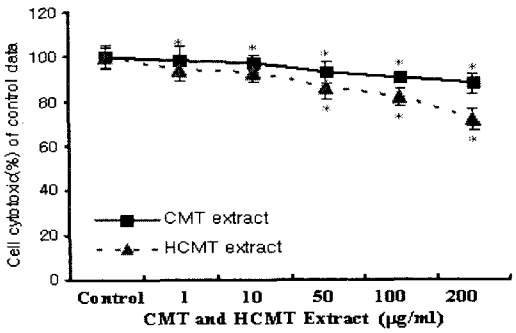


Fig. 3. Cytotoxicity of CMT and HCMT extract on mLFCs. mLFCs were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract. The data (% cytotoxicity) in the Figure are expressed as the mean ± SEM. Comparison between CMT and HCMT-treated and untreated control groups were analyzed using ANOVA test(*$p<0.05$).

2) BV2 microglial cell line의 형태학적 변화와 세포생존률 측정

BV2 microglial cell line에 LPS를 처리하여 6시간이 경과하면 대조군은 구형인 세포가 넓게 퍼지면서 세포가 활성화된 형태적 변화를 보였고 72시간 경과 시, 세포 중 절반 이상이 사멸됨을 관찰할 수 있다. 그에 비하여 香附子聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 잘 유지됨을 볼 수 있다(Fig. 4A).

BV2 microglial cell line에 대한 세포독성 평가에서는 LPS (0.1㎍/ml)와 聰明湯 및 香附子聰明湯 추출물 (100 ㎍/㎖)에서 각각 52.3±10.1, 87.7±3.2, 83.3±5.0%로 대조군에 비해 聰明湯, 香附子聰明湯이 모두 유의성(*$p<0.05$) 있는 차이를 보였다(Fig. 4B).

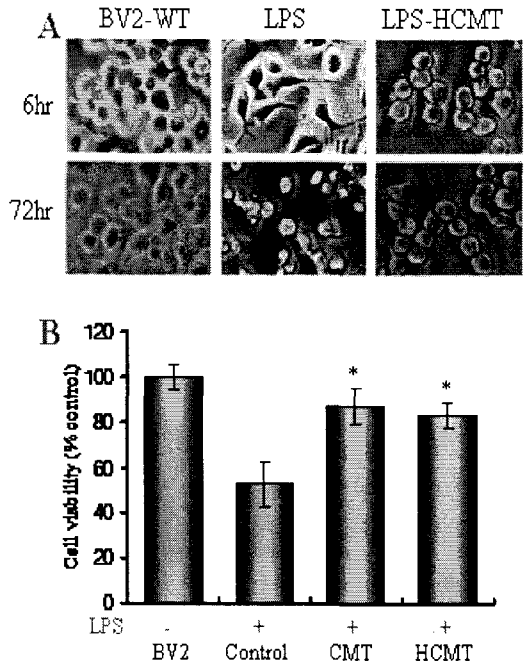


Fig. 4. The effect of CMT and HCMT on morphological change and cell viability cell death in LPS-treated BV2 microglial cells.

BV2 microglial cell line(2x105 cells/well in 24-well plates) were pretreated with CMT and HCMT for 1hr and then treated with LPS(0.1㎍/ml) for 6 or 72hrs. Cell morphology was observed using phase contrast microscopy(A) while cell viability was determined by SRB assay(B). Results are mean±SEM from three experiments performed in duplicate. Statistically significant value compared with control group data by ANOVA test(*p<0.05).

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

1) IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/mℓ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 IL-1β 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 0.748, 0.874, 0.975, 0.644, 0.738, 0.869로 나타났다. 전체적으로 香附子聰明湯이 聰明湯보다 IL-1β 발현을 억제하였고, 香附子聰明湯 100㎍/mℓ 농도에서 발현억제 효과가 가장 좋았다(Fig. 5).

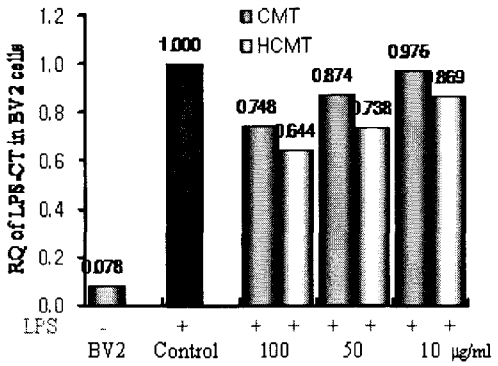


Fig. 5. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on IL-1β mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/mℓ) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/mℓ) for 6hrs. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β mRNA express 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.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/mℓ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 IL-6 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 0.688, 0.815, 0.968, 0.446, 0.687, 0.820로 나타났다. 전체적으로 香附子聰明湯이 聰明湯보다 IL-6 발현을 억제하였고, 香附子聰明湯 100㎍/mℓ 농도에서 발현억제 효과가 가장 좋았다(Fig. 6).

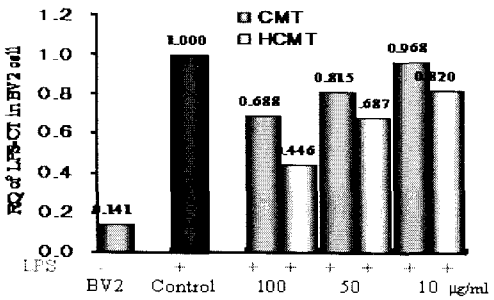


Fig. 6. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on IL-6 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/㎖) for 6hrs. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-6 mRNA express 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.

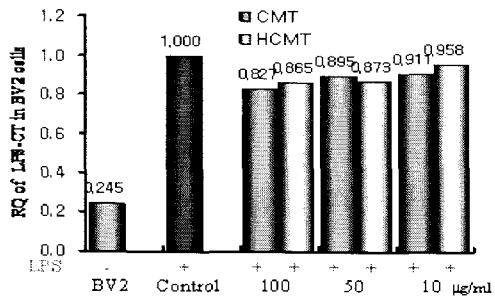


Fig. 7. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on TNF-α mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/㎖) for 6hrs. TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TNF-α mRNA express 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.

3) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/㎖ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 TNF-α 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 0.827, 0.895, 0.911, 0.865, 0.873, 0.958로 나타났다. 전체적으로 농도 의존적으로 TNF-α 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 7).

4) IL-10 mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/㎖ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 IL-10 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 1.345, 1.140, 0.985, 1.453, 1.205, 0.996로 나타났다. 전체적으로 농도 의존적으로 IL-10 유전자 발현은 증가하였다(Fig. 8).

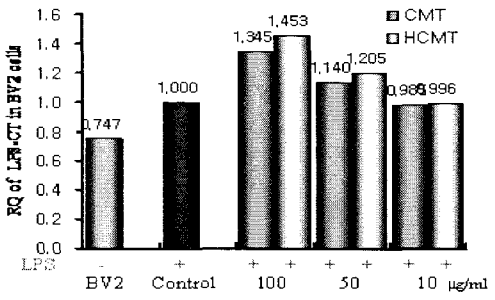


Fig. 8. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on IL-10 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/㎖) for 6 hrs. IL-10 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-10 mRNA express 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.

5) TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/㎖ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 TGF-β1 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 1.442, 1.105, 0.988, 1.685, 1.354, 0.975로 나타났다. 전체적으로 농도 의존적으로 TGF-β1 유전자 발현은 증가하였다(Fig. 9).

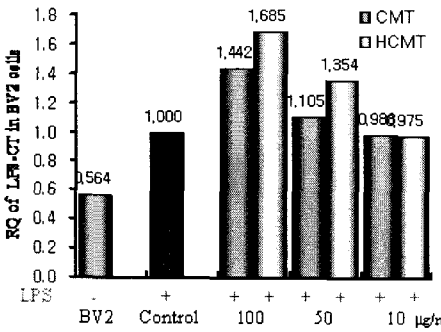


Fig. 9. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on TGF-β1 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2 ㎍/㎖) for 6 hrs. TGF-β1 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TGF-β1 mRNA express 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.

6) COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/㎖ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 COX-2 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 0.744, 0.865, 0.991, 0.683, 0.745, 0.922로 나타났다.

전체적으로 香附子聰明湯이 聰明湯보다 COX-2 발현을 억제하였고, 香附子聰明湯 100㎍/㎖ 농도에서 발현억제 효과가 가장 좋았다(Fig. 10).

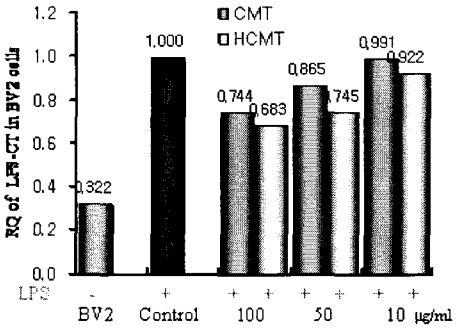


Fig. 10. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on COX-2 mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/㎖) for 6 hrs. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. COX-2 mRNA express 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.

7) NOS-II mRNA 발현에 미치는 영향

100, 50, 10㎍/㎖ 각 농도별 聰明湯, 香附子聰明湯의 NOS-II 유전자 발현은 LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, 각각 0.623, 0.744, 0.865, 0.479, 0.671, 0.898로 나타났다.

전체적으로 香附子聰明湯이 聰明湯보다 NOS-II 발현을 억제하였고, 香附子聰明湯 100㎍/㎖ 농도에서 발현억제 효과가 가장 좋았다(Fig. 11).

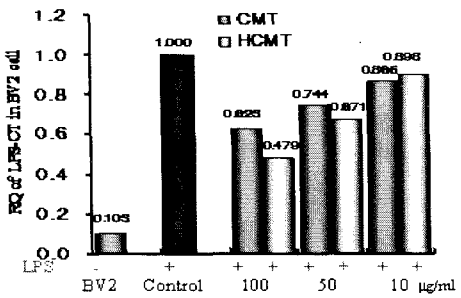


Fig. 11. Inhibitory effects of CMT and HCMT extract on NOS-II mRNA expression in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2㎍/㎖) for 6 hrs. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. NOS-II mRNA express 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.

3. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 proinflammatory cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β 생성량은 정상군이 31.3±15.3pg/㎖이고, 대조군은 633±61.6pg/㎖, LPS와 CMT 처리군은 522±114.2pg/㎖, LPS와 HCMT 처리군은 501±144.8pg/㎖로 나타났으며, 聰明湯과 香附子聰明湯 두 실험군에서 IL-1β cytokine의 생성이 모두 감소하였으나, 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 12).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-6 생성량은 정상군이 168±77.2pg/㎖이고, 대조군은 5896±1285.6pg/㎖, LPS와 CMT 처리군은 5015±476.2pg/㎖, LPS와 HCMT 처리군은 4780±344.4pg/㎖로 나타났으며, 聰明湯과 香附子聰明湯 두 실험군에서 IL-6 cytokine의 생성이 모두 감소하였으나, 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 13).

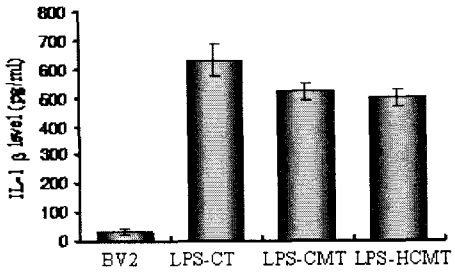


Fig. 12. Inhibitory effect of CMT and HCMT extract on the IL-1β production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with CMT and HCMT extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and IL-1β concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means±S.D(N=3). Statistically significant value compared with LPS-control group data by ANOVA test(*p<0.05).

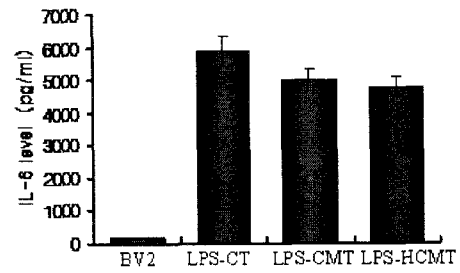


Fig. 13. Inhibitory effect of CMT and HCMT extract on the IL-6 production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with CMT and HCMT extract(100㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(0.1㎍/㎖) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and IL-6 concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means±S.D(N=3). Statistically significant value compared with LPS-control group data by ANOVA test(*p<0.05).

3) TNF-a 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 TNF-α 생성량은 정상군이 455±183.2pg/mℓ이고, 대조군은 2664±512.5pg/mℓ, LPS와 CMT 처리군은 2465±322.1pg/mℓ, LPS와 HCMT 처리군은 2654±1036.3pg/mℓ로 나타났으며, 聰明湯과 香附子聰明湯 두 실험군에서 TNF-α cytokine의 생성이 모두 감소하였으나, 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 14).

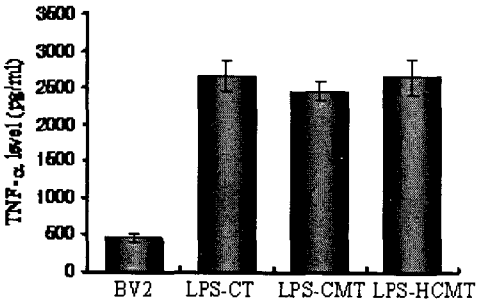


Fig. 14. Inhibitory effect of CMT and HCMT extract on the TNF-α production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line were pretreated with CMT and HCMT extract(100μg/mℓ) in the presence or absence of lipopolysacchride(0.1μg/mℓ) for 48hrs. The culture supernatant were collected after 48hrs and TNF-α concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means±S.D(N=3). Statistically significant value compared with LPS-control group data by ANOVA test(*p<0.05).

4. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량은 정상군이 9.4±3.1mM, 대조군이 65.4±13.6mM로 나타났으며, CMT extract 100, 50, 10μg/mℓ 처리군에서는 각각 52.3±10.2, 57.6±11.7, 63.2±10.5mM로 나타났고, HCMT extract 100, 50, 10μg/mℓ 처리군에서는 각각 52.1±10.2, 57.7±10.3, 59.1±11.0mM로 나타났다. 그러나, 유의성(*p<0.05) 있는 감소를 보이지 못했다(Fig. 15).

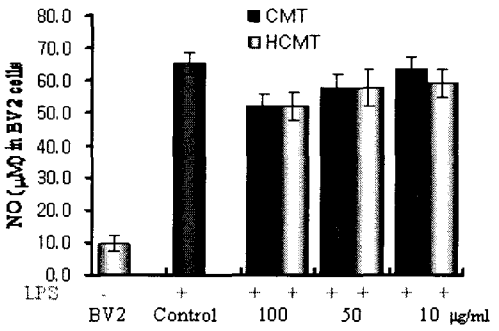


Fig. 15. Inhibitory effect of CMT and HCMT extract on the NO release in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cell line was pretreated with various concentrations of CMT and HCMT extract(100, 50, 10μg/mℓ) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2μg/mℓ) for 48hrs. The culture supernatent was collected 24hrs later and NO(nitric oxide) concentration in the supernatant was assayed. The data are expressed as the mean±SEM. Statistically significant value compared with control group data by ANOVA test(*p<0.05).

5. BV2 microglial cell line에서 ROS의 분석

BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 ROS를 발현하는 염증세포의 수를 분석한 결과, 정상군에서 3.2(%), 대조군은 46.9(%)이었고 香附子聰明湯 100μg/mℓ 실험군(C)은 25.6(%), 香附子聰明湯 10μg/mℓ 실험군(D)은 31.5(%)로 나타났다(Fig. 16).

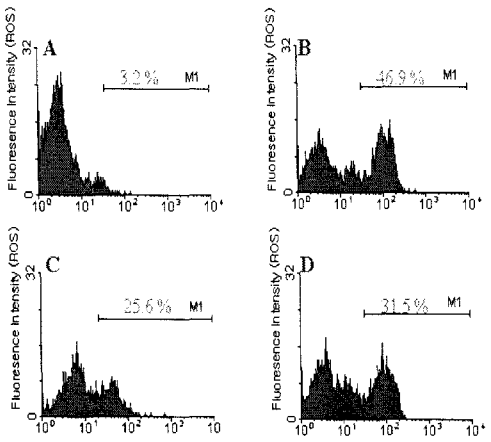


Fig. 16. Inhibitory effect of CMT and HCMT extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

BV2 microglial cells were treated with various concentrations of CMT and HCMT extract(C: 100㎍/㎖, D: 10㎍/㎖) in the presence(control, B) or absence(A) of LPS(2㎍/㎖) for 48hrs. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent(50mM), harvested, and assayed for ROS positive cells(M1) by flow cytometry.

6. PC-12 세포주 세포성 단백질에서의 AChE 활성도 측정

PC-12 세포주에서 AChE 생성량은 정상군이 18.9±4.8%, 대조군이 100±5.8%로 나타났으며, CMT 100, 50, 10㎍/㎖ 처리군에서는 각각 78.6±10.8%, 89.4±5.2%, 97.8±1.2%로 나타났고, HCMT 100, 50, 10㎍/㎖ 처리군에서는 각각 68.7±9.5, 74.3±7.6, 92.2±4.8%로 나타났다.

대조군에 비해 聰明湯 100㎍/㎖, 香附子聰明湯 100, 50㎍/㎖에서 유의성(*p<0.05) 있는 감소를 보였고, 같은 농도에서 聰明湯과 香附子聰明湯 간의 차이는 유의성이 없었다(Fig. 17).

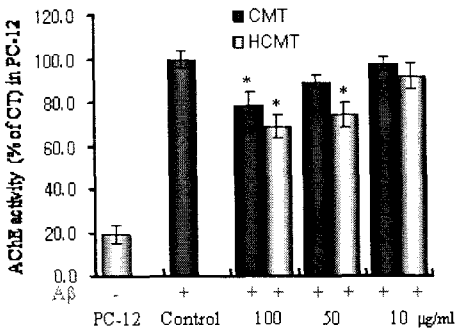


Fig. 17. Inhibitory Effects of CMT and HCMT extract on the AChE Activity in Aβ stimulated PC-12 cells.

PC-12 cell was pretreated with various concentration CMT and HCMT extract(100, 50, 10㎍/㎖) in the presence Aβ(10μM) for 24hrs. The lysate(50㎕) were measured using AChE diagnosis kits. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The data are expressed as the mean±SEM. Statistically significant value compared with control group data by ANOVA test(*p<0.05).

7. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 ALT., Total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, uric acid, AChE에 미치는 영향

1) ALT.에 미치는 영향

혈청 중 ALT. 수치는, 정상군이 16.1±31.1(IU/L), scopolamine을 투여한 대조군은 89.0±2.8(IU/L), Galanthamine투여 양성대조군은 193.9±62.6(IU/L), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 110.1±21.8(IU/L), 187.2±18.2(IU/L), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 157.5±21.4(IU/L), 114.5±10.8(IU/L)로 측정되었다.

대조군에 비해 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 18).

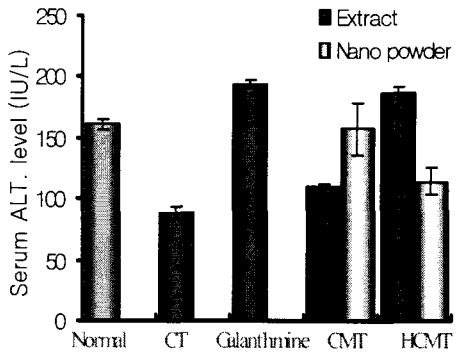


Fig. 18. Effects of CMT and HCMT on the serum ALT. level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

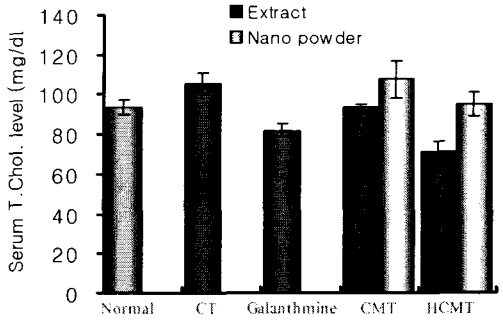


Fig. 19. Effects of CMT and HCMT on the serum total cholesterol level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

2) total cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 total cholesterol 수치는, 정상군이 93.8±2.4(㎎/dℓ), scopolamine을 투여한 대조군은 105.6±9.5(㎎/dℓ), Galanthamine투여 양성대조군은 81.9±2.5(㎎/dℓ), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 93.4±14.8(㎎/dℓ), 71.3±6.3(㎎/dℓ), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 107.5±15.6(㎎/dℓ), 95.1±16.3(㎎/dℓ)로 측정되었다.

대조군에 비해 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했지만, Nano powder보다 Extract의 감소치가 더 컸다(Fig. 19).

3) HDL-cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 HDL-cholesterol 수치는, 정상군이 73.2±2.6(㎎/dℓ), scopolamine을 투여한 대조군은 81.6±6.9(㎎/dℓ), Galanthamine투여 양성대조군은 63±1.3(㎎/dℓ), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 89.7±8.3(㎎/dℓ), 58.4±5.4(㎎/dℓ), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 83.8±11.9(㎎/dℓ), 75.6±11.9(㎎/dℓ)로 측정되었다.

대조군에 비해 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 20).

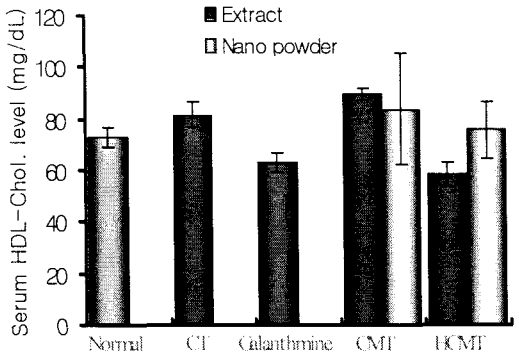


Fig. 20. Effects of CMT and HCMT on the serum HDL-cholesterol level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

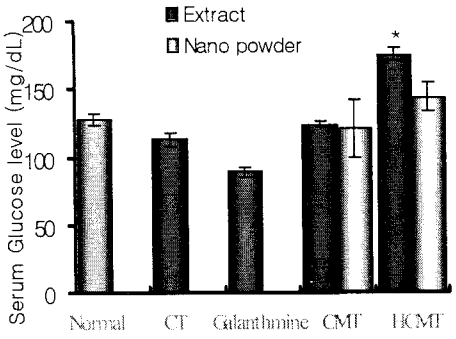


Fig. 21. Effects of CMT and HCMT on the serum glucose level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

4) glucose에 미치는 영향

혈청 중 glucose 수치는, 정상군이 127.8±2.9(㎎/㎗), scopolamine을 투여한 대조군은 112.8±7.2(㎎/㎗), Galanthamine투여 양성대조군은 88.7±4.2(㎎/㎗), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 123.6±9.3(㎎/㎗), 175.1±15.4(㎎/㎗), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 120.8±6.7(㎎/㎗), 143.7±9.1(㎎/㎗)로 측정되었다.

대조군에 비해 香附子聰明湯 Extract만이 유의성(*p<0.05) 있는 증가를 보였다(Fig. 21).

5) uric acid에 미치는 영향

혈청 중 uric acid 수치는, 정상군이 2.6±0.5(㎎/㎗), scopolamine을 투여한 대조군은 7.1±0.3(㎎/㎗), Galanthamine투여 양성대조군은 2.5±0.3(㎎/㎗), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 5.3±0.3(㎎/㎗), 5.2±0.4(㎎/㎗), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 5.0±0.2(㎎/㎗), 5.2±0.2(㎎/㎗)로 측정되었다.

모든 군에서 유의성(*p<0.05) 있는 감소를 보였지만, 각 실험군 간의 차이는 없었다(Fig. 22).

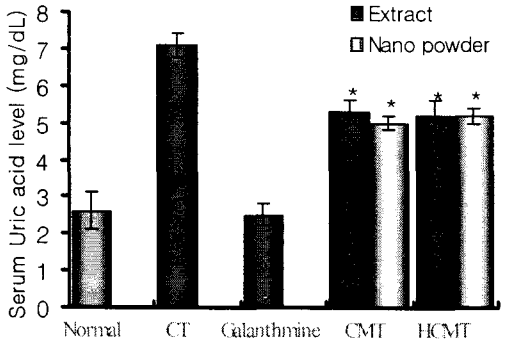


Fig. 22. Effects of CMT and HCMT on the serum uric acid level in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

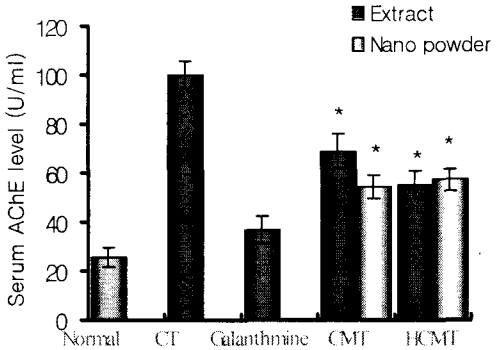


Fig.23. Effects of CMT and HCMT on the serum AChE activity in scopolamine-induced memory deficit mice.

Normal : Non-treatment group.
Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine, the injection of scopolamine(1㎎/㎏) continued once a day for 7 days. Data represent means±S.D(N=5). and analyzed for serum level as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with scopolamine only group data by ANOVA test(*p<0.05).

6) AChE 활성도에 미치는 영향

혈청 중 AChE 활성도는, 정상군이 25.3±4.1(U/ml), scopolamine을 투여한 대조군은 100.0±5.9(U/ml), Galanthamine투여 양성대조군은 36.7±5.6(U/ml), CMT, HCMT Extract 실험군은 각각 69.0±7.2(U/ml), 55.3±5.4(U/ml), CMT, HCMT Nano powder 실험군은 각각 54.3±5.0(U/ml), 57.3±4.2(U/ml)로 측정되었다. 대조군에 비해 모든 군에서 유의성(*p<0.05) 있는 감소를 보였고, 제형에 따른 실험군 간의 차이는 현저하지 않았다(Fig. 23).

8. Scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델에 대한 효과

1) Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Stop-through latency를 관찰한 결과 대조군(CT)에서는 66.5±6.2(sec.), Galanthamine에서는 10.8±2.4(sec.), CMT, HCMT Extract에서는 각각 31.7±3.5(sec.), 38.9±12.3(sec.), CMT, HCMT Nano powder에서는 각각 25.2±10.5(sec.), 31.0±8.9(sec.)으로 측정되었다 대조군에 비해 모든 군에서 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보였고, 각 군간의 차이는 없었다(Fig. 24).

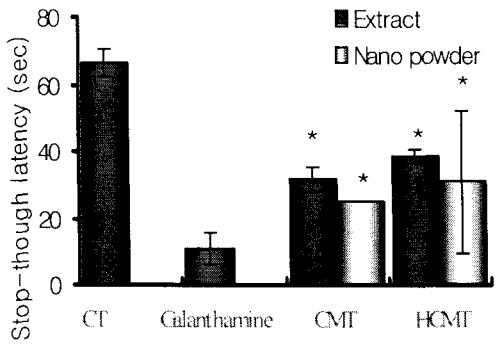


Fig. 24. Effects of CMT and HCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the stop-through type Morris water maze test.

Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract(400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder): Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
After ICR mice were administered of CMT and HCMT orally or injected galanthamine and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. The stop-VIDEOTRACKING was initiated at 1 week and 3 week after orally administered of CMT and HCMT(400㎎/㎏) and the retention trial was carried out after 7 day after the acquisition training trial(pre-training). Data represent means±S.D(N=10). Stop-though latency each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

2) Distance movement-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Distance movement-through latency를 관찰한 결과 scopolamine을 처리한 대조군(CT)은 30분 후에 1113.8±123.7(cm), Galanthamine에서는 263.1±45.0(cm), CMT, HCMT Extract에서는 각각 835.0±210.9(cm), 741.3±264.2(cm), CMT, HCMT Nano powder에서는 각각 717.4±232.2(cm), 609.1±135.5(cm)로 측정되었다. 모든 군에서 유의성(*p<0.05) 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 25).

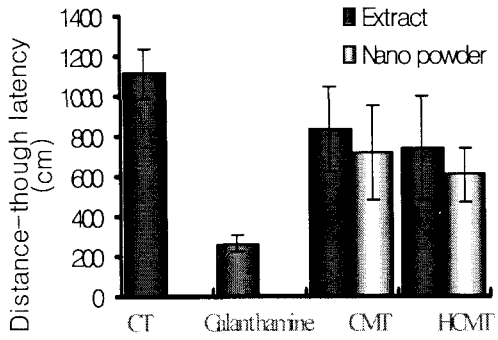


Fig. 25. Effects of CMT and HCMT on the scopolamine-induced memory deficit mice in the distance movement-through type Morris water maze test.

Control : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p).
Galanthamine : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and Galanthamine(3㎎/㎏ i.p).
CMT and HCMT(Extract) : Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT extract (400㎎/㎏ p.o).
CMT and HCMT(Nano powder): Group treated with scopolamine(1㎎/㎏ i.p) and CMT and HCMT Nano powder(400㎎/㎏ p.o).
The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 1 week after orally administered of CMT and HCMT(400 ㎎/㎏) and the retention trial was carried out after 7 day after the acquisition training trial(pre-training). Data represent means±S.D(N=10).
Lardist this is the total distance(in cm) covered by the animal in large movement, and Smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data(Lardist plus Smldist) represent means±S.D(N=10). Statistically significant value compared with control group by ANOVA test(*p<0.05).

Ⅳ. 考 察

痴呆는 정신활동에 장애가 나타나는 병증으로, 흔히 '老妄' 이라 불리며, 점진적인 기억력 장애가 失語症, 失認症, 失行症등의 행동적인 장애와 함께 나타나 사회 직업적 기능의 장애를 가져오는 질환이다[25]. 정신적으로 憂鬱症이나 躁症, 妄想, 幻覺, 多動傾向 등의 증상을

수반할 수 있다. 예후는 대개 비가역적이면서 잠행적이다.

DSM-Ⅳ에 근거하여 痴呆를 분류하면, 첫째, 源發性 退行性 痴呆(primary degenerative dementia)인 AD와 둘째, 腦動脈 硬化症 및 기타 뇌혈관장애가 원인이 되는 血管性 痴呆(Vascular dementia), 셋째, 질병에 의한 痴呆로는 Pick병, Creutzfeldt-Jakob병, Huntington병, HIV 감염에 의한 痴呆가 있으며, 기타 산업재해 및 교통사고 등으로 인한 외상 후 痴呆, 알코올성 痴呆 등이 있다[26].

AD의 발병에는 β amyloid peptide(Aβ), estrogen, apolipoprotein E, presenilin, oxidants free radicals, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[2].

βA가 축적되면, 신경세포를 손상시키고, 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 상처받기 쉬운 상태가 됨으로써 치매의 증상이 유발되는 것이다.

치매의 주증상인 기억력감퇴는 뇌조직 내에서 choline계 활성이 감소되어 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이며, 이 현상은 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 인해 더욱 심화된다[7,8].

AD와 관련된 또 다른 이론으로, 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증반응 등의 자극에 의해 뇌혈관장벽이 손상되어 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 astrocyte 및 microglial cell들이 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 뇌의 cytokine 항상성이 파괴되어 신경세포의 사멸을 촉진시킨다는 가설인데, 최근 많은 연구결과들에 의하여 입증되고 있다[5,6,27]. 뇌손상 시 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 microglial cell로, IL-1 및 TNF-α를 유도 발현시켜, astrocyte를 활성화시키고, 활성화된 astrocyte는 IL-6, IL-8 등의 cytokine을 생성시켜 활성산소의 일종인 peroxynitrite를 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다. 또한, 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apoliprotein E를 분비하여 염증 및 βA에 의한 신경세포독성을 촉진시킨다. IL-1의 작용은 면역계에 한하지 않고 내분비계, 신경계에 다양하게 영향을 미치며, 그 작용의 대부분은 염증을 유발하여 관절조직의 파괴에도 관여하게 된다. 특히 IL-1β는 Aβ에 의하여 분비가 증가되며, 인간 혈관계에서의 실험에서 CD40의 표현을 촉진시켜 Aβ가 AD에 영향을 미치는 중요한 과정 물질이 되며, IL-6는 amyloid 침착과 노인반(senile plaque)형성과 관련이 깊다.

Microglial cell의 활성화로 IL-10, TGF-β 등의 anti-inflammatory cytokine도 생성되는데, IL-10은 T세포, $CD5^+$, B세포, 단핵구 등에 의해 생성된다. T,B세포 등에 대하여 다양한 활성이 있는데, 특히 단핵구, macrophage계 세포의 IL-1, IL-6, TNF-α 생산을 억제하는 항염증성 cytokine으로 주목되고 있다. IL-10은 또한 in vitro에서 iNOS의 발현을 억제한다. TGF-β은 조직 손상 후 재생과정에서 나타나는 cytokine의 하나로 혈소판 및 내피세포, 대식세포 등에서 생산되며 대식세포에서 생성되는 NO를 불활성화 시킨다. 최근 이들 anti-inflammatory cytokine이 AD의 변이기전을 저해한다는 연구가 보고되고 있다[6].

COX-2는 Cyclooxygenase(COX)의 두 가지 이성체(isform)중 하나로, COX-1의 발현 억제가 여러 가지 부작용을 가지는데 반해, COX-2는 염증을 유발하는 IL-1β나 TNF-α와 같은 cytokine류, 박테리아 내독소, 성장호르몬이나 기계적 및 온도에 의한 조직 손상에 의해 유도된다. 최근의 연구에서 AD의 초기에는 큰 변화는 없으나 말기에는 증가를 보이며, COX-2 inhibitor인 celecoxib은 완만하게 진행하는 AD환자에게 큰 효과가 없으나,

임상이전이나 임상초기의 AD환자에 응용할 수 있다고 보고되었다.

痴呆의 치료에는 환자와 가족에 대한 지지적 정신의학적 치료, 심리 사회학적 치료, 파괴적인 행동을 포함한 증상에 대한 약물적 치료가 있다. 기억력 감퇴증상은 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는, acetylcholine 합성전구체인 lecithin, 수용체 활성제인 RS-86, nicotine 등과 acetylcholine 분해억제제인 tacrine, Galanthamine 등이 있다. Galanthamine은 acetylcholine의 농도를 높이면서 주의력, 기억 및 학습에 작용하는 nicotine 수용체의 활성도를 증가시켜 인지기능의 악화를 막아 일상생활의 질을 유지토록 하는 효과가 있다[28].

韓醫學에서 痴呆는 ≪景岳全書·癲狂痴獃≫[9]에서 "痴獃症, …… 言辭顚倒, 擧動不經, 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 痴獃에 대하여 최초 기술되었으며, 《辨證奇問》[10], 《石室秘錄》[29] 등은 '呆病'에 대해 상세히 기술하고 있고, ≪黃帝內經≫[30,31]을 비롯한 많은 歷代醫書[9,32,33]에서도 '健忘' 등의 언급에서 유사한 증상을 찾아볼 수 있다. 痴呆의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 원인은 주로 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情損傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있으며, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》[11]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기재되어 있으며, 心虛 및 痰濁으로 인한 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다.

香附子는 理氣解鬱, 止痛調經의 主治와 治肝胃不和, 氣鬱不舒, 胸腹脇肋脹痛, 痰飮痞滿, 月經不調, 崩漏帶下의 效能을 가지는데, 本草秘要에는 血藥을 氣分에 도달하게 하는 氣分의 君藥이라고 하였다[34].

최근 들어 한의학계에는 痴呆와 관련된 다수의 문헌적, 실험적, 임상연구가 보고되고 있으며, 하[16]는 聰明湯이 CT-105와 rIL-1β를 처리한 PC-12 세포주의 APP, AChE 유전자 발현을 억제하고 기억력 개선 효과가 있으며, 윤[18]은 香附子가 항콜린작용과 amyloid precursor protein과 presenilin-1, presenilin-2 발현을 억제하는 효과가 있으므로, 痴呆의 예방과 치료에 활용할 수 있다는 연구를 발표하였다.

현재 증류하여 만든 증류탕약으로 소아환자 복용을 용이하게 만드는 등, 기존의 한약을 사용하는 방식에서 벗어나, 복용의 편리함과 효과를 높이려는 제형변화가 시도되고 있다. drug delivery system(DDS) 분야에서 제형을 변화시켜 약물의 흡수율과 효과를 높이는 nanotechnology를 이용한 나노입자가 개발되어, 나노약물전달체, 나노진단시약, 나노의료용 물질, 나노바이오물질 등에 다양하게 활용되고 있는데, 한약의 나노 제형에 관한 연구결과는 미흡한 편이다.

이에 著者는 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물, 나노분말 제형으로 抗痴呆效果에 관한 실험적 연구를 시도하였다. mLFC와 BV2 microglial cell에서 세포독성을 관찰한 이후, in vitro 실험으로 BV2 microglia 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현과 IL-10과 TGF-β1등의 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하고, NO와 ROS도 측정하였다. in vivo 실험에서 聰明湯과 香附子聰明湯의 extract 제형과 나노분말 제형을 사용하여, scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 생쥐모델에서 혈청 내 ALT., total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, uric acid, AChE에 미치는 변화를 측정하고, Moris water maze로 기억력을 관찰하였다. 실험으로 얻은 결과를 분석하였다.

먼저 정상 생쥐의 mLFC에서 聰明湯과 香附子聰明湯의 세포독성을 측정한 결과, 세포의 생존률은 대조군에 비해 聰明湯 200, 100, 50, 10, 1㎍/㎖ 실험군과 香附子聰明湯 100, 50, 10㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 감소하였으나, 80% 이상으로 나타났다(Fig. 3).

LPS(lipopolysaccharide)로 처리한 BV2 microglial cell 세포의 생존률을 측정한 결과, 聰明湯 실험군은 87.7±3.2(%), 香附子聰明湯 실험군은 83.3±5.0(%)로 대조군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯이 모두 유의성 있게 높았다(Fig. 4B).

이러한 결과 100㎍/㎖ 이하의 농도로 처리하였을 때 정상세포인 mLFC와 병적 상태의 세포인 BV2 microglial cell line에서 생존율이 80% 이상이 되므로, 이후 실험실에서는 100㎍/㎖ 이하의 聰明湯 및 香附子聰明湯의 실험군을 사용하였다.

실험에서 사용된 BV2 microglial cell(The immortalized murine cell line)은 mouse의 microglial cell의 형태적, 기능적 특징을 갖추었다[35]. 이는 중추신경계에 상주하는 macrophage로 뇌손상 및 외부로부터 이물질의 침입 등의 자극이 주어질 때 활성화되어, 세포증식과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형된다. 또한, 이 세포는 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 proinflammatory cytokines과 COX-2, NO를 포함하며, microglial cell의 활성화는 AD와 파킨슨병과 같은 신경사멸 질환의 개시와 진행에서 주축인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

LPS는 痴呆를 포함한 각종 뇌질환에서 관찰되는 cytokine분비 증가현상 등과 같은 유사반응을 유발하는 효과적인 물질로, 세포막 수용체인 CD14에 결합하여 microglial cell을 활성화시키는데, 이 LPS를 투여해 치매 병태 모델을 만들어 연구하는데 이용하고 있다[36].

Nitric oxide(NO)는 특이 확산성 분자 전달자로서 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine의 gaundine 잔기 말단으로부터 생성되며, 생성된 NO는 뇌의 중추신경에서 다양한 생리적, 병리적 과정을 조절한다. nNOS, eNOS, iNOS 세 이성체중 하나인 iNOS 발현은 뇌신경 세포에서 NO를 매개로 한 신경세포 손상 및 사멸을 유도한다. NO는 자유 래디칼 기체(free radical gas)로 중추신경계에서 매우 유독한 물질이지만, cytokine으로 미리 자극을 주거나 적은 양의 NO를 투여시키면 세포 보호 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[37].

본 실험에서는 LPS 처리한 BV2 microglial cell line에 각각 다른 농도의 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)을 투여한 후 6시간 배양하여, IL-1β, IL-6, TNF-α, NOS-Ⅱ, COX-2, IL-10, TGF-β1의 mRNA 발현을 관찰하였다.

그 결과, LPS 처리군의 RQ값을 1.000으로 기준하였을 때, proinflammatory cytokine IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA의 발현이 억제되었고, 특히 IL-1β, IL-6은 香附子聰明湯 실험군에서 더 감소하였다. 그리고 COX-2, NOS-Ⅱ의 mRNA의 발현이 억제되었고, anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF-β1의 mRNA의 발현 농도에 따라 증가하였다(Fig.5~11).

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생산량을 측정한 결과, LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯 두 실험군에서 모두 감소하였으나, 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 12~14).

NO는 혈류의 조절자이며 cyclic CMP를 통한 신경의 중재자 역할도 하지만, 염증을 유발하거나 신경조직의 손상 등을 일으키기도 한다. ROS는 호기성 대사과정의 정상적인 생산물이나 과도하게 생산되면 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 그중에서도 특히 뇌조직은 고도불포화 유지된 지방산으로 되어있어 특히 손상이 쉽게 된다. 이들 산화적 손상은 노화

와 파킨슨병, AD등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다.

이러한 관점에서 BV2 microglial cell line 배양상층액의 NO와 ROS의 생성을 관찰한 결과, NO의 생성량은 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 감소하였으나, 유의성 있는 차이를 보이지 못했다(Fig. 15). ROS의 생성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 감소하였다(Fig. 16).

AD의 발병기전과 관련하여 신경독성 및 신경퇴행변화의 주요한 역할을 하는 β amyloid peptide(Aβ)는 β-secretase나 γ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되는데, 고농도의 cholesterol은 β-secretase나 γ-secretase를 자극하여 Aβ의 생성을 촉진하고, Aβ의 증가는 AD의 발병을 유도한다.

기억력감퇴와 관련된 choline계 활성을 살펴보기 위하여, PC-12 세포주에 Aβ처리한 세포성 단백질에서 AChE 활성도를 측정한 결과, 대조군에 비해 聰明湯 100㎍/㎖ 실험군과 香附子聰明湯 100, 50㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 17).

Scopolamine은 절후 부교감 신경이 분포된 표적장기에서의 acetylcholine의 작용, 무스카린성 수용체 흥분효과를 봉쇄하는 항무스카린성 약물로, 다양한 인지기능 중 기억력감퇴에만 관여하는 것으로 알려져 있다.

in vivo 실험에서 聰明湯과 香附子聰明湯의 제형변화에 따른 효과의 차이를 검증하고자, 각 처방의 동결 건조한 extract 제형과 나노분말 제형을 사용하여 실험하였고, 聰明湯과 香附子聰明湯의 두 가지 제형이, scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 생쥐모델에서 혈청 내 ALT., total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, uric acid, AChE에 미치는 변화를 측정하고, Moris water maze를 이용하여 기억력을 관찰하였다.

ALT.(alamine aminotransferase)는 아미노산과 α-케토산 사이의 아미노기 전이를 행하는 효소로 간세포 내에 특히 다량 존재하며, 간세포가 손상되면 혈중으로 다량 이탈하여 혈청 중의 농도가 현저하게 상승하므로 간손상의 지표로 활용된다. Cholesterol은 대부분 간에서 합성되고 인지질과 함께 세포막의 구성성분이며, steroid hormone의 생산 원료이다. HDL-cholesterol은 간 및 소장에서 합성되고, 말초조직의 cholesterol 처리장기인 간으로 운송하여 담즙산으로 장관에 배설되게 하는 항동맥경화 작용이 있어 관상동맥 질환의 중요한 방어인자이다. 이들 cholesterol의 혈청 내 수치는 간의 합성 분비상태 즉 간기능을 반영하므로 간손상시 이들 cholesterol의 혈청 수치에 변화를 초래한다[38].

혈청 내 ALT., total cholesterol, HDL-cholesterol의 변화를 관찰한 결과, 정상군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물 및 나노분말 제형을 투여한 모든 실험군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 따라서 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물 및 나노물질은 간기능과 지질대사에 유의한 영향을 주지 않을 것으로 사료되었다(Fig. 18~20).

노화에 따른 glucose 대사의 변화는 AD 병리기전의 중요한 인자로 제기되고 있는데[39], glucose는 scopolamine등에 의해 유도된 기억력감퇴를 회복시키는 역할을 하며, 이 작용은 choline계와의 기능적인 상호작용으로 이루어지는 것으로 생각되고 있다. uric acid의 작용은 뚜렷이 밝혀지지 않았지만, AD와 뇌혈관성 치매에서 증가되는 것으로 알려져 있다[40].

기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 glucose와 uric acid의 변화를 측정한 결과, 대조군에 비해 香附子聰明湯 추출물 실험군에서 유의하게 증가한 glucose 수치를 확인하였다(Fig. 21). 혈청 내 uric acid는 대조군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였으나, 이들 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 22).

또한, 기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 AChE의 활성은 대조군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯 모든 실험군에서 유의하게 감소되었으나 실험군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 23).

Morris water maze실험을 통한 기억력감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말을 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 단축을 보였다. 특히, 100㎍/㎖ 香附子聰明湯 추출물에서 억제효과가 높았다(Fig. 24).

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 다소 거리의 단축을 보였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 25).

이상의 내용을 종괄해 보면 聰明湯과 香附子聰明湯은 LPS를 처리한 BV2 microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-Ⅱ의 proinflammatory cytokine mRNA 발현을 억제하고, IL-10, TGF-β1의 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현을 증가시켰으며, IL-1β, IL-6, TNF-α, NO, ROS의 생성량을 감소시켰다. 또한 Aβ를 처리한 PC-12 세포주에서 AChE 활성도를 감소시켰으며 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 glucose를 증가시키고, uric acid를 감소시켰으며, AChE의 활성을 억제 하였다. Morris water maze실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

본 실험에서 聰明湯과 香附子聰明湯의 효과를 비교하여 보면, BV2 microglial cell line에서 proinflammatory cytokine mRNA 발현의 억제와 anti-inflammatory cytokine mRNA 발현의 증가, proinflammatory cytokine 및 NO 생성량의 감소에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, PC-12 세포주에서 AChE의 활성도는 聰明湯 100㎍/㎖, 香附子聰明湯 100, 50㎍/㎖ 실험군에서 유의성 있게 억제되었다. 이는, 聰明湯 및 香附子聰明湯의 투여로 AChE의 활성도를 억제함으로써, 뇌조직 내의 acetylcholine을 활성화하여 기억력저하의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

또한 추출물 및 나노분말을 비교하면 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 혈청 내 glucose의 증가, uric acid의 감소, AChE의 활성 억제 효과 그리고 Morris water maze 실험을 통한 stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 개선 효과에 대해 추출물과 나노분말 간의 유의한 차이는 없었다. 이로써 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물 및 나노분말이 AChE을 억제하고 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력감퇴를 개선시키리라 판단되며, 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말이 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐모델의 기억력감퇴 억제에 효과가 있음을 알 수 있다.

따라서 聰明湯 및 香附子聰明湯은 microglial cell 등의 염증반응, cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 痴呆와 choline성 신경세포의 퇴화에 의해 야기되는 기억력감퇴에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 痴呆에 대한 聰明湯 및 香附子聰明湯의 임상적 활용, 그리고 한약 추출물뿐만 아니라 나노분말의 효능에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물 및 나노분말 제형을 이용한 抗痴呆效果에 관한 실험적 연구결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 聰明湯 및 香附子聰明湯 추출물은 BV2

microglial cell line에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-Ⅱ의 mRNA 발현을 억제하고, IL-10, TGF-β1의 mRNA의 발현을 증가시켰다.

2. 聰明湯 및 香附子聰明湯 추출물은 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, NO, ROS의 생산량을 감소시켰다.
3. 聰明湯 및 香附子聰明湯 추출물은 PC-12 세포주의 세포성 단백질에서AChE 활성을 유의성 있게 억제하였다.
4. 香附子聰明湯의 추출물은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 glucose를 유의성 있게 증가시켰다.
5. 聰明湯 및 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내 uric acid를 유의성 있게 감소시켰다.
6. 聰明湯 및 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 혈청 내에서 유의성 있게 AChE 활성은 억제하였다.
7. 聰明湯 및 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말은 Morris water maze를 통한 stop-through latency측정을 감소시켰다.
8. 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물과 나노분말 제형의 실험결과를 비교하였을 때, 서로 간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

이상의 결과로 미루어 보아 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물 및 나노분말은 痴呆의 예방과 치료에 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 제형간의 연구 및 임상에서의 활용방안에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

參 考 文 獻

1. 대한한방신경정신과학회편 : 한방신경정신의학, 서울, 집문당, pp.311-316, 2005.
2. Whitehouse PJ·Price DL·Struble RG·Clark AW·Coyle JT·Delon MR : Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. Science, 215(4537):1237-1239, 1982.
3. Lee, S. C., Liu W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F. and Berman, J. W. :Cytokine production by human fetal microglia and astrocytess. J. Immunol., 150, 2659, 1998.
4. Peterson, P. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. C. and Peterson, P. K. : Activated microglia mediated neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J. Immunol., 149, 2730, 1992
5. Pyo H·Joe E·Jung S·Lee SH·Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem, 274(49):34584-34589, 1999.
6. Aloisi F·Car e A·Borsellino G·Gallo P·Rosa S·Bassani A·Cabibbo A·Testa U·Levi G·Peschle C : Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol, 149(7):2358-2366, 1992.
7. 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.
8. De Vente J·Markerink-van Ittersum M·van Abeelen J·Emson PC·Axer H·Steinbusch HW : NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain ; effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. Eur J Neurosci, 12(2):507-519, 2000.
9. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
10. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書, 台北, 甘地出版社, pp.222-225, 233-235, 1990.
11. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp.55-56, 1996.
12. 류영수 외 : 痴呆의 病理에 대한 동·서의학적 고찰, 동의병리학회지, 13(1):36-46, 1999.
13. 정인철 외 : 痴呆에 대한 문헌적 고찰, 동의신경정신과학회지, 7(1):77-94, 1996.
14. 황의완 외 : 痴呆에 대한 한의학적 임상연구, 동의신경과학회지, 7(1):1-13, 1996.
15. 김영욱 : 聰明湯이 건망유도 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 한방재활의학과학회지, 8(2):464-479, 1998.
16. 하수영 : 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer´s Disease 病態 모델에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 박사학위논문, 2004.
17. 박지운 : 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer´s Disease 病態 모델에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 박사학위논문, 2004.
18. 윤상학 외 : 香附子가 痴呆病態모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 14(1):59-74, 2003.
19. 김현수 외 : 巴戟天이 痴呆 病態모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 14(1):45-58, 2003.
20. 박지운 외 : 日黃蓮이 痴呆病態모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 15(1):87-100, 2004.
21. 김 혁 외 : 한약 조성물의 제법과 제형 변화를 통한 농축제제에 대한 연구, 경희대학교대학원, 석사학위논문, 2000.
22. 한국 한의학 연구원 : 새로운 한약 제제의 개발에 관한 연구. 최종보고서, 서울, 경희대학교, pp.102-105, 1998.
23. 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.
24. Zor T·Selinger Z : Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. Anal Biochem, 236(2):302-308, 1996.
25. 이광우 : 임상신경학, 서울, 범문사, pp.203-215, 2002
26. 미국정신의학회 : 정신장애의진단 및 통계편람 Ⅳ, 서울, 하나의학사, pp.19-21, 184-211, 1995.
27. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A : On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Eur J Immunol, 19(4):689-694, 1989.
28. Geerts H.: Indicators of neuroprotection with galantamine. Brain Res Bull. 64(60):519-24, 2005.

29. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
30. 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.
31. 洪元植 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.68, 342, 1985.
32. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129-135, p.534, 545, 550, 1982.
33. 趙 佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, pp.822-825, 1987.
34. 서부일, 변성희 : 國譯本草秘要, 서울, 一中社, pp.460-464, 2000.
35. V. Bocchini, R. Mazzolla, R. Barluzzi, E. Blasi, P. Sick and H. Kettenmann : An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. J. Neurosci. Res. 31:616-621, 1992.
36. Nick J 외 : Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. J Immunol, 156:4457, 1996.
37. Simmons ML·Murphy S : Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem, 59(3):897-905, 1992.
38. Allison B. 외 : Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer' s disease. Neurobiology of Aging, 25(8):977-989, 2004.
39. Hoyer S : Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. J Neural Transm Suppl, 54:187-194, 1998.
40. 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.