

砂仁이 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향

최보윤 · 정인철 · 이상룡*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of Amomum villosum(AMV) Extract on the Alzheimer's Disease Model

Bo Yun Choi, 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 Amomum villosum(AMV) on the Alzheimer's disease. The effects of AMV extract on amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 cell line treated by amyloid β protein(Aβ) ; IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA of THP-1 cell line treated by lipopolysaccharide(LPS) ; AChE activity of PC-12 cell lysate treated by Aβ ; serum glucose, uric acid, AChE activity of memory deficit rats induced by scopolamine ; behavior of memory deficit mice induced by scopolamine were investigated, respectively. AMV extract suppressed APP, AChE, GFAP mRNA in PC-12 cell treated by Aβ ; IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in THP-1 cell treated by LPS ; AChE activity in cell lysate of PC-12 cell treated by Aβ. AMV extract increased glucose, decreased uric acid and AChE significantly in the serum of the memory deficit rats induced by scopolamine. AMV 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 AMV extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : Amomum villosum(AMV), Dementia, Alzheimer's disease, βA, cytokine

서론

치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이나 질병 등에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지 기능과 고등 정신 기능이 감퇴하는 복합적인 임상증후군을 일괄하여 지칭하는 것으로, 원인적 발생빈도는 알츠하이머 병(Alzheimer's disease ; AD)이 가장 빈번하여 60%에 달하고 뇌혈관 질환에 의한 혈관성 치매(vascular dementia ; VD)가 20% 정도이다¹⁾.

AD는 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실을 초래함으로써 나타나며²⁾ amyloid precursor proteins(APP)의 일부인 amyloid β protein(Aβ)³⁾과 IL-1, IL-6 등의 proinflammatory cytokine⁴⁾, acetylcholine 등 신경전달 물질의 감소 및 acetylcholinesterase(AChE)의 증가⁵⁾

등도 AD의 발생에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

韓醫學의으로 痴呆는 '呆病⁶⁾, '健忘⁷⁾등의 범주에 속하며, 明代 張介賓의 《景岳全書·癡狂癡默》⁸⁾에서는 "癡默症, …… 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常……"이라 하여 痴呆와 유사한 癡默에 대해 최초로 기술하고 있으며, 痴呆의 원인으로는 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 거론되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

砂仁은 芳香化濕藥에 해당하는 약물로 化濕開胃, 溫脾止瀉, 理氣安胎 등의 효능이 있어 濕濁中阻, 脘痞不飢, 脾胃虛寒, 嘔吐泄瀉 등을 치료¹²⁾하며 《本草求真》¹³⁾에서는 "醒脾胃要藥"이라 하였고, 《東醫寶鑑》¹⁴⁾에서는 "性溫味辛無毒, 治一切氣, 心腹痛, 宿食不消, 赤白泄痢, 溫暖脾胃, 止胎痛, 治霍亂."이라 하여 化濕開胃, 溫暖脾胃하는 砂仁의 효능은 痰飲으로 인한 痴呆의 치료와 예방에 사용될 수 있으리라 사료된다.

최근 痴呆에 대한 연구동향을 살펴보면 APP와 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구¹⁵⁾, 임상에서 활용되는 여러 複

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

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

· 접수 : 2005/09/05 · 수정 : 2006/12/30 · 채택 : 2006/01/20

合處方과 單味藥物들이 腦組織의 酸化作用¹⁶⁾ 및 生化學的 變化¹⁷⁾에 미치는 影響이나, AD 病態 모델에 미치는 影響에 대한 연구¹⁸⁾ 등이 이루어 졌으나 砂仁에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者は 砂仁이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA와 THP-1 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine mRNA 발현을 관찰하였고, PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도를 관찰하였으며, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 白鼠 모델의 혈청내 glucose, uric acid, AChE에 대한 砂仁의 효능을 관찰하였고 Morris water maze를 이용하여 VIDEOTRACK을 통한 생쥐의 행동 변화를 측정함바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

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 -amino- ethyl 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 acryl- amide, magnesium chloride(MgCl₂)은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사(U.S.A.) 제품 등을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer(shimadzu, Japan), rotary vaccum evaporator(BUCHI 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) 등의 것이었다.

2) 동물

본 실험을 위하여 사용된 International Cancer Research(ICR)계 생쥐와 Sprague-Dawley(SD)계 백서는 한국생명과학연구원에서 분양 받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고휘사료(조단백질 22.1%이상, 조지방

8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 砂仁(Amomum villosum ; AMV)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

砂仁 200g에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 砂仁 추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) mLFC와 PC-12 세포주에 대한 세포독성 측정

(1) 세포배양

정상 생쥐의 폐 조직 세포(mouse lung fibroblast cell ; mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.), DNase type I(0.15mg/ml, Sigma, U.S.A.), antibiotics(penicillinm 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml))을 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양한다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 분주한다.

PC-12(ATCC, CRL1721) 세포주는 rat의 adrenal pheochromocytoma에서 유래된 세포로 DMEM에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청으로 배양하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법¹⁹⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. PC-12 세포주와 mLFC는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10⁴개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO₂)에서 2시간 배양한 후 砂仁 추출물(최종 농도 400 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50 μ l를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조한다. SRB(0.4% SRB / 1% acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색한다. 그리고 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 reader 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA 및 THP-1 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 발현 분석

(1) 약물처리

PC-12 세포주는 24 wells plate에 2 \times 10⁶세포를 각각 분주한 후 12시간 이상 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 砂仁 추출물을 100 μ g/ml, 10 μ g/ml과 1 μ g/ml의 농도로 첨가하고 1시간 후 β -amyloid(A β) 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 동시 배양하였다.

THP-1(ATCC, TIB-202) 세포주는 acute monocytes로 DMEM에 10% 우태아 혈청, penicillin (100U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) 그리고 10 μ g/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO₂인 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한 것에 lipopolysacchride(LPS) 2 μ g/ml를 동시 처리하여 proinflammatory cytokine을 유발시켰다. 砂仁 추출물은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution (HBSS)으로 세척한 후에 우태아 혈청 결핍 DMEM배지에 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(2) mRNA 추출

PC-12 세포주와 THP-1 세포주는 砂仁 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 A β (10 μ M)와 LPS(2 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyro-carbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) RT-PCR

역전사 반응(Reverse Transcriptase ; RT)은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성 시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(150mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행한다.

반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)- α , β -actin, APP, AChE, GFAP 그리고 G3PDH를 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 최종 부피가 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 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide sequence의 염기배열은 다음과 같다.

㉠ human IL-1 β

sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTCCATTAC-3'

㉡ human IL-6

sense oligonucleotide	5'-GACTGATGTTGTGACAGCCACTG-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

㉢ human TNF- α

sense oligonucleotide	5'-AGCGTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

㉣ human β -actin

sense oligonucleotide	5'-TGGAACTCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TAAACGCGAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

㉤ rat APP

sense oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGCTGAGCATCT-3'

㉥ rat AChE

sense oligonucleotide	5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGGCTGAGCATCT-3'

㉦ rat G3PDH

sense oligonucleotide	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide	5'-TCCACCACCTGTGTGCTGA-3'

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

4) PC-12 세포주 세포성 단백질에서의 AChE 활성도 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 세포주에 砂仁 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 A β (10 μ M)를 첨가하여, 24시간 동시 배양한

후 세포 용해액을 얻어 AChE 활성도를 측정하였다. 세포 용해액을 얻기 위하여 50 μ l의 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 μ g/ml leupetin)을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리한 후 Bradford 염색법²⁰⁾으로 단백질질을 정량하여 50 μ g으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포 용해액을 표시한 후 sodium chloride solution 0.2ml와 혼합하였다. 각 tube에 water 3.0ml, nitrophenol solution 2.0ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Scopolamine으로 유도된 acetylcholine 결핍 백서 모델의 혈액분석

(1) 약물 투여 및 scopolamine 주사

30주령 SD계 백서 5마리를 1군으로 하여 아무런 처리를 하지 않은 대조군, Tacrine(10mg/kg)을 경구투여한 양성대조군, 砂仁 추출물(75mg/kg)을 10일 동안 경구 투여한 실험군 3개 군으로 나누고, scopolamine(1mg/kg)을 7일간 1일 1회 복강 주사 후 심장전자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다.

(2) Glucose, uric acid의 측정

혈청중 glucose, uric acid치는 자동생화학분석기(Express 550)를 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) 0.2ml와 serum 0.2ml를 넣고 혼합하였다. blank tube와 test tube에 3.0 ml water, nitrophenol solution(cat. No. 420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가한다. acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C 수조에서 정확히 30분간 배양시킨 후 ELISA reader 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 $\Delta A = ABLANK - ATEST$ 공식에 의하여 활성도를 측정하였다.

6) Scopolamine으로 유도된 학습과 기억력 감퇴 생쥐 모델의 Morris water maze 실험

(1) 반복 학습 및 약물 투여

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 27 $^{\circ}$ C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1주일간 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR계 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(tacrine 10mg/kg p.o), 실험군(砂仁 75mg/kg p.o)으로 분류하였고, 21일간 계속 약물 투여와 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다.

(2) 기억력 측정

훈련과 약물 투여가 종료된 ICR계 생쥐에 scopolamine(1mg

/kg)을 복강 주사하고 30분 후에 water maze에 ICR계 생쥐를 한 마리씩 넣고 VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고, 이를 videotrack software로 분석하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법²¹⁾을 이용하여 p<0.05 수준에서 검정하였다.

성 적

1. mLFC와 PC-12 세포주에 대한 세포독성

mLFC의 생존율에 있어서는 대조군에 비해 200 μ g/ml 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 400 μ g/ml의 실험군은 83 \pm 3.7(%)로 유의성 있는 감소를 보였으며, PC-12 세포주의 생존율은 대조군에 비해 100 μ g/ml 이하의 실험군에서는 큰 변화가 없었고 200, 400 μ g/ml의 실험군에서는 87 \pm 2.9, 85 \pm 4.3(%)로 유의성 있게 감소되었다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity Effects of AMV Extract on mLFC and PC-12 Cell Line

Group	Concentration (μ g/ml)	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell line
Control	0	100 \pm 5.1 ^{a)}	100 \pm 4.5
	1	97 \pm 5.7	98 \pm 4.9
	10	98 \pm 4.5	96 \pm 3.5
AMV	50	96 \pm 3.6	93 \pm 5.1
	100	92 \pm 3.2	89 \pm 4.2
	200	86 \pm 5.2	87 \pm 2.9
	400	83 \pm 3.7*	85 \pm 4.3*

a) : Mean \pm Standard error. * : p<0.05

2. PC-12 세포주의 APP, AChE, GFAP mRNA 발현 억제 효과

APP mRNA 발현에 있어서 정상군은 28(Ht)로 나타났고 대조군은 198(Ht)로 나타났으며 砂仁 100 μ g/ml 투여 실험군은 156(Ht), 砂仁 10 μ g/ml 투여 실험군은 201(Ht), 砂仁 1 μ g/ml 투여 실험군은 203(Ht)으로 나타났다(Fig. 1).

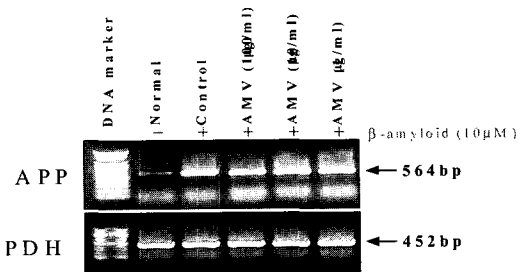


Fig. 1. Inhibitory effects of AMV extract on APP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with A β .

AChE mRNA 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 대조군은 171(Ht)로 나타났으며 砂仁 100 μ g/ml 투여 실험군은 32(Ht), 砂仁 10 μ g/ml 투여 실험군은 145(Ht), 砂仁 1 μ g/ml 투여

실험군은 173(Ht)으로 나타났다(Fig. 2).

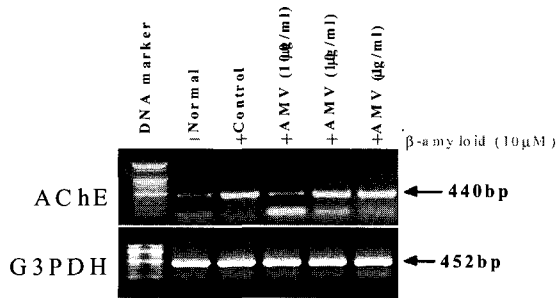


Fig. 2. Inhibitory effects of AMV extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with Aβ.

GFAP mRNA 발현에 있어서 정상군은 78(Ht)로 나타났고 대조군은 148(Ht)로 나타났으며 砂仁 100µg/ml 투여 실험군은 16(Ht), 砂仁 10µg/ml 투여 실험군은 52(Ht), 砂仁 1µg/ml 투여 실험군은 109(Ht)로 나타났다(Fig. 3).

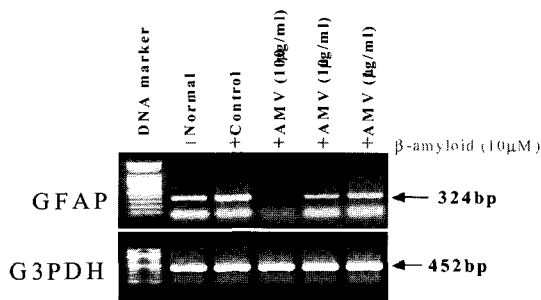


Fig. 3. Inhibitory effects of AMV extract on GFAP mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with Aβ.

3. THP-1 세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현 억제 효과

IL-1β mRNA 발현에 있어서 정상군은 56(Ht)로 나타났고 대조군은 197(Ht)로 나타났으며 砂仁 100µg/ml 투여 실험군은 47(Ht), 砂仁 10µg/ml 투여 실험군은 16(Ht), 砂仁 1µg/ml 투여 실험군은 184(Ht)로 나타났다(Fig. 4).

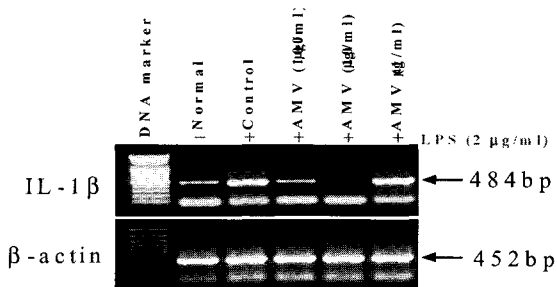


Fig. 4. Inhibitory effects of AMV extract on IL-1β mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.

IL-6 mRNA 발현에 있어서 정상군은 14(Ht)로 나타났고 대조군은 208(Ht)로 나타났으며 砂仁 100µg/ml 투여 실험군은 23(Ht), 砂仁 10µg/ml 투여 실험군은 86(Ht), 砂仁 1µg/ml 투여 실험군은 171(Ht)로 나타났다(Fig. 5).

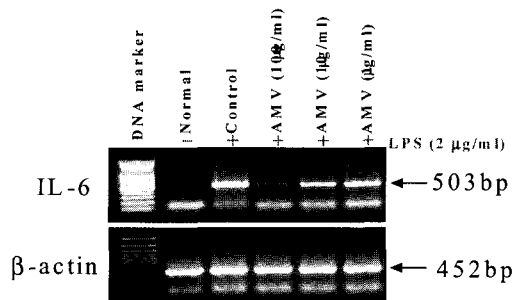


Fig. 5. Inhibitory effects of AMV extract on IL-6 mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.

TNF-α mRNA 발현에 있어서 정상군은 42(Ht)로 나타났고 대조군은 168(Ht)로 나타났으며 砂仁 100µg/ml 투여 실험군은 55(Ht), 砂仁 10µg/ml 투여 실험군은 90(Ht), 砂仁 1µg/ml 투여 실험군은 139(Ht)로 나타났다(Fig. 6).

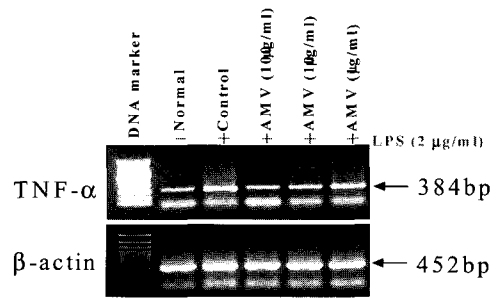


Fig. 6. Inhibitory effects of AMV extract on TNF-α mRNA expression in THP-1 cell line cultures after treatment with LPS.

4. PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도 억제 효과

PC-12 세포주 세포성 단백질에서 AChE 활성도 억제 효과를 본 결과 대조군에 비해 砂仁을 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml를 투여한 실험군은 각각 37.8±4.6, 61.0±7.2, 86.4±5.7(%)로 나타나 유의성 있는 억제효과를 보였다(Fig. 7).

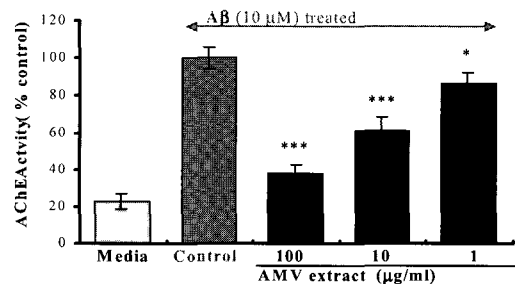


Fig. 7. Inhibitory Effects of AMV Extract on the AChE Activity in Aβ stimulated PC-12 cells.

5. 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, 71.5±8.9(mg/dl)로 상승을 보였으나 유의성은 없었다(Table 2). Uric acid는 대조군이 2.54±0.19(mg/dl)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 2.06±0.17,

2.02±0.06(mg/dl)로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다 (Table 2). AChE activity는 대조군이 69.3±5.6(U/ml)인데 비하여, tacrine 투여군과 실험군은 각각 31.3±7.1, 40.1±6.6(U/ml)으로 나타나 모두 유의성 있는 감소효과를 보였다(Table 2).

Table 2. Effects of AMV on the Serum Level in Rat Serum Acetylcholine Decrease by Scopolamine Induced Amnesia Rat

Group	Glucose (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)	AChE (U/ml)
Normal	87.8±4.7 ^{a)}	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***
AMV	71.5±8.9	2.02±0.06*	40.1±6.6**

a) : Mean ± Standard error. * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

6. Scopolamine으로 유도된 학습과 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 38.4±3.1(sec)로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 8).

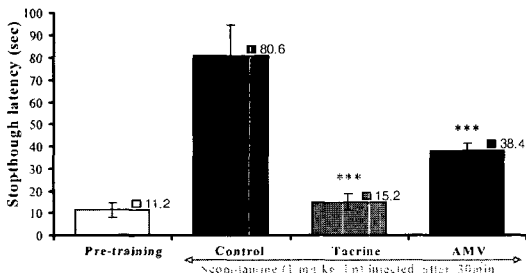


Fig. 8. Effects of AMV on the memory deficit mice induced by scopolamine in the stop-through type Morris water maze test. *** : p<0.001

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

Distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군은 1466±153.4(cm)로 나타났고, tacrine 투여군은 486±34.0(cm)으로 나타났으며, 실험군은 621±55.4(cm)으로 나타나 유의성 있는 단축을 보였다(Fig. 9, 10).

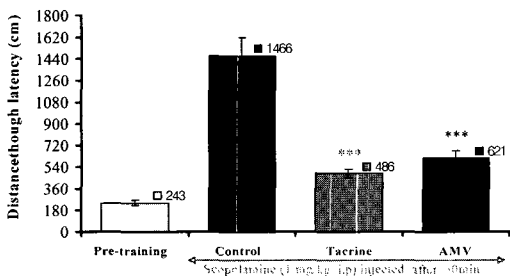


Fig. 9. Effects of AMV on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze test. *** : p<0.001

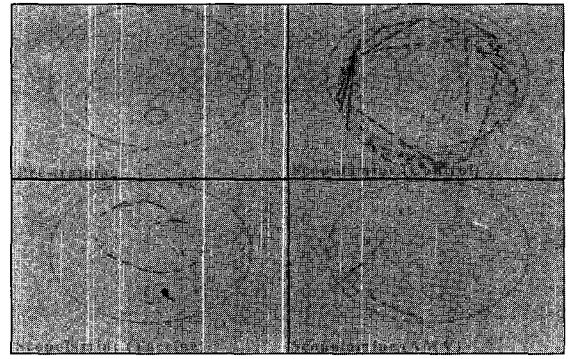


Fig. 10. Photograph on the memory deficit mice induced by scopolamine in the distance movement-through type Morris water maze test.

고찰

20세기 중반을 지나면서부터 전세계적으로 노인층 인구가 크게 증가되는 경향을 보이고 있으며 21세기 중반 이후로는 사회적으로 정년을 넘긴 고령층 인구가 전체 인구의 20%를 초과할 전망이다. 이러한 노인 인구의 증가는 종래 사망의 큰 원인이었던 여러 가지 전염성 질환이 현저하게 감소되었을 뿐만 아니라 사회복지 차원에서의 많은 개선이 있었기 때문이다²³⁾. 우리나라의 경우, 1990년 65세 이상 노인 인구는 약 5.0%이며, 2000년에는 약 6.8%, 2020년에는 거의 12% 수준에 이를 것으로 추산된다²³⁾. 고령사회로 인한 문제 가운데 하나가 치매환자의 증가인데 치매는 현재 심장병, 암, 뇌졸중에 이어 4대 주요 死因으로 불릴 정도로 중요한 기질성 장애의 하나이다²⁴⁾.

치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이나 질병 등의 외인에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지 기능과 고등 정신 기능이 감퇴하는 복합적인 임상증후군을 일괄하여 지칭하는 것이다. 이러한 증상은 의식이 명료한 상태에서 발생해야 하며 국소적인 한두 가지의 인지기능의 상실이 있거나 일과성의 증상을 의미하는 것은 아니다¹⁾.

치매의 원인적 발생빈도는 AD가 가장 빈번하여 60%에 달하고 VD는 20% 정도이다¹⁾. AD는 1906년 독일의 정신과 의사인 Alois Alzheimer가 초로기 치매에 관하여 보고하면서 처음 알려진 것으로, 뇌신경 세포가 어떤 원인에 의해서 변성 탈락하여 전반적인 뇌위축과 뇌세포의 소실로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 망상, 행동장애 등의 증상을 나타내는 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다²⁾.

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 있다²⁵⁾.

Aβ는 β-secretase나 γ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP 일부가 잘라져서 생성되는데 이 단백질은 소수성-잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다²⁶⁾. APP의 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 세

포·세포간, 세포·간질간의 유착에 관여하며 구리, 아연 등 각종 이온의 세포내 유입에 관여할 것으로 생각되는 단백질로²⁷⁾, APP의 유전자는 21번 염색체에 위치하고 있으며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자에서 전형적인 AD 증상이 나타나는 점에서 그 중요성이 더욱 증대된다고 할 수 있으며, 이러한 병변은 유전자 증가에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 추측되고 있다²⁸⁾.

AD와 관련된 또 다른 중요한 이론은 astrocyte와 microglial cell 등의 신경교세포에서 생성되는 proinflammatory cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 가설이다⁴⁾. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자이며 cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만 일단 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증반응 등의 자극에 의해 손상된 뇌혈관장벽(brain blood barrier ; BBB)을 통해 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면, 활성화된 astrocyte와 microglial cell 등이 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 신경세포의 사멸이 촉진된다^{4,28)}.

특히 A β 가 침적된 노인반 주변에 활성화된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 이들 신경교세포들은 A β 에 의해 과잉 생산된 ROS 등이 매개되어 활성화되고 이러한 astrocyte와 microglial cell의 활성화는 proinflammatory cytokine의 발현을 통해 AD의 병리기전에 기여하는 것으로 알려져 있어 A β 와 proinflammatory cytokine의 상관성이 주목되고 있다²⁹⁾.

또한 이러한 과정에서 GFAP(glial fibrillary acidic protein)의 수치가 상승하는데, GFAP란 뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표지자로서, AD 환자에게서 현저하게 증가하는 경향을 보이며, 이는 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 신경변성 과정을 촉진하게 된다³⁰⁾.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는데³¹⁾, AD의 주증상인 기억력장애도 해마 및 측두엽의 변연계에서 콜린성 신경전달 물질이 소실되기 때문인 것으로 알려져 있다³²⁾. 특히 AD 환자에게서 나타나는 기억력감퇴는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이며 이 현상은 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다³³⁾. 이처럼 AD는 뇌조직 내에서 choline계 활성이 감소되어 기억력의 감퇴를 일으키기 때문에 신경접합부에 작용하는 acetylcholine의 양을 증가시키거나, AChE의 활성을 억제하는 약물들이 개발 중인데 대표적인 것으로는 AChE의 활성을 억제하는 tacrine 등이 있다³⁴⁾. 이러한 약제는 비록 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 문제가 있지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 치료제로서 효과가 우수한 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

韓醫學으로 痴呆는 '呆病'⁶⁾, '健忘'⁷⁾ 등의 範疇에 속하며, 明代 張介賓의 《景岳全書·癡狂痴默》⁸⁾에서는 "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……"이라 하여 痴呆와 유사한 痴默에 대해 최초로 기술하고 있다.

淸代の 陳⁶⁾ 등은 치매와 유사한 개념으로 '呆病'에 대해 상세히 서술하고 있다. 또한 《黃帝內經》³⁶⁾을 비롯하여 많은 歷代醫書^{7,8)}에서도 '痴呆'나 '呆病'의 명칭은 없으나 '健忘' 등의 언급에서 유사한 증상을 제시하고 있다.

痴呆의 증상은 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 등이며, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다. 원인은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다⁹⁻¹¹⁾.

砂仁(Amomum villosum)은 生薑科(Zingiberaceae)에 속한 陽春砂의 成熟한 果實을 건조한 것으로 芳香化濕藥에 해당하며, 化濕開胃, 溫脾止瀉, 理氣安胎 등의 효능이 있어 濕濁中阻, 脘痞不飢, 脾胃虛寒, 嘔吐泄瀉 등을 치료¹²⁾하며, 《申氏本草學》³⁷⁾에서는 "砂仁은 天地陰陽의 氣를 稟하고 生하여 陽에 屬하고 降이 升보다 많아서 行氣調中의 要藥이 된다"고 하였으며, 《本草求真》¹³⁾에서는 "醒脾調胃要藥"이라 하였고, 《東醫寶鑑》¹⁴⁾에서는 "性溫味辛無毒, 治一切氣, 心腹痛, 宿食不消, 赤白泄痢, 溫暖脾胃, 止腹痛, 治霍亂."이라 하였다.

痰飲은 痴呆의 중요한 원인 중 하나인데⁹⁻¹¹⁾, 脾胃는 水液代謝의 中樞로 痰飲의 生成과 밀접한 관련이 있으므로³⁸⁾, 化濕開胃의 效能 및 그 主治로 미루어 砂仁을 痴呆의 치료와 예방에 응용할 수 있으리라 사료된다.

이에 著者は 砂仁의 痴呆에 대한 효과를 알아보려고, PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP의 유전자 발현과 AChE의 활성도를 관찰하였고 THP-1 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 유전자 발현을 관찰하였으며, 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 세포주를 분리하여 砂仁의 세포독성을 측정한 결과, mLFC 및 PC-12 세포주 모두의 생존률에 있어서 대조군에 비해 200 μ g/ml 이하의 실험군은 큰 변화가 없었고 400 μ g/ml의 실험군은 각각 83 \pm 3.7(%)와 85 \pm 4.3(%)로 감소되었다(Table 1). 따라서 본 실험에서는 세포독성의 영향을 받지 않는 농도인 100 μ g/ml 이하의 砂仁을 사용하여 砂仁이 AD 유발인자에 미치는 영향을 살펴보았다.

AD 유발과 관련되어 있는 APP, AChE, GFAP의 mRNA 발현을 PC-12 세포주에서 관찰한 결과, APP, AChE, GFAP mRNA 발현에 있어서 10 μ M의 A β 만을 처리한 대조군에 비해, 10 μ M의 A β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 砂仁을 함께 투여한 실험군에서 모두 농도 의존적으로 APP, AChE, GFAP의 mRNA의 발현이 억제되었는데(Fig. 1-3), 이를 통하여 砂仁은 AD를 유발하는 여러 물질의 유전자 발현의 억제를 통하여 AD에 효과가 있음을 알 수 있었다.

THP-1 세포주는 사람의 monocyte로 LPS의 자극으로 microglial cell과 유사한 형태를 나타내므로 사람의 microglial

cell의 모델로 사용할 수 있고³⁹⁾, 또한 LPS와 A β 를 처리한 THP-1 세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , TNF- α 의 생성이 증가된다는 것이 보고된 바 있다⁴⁰⁾. 본 실험에서는 THP-1을 LPS로 처리한 후 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 발현을 관찰함으로써 砂仁이 microglial cell의 proinflammatory cytokine 발현에 미치는 억제효과를 측정할 결과 대조군에 비해 실험군에서 IL-1 β 의 mRNA 발현이 억제되었는데, 특히 10 μ g/ml의 砂仁을 투여한 실험군에서 발현억제효과가 100 μ g/ml 투여군에 비해 양호하였다(Fig. 4). IL-6와 TNF- α mRNA 발현에서는 2 μ g/ml의 LPS만을 처리한 대조군에 비해, 2 μ g/ml의 LPS와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 砂仁을 함께 투여한 실험군에서 유전자 발현이 농도 의존적으로 억제되었는데(Fig. 5, 6), 이를 통하여 砂仁이 proinflammatory cytokine의 발현 억제를 통해 AD의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

PC-12 세포주의 세포성 단백질에서의 AChE 활성도를 측정할 결과 10 μ M의 A β 만을 처리한 대조군에 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 砂仁을 함께 투여한 실험군에서 모두 유의성 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 7), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 砂仁의 투여로 PC-12 세포주의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되어, 砂仁의 투여가 acetylcholine을 활성화시킴으로써 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Glucose는 scopolamine 등에 의해 유도된 기억력감퇴를 회복시키는 역할을 하며 이 작용은 choline계와의 기능적인 상호작용으로 이루어지는 것으로 생각되고 있으며⁴¹⁾, uric acid는 핵산 중 purine 염기의 최종 대사산물로, 치매에서의 uric acid의 작용은 뚜렷이 밝혀지지 않았지만 AD와 VD에서 증가되는 것으로 알려져 있다⁴²⁾.

이런 관점에서 砂仁이 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청내 glucose, uric acid 및 AChE에 미치는 효과를 분석한 결과, glucose는 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 증가를 보였으나 유의성은 없었고, uric acid는 대조군에 비하여 tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 나타냈으며, AChE 활성도는 대조군에 비하여 tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 보여주었는데(Table 2), 이로써 砂仁이 glucose를 효과적으로 증가시키지는 못했으나, uric acid를 감소시키고 AChE의 활성을 억제함으로써 AChE의 과다로 인한 acetylcholine의 작용 저하를 개선하여 기억력감퇴에 대한 치료효과가 있을 것으로 판단된다.

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐모델의 Morris water maze 실험을 통한 기억력 감퇴 억제 효과를 분석한 결과, stop-through latency는 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 시간의 단축을 보였고(Fig. 8), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 대조군에 비해 Tacrine 투여군과 실험군에서 모두 유의성 있는 거리의 단축을 보였는데(Fig. 9, 10), 이것으로 砂仁 투여 후 기억력감퇴가 억제되었음을 볼 수 있었다.

이상의 내용을 총괄해 보면 砂仁은 PC-12 세포주에서 유전

자 수준에서 APP, AChE, GFAP의 발현과 IL-1 β , IL-6의 proinflammatory cytokine의 발현을 억제하였고, 세포성 단백질 수준에서 AChE의 활성을 감소시켰으며, scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 白鼠 모델의 혈청내 uric acid와 AChE를 감소시켰으며 Morris water maze 실험에서 scopolamine으로 유도된 생쥐의 기억력감퇴를 개선시켰다.

이러한 결과를 종합해 봤을 때 砂仁은 AD에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

砂仁이 AD 병태모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

砂仁은 PC-12 세포주에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였다. 砂仁은 THP-1 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA의 발현을 억제하였다. 砂仁은 PC-12 세포주의 세포성 단백질에서 AChE의 활성을 유의성 있게 억제하였다. 砂仁은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 백서의 혈청 내에서 유의성 있게 uric acid를 감소시키고, AChE 활성을 억제하였다. 砂仁은 scopolamine으로 유도된 기억력감퇴 생쥐의 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 유의성 있게 기억력감퇴를 개선시켰다.

이상의 결과로 보아 砂仁은 AD의 치료와 예방 및 기억력 감퇴에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이광우 편저. 임상신경학, 서울, 법문사, pp 203-215, 2003.
2. 이근후. 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1986.
3. Li, W.Y., Butler, J.P., Hale, J.E., McClure, D.B., Little, S.P., Czilli, D.L., Simmons, L.K. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 95(1):1-4, 2000.
4. Downen, M., Amaral, T.D., Hua, L.L., Zhao, M.L., Lee, S.C. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28(2):114-127, 1999.
5. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficarò, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(4):691-699, 1999.
6. 陳士澤 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p 102, 1984.
7. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp 129-135, 534, 545, 550, 1982.
8. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
9. 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.
10. 陳輝 외 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp 242-251,

- 784-791, 1993.
11. 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.
 12. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, pp 294-296, 1992.
 13. 黃宮繡 : 本草求真, 서울, 一中社, pp 109-110, 1992.
 14. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 법인문화사, p 1947, 1999.
 15. 손윤경 : Alzheimer병의 신경병리학적 소견과 분자생물학적 연구동향, 계명의대논문집, 16(3):323-338, 1997.
 16. 鄭仁哲, 李相龍 : 溫膽湯이 腦組織이 酸化作用에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 8(2):51-62, 1997.
 17. 朴鍾雲, 李基商, 文炳淳 : 四物湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 19(1):185-201, 1998.
 18. 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.
 19. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, D., Warren, J.T., Kennedy, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112, 1990.
 20. Zor, T., Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236(2):302-308, 1996.
 21. 金宇哲 외 : 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp 177-179, 1990.
 22. 의학교육연수원 : 의학연수교육총서 제6집 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, pp 4-5, 1999.
 23. 보건복지부 : 보건사회통계연보, 서울, 보건복지부, pp 236-239, 302-309, 1991.
 24. 김영숙 : 치매에 대한 통합적 접근법, 서울, 교육과학사, p 3, 2002.
 25. Selkoe, D.J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 8(11):447-453, 1998.
 26. Reznik-Wolf, H., Machado, J., Haroutunian, V., DeMarco, L., Walter, G.F., Goldman, B., Davidson, M., Johnston, J.A., Lannfelt, L., Dani, S.U., 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Hu, J., Akama, K.T., Krafft, G.A., Chromy, B.A., Van Eldik, L.J. : Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes ; morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, 785(2):195-206, 1998.
 30. 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.
 31. De Vente, J., Markerink-van, Ittersum, M., Van Abeelen, J., Emson, P.C., Axer, H., Steinbusch, H.W. : 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.
 32. Park, C.H., Kim, S.H., Choi, W., Lee, Y.J., Kim, J.S., Kang, S.S., Suh, Y.H. : Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med*, 62(5):405-409, 1996.
 33. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficarò, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. : In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(4):691-699, 1999.
 34. Raskind, M.A., Sadowsky, C.H., Sigmund, W.R., Beitler, P.J., Auster, S.B. : Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 54(7):836-840, 1997.
 35. Cheng, D.H., Tang, X.C. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacol Biochem Behav*, 60(2):377-386, 1998.
 36. 洪元植 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, pp 37, 124, 196, 229, 217-218, 229, 1985.
 37. 申倍求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp 582-584, 1988.
 38. 대한동의생리학회편 : 동의생리학, 서울, 경희대학교 출판국, pp 293-294, 1993
 39. Stephen, L.Y., Loyd, H.B., June, K.A., Joyce, M.A., Michael, D.D., Paula, B.E., Anthony, M.P., Piorkowski, Kurt, R.B. 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.
 40. Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Naworth, P., Stern, D., Schmidt, A.M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382(6593):685-691, 1996.
 41. 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.
 42. 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.