

黃連解毒湯의 산화적 DNA 손상에 대한 보호효과 및 항산화효소계의 발현과 Acetylcholinesterase 활성에 미치는 영향

문진영**

동국대학교 한의과대학

Effects of Hwangryunhaedok-tang on DNA Damage, Antioxidant Enzymes
Expression and Acetylcholinesterase Activity

Jin-Young Moon**

College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyungju, 780-714, Korea

ABSTRACT

Objectives : In Alzheimer's disease(AD), free radical oxidative stress caused by amyloid beta-peptide may lead to DNA damage, neuronal dysfunction, neurotoxicity and cell death. Hwangryunhaedok-tang(HHT) is traditionally used for the treatment of pyrogenetic diseases. To develop a new anti-AD drug from natural herb, HHT was selected and extracted in this study.

Methods : The antioxidant activities of HHT water extract powder were examined by hydroxyl radical-induced DNA strand nicking assay, and antioxidative enzymes expression assay in H460 cell. In addition, HHT was examined for the inhibitory effect on the acetylcholinesterase(AChE) using by Ellman's coupled assay.

Results : The HHT exhibit DNA protective effect in the hydroxyl radical-induced DNA strand nicking assay. mRNA expression of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were recovered at a normal level by HHT treatment in H460 cell. Furthermore, water extract of HHT showed inhibitory effect on AChE activity.

Conclusion : These results suggest that HHT may be effective in delaying and preventing AD progression related to the free radical-induced DNA damage and AChE activity.

Key words : Hwangryunhaedok-tang, DNA damage, acetylcholinesterase, Alzheimer

#*제1저자, 교신저자, : 문진영, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

· Tel: 054-770-2665 · E-mail: ampmoon@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2007년 02월 12일 · 수정 : 2007년 03월 06일 · 채택 : 2007년 03월 20일

서론

1907년 독일의 알로이스 알츠하이머(Alois Alzheimer)에 의해 처음으로 보고된 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은¹⁾ 혈관성 치매 및 파킨슨병 등과 더불어 노인성 치매를 일으키는 가장 주된 원인이 되는 퇴행성 신경계질환으로서 암, 심장질환과 함께 사망을 야기하는 주요 질환이며, 노화가 진행될수록 발병의 위험도가 크게 높아지므로²⁾, 인구의 고령화 현상이 가속화됨에 따라서 환자수가 매년 증가하는 추세에 있다. 한편, 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 단백질, 지질 및 DNA의 산화가 알츠하이머병 환자의 뇌 속에서 관찰되어지며³⁾, 이러한 알츠하이머병의 발병 과정에서 중심적인 역할을 하는 것이 바로 베타아밀로이드 펩타이드(amyloid beta-peptide)이다⁴⁾. 즉, 베타아밀로이드에 의해 유도된 자유기(free radiaci)는 산화적 스트레스와 신경독성을 유발함으로써 결국 알츠하이머 환자의 신경세포 변성과 소실에 관여하는 것으로 알려져 있다^{5, 6)}. 현재 알츠하이머병의 치료제로는 콜린성 신경계 가설에 의거하여 아세틸콜린분해효소 저해제(acetylcholinesterase inhibitor)들이 주로 사용되고 있으며, 그 외 항산화제를 비롯한 다수의 약물들이 현재 개발 중이다⁷⁻¹⁰⁾. 黃連解毒湯(황련해독탕)은 外臺秘要에 최초로 수록된 이래, 傷寒으로 인한 熱과 飲酒毒과 같은 一切의 熱毒을 풀기위한 목적으로 주로 사용되어 왔다¹¹⁻¹²⁾. 黃連解毒湯에 대한 지금까지의 연구를 살펴보면 항궤양 효과¹³⁾, 이노작용 및 혈압강화 효과¹⁴⁾, 그리고 항균 효과¹⁵⁾ 등이 보고된 바 있다. 특히, 본 처방의 뇌기능 조절과 관련한 연구로는 뇌허혈이 유발된 흰쥐의 신경세포를 보호하거나 세포괴사를 방지함으로써 기억력 및 공간 인지능력을 향상시키는 것으로 보고되었다¹⁶⁻¹⁷⁾. 이에 본 연구에서는 황련해독탕이 알츠하이머병의 치료후보 약물로 개발될 가능성을 검토하기 위한 일환으로 알츠하이머병의 발병 과정에서 중요시되고 있는 자유기로 유도된 DNA의 손상에 대한 보호효과, 항산화효소계의 발현 조절효과 및 acetylcholinesterase에 대한 활성 저해효과를 검토하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 黃連解毒湯 추출물의 제조

1) 약재

본 실험에서 사용한 黃連解毒湯(Hwangryunhaedok-tang, HHT)은 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였으며, 약재의 구성 및 용량은 아래와 같다(Scheme 1).

韓藥名	生藥名	用量
黃連	Coptidis Rhizoma	20.0 g
黃芩	Scutellariae Radix	20.0 g
黃柏	Phellodendri Cortex	20.0 g
梔子	Gardeniae Fructus	20.0 g
Total amounts		80.0 g

Scheme 1. The composition of HHT

2) 시료 조제

黃連解毒湯 80 g에 3차 증류수 500 ml를 가하여 환류냉각관이 부착된 전탕기(heating mantle, HMI-F300, HANA INS.)에서 3 시간 동안 끓이고, 이를 여과(Whatman filter paper #2)하였다. 여액을 2,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상층액을 취하여 rotary evaporator (EYELA N-1000, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 과정에서 얻은 시료를 다시 freezer dryer (LABCONCO 77530, USA)에서 동결건조하여 10.54 g의 최종 추출물을 회수하여 실험에 사용하였다.

2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), isopropanol, ethidium bromide (EtBr), magnesium chloride (MgCl₂), acetylcholinesterase(AChE), 5,5'-dithio bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, ethyl alcohol anhydrous (EtOH), methyl alcohol anhydrous (MeOH)는 Merck사 (Merck KGaA, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (Hyclone, U.S.A) 제품을 구입하여 세포 배양을 하였다. Agarose, 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA 및 antibiotic-antimycotic은 Gibco사 (Invitrogen Corp. U.S.A)에서 구입하였으며, RNA isolation과 cDNA 합성을 위한 Kit (Trizol reagent, ImProm-II Reverse Transcription System)

는 Promega사 (U.S.A) 제품을 사용하였고, ferrous chloride (FeCl₂) 포함한 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

3. 세포배양

黃連解毒湯이 세포수준에서 항산화효소계의 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 본 실험에서는 rat hepatoma 세포주인 H4IIE 세포를 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받아, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 한편 세포의 계대 유지는 tissue culture flask에서 70~80%의 밀도로 자랐을 때 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 처리하여 1:5 비율로 조정된 뒤 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였다.

4. Fenton's reagent에 의한 super-coil DNA 분절 억제능 측정

Supercoiled pBR322를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 super-coil DNA의 분절 억제 현상을 살펴 보았다¹⁸⁾. 먼저 추출된 0.5 μg의 DNA에 Fenton's reagents (30 mM H₂O₂, 0.05 mM ascorbic acid, and 0.08 mM FeCl₃)를 첨가하고, 여기에 각 농도별 黃連解毒湯을 처리하여 최종 부피가 20 μl가 되도록 조정하였다. 그리고 혼합물을 37 °C에서 30 분 동안 정치시키고 ethidium bromide 염색법에 의하여 1 % agarose gel에서 분석하였다.

5. RT-PCR을 이용한 항산화효소계의 발현 측정

역전사 (reverse transcription, RT)에 의한 중합연쇄반응 (polymer chain reaction, PCR)을 이용하여 H4IIE 세포에서 黃連解毒湯의 항산화활성을 측정하였고 PCR은 ASTEC (PC 320, Japan)을 사용하였으며, total RNA는 Trizol-Reagent를 이용하여 추출하였다. 먼저 6 well plate에 각각 4 × 10⁴개의 H4IIE 세포를 분주하고 24 시간이 경과한 후, 농도별 黃連解毒湯을 세포에 처리함으로써 시료의 세포독성을 MTT assay¹⁹⁾로 평가하여, 세포독성을 나타내지 않는 안전한 농도범위를 선정하였다. 그리고 농도가 선정 (0.01 ~ 1.0 mg/ml)된 黃連解毒湯 추출물을 H4IIE 세포에 처리하여 catalase activity, rat CuZn SOD(superoxide dismutase), Mn SOD 및

glutathione peroxidase (GPx) 발현 양상을 비교 실험하였다. 각 PCR 생산물 (cDNA)의 분석을 위하여 1.2% agarose gel에 loading 하였고, ethidium bromide staining 방법을 사용하여 분석하였다. 각 실험군의 primer는 다음과 같이 제작하였다.

	sense oligonucleotide 5'-3'	antisense oligonucleotide 5'-3'
① GAPDH	GCCTTCGGTGTTCCTACC	ACTCCTTGGAGGCCATGT
② Catalase	GACTGACCAGGGCA TCAA	GCGGTGAGTGTCTGGTA
③ CuZn SOD	GCGGTCAATCACTTCGAG	GTACGGCCAATGATGGAA
④ Mn SOD	CTGAACGTCACCGA GGAG	CAGGGCGCAATCTGTAAG
⑤ GPx	CCAACGTGGCCCTCG	AACTTGGTAAAGTTCCA

6. Acetylcholinesterase 효소 활성에 대한 저해능 측정

AChE 효소활성에 대한 黃連解毒湯의 저해효과를 검토하기 위하여 본 실험에서는 Ellman's coupled assay²⁰⁾의 방법에 의거하여 관찰하였다. 효소의 반응은 25±0.1 °C의 항온수조 (SM01, JEIO Tech., Korea)에서 실행하였으며, 1 ml 용량의 cuvette을 반응조로 사용하였다. 즉, coupling agent (0.2 mM DTNB) 및 黃連解毒湯을 농도별로 혼합한 후 항온수조에서 4 분간 반응시키고, 기질 (AChE, 10 unit/10 μl)를 즉시 첨가하여 60 초간 정치하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계 처리

실험 결과에 대한 통계적 처리 및 유의성 분석은 student's *t*-test로 검증하였고, 실험결과는 평균값과 오차(means ± SD)로 표기하였다.

결 과

1. DNA 분절 억제 효과

Supercoiled pBR322 대장균으로부터 plasmid DNA를 추출하여, Fenton 반응계에서 유도된 DNA nicking 정도를 시간경과에 따라 살펴보았다. 그 결과, 반응시간의 경과에 따라 plasmid DNA의 nicking이 증가하였으며, 특히 30 분이 경과한 시점에서 double-strand 형태(form III 형성)의 분절이 현저하게 나타났으며, 1 시간이 경과한 시점에서는

supercoiled DNA가 single-strand 형태(form II)의 분절이 현저하게 유도되었다.(Figure 1. A). 이 실험결과를 바탕으로 黃連解毒湯의 DNA 분절 저해능 실험은 반응 시간 30 분을 기준으로 검토하기로 결정하였다. 黃連解毒湯의 DNA nicking 저해능을 규명하고자, 농도별 黃連解毒湯을 처리하여 분절 억제효과를 관찰한 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에서는 정상적인 DNA의 형태인 form I의 양상을 보였으며, Fenton 반응을 유도하였을 때 form III의 형태로 DNA가 분절됨을 관찰할 수가 있었다. 한편, 시료의 처리에 의하여 form III가 감소함과 동시에 정상적인 form I의 형태가 현저하게 나타남을 관찰할 수 있었다(Figure 1. B). 이 결과에서 黃連解毒湯은 Fenton 반응계에서 생성된 hydroxyl radical에 의한 DNA의 분절을 농도의존적으로 방어함을 알 수 있었다.

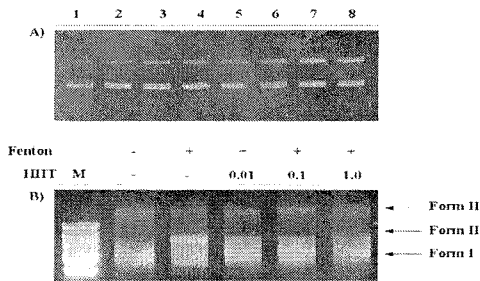


Figure 1. Inhibitory effects of IIIT extract on DNA nicking caused by Fenton's reaction induced hydroxyl radicals. The DNA nicking reaction was initiated by the addition of 0.5 mg of pBR322 plasmid DNA. (A) Lanes 1 through 8 represent the results from the mixture incubated for 0, 5, 10, 20, 30, 45, 50 and 60 min, respectively. (B) Lanes show the IIIT samples treated range from 0.01 to 1 mg/ml, respectively. M(Size marker 100 bp), Form I(Supercoiled DNA), Form II(Single strand nicking form), Form III(Double strand nicking form)

2. RT-PCR을 이용한 항산화효소계의 발현

H4IIE 세포에 H₂O₂와 농도별 黃連解毒湯 추출물을 처리한 다음, RT-PCR을 이용하여 항산화 효소계의 발현 양상을 살펴보았다. 먼저 catalase와 CuZn SOD의 발현을 관찰한 결과, H₂O₂ 처리군 및 黃連解毒湯 처리군에서 모두 발현양의 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. 한편 GPx는 H₂O₂를 처리하였을 때 발현이 감소하였으나, 黃連解毒湯을 0.01, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 처리함에 따라 발현양이 다시 증가하였다. 또한

Mn SOD(Manganese superoxide dismutase)는 H₂O₂ 처리에 의해 발현양이 증가하였으나, 黃連解毒湯을 0.01, 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 실험군에서 발현양이 감소되었다가 1 mg/ml을 처리한 실험군에서는 다시 정상군 수준으로 회복되었다. 한편 활성대조군으로 사용한 GAPDH는 모든 실험군에서 일정한 수준으로 발현이 유지되었다(Figure 2).

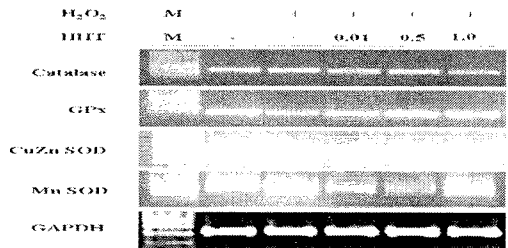


Figure 2. Catalase, CuZn superoxide dismutase(CuZn SOD), manganese superoxide dismutase (Mn SOD) and glutathione peroxidase (GPx) mRNA expression in H4IIE cells after IIIT exposure. A PCR blot of Catalase, CuZn SOD, Mn SOD, GAPDH mRNAs obtained by RT-PCR after exposure of H4IIE cells to indicated concentrations of IIIT for 24 hrs. IIIT samples treated range from 0.01 to 1 mg/ml.

3. Acetylcholinesterase 효소 활성의 저해 효과

黃連解毒湯이 AChE 효소활성에 대한 저해 효과를 검토하기 위하여 본 실험에서는 Ellman's coupled assay 방법을 이용하여 관찰해 보았다. 전기뱀장어에서 추출 정제된 acetylcholinesterase를 사용하여 黃連解毒湯의 효소활성 저해 효과를 측정된 결과, 농도별 黃連解毒湯 추출물을 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml로 각각 처리하였을 때, AChE 효소의 활성이 12, 71, 82, 85, 85, 85, 78 % 저해되었다(Figure 3.). 이 결과에서 黃連解毒湯은 세포에 독성을 나타내지 않은 저농도에서도 매우 현저한 AChE 효소 활성에 대한 저해효과를 보였으며, 최고 85%에 이르는 저해 활성을 나타내었다.

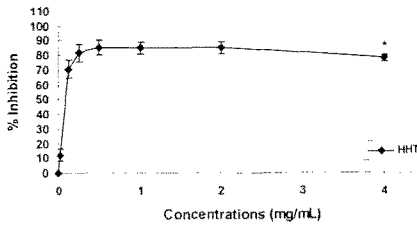


Figure 3. Inhibitory effects of HHT water extract on acetylcholinesterase-mediated AChE activity. The concentration of HHT samples tested ranged from 0.025 to 4 mg/mL. Values are expressed as the percentage of controls (means±S.D). The results are the means of three separate experiments.

고찰

黃連解毒湯은 黃連, 黃芩, 黃柏 및 梔子로 구성된 처방으로서 外臺秘要의 一卷에 '崔氏方'을 인용하여 처음으로 수록되었고, 처방명은 黃連을 비롯한 네 가지 약물로 熱毒을 解除한다는 뜻을 담고 있다^{11, 12)}. 알츠하이머병은 행동과 인지기능이 서서히 점진적으로 감퇴되는 특징을 지닌 뇌의 퇴행성 질환으로, 노령 인구에서 다발되며, 환자수는 전세계적으로 1,500만명에 달한다고 알려져 있다²¹⁾. 알츠하이머병의 신경병리학적 특징으로는 베타아밀로이드가 많이 함유된 비정상적인 물질들의 집합체인 노인성반(amyloid rich senile plaques), 신경세포안에서 신경섬유가 꼬여 있는 신경원섬유 덩어리(neurofibrillary tangles), 및 신경세포의 퇴행변성(neuronal degeneration)이다²⁾. 한편 알츠하이머병 환자의 특징적 소견인 베타아밀로이드에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔으나, 생성 기전에 대해서는 아직까지 명확하게 규명되지 않고 있다. 그러나 베타아밀로이드가 축적되면 자유기와 산화적 스트레스 및 DNA의 손상이 일어나고, 이로 인해 신경세포에 대한 독성과 변성이 야기된다. 또한 알츠하이머병이 진행되면 신경세포 뿐만 아니라, 신경전달물질에도 변화가 일어나는데, 알츠하이머병 환자의 인지능력 저하와 밀접한 관련성을 지닌 것이 바로 아세틸콜린의 양적 감소이다. 따라서 현재 알츠하이머병 환자에게 사용되고 있는 대부분의 치료제는 아세틸콜린 분해효소 저해제이며, 본 질병의 진행속도를 감소시키거나 신경세포의 손상 보호를 목적으로 항산화제 또한 주목받고 있다. 본 연구에서는 黃連解毒湯이 알츠하이머병의 예방 및 치료제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 자유기에 의한 세포내 DNA의 산화적 손상에 대한 보호효과와 항산화효소

계의 발현조절, 그리고 아세틸콜린 분해효소에 대한 활성 저해효과를 살펴보았다. 그 결과, 黃連解毒湯은 Fenton 반응계에서 유도된 hydroxyl radical에 의한 DNA의 분절을 효과적으로 방어하였다(Figure 1). 이 결과는 黃連解毒湯 추출물이 알츠하이머병 환자에서 자유기에 의한 뇌신경세포의 산화적 손상을 방어함으로써 신경세포 독성과 변성을 억제하거나 차단할 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 한편 黃連解毒湯이 자유기의 산화적 손상에 대한 효소적 방어기구인 항산화효소계에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴보았다. 즉, H4IIE 세포에 H₂O₂와 黃連解毒湯 추출물을 처리한 다음, RT-PCR을 이용하여 mRNA 수준에서 항산화효소계의 발현을 살펴보았다. 그 결과, catalase와 CuZn SOD의 발현에는 변화가 관찰되지 않았다. 반면, GPx와 Mn SOD의 발현이 H₂O₂ 처리에 의하여 뚜렷한 변화를 나타내었고, 이러한 비정상적인 발현 양상은 黃連解毒湯 추출물의 처리에 의해 다시 정상적인 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 이 결과에서 黃連解毒湯은 GPx와 Mn SOD의 효소활성을 정상적인 수준으로 유지함으로써 superoxide anions, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical과 같은 활성 산소종에 의한 세포의 산화적 손상을 방지할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 黃連解毒湯이 AChE 효소활성에 대한 저해 효과를 Ellman's coupled assay 방법을 이용하여 검토한 결과, 黃連解毒湯 추출물은 세포에 독성을 나타내지 않은 저농도에서도 AChE 효소 활성을 매우 현저하게 저해하였고, 최대 85%에 이르는 저해 효과를 나타내었다. 이 결과에서 黃連解毒湯은 알츠하이머병 환자에서 관찰되어지는 신경전달물질의 변화, 특히 아세틸콜린의 양적인 감소로 인하여 나타나는 인지능능이 감퇴 증상을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

黃連解毒湯을 대상으로 알츠하이머병의 예방 및 치료제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 free radical에 의한 세포 DNA의 산화적 손상과 항산화효소계의 발현 조절효과 및 AChE에 대한 저해효과를 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 黃連解毒湯은 Fenton 반응계에서 유도된 hydroxyl radical에 의한 super-coil DNA의 강제분절을 효과적으로 방어하였고, H4IIE 세포에서 산화유도제인 H₂O₂의 처리에 의해 비정상적으로 발현된 GPx와 Mn SOD를 정상적인 수준으로 회복시켰으며, 세포독성을 나타내지 않은

저농도에서 AChE 효소의 활성을 강하게 저해하였다. 위의 결과에서 黃連解毒湯은 신경세포의 산화적 손상 및 변성을 방지하고, 알츠하이머 환자의 인지기능 감퇴의 예방 및 치료에 효과적으로 작용할 것으로 평가되며 이에 관한 보다 세부적인 연구의 진행이 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게재장려금의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy*. 1995; 8(6):429-31.
2. Veurink G, Fuller SJ, Atwood CS, Martins RN. Genetics, lifestyle and the roles of amyloid beta and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Annals of human biology*. 2003 ;30(6):639-67.
3. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity : implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free radical research*. 2002;36(12):1307-13.
4. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics*. 2006;15(9):1437-49.
5. Butterfield DA, Kanski J. Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42. *Peptides*. 2002;23(7): 1299-309.
6. Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2006;96(1):1-13.
7. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52:691-9.
8. Costagli C, Galli A. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents: focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:1733-7.
9. 양동원. 알츠하이머병의 치료약제. *대한의사협회지*. 2002;45:401-8.
10. 어경윤. 알츠하이머병의 새로운 치료. *대한치매학회지*. 2005;4(2):59-62.
11. 신재용, 방약합편해설. 서울:성보사. 1991:215.
12. 황도연, 증맥·방약합편. 서울:남산당. 1987:132.
13. 안중환, 최은영, 이성환, 박인식, 임성우. 황련해독탕이 DDS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 2006;27(2):182-95.
14. 국운범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지*. 2002;10(1):113-29.
15. 서형식. 소염 약침액, 황련해독탕, 황련이 staphylococcus epidermidis에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. *한방안이비인후피부과학회지*. 2006;19(2):19-25.
16. 공민정, 하니나, 이하영, 김용태, 노승주, 김호철. 황련해독탕과 가미방의 인지기능회복에 대한 연구. *대한본초학회지*. 2004;19(4):161-8.
17. 이민정, 김영옥, 이강진, 유영법, 김선여, 김성수, 김호철. 황련해독탕의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과. *대한한의학회지*. 2002;23(4):161-8.
18. Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J. Agric. Food Chem*. 2002;50:6490-6.
19. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. *J. Immun. Methods*. 1993;157:203-7.
20. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
21. Samanta MK, Wilson B, Santhi K, Kumar KP, Suresh B. Alzheimer disease and its management: a review. *Am J Ther*. 2006;13(6):516-26.