

## 治痰 한약의 항알츠하이머 효능 비교 연구

곽채원<sup>1#</sup>, 최진규<sup>2</sup>, 김정희<sup>1</sup>, 오명숙<sup>1,2\*</sup>

1 : 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 2 : 경희대학교 경희동서약학연구소

### Comparative study on anti-Alzheimer's effects of herbal medicines treating phlegm

Chaewon Kwak<sup>1#</sup>, Jin Gyu Choi<sup>2</sup>, Jeong Hee Kim<sup>1</sup>, Myung Sook Oh<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Graduate School, Kyung Hee University  
2 : Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute, Kyung Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives** : It has been known to be correlated between phlegm and dementia from the perspective of oriental medicine, but it is unexplored whether herbal medicines to treat phlegm have pharmacological actions on Alzheimer's disease (AD). The aim of this study was to evaluate and to compare effects of herbal medicines to treat phlegm against AD *in vitro*.

**Methods** : We selected 11 herbal medicines which treat phlegm and obtained each extract by boiling in 10-fold distilled water for 2 h. And we performed the assay of acetylcholinesterase (AChE) inhibitory effects of 11 herbal extracts. Next, we evaluated neuroprotective effects of them against amyloid beta<sub>25-35</sub> (A $\beta$ <sub>25-35</sub>) plaque-induced toxicity in HT22 mouse hippocampal neuronal cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. To investigate whether they show the anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide (LPS), we also measured the levels of nitric oxide (NO) in BV2 microglia cells using griess reagent assay.

**Results** : We found that Gamiyeongsin-hwan (GYH) and Cheonghunhwadam-tang (CHT) exhibited remarkable AChE inhibitory effects. In HT22 cells, Arisaematis Rhizoma, Trichosanthis Semen and Fritillariae Thunbergii Bulbus suppressed A $\beta$ <sub>25-35</sub> plaque-induced neuronal cell death. In BV2 cells, Cheongung-hwan significantly inhibited the increase of NO contents induced by LPS and GYH and CHT showed a tendency to inhibit LPS-induced NO generation.

**Conclusions** : These results suggest that several herbal medicines to treat phlegm showed the significant effects on AChE inhibition, neuroprotection against A $\beta$ <sub>25-35</sub> plaque-induced toxicity, and inhibition of NO generation. Therefore, we demonstrate the possibility that herbal medicines with treating phlegm has effects against AD.

**Key words** : Alzheimer's disease, dementia, phlegm, acetylcholinesterase, amyloid beta, neuroinflammation

## I. 서 론

치매는 주요 신경 인지 장애로 정의하고 있으며, 기억력, 학습, 언어, 행정기능, 사회적 인식, 운동 능력 등과 같은 여러 인지 기능 장애가 나타나게 된다. 전 세계적으로 2015년까지

약 4,700만명의 환자들이 치매를 앓고 있으며, 2050년에는 약 3배가 늘어날 것으로 전망된다<sup>1,2)</sup>. 치매의 종류는 대뇌의 위축과 노인반, 신경원섬유의 변화로 병리적 현상이 나타나는 알츠하이머병이 약 50%를 차지하며 그 밖에 혈관성 치매, 파킨슨병성 치매 등이 있다<sup>3)</sup>. 치매에서 높은 비중을 차지하고

\*Corresponding author : Myung Sook Oh, Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea; Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

· Tel : +82-02-961-9436 · E-mail : msohok@khu.ac.kr

#First author : Chaewon Kwak, Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-02-961-2252 · E-mail : kwak,cw@khu.ac.kr

· Received : 17 Apr 2019 · Revised : 29 May 2019 · Accepted : 25 Jul 2019

있는 알츠하이머병의 병리적 기전은 뇌에서 amyloid beta(Aβ) plaque의 생성 및 축적과 함께 tau protein의 과인산화로 neurofibrillary tangle이 형성되어 발생하는 신경세포손상이 주된 원인으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 현재 시판되고 있는 콜린성 치료제인 donepezil, rivastigmine, galantamine 등의 아세틸콜린 분해 효소 억제제가 치매 질병에 주로 사용되고 있지만<sup>5)</sup>, 일시적으로 증상을 개선하는 수준이며, 모든 환자에게 적용을 하지 못한다는 점에서 보다 근본적인 치료제 개발이 필요한 실정이다.

한의학적으로 치매를 설명할 수 있는 범주 중에서 健忘에 대한 문헌을 증점으로 살펴보았다. <<東醫寶鑑>>에서 健忘은 다른 臟腑 중에서도 心과 脾와 관련되어 있다고 하였다. 心이 傷하게 되면 血이 줄어들고 홀어져서 神이 제자리를 못하게 되고, 脾가 傷하면 衛氣가 쇠약해져서 健忘이 생긴다고 하였다. 이렇게 健忘은 精神이 부족해서 생기는 경우도 있지만, 痰에 의해 생기는 경우도 있다. 痰이라는 것은 津液이 熱을 받아서 생긴 것을 말하며, 熱이 날 경우 津液이 熏蒸을 받아 걸쭉해져서 痰이 생성된다<sup>6)</sup>. 痰과 健忘의 상관관계에 대한 문헌을 살펴보면 <<醫宗必讀>>에서는 心이 아래에서 神과 交流하지 못하면 火가 神明을 어지럽게 하고, 神이 위에서 心과 交流하지 못하면 精氣가 伏하여 쓰지 못하게 되고, 火가 위에 있으면 痰이 되고, 水가 아래에 있으면 燥가 생기게 되어, 昏하고 浬안하지 못하여 健忘이 발생된다고 하였다. <<千金要方>>에서는 病으로 인하여 心神이 離散되고, 腎氣의 失強으로 痰涎이 乘虛하여 竅隧를 侵犯함으로써 健忘이 발생된다고 하였다. <<古醫醫鑑>>에서는 心은 血을 생성하는데 血이 부족하여 眞臟을 營養하지 못하면 痰이 발생하여 氣가 鬱滯되고, 이로 인해 脾가 舒하지 못함으로써 健忘이 발생한다고 하였다<sup>7)</sup>. 이처럼 痰은 健忘을 발생시키는데 영향을 주며, 治痰 관련 약재 또는 처방이 치매를 치료할 가능성을 시사하고 있다.

본 연구에서는 “溫化寒痰藥” 또는 “清化熱痰藥” 배속의 후보 약재와 治痰 처방을 조사하였다. 그 중 동물성, 광물류, 해조류, 조개류 약재거나 알츠하이머병에 대한 선행연구가 있는 약재 및 처방을 제외하여 8종 약재(半夏, 天南星, 皂莢, 栝樓仁, 浙貝母, 川貝母, 冬瓜子, 白前)와 3종 처방(加味寧神丸, 清量化痰湯, 川芎丸)을 선정하였다(Fig. 1). 선정 약재 및 처방들의 선행연구를 살펴보면 半夏는 항천식 효과<sup>8)</sup>, 항구토 효과<sup>9)</sup>, 복수압 억제 효과<sup>10)</sup>, 항비만 효과<sup>11)</sup> 등이 보고되어 있으며, 天南星은 자궁경부암 세포의 증식억제 효과<sup>12)</sup>, 발모 촉진 및 유도 효과<sup>13)</sup> 등이 보고되어 있다. 皂莢은 조혈의 성분인 sapoinin C의 폐암세포에서의 항암 효과<sup>14)</sup>, 항산화 효과<sup>15)</sup>, 각질세포에서의 항염증 및 피지 분비 억제 효과<sup>16)</sup> 등이 보고되어 있다. 栝樓仁은 항염증 효과<sup>17)</sup>, corticosteroids 장기 투여에 의한 피부장벽 손상 억제 효과<sup>18)</sup>, 백혈병 세포에서의 항암 효과<sup>19)</sup> 등이 보고되어 있다. 浙貝母는 멜라닌 생성 억제 효과<sup>20)</sup>, 유방암 세포에서의 항암 효과<sup>21)</sup>, 浙貝母의 성분인 verticine, ebeiedine, suchengbeisine의 기도 상피 세포에서의 MUC5AC 유전자 발현 억제 효과<sup>22)</sup> 등이 보고되어 있다. 川貝母는 자궁내막암 억제 효과<sup>23)</sup>, 호흡기 염증 억제 효과<sup>24)</sup> 등이 보고되어 있다. 冬瓜子は 지방간 세포에서의 지방중 완화 효과<sup>25)</sup>, 암세포에서의 항암효과<sup>26)</sup> 등이 보고되어 있다. 白前은 白前の 성분인 C21 steroidal glycosides의 항암 효과<sup>27)</sup>, 白前の 성분인

cynatratoside B의 평활근 이완 효과<sup>28)</sup> 등이 보고되어 있다. 清量化痰湯은 항비만 효과<sup>29)</sup>, 국소뇌혈류량 증가 효과<sup>30)</sup> 등이 보고되어 있다. 이처럼 다양한 질환에서 선행 연구가 진행되고 있지만 알츠하이머병에 대한 연구는 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 총 11종의 治痰 약재 및 처방 추출물의 acetylcholinesterase (AChE) 억제 활성, nitric oxide (NO) 생성량, 세포 생존율 측정에서 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

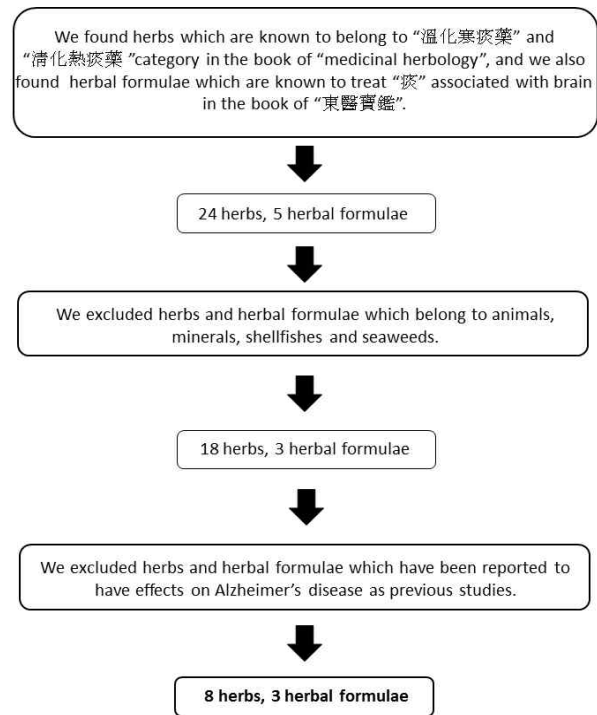


Fig.1 The process of selecting a candidate for treating Alzheimer's disease. We searched herbs to belong to "溫化寒痰藥" and "清化熱痰藥" category and herbal formulae to treat "痰". Except for herbs or herbal formulae of animals, minerals, shellfishes and seaweeds, 8 herbs and 3 herbal formulae were selected as candidates.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 약재들은 광명당제약(Ulsan, Korea)에서 구입하였다. 건조된 약재들을 분쇄기를 이용하여 분말화한 후 10배의 2차 증류수를 가하여 환류 추출기에서 2 시간 동안 가열 추출하였으며, 감압 여과 후, 여과액을 동결건조하여 powder 형태의 시료를 얻었다. 동결건조 후의 수율(yield, %)은 半夏(Pinelliae Tuber; PT) 2.67%, 天南星(Arisaematis Rhizoma; AR) 14.56%, 皂莢(Gleditsiae Fructus; GF) 28.07%, 栝樓仁(Trichosanthis Semen; TS) 5.38%, 浙貝母(Fritillariae Thunbergii Bulbus; FT) 12.55%, 川貝母(Fritillariae Cirrhosae Bulbus; FC) 7.12%, 冬瓜子(Benincasae Semen; BS) 4.29%, 白前(Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix; CR) 7.40%, 加味寧神丸(Gamiyeongsin-

hwan; GYH) 10.85%, 清暈化痰湯(Cheonghunhwadam-tang; CHT) 14.97%, 川芎丸(Cheongung-hwan; CGH) 21.96%이며, 시료는 -20 °C에서 보관 후 매 실험마다 용매에 녹여 사용하였다 (Table 1, 2).

Table 1. The list of herbal extracts

Herb medicine name	Pharmaceutical name (生藥名)	Scientific name (學名)
半夏	Pinelliae Tuber	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach
天南星	Arisaematis Rhizoma	<i>Arisaema amurense</i> Maximowicz
皂莢	Gleditsiae Fructus	<i>Gleditsia sinensis</i> Lamark
桔梗仁	Trichosanthis Semen	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz
浙貝母	Fritillariae Thunbergii Bulbus	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel
川貝母	Fritillariae Cirrhosae Bulbus	<i>Fritillaria cirrhosa</i> D. Don
冬瓜子	Benincasae Semen	<i>Benincasa cerifera</i> Savi
白前	Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix	<i>Cynanchum stauntoni</i> (Decne) Schltr. ex Levl.

Herbal formulae name	Pharmaceutical name (生藥名)	Scientific name (學名)	Weight (g)
加味寧神丸	Rehmanniae Radix (地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz ex Steudel	5.6
	Angelicae Gigantis Radix (當歸)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	3.8
	Paeoniae Radix (白芍藥)	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	3.8
	Poria Sclertum cum Pini Radix (白茯苓)	<i>Poria cocos</i> Wolf	3.8
	Liriodiopsis seu Ophiopogonis Tuber (麥門冬)	<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	3.8
	Citri Unshius Pericarpium (陳皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	3.8
	Fritillariae Thunbergii Bulbus (浙貝母)	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	3.8
	Polygalae Radix (遠志)	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	2.6
	Cnidii Rhizoma (川芎)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	2.6
	Zizyphi Semen (酸棗仁)	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>spinosa</i> Hu ex H. F. Chou	1.9
	Coptidis Rhizoma (黃連)	<i>Coptis chinensis</i> Franchet	1.9
	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	1.9
	Citri Unshius Pericarpium (陳皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	3.8
	Pinelliae Tuber (半夏)	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	3.8
Poria Sclerotium (白茯苓)	<i>Poria cocos</i> Wolf	3.8	
Ponciri Fructus Immaturus (枳實)	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafinesque	2.6	
Atractylodis Rhizoma Alba (白朮)	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	2.6	
Cnidii Rhizoma (川芎)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	1.9	
Scutellariae Radix (黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	1.9	
Angelicae Dahuricae Radix (白芷)	<i>Angelica dahurica</i> Bentham et Hooker f.	1.9	
Osterici seu Notopterygii Radix et Rhizoma (羌活)	<i>Ostericum koreanum</i> Maximowicz	1.9	
Ginseng Radix (人蔘)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	1.9	
Arisaematis Rhizoma (天南星)	<i>Arisaema amurense</i> Maximowicz	1.9	
Saposhnikoviae Radix (防風)	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin	1.9	
Asiasari Radix et Rhizoma (細辛)	<i>Asarum sieboldii</i> Miq.	1.1	
Coptidis Rhizoma (黃連)	<i>Coptis chinensis</i> Franchet	1.1	
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	1.1	
Zingiberis Rhizoma Recens (生薑)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	4	
川芎丸	Platycodonis Radix (桔梗)	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	9.4
	Cnidii Rhizoma (川芎)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	6.1
	Menthae Herba (薄荷)	<i>Mentha arvensis</i> Linné var. <i>piperascens</i> Malinvaud ex Holmes	6.1
	Asiasari Radix et Rhizoma (細辛)	<i>Asarum sieboldii</i> Miq.	2.3
	Saposhnikoviae Radix (防風)	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin	2.3
	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	2.3

Table 2. Yields of herbal extracts

Extracts	Yield (%)
PT	2.67
AR	14.56
GF	28.07
TS	5.38
FT	12.55
FC	7.12
BS	4.29
CR	7.40
GYH	10.85
CHT	14.97
CGH	21.96

PT; Pinelliae Tuber, AR; Arisaematis Rhizoma, GF; Gleditsiae Fructus, TS; Trichosanthis Semen, FT; Fritillariae Thunbergii Bulbus, FC; Fritillariae Cirrhosae Bulbus, BS; Benincasae Semen, CR; Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix; GYH; Gamiyeongsin-hwan, CHT; Cheonghuhwadam-tang, CGH; Cheongung-hwan

## 2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Hyclone (Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), acetylthiocholine iodide, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), AChE from *Electrophorus electricus*, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, griess reagent 등은 Sigma-Aldrich사(St Louis, CA USA)에서 구입하였고,  $A\beta_{25-35}$  human, mouse/rat는 Anaspec사(Fremont, CA USA)에서 구입하였고, sodium bicarbonate 등은 덕산종합과학(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) Acetylcholinesterase 저해 활성 측정

AChE 저해 활성 측정은 Ellman법<sup>31)</sup>의 방법을 변형하여 colorimetric 방법으로 측정하였으며, acetylthiocholine iodide를 기질로 사용하였다. 620  $\mu$ l의 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 7.0), 25  $\mu$ l의 Ellman's reagent (10mM DTNB, 15 mM sodium bicarbonate), 25  $\mu$ l의 AChE 및 80  $\mu$ l의 한약재 추출물(100  $\mu$ l/ml)을 가한 후 shaking 하였다. 이후 blank 설정을 위하여 각각 tube에 반으로 나눈 후 하나는 25  $\mu$ l acetylthiocholine iodide (75 mM)을 가하여 반응시키고, 다른 하나는 25  $\mu$ l의 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 8.0)를 가하여 반응시켰다. 96 well microplate에 넣고 37°C에서 20분간 incubation 시킨 후 412 nm에서 spectrophotometer (Versamax microplatereader;

Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. AChE 저해 활성(AChE inhibition (%))은 다음의 수식을 이용하여 계산하였으며, control군에 대한 %로 표시하였다.

AChE inhibition (%)

$$= \frac{\{(\text{control-blank}) - (\text{sample-blank})\}}{\text{control}} \times 100$$

### 2) HT22 세포에서 $A\beta_{25-35}$ plaque에 대한 세포 보호 효과 측정

#### (1) 세포배양

실험에는 HT22 해마 신경 세포를 사용하였으며 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양하여 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 조건인 incubator에서 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다.

#### (2) $A\beta_{25-35}$ plaque 준비

$A\beta_{25-35}$  plaque은 이전 방법에서 설명한 대로 제조하였다<sup>32)</sup>. 간단히 설명하자면,  $A\beta_{25-35}$  monomer를 증류수로 희석하여 500  $\mu$ mol/L 만큼 최종농도를 설정한 후 37°C에서 3일 동안 incubation하여 amyloid plaque을 제조하였다.

#### (3) 세포생존율 측정

세포생존율을 확인하기 위하여 HT22 세포를 96 well microplate에  $3.0 \times 10^3$  cells/well로 분주하고 18시간 후, 한약재 추출물을 100  $\mu$ g/ml로 26시간 동안 처리하였다.  $A\beta_{25-35}$  plaque으로 유도된 독성에 대한 세포생존율을 확인하기 위하여 한약재 추출물을 10  $\mu$ g/ml로 3시간 전처리 한 후, 3  $\mu$ mol/L의  $A\beta_{25-35}$  plaque를 23시간 더 처리하였다. 약물처리 및  $A\beta_{25-35}$  plaque과의 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/ml를 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 용액을 제거하고 DMSO를 이용해 decrystallization 후 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

### 3) BV2 세포에서의 LPS에 대한 항염증 효과 측정

#### (1) 세포배양

실험에는 BV2 미세아교세포를 사용하였으며 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양하여 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 조건인 incubator에서 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다.

#### (2) 세포생존율 측정

세포생존율을 확인하기 위하여 BV2 세포를 96 well microplate에  $3.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24시간 후, 한약재 추출물을 100  $\mu$ g/ml로 24시간 동안 처리하였다. LPS로 유도된 독성에 대한 세포생존율을 확인하기 위하여 한약재 추출물을 10  $\mu$ g/ml로 1시간 전처리 한 후, 100 ng/ml의 LPS를 23시간 더 처리하였다. 양성대조군은 Quercetin(10  $\mu$ M)을

사용하였다<sup>33)</sup>. 약물처리 및 LPS와 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/ml를 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 용액을 제거하고 DMSO를 이용해 decrystalization 후 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) LPS에 의한 nitric oxide 생성에 관한 영향측정

LPS로 유도한 NO 발현 억제 효능을 확인하기 위해 griess reagent를 이용한 발색시험을 수행하였다. BV2 세포를 96 well microplate에 3.0×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 24시간 후, 한약재 추출물 10 µg/ml과 quercetin 10 µM을 1시간 전처리 한 후, 100 ng/ml의 LPS를 23시간 더 처리하였다. 상층액 70 µl을 회수하여 동량의 griess reagent와 반응시켜 10분 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 농도는 sodium nitrite를 표준물질로 하여 정량곡선 대비 수치로 계산하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 mean ± SEM으로 표시하였다. 통계처리는 Graphpad Prism 5.0 software (San Diego, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의성은 One-way ANOVA, 사후검정은 Tukey's test를 사용하였다. 분석 시 p값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1. Acetylcholinesterase 저해 효과

11종 추출물의 AChE 억제 활성을 100 µg/ml 농도에서 측정한 결과 PT, AR, FT, FC, CGH에서는 억제 활성을 나타내지 않았으며, GF는 1.33±1.75%, TS는 5.04±1.02%, BS는 2.22±0.83%, CR은 12.12±0.62%, GYH는 72.40±0.16%, CHT는 67.79±0.24%의 억제 활성을 보였다 (Table 3).

Table 3. Inhibitory effects of herbal extracts on AChE activity

Extracts (100 µg/mL)	Inhibitory activity (%)
Pinelliae Tuber (PT)	N.D*
Arisaematis Rhizoma (AR)	N.D*
Gleditsiae Fructus (GF)	1.33±1.75
Trichosanthis Semen (TS)	5.04±1.02
Fritillariae Thunbergii Bulbus (FT)	N.D*
Fritillariae Cirrhosae Bulbus (FC)	N.D*
Benincasae Semen (BS)	2.22±0.83
Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix (CR)	12.12±0.62
Gamiyeongsin-hwan (GYH)	72.40±0.16
Cheonghuhwadam-tang (CHT)	67.79±0.24
Cheongung-hwan (CGH)	N.D*

N.D\*: PT, AR, FT, FC, CGH have no AChE inhibitory effects. Values are expressed as the mean ± SEM. PT; Pinelliae Tuber, AR; Arisaematis Rhizoma, GF; Gleditsiae Fructus, TS; Trichosanthis Semen, FT; Fritillariae Thunbergii Bulbus, FC; Fritillariae Cirrhosae Bulbus, BS; Benincasae Semen, CR; Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix; GYH; Gamiyeongsin-hwan, CHT; Cheonghuhwadam-tang, CGH; Cheongung-hwan

2. HT22 세포에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 유도 세포독성에 대한 신경 보호 효과

11종 추출물이 HT22 세포에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. HT22 세포에서 100 µg/ml로 처리 후, 세포 생존율을 확인하였을 때, GF와 CR에서 세포독성이 관찰됨을 확인하였다 (Fig. 2A). 이후 GF, CR을 제외한 9종 한약재 추출물을 10 µg/ml로 처리 후, Aβ<sub>25-35</sub> plaque 독성에 대한 세포 생존율을 확인하였을 때, Aβ<sub>25-35</sub> plaque 단독 처리군(32.22±0.5%)에서 대조군 대비 세포 생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였으며(p < 0.001), 한약재 추출물 처리군 중 AR(41.54±0.35%), TS(39.42±0.51%), FT(47.45±1.01%) 처리군에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 단독 처리군 대비 세포 생존율이 유의하게 증가하였다(Fig. 2B).

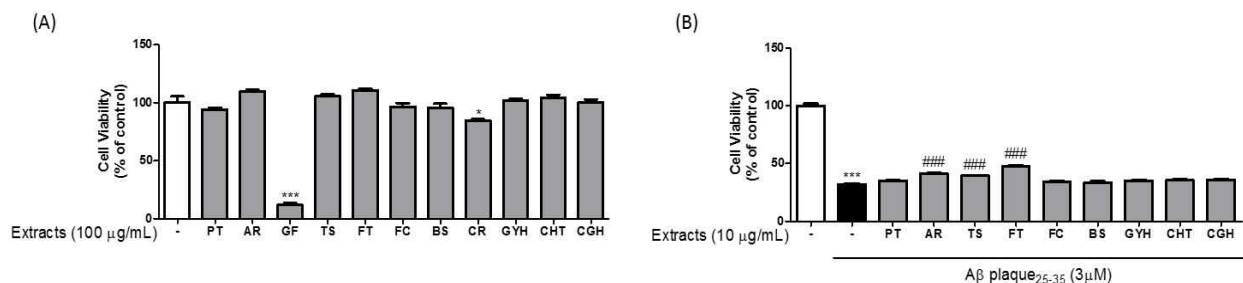


Fig 2. Effects of herbal extracts on cell death induced by Aβ<sub>25-35</sub> plaque in HT22 cells. HT22 cells were treated with herbal extracts for 3 h and incubated (A) without or (B) with Aβ<sub>25-35</sub> plaque (3 µmol/L) for a further 23 h. Cell viabilities were measured by MTT assay 26 h after sample treatment and are presented as percentage of control. Values are mean ± SEM. \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 vs. Aβ<sub>25-35</sub> plaque-only group. PT; Pinelliae Tuber, AR; Arisaematis Rhizoma, GF; Gleditsiae Fructus, TS; Trichosanthis Semen, FT; Fritillariae Thunbergii Bulbus, FC; Fritillariae Cirrhosae Bulbus, BS; Benincasae Semen, CR; Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix; GYH; Gamiyeongsin-hwan, CHT; Cheonghuhwadam-tang, CGH; Cheongung-hwan

### 3. BV2 세포에서 LPS 유도 NO 생성에 대한 억제 효과

11종 추출물이 BV2 세포에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. BV2 세포에서 100 µg/ml로 처리 후, 세포 생존율을 확인하였을 때, GF와 CR에서 세포독성이 관찰됨을 확인하였다(Fig. 3A). 이 후 GF, CR을 제외한 9종 한약재 추출물을 10 µg/ml로 처리 후, LPS 독성에 대한 세포 생존율을 확인하였을 때, 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig.

3B). 또한 상등액을 이용하여 NO 생성량을 측정하였을 때, LPS 단독 처리군(278.95±10.89 µmol/L)에서 대조군(28.84±1.08 µmol/L) 대비 통계적으로 유의하게 증가하였고( $p < 0.001$ ), 한약재 추출물 처리군 중 CGH(141.41±9.91 µmol/L) 처리군에서 LPS 단독 처리군 대비 NO 생성량이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 GYH(229.85±15.06 µmol/L), CHT(233.42±9.91 µmol/L) 처리군에서도 LPS 단독 처리군 대비 NO 생성량이 감소하는 경향이 나타났다(Fig. 3C).

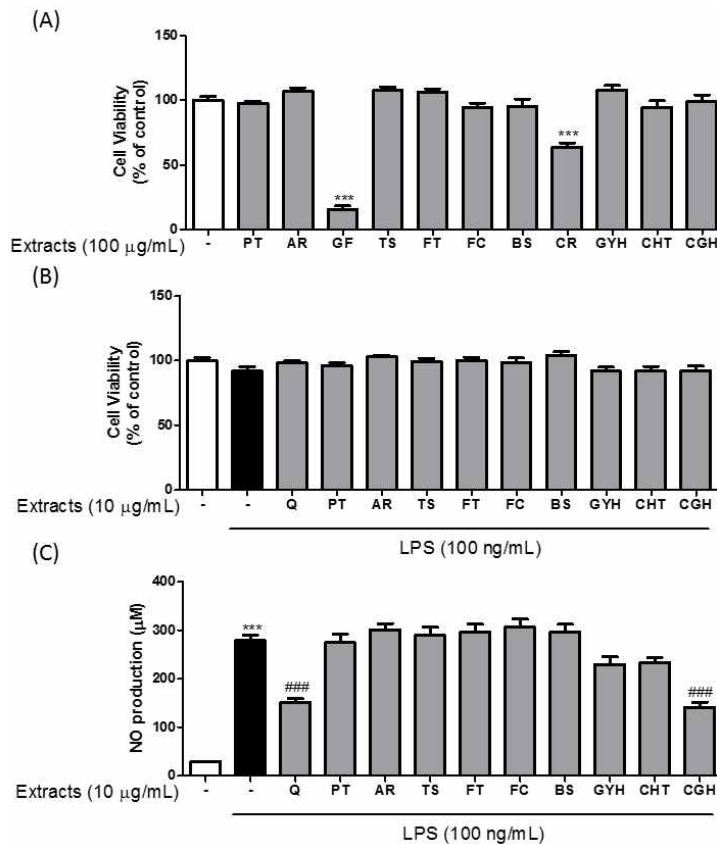


Fig. 3. Inhibitory effects of herbal extracts on LPS-induced production of NO in BV2 cells. (A) The cells were treated with herbal extracts for 24 h. (B, C) The cells were treated with 100 ng/ml LPS for 23 h after pre-treatment with herbal extracts or quercetin (positive control, Q) for 1 h. NO generation was determined by the nitrite levels in the supernatant using the griess reagent. Cell viability was measured by MTT assay 24 h after sample treatment and are presented as percentage of control. Values are mean ± SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control group, ###  $p < 0.001$  vs. LPS-only group. PT; Pinelliae Tuber, AR; Arisaematis Rhizoma, GF; Gleditsiae Fructus, TS; Trichosanthis Semen, FT; Fritillariae Thunbergii Bulbus, FC; Fritillariae Cirrhosae Bulbus, BS; Benincasae Semen, CR; Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix; GYH; Gamiyeongsin-hwan, CHT; Cheonghuhwadam-tang, CGH; Cheongung-hwan

Table 4. Summary of evaluation of anti-Alzheimer's effects of herbal medicines treating phlegm

	PT	AR	GF	TS	FT	FC	BS	CR	GYH	CHT	CGH
AChE inhibition assay	N.D	N.D	↓	↓	N.D	N.D	↓	↓	↑	↑	N.D
MTT assay (Aβ <sub>25-35</sub> plaque/HT22 cell)	N.D	###	***	***	***	N.D	N.D	#	N.D	N.D	N.D
NO assay (LPS/BV2 cell)	N.D	###	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	###	N.D	N.D	&&&

N,D It has no effects.

↓ It has AChE inhibitory effects < 50%.

↑ It has AChE inhibitory effects > 50%.

# It has cytotoxicity in HT22 and BV2 cell, (#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  vs. control group).

\* It has significantly neuroprotective effects in Aβ<sub>25-35</sub> plaque induced HT22 cell (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Aβ<sub>25-35</sub> plaque-only group).

& It has significantly inhibitory effect of NO production in LPS-induced BV2 cell (&&&  $p < 0.001$  vs. LPS-only group).

## IV. 고찰

본 연구에서는 治痰 효능이 알려져 있는 11종의 약재 또는 처방 추출물에 대한 AChE 억제 효과, 해마 신경세포보호효과, NO 생성 억제 효과를 알아보려고 하였다.

신경전달물질 중 하나인 acetylcholine은 콜린성 신경계에 주로 분포하며 학습과 기억에 관여한다고 알려져 있다. 그러나 알츠하이머병 환자의 뇌 신경절에서는 콜린성 신경계가 퇴화되며, 이로 인해 acetylcholine 양이 감소되는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병으로 인한 acetylcholine의 감소를 막기 위하여 acetylcholine을 가수 분해하는 AChE의 저해제를 이용하여 콜린성 기능을 향상시키는 약물에 대한 많은 연구가 보고되고 있다<sup>34,35</sup>. 한약재 추출물의 AChE 억제활성을 측정할 결과 GYH는 72.40±0.16%, CHT에서는 67.79±0.24%의 억제 활성을 보였다. AChE 억제 활성을 측정한 연구들을 살펴 보았을 때, 鬱金과 薑黃 추출물 500 µg/ml에서 각각 약 53%, 51%의 AChE 억제능을<sup>36</sup>, 魚腥草의 IC<sub>50</sub> value는 79.67 µg/ml의 AChE 억제능을 가진다는 연구 보고가 있다<sup>37</sup>. 이와 비교하였을 때 GYH, CHT는 비교적 우수한 AChE 억제활성을 보인다고 할 수 있다. GYH와 CHT에서 공통 약재로 黃連이 포함되어 있는데, 黃連의 활성성분인 berberine의 AChE 억제능이 매우 우수하다고 알려져 있다<sup>38</sup>. 따라서 GYH, CHT의 AChE 억제능은 berberine과 더불어 포함되어 있는 여러 성분의 복합작용에 기인한 것으로 보인다.

Aβ는 알츠하이머병을 일으키는 병리적 산물 중 하나로 알려져 있다. Presenilin 유전자의 돌연변이로 인하여 유전자에 있는 γ-secretase에 의해 amyloid 전구체 단백질을 절단하고, amyloid peptide를 세포질로 방출하여 Aβ plaque을 형성하게 되며 이는 신경세포 사멸을 유도 한다<sup>39</sup>. Aβ<sub>25-35</sub>는 Aβ full length 단백질에서 신경독성과 관련된 가장 핵심적인 amino acid 배열로 알려져 있다<sup>40</sup>. 본 연구에서는 HT22 세포에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 독성에 대한 11종 추출물의 세포보호효과를 알아보기 위하여 세포생존율을 측정하였을 때, AR, TS, FT 처리군에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 단독 처리군 대비 세포 생존율이 유의하게 증가하는 것으로 보아 세포보호효과가 있음을 확인하였다.

다음으로 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 MTT assay 및 NO 생성량을 측정하였다. LPS는 그람 음성균의 세포표면을 구성하는 물질로서 microglia 세포의 활성을 유도하여 pro-inflammatory cytokine을 생성하고, 이는 세포의 염증반응을 일으킨다<sup>41</sup>. NO는 ONOO-로 변화되어 과량 생성이 되면 산화적 스트레스를 일으켜 microglia 세포를 활성화하며<sup>42,43</sup>, 이러한 microglia 세포의 과도한 활성화는 만성염증을 유발하여 신경 퇴행성 뇌질환을 일으키는 주요 원인으로 작용한다<sup>44</sup>. 본 실험에서는 BV2 microglia 세포에서 LPS 독성에 대한 11종 한약재 추출물의 NO 생성 억제 효과를 평가하였다. 그 결과 GF와 CR에서 BV2 세포에 대한 독성을 보였으며, LPS 의해 세포 생존율이 약간 감소한 한약재 추출물 처리군도 있었으나 실험에는 영향을 미치지 않았다. 반면 CGH 처리군에서 LPS 단독 처리군 대비 통계적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였으며, GYH, CHT 처리군에서도 LPS 단독 처리군 대비 NO

생성 억제 경향을 확인하였다. CGH의 구성 약재 중 桔梗이 君藥으로 사용되는데 길경 추출물이 BV2 microglia 세포에서 LPS 독성에 의한 NO 및 prostaglandin E2 생성을 억제하고, cyclooxygenase-2와 inducible NO synthase 발현을 감소시키며, interleukin-8을 감소시켜서 항염증 효능을 나타낸다고 보고하였다<sup>45</sup>. 따라서 CGH의 효과는 君藥인 桔梗과 더불어 포함되어 있는 약재들의 복합작용에 기인한 것으로 보인다.

한의학적으로 痰은 체내의 비생리적인 체액으로써 체내에 정체된 산물을 말한다<sup>46</sup>. 비만은脾胃 기능의 失調로脾胃가 不能運行하여 濕, 痰, 瘀 등의 병리적 산물을 만들어내고 이들이腸胃에 停滯 되어 형성된다고 보았다<sup>47</sup>. 실제로 Subbiah 등의 연구에 따르면, 비만 환자의 치매 발병률은 정상군의 치매 발병률에 비해 3배 이상 높았으며<sup>48</sup>, Louise 등의 연구에서는 비만 환자의 뇌에서 정상인의 대뇌피질 전두엽 부분에서 국소 혈류량 감소와, 기억과 관련된 대뇌피질 영역에서의 기능의 감소를 보고하였다<sup>49</sup>. 이는 痰의 停滯로 인한 비만 상태가 치매와 밀접한 상관관계가 있음을 보여주며, 따라서 治痰 효능을 가진 약재 및 처방의 치매 치료 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 11종 한약재 추출물의 항알츠하이머 효능을 AChE 억제 효능 평가, HT22 해마 신경 세포에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 독성에 대한 세포 보호 효과 평가, BV2 신경아교세포에서 LPS 독성에 대한 NO 생성 억제 효능 평가를 통하여 확인하였다. 이상의 결과는 治痰 효능을 가지는 약재 또는 처방이 항알츠하이머 소재로서의 가능성을 세포 수준 연구에서 처음 규명하였다는 점에서 시사하는 바가 크다.

## V. 결론

본 연구에서는 治痰 효능 약재 8종 및 처방 3종에 대한 항알츠하이머 효능 평가를 수행하였고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AChE 억제 효능 평가를 하였을 때, 加味寧神丸, 淸量化痰湯의 우수한 AChE 억제능을 확인하였다.
2. HT22 해마신경세포에서 Aβ<sub>25-35</sub> plaque 단독 처리군 대비 天南星, 栝樓仁, 浙貝母 처리군에서 세포 생존율이 유의하게 증가함을 확인하였다.
3. BV2 microglia 세포에서 LPS 단독 처리군 대비 川芎丸 처리군에서 NO 생성량이 유의하게 감소하였으며, 加味寧神丸, 淸量化痰湯에서도 NO 생성량이 감소함을 확인하였다.

이상의 결과는 治痰 한약재의 항알츠하이머 소재로서의 가능성을 과학적으로 규명한 점에서 시사하는 바가 크다.

## 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획

평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구를 수행하였음(318027-04).

## References

1. Fisher TJ, Schwartz AC, Greenspan HN, Heinrich TW. Dementia: A complex disease with multiple etiologies and multiple treatments. *Int J Psychiatry Med*, 2016 ; 51(2) : 171-81.
2. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*, 2017 ; 390(10113) : 2673-2734.
3. Ha TY, Ahn JY. Development trend of prevention and treatment of dementia. *Bulletin of food technology*, 2003 ; 16(1) : 55-63.
4. Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2016 ; 12(4) : 459-509.
5. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006 ; Issue 1.
6. Heo J. Donguibogam, 3. Seoul : Yeogang, 2005 : 122-123, 260-261.
7. Choi YJ, Seong GG, Mun BS. A Bibliographic Study on the Types of Differential Diagnosis of Amnesia. *Journal of Korean Oriental Medicine*, 1996 ; 17(1) : 374-406.
8. Ok IS, Kim SH, Kim BK, Lee JC, Lee YC. Pinellia ternata, Citrus reticulata, and their combinational prescription inhibit eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing CCR3+ and Th2 cytokines production in the ovalbumin-induced asthma model. *Mediators Inflamm*, 2009 ; 2009 : 1-10.
9. Nijima A, Okui Y, Kubo M, Higuchi M, Taguchi H, Mitsuhashi H, Maruno M. Effect of Pinellia ternata tuber on the efferent activity of the gastric vagus nerve in the rat. *Brain Res Bull*, 1993 ; 32(2) : 103-6.
10. Li X, Lu P, Zhang W, Li B, Yang R, Luo K. Study on anti-Ehrlich ascites tumour effect of Pinellia ternata polysaccharide in vivo. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2013 ; 10(5) : 380-385.
11. Kim YJ, Shin YO, Ha YW, Lee S, Oh JK, Kim YS. Anti-obesity effect of Pinellia ternata extract in Zucker rats. *Biol Pharm Bull*, 2006 ; 29(6) : 1278-81.
12. Jo JH, Jang JB, Lee GS, Bae WJ. Inhibitory effects of Arisaematis rhizoma on cell proliferation in HeLa cell. *The Journal of Korean obstetrics & gynecology*, 2006 ; 19(3) : 25-40.
13. Kwon KS, Lee MW, Jeong HS, Song BY, Song JM, Lee CH. Experimental Studies on the Hair Growth Activity of Fractions and Extract of Arisaematis Rhizoma in C57B/6N Mice. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*, 2009 ; 23(3) : 619-630.
14. Cheng Y, He W, He Y. Gleditsia Saponin C Induces A549 Cell Apoptosis via Caspase-Dependent Cascade and Suppresses Tumor Growth on Xenografts Tumor Animal Model. *Front Pharmacol*, 2018 ; 8 : 988.
15. Park DY. Antioxidant activities of extracts from Gleditsiae fructus. *Chung-Ang University School of Medicine and Food*, 2012 ; 6 : 59.
16. Koo EJ, Han JK, Kim YH. The Effects on Anti-inflammatory Action in HaCaT Cells and Inhibiting Sebum Secretion in SEB-1 Cells by Gleditsiae Fructus Extract. *The journal of pediatrics of Korean medicine*, 20116 ; 30(2) : 96-106.
17. Son JH, Kim DC. In Vitro Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Effects of Trichosanthes Semen, Gardeniae Fructus, and Angelicae Dahuricae Radix Aqueous Extracts. *The Journal of Korean obstetrics & gynecology*, 2013 ; 26(1) : 41-58.
18. Nam HJ, Kim KS, Kim YB. Effect of Seed of Trichosanthes kirilowii on the Skin Barrier of High Dose Corticosteroid Injected hairless Mouse. *The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, 2008 ; 21(3) : 1-9.
19. Lee EO, Lee JR, Kim KH, Baek NI, Lee SJ, Lee BH, Cho KD, Ahn KS, Kim SH. The methylene chloride fraction of Trichosanthis Fructus induces apoptosis in U937 cells through the mitochondrial pathway. *Biol Pharm Bull*, 2006 ; 29(1) : 21-5.
20. Ha TK, Lee BK, Yoon JR, Mun YJ, Woo WH, Park SH, Lee JC. Inhibitory Effect of Fritillaria Verticillata Willd. var. Thunbergii Bak Ethanol Extract on Melanin Biosynthesis. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*, 2011 ; 25(3) : 510 - 515.
21. Jin MH, Hong SH, Park C, Choi YH, Park SE. Anti-cancer Effects of Oldenlandia diffusa, Cremastra appendiculata and Fritillaria thunbergii on MCF-7 Cells. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*, 2014 ; 28(3) : 310 -316.
22. Kim EJ, Yoon YP, Woo KW, Kim JH, Min SY, Lee HJ, Lee SK, Hong JH, Lee KR, Lee CJ. Verticine, ebeiedine and suchengbeisine isolated from the bulbs of Fritillaria thunbergii Miq. inhibited the



- gene expression and production of MUC5AC mucin from human airway epithelial cells. *Phytomedicine*. 2016 ; 23(2) : 95-104.
23. Bokhari AA, Syed V. Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signaling by *Scutellaria baicalensis* and *Fritillaria cirrhosa* Extracts in Endometrial Cancer. *J Cell Biochem*. 2015 ; 116(8) : 1797-805.
  24. Wang D, Yang J, Du Q, Li H, Wang S. The total alkaloid fraction of bulbs of *Fritillaria cirrhosa* displays anti-inflammatory activity and attenuates acute lung injury. *J Ethnopharmacol*. 2016 ; 193 : 150-158.
  25. Choi JY, Kim SY, Kwun MJ, Kim KH, Joo MS, Han CW. Effects of Ethanol Extract of *Benincasa* Seeds on the Experimental Cellular Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The journal of internal Korean medicine*. 2012 ; 33(4) : 438-447.
  26. Choi HR, Lee KH, Kim CH. Radiosensitizing and Antitumor Effect of the Seed of *Benincasa hispida*. *Korean journal of food science and technology*. 2003 ; 35(3) : 479-482.
  27. Yin ZQ, Yu SL, Wei YJ, Ma L, Wu ZF, Wang L, Zhang QW, Zhao M, Ye WC, Che CT, Zhang J. C21 steroidal glycosides from *Cynanchum stauntonii* induce apoptosis in HepG2 cells. *Steroids*. 2016 ; 106 : 55-61.
  28. Yue GG, Chan KM, To MH, Cheng L, Fung KP, Leung PC, Lau CB. Potent airway smooth muscle relaxant effect of cynatratoside B, a steroidal glycoside isolated from *Cynanchum stauntonii*. *J Nat Prod*. 2014 ; 77(4) : 1074-7.
  29. Md, Jamal Uddin. Study on anti-obesity effects of CHWDT and anti-inflammatory effects of nicotine. *The graduate school of the university of Ulsan*. 2013 ; 2(7) : 63.
  30. Kim CJ, Cho SI, Jeong HW. Experimental Study of CheonghunHwadam-tang on the Cerebral Blood Flow in Rats. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*. 2002 ; 16(2) : 316-321.
  31. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961 ; 7 : 88-90.
  32. Kim N, Choi JG, Park S, Lee JK, Oh MS. Butterbur Leaves Attenuate Memory Impairment and Neuronal Cell Damage in Amyloid Beta-Induced Alzheimer's Disease Models. *Int J Mol Sci*. 2018 ; 19(6) : 1644.
  33. Kang CH, Choi YH, Moon SK, Kim WJ, Kim GY. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- $\kappa$ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway. *Int Immunopharmacol*. 2013 ; 17(3) : 808-13.
  34. Nam SO, Yun YD, Park DH, Ryu JH, Lee YS. Study on the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Coumarin Derivatives. *Yakhak hoeji*. 2011 ; 55(6) : 473-477.
  35. Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2001 ; 122(16) : 1961-9.
  36. Jung SY, Park SJ, Park JH, Jhee KH, Lee IS, Yang SA. Effects of Ethanol Extracts from *Zingiber officinale* Rosc., *Curcuma longa* L., and *Curcuma aromatica* Salisb. on Acetylcholinesterase and Antioxidant Activities as well as GABA Contents. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2012 ; 41(10) : 1395-1401.
  37. Huh E, Kim HG, Park H, Kang MS, Lee B, Oh MS. *Houttuynia cordata* Improves Cognitive Deficits in Cholinergic Dysfunction Alzheimer's Disease-Like Models. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014 ; 22(3) : 176-83.
  38. J Xiang, C Yub, F Yang, L Yang, H Din. Conformation-activity studies on the interaction of berberine with acetylcholinesterase: Physical chemistry approach. *Progress in Natural Science*. 2009 ; 19(12) : 1721-1725.
  39. Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med*. 2016 ; 89(1) : 5-21.
  40. Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci*. 2010 ; 11(1) : 54-67.
  41. Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol*. 2016 ; 14(2) : 155-64.
  42. Wu CH, Chen TL, Chen TG, Ho WP, Chiu WT, Chen RM. Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J Trauma*. 2003 ; 55 : 540-5.
  43. Mouton PR, Kelley-Bell B, Tweedie D, Spangler EL, Perez E, Carlson OD, Short RG, deCabo R, Chang J, Ingram DK, Li Y, Greig NH. The effects of age and lipopolysaccharide (LPS)-mediated peripheral inflammation on numbers of central catecholaminergic neurons. *Neurobiol Aging*. 2012 ; 33 : 423.e27-36.
  44. Park GH, Kim HG, Ju MS, Kim AJ, Oh MS. Thuja

- orientalis leaves extract protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity via inhibiting inflammatory action, *The Korea journal of herbology*, 2014 ; 29(3) : 27-33.
45. Jang MH, Kim CJ, Kim EH, Kim MG, Leem KH, Kim J. Effects of Platycodon grandiflorum on lipopolysaccharide-stimulated production of prostaglandin E2, nitric oxide, and interleukin-8 in mouse microglial BV2 cells, *J Med Food*, 2006 ; 9(2) : 169-74.
46. Lee JH, Oh TH, Jeong SK, Lee HG. The bibliographical study on the Dam-Eum, *The journal of internal Korean medicine*, 1992 ; 13(1) : 156-166.
47. Lee JM, Sim SY. Obesity's Acupuncture & Moxibustion Therapy in a viewpoint of Donguibogam, *The Korean journal of maridian & acupoint*, 2003 ; 20(1) ; 91-101.
48. Pugazhenti S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017 ; 1863(5) : 1037-1045.
49. Dye L, Boyle NB, Champ C, Lawton C. The relationship between obesity and cognitive health and decline, *Proc Nutr Soc*, 2017 ; 76(4) : 443-454.