

동의신경정신과 학회지  
J. of Oriental Neuropsychiatry  
Vol. 13. No. 2, 2002

## 天王補心丹이 痴呆病態모델에 미치는 影響

이준영 · 정인철 · 이상룡  
대전대학교 한의과대학 신경정신과 교실

### Effects of ChenWhangBosimDan(CWBD) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia mice

Junyoung Lee, Inchul Jung, Sangryong Lee

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

Alzheimer's disease(AD) is a progressive neurodegenerative disease, which is pathologically characterized by neuritic plaques and neurofibrillary tangles associated with the acetylcholinesterase, apolipoprotein E and butylcholinesterase, and by mutations in the presenilin genes PS1 and PS2, and amyloid precursor proteins (APPs)'s overexpression.

The present research is to examine the inhibitory effect of CWBD on PS1, PS2 and APPs's overexpression detected by Western blotting. To verify further the effects of CWBD on cognitive deficits, we tested it on the scopolamine(1mg/kg)-induced amnesia model of the mice using the Morris water maze tests, and there were ameliorative effects on memory impairment as a protection from scopolamine. CWBD only partially blocked the increase in blood serum level of acetylcholinesterase and Uric acid induced by scopolamine, whereas blood glucose level was shown to attenuate the amnesia induced by scopolamine and increased extracellular serum level.

In conclusion, studies of CWBD that has been known as anti-choline and inhibitory abilities of APPs's overexpression could also be used further as a important research data for a preventive and promising symptomatic treatment for Alzheimer's disease.

**Key Word** : Alzheimer's disease(AD), ChenWhangBosimDan(CWBD)

### I. 緒 論

天王補心丹은 《世醫得效方》의 처방으로<sup>1)</sup> 終南의 宣律師가 課誦으로 勞心病에 걸려 꿈에 天

王이 이 처방을 주었다고 해서 이름이 지어졌는데<sup>2)</sup>, 精神過勞, 心臟機能의 衰弱으로 인한 貧血, 心悸亢進, 不安, 驚悸, 不眠, 健忘, 疲勞, 煩悶 등을 呼訴하는 者를 目標로 하여, 寧心, 補腎, 益血, 固精, 壯力, 強志하고, 三焦를 맑게 하며 痰涎을 化하고, 煩熱을 祛하며 驚悸를 除하는 處方이다<sup>1)</sup>.

“健忘”은 痴呆의 代表的인 症狀으로서, 痴呆와 的 聯關性은 《內經》<sup>3)</sup> 과 歷代醫書<sup>4,5)</sup>에서 記述이 있었으며, 痴呆는 明代 張<sup>6)</sup>의 《景岳全書·癡

· 교신저자 : 이준영, 경기도 수원시 팔달구 영통동 945-4 한솔프라자 4층 동지한의원(Tel 031-206-7889, Fax 041-553-2225 E-mail : jy270@dreamx.net)

狂痴呆》중에 처음으로記載되었고, 清代의 陳 등<sup>7,8)</sup>에 의해 “呆病”이 痴呆와 類似的한 範疇로 言及되었다. 痴呆의 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있으며<sup>6,8)</sup>, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾胃 등이 주로 사용되고 있다.

西洋醫學의 으로 痴呆는 여러 가지 原因疾患에 의해 惹起되는 知能低下를 특징으로 하는 症候群<sup>9)</sup>으로, 대개 慢性的으로 進行하여 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등을 包含하는 高度의 大腦機能 障病가 나타난다<sup>9,10)</sup>.

痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 退行性 變化, 腦血管障病, 腦의 炎症性障病, 代謝性疾患, 內分泌疾患, 外傷, 中毒 등<sup>10)</sup>이며 이 중 腦의 退行性 變化에 의한 Alzheimer型 痴呆와 腦硬塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混存된 混合型 痴呆가 많은 比率을 차지하고 있다<sup>9)</sup>.

Alzheimer's Disease(AD)는 誘發인자는 presenilin 突然變異로 인해 非正常的으로 分解된 presenilin 代謝物이 Amyloid Precursor Protein(APP)의 形成을 促進하여 AD를 일으키는 것이고<sup>11)</sup>, AD의 1차 症狀인 記憶力 減退現狀은 콜린성 神經系와 密接한 關係가 있다는 證據가 多樣하게 提示되고 있다<sup>12,13)</sup>.

最近 韓醫學 영역에서의 痴呆研究를 살펴보면 腦의 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究<sup>14)</sup>가 이루어지고 있으며, 白鼠의 記憶과 行動에 대하여 Morris water maze<sup>15,16)</sup>와 Radial arm maze<sup>17,18)</sup>의 두 부분의 課題를 통하여 研究하고 있으며, AD의 또 다른 原因인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 遺傳子의 過多 發顯에 對한 研究<sup>13,19)</sup>가 이루어지고 있으나 天王補心丹이 痴呆모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 天王補心丹이 痴呆의 治療에 活用될 수 있는지를 實驗의 으로 檢證하고자, 正常 생쥐의 mouse lung fibroblast cell(mLFC)와 pheochromocytoma cell line(PC-12 cell)에 대한 天王補心丹의 細胞毒성을 測定하고, PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯과, PC-12 cell의

細胞性 蛋白質에서 AChE의 活性度, APP, PS-1, 2의 發顯을 觀察하였고, scopolamine을 복강처리한 白鼠의 AChE의 活性 및 glucose, uric acid를 測定하였으며, Videotrack(animal and human being behaviour analysis system)을 통해 行動의 變化를 觀察한 바 有意한 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

180~250g 30週齡의 Sprague Dawley(SD)系 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 供給받아 使用하였고, 6週齡의 International Cancer Research(ICR)系 생쥐와 20g 4週齡의 BALB/c를 韓國化學研究所에서 供給받아 使用하였다. 動物은 實驗室 環境(溫度 23±2℃, 相對濕度 50±10%, 照明時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300 Lux)에 2週日間 適應시켜 體重變化가 一定하고 健康한 動物만을 選別하여 實驗에 使用하였다. 飼料는 固形飼料(粗蛋白質 22.1% 이상, 粗脂肪 8.0% 이하, 粗纖維 5.0% 이하, 粗灰分 8.0% 이하, 갈슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사 Co.)를, 食水는 精製水를 자유로이 攝取케 하였다.

#### 2) 藥材

天王補心丹은 <世醫得效方><sup>1)</sup>의 處方構成에서 清心熱하는 黃蓮을 加味하여 生乾地黃酒洗 黃連酒炒 石菖蒲 人蔘 當歸酒洗 五味子 天門冬 麥門冬 柏子仁 酸棗仁炒 玄蔘 白茯苓 遠志 丹蔘 桔梗으로 구성된 處方으로, 1貼의 分量은 다음과 같다.

Prescription of ChenWhangBosimDan(CWBD)

韓藥名	生藥名	用量(g)
生乾地黃酒洗	<i>Rehmanniae Radix</i>	8.0
黃連酒炒	<i>Coptidis Rhizoma</i>	8.0
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	4.0
人參	<i>Ginseng Radix</i>	2.0
當歸酒洗	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	2.0
天門冬	<i>Asparagi radix</i>	2.0
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	2.0
柏子仁	<i>Biotae Semen</i>	2.0
酸棗仁炒	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	2.0
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	2.0
白茯苓	<i>Poria</i>	2.0
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	2.0
丹參	<i>Salviae Miltorrhizae Radix</i>	2.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	2.0
Total amount		44.0

3) 檢液의 製調

天王補心丹 3貼 分量 132g을 깨끗이 씻어 3,000ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml를 添加하였다. 3時間 加熱 抽出하고 濾過紙를 利用하여 沈澱物을 3回 濾別한 후, 이 濾過液을 rotary vaccum evaporator (Buchi 461, Switzerland)에서 減壓 濃縮하였다. 이 濃縮液을 -84℃ deep freezer (Sanyo Co., Japan)에서 4時間 동안 放置하고 24時間 동안 freeze dryer (Eyela Co., Japan)로 凍結乾燥하여 10g의 粉末을 얻어서 實驗에 必要한 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

4) 試藥 및 機器

試藥 중 Cholinesterase kit, scopolamine, Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40, Ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), DL-dithiothreitol (DTT), leupetin, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide,

magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을, 그리고 Agarose는 FMC사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, anti-human APP N-terminal antibody (Boehringer Mannheim, Canada), anti-human Presenilin-1 (Oncogen, U.S.A.), anti-human Presenilin-2 (Oncogen U.S.A.), anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab (Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.)과 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

器機는 원심분리기 (한일과학), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), serum separator (녹십자, Korea), Minos-ST (Cobas Co., France), centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Swiss), Bio-freezer (Sanyo, Japan), deep freezer (Sanyo

Co., Japan), freeze dryer (Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama Co., Japan), ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), roller mixer (Gowon Scientific Technology Co., Korea), vortex (비전과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), ELISA LEADER (molecular devices, U.S.A.), Videotrack (Viewpoint, France) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) PC-12 cell에 대한 세포독성測定

#### (1) mLFC와 PC-12 cell의培養

mLFC는, BALB/c 생쥐의 정상 肺組織을 D-PBS로 3회 洗滌한 후 작은 조각으로 切斷하여 conical tube(15ml)에 넣어 1400 rpm으로 5분간 遠心分離하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 狀態의 培養基에서 2時間 동안 培養하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 添加한 후 30분간 계속 培養하였다. 培養 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm으로 遠心分離한 후 RPMI 1640-10% FBS 培養液에서 1週日 동안 培養하였다. 1週日 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 分離하여 RPMI 1640-5% FBS 培養液에 10<sup>5</sup>cells/ml 濃度로 맞추어 96 well plate에 나누었다.

PC-12 (ATCC, CRL1721)는 rat의 adrenal pheochromocytoma로 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) 그리고 10 µg/ml의 gentamycin이 含有된 培養液에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 狀態의 培養器에서 培養하였다.

#### (2) 細胞毒性測定

細胞毒性測定方法은 SRB assay법<sup>20)</sup>을 약간 變形하여 實驗에 使用하였다. mL FC와 PC-12 cell을 2.0 x 10<sup>4</sup>개의 細胞로 96 well plate에 나누고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>常態의 배양기에서 2時間 培

養한 후 CWBD 抽出物(最終 濃度 400µg/ml, 200 µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 72 時間 동안 處理하였다. 培養終了 후에 培養液을 버리고 D-PBS로 2회 洗滌하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 µl를 加하고 1時間 동안 4 °C에 放置하였다. 그 후 蒸溜水로 5회 洗滌한 다음 well plate를 空氣 중에서 乾燥하였다. SRB (0.4% SRB/1% acetic acid) 溶液을 100µl/well로 加하고 室溫에서 30분간 染色하였다. 그리고 0.1% acetic acid 溶液으로 約 4회 洗滌한 다음 空氣 중에서 乾燥하고 10 mM Tris Base로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER에서 540nm로 吸光度를 測定하였다.

### 2) PC 12 cell의 APP, PS-1, PS-2, AChE 測定

#### (1) AChE, NOsII mRNA 發顯測定

##### ① mRNA 抽出

PC-12 cell은 24 well plate에 1 x 10<sup>6</sup> 細胞로 각 well에 分駐하고, CWBD 抽出物 (100µg/ml, 10µg/ml)을 處理하고 1時間 후 PMA와 r IL-1β (100ng/ml)를 處理한 후 24時間 동안 培養하였다. 培養終了 후 上層液을 回收한 후 RNAzol<sup>B</sup>를 利用하여 PC-12 cell 細胞膜을 터뜨려 mRNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 mRNA는 diethyl pyrocarbonate를 處理한 20ml의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

##### ② RT-PCR

역전사 (reverse transcription) 反應은 준비된 total mRNA 3 µg을 75°C에서 5分 동안 變成 (denaturation)시키고, 이에 2.5µl 10 mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides (25pmole/25µl), RNA inhibitor로써 1µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1µl 100 mM DTT, 4.5µl 5 × RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 加한 후, 1µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 加하고 DEPC 處理된 蒸

溜水를 利用하여 最終 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시킨 후 合成된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 使用하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 恒溫水槽 方式의 Primus 96 Legal PCR system을 利用하여 隨行하였다. 反應은 이미 合成된 3 $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 使用하고, 주형에 대한 primer는 AChE, NOs II와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 增幅하기 위하여 sense primer (20pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer (20pmole/ $\mu$ l)를 混合하여 1 $\mu$ l를 加하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu$ l Taq polymerase (5U/ $\mu$ l)를 添加한 다음 最終 부피가 30 $\mu$ l 되도록 滅菌蒸溜水를 加하고 pre-denaturation (95 $^{\circ}$ C, 5分), denaturation (95 $^{\circ}$ C), annealing (55 $^{\circ}$ C, 1分), elongation (72 $^{\circ}$ C, 1分)을 25回 施行한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3分 동안의 條件으로 하여 PCR을 修行하였다. 각 PCR products는 20 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 條件에서 20分간 전기영동을 통하여 分析하였다.

Oligonucleotide sequence의 鹽基配列은 다음과 같다.

㉑ rat AChE

sence oligonucleotide :

5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'

antisense oligonucleotide :

5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'

㉒ rat NOs II

sence oligonucleotide :

5'-TCCCAATCTggAACAgCCAgCTgg-3'

antisense oligonucleotide :

5'-gTCCATgCAGACAgCCACATCCTC-3'

㉓ rat G3PDH

sence oligonucleotide :

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisense oligonucleotide :

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR product의 量은 Windows 1D main program (AAB, U.S.A.)을 利用하여 최고값 (height, Ht)으로 測定하였다.

(2) AChE activity 測定 및 Western blot 分析

① 細胞性 蛋白質 抽出

PC-12 cell에 CWBD 抽出物(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)과 PMA, r IL-1 $\beta$ 를 24時間 동안 同時 培養한 후 細胞性 lysate를 얻어 AChE 活性도를 測定하였고, CWBD 抽出物(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml)과 PMA를 同時 培養한 후 3回 D-PBS로 細胞를 水洗한 후 細胞性 lysate를 얻어 Western blot에 使用하였다.

세포성 lysate를 얻기 위하여 50 $\mu$ l의 lysis 완충용액(Tris-HCl (200mM; pH 8.0), 200mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 $\mu$ g/ml leupetin)을 混合한 후 얼음에서 30分간 培養하고 5分간 遠心 分離하여 細胞性 lysate를 얻어 Bradford 染色法<sup>21)</sup>으로 蛋白質을 定量하였다.

② AChE activity 測定

細胞性 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2ml과 混合하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 添加하였다. 다시 5分 후 acetylcholine chloride solution을 添加하고 時間을 精確히 紀錄하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 30分간 培養시킨 후 ELISA LEADER로 420nm에서 吸光度를 測定하였다.

③ APP, PS-1, PS-2의 Western blot 分析

細胞 lysate (50 $\mu$ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 轉移시켰다. 2% BSA로 2時間 blocking한 후, anti-human APP N-terminal

antibody, anti-human presenilin-1, 그리고 anti-human presenilin-2을 각각 處理하여 4℃에서 overnight 시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP- conjugated secondary Ab과 反應시킨 후 ECL- Hybond film으로 immunoblotting을 하여 分析하였다.

### 3) Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠 모델의 血液分析

#### (1) 藥物 投與 및 scopolamine 注射

老老 (30週齡) SD계 白鼠 5마리를 1群으로 하여 對照群, tacrine을 投與한 陽性對照群 (10mg/kg), 天王補心丹 投與群 (200mg/kg)으로 나누고, 각각 scopolamine (1mg/kg)을 7日間 1日 1回 腹腔 注射하면서 藥物을 함께 投與하였다.

#### (2) WBC, RBC, PLT의 變化 測定

藥物投與 10日 後 SD계 白鼠에서 直接 心臟採 血法으로 10ml의 血液을 포집하였다. 그 中 2ml는 CBC bottle에 넣어 白血球數, 赤血球數, 血小板數의 含量을 計算하였고, 計算은 Fonic法에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

#### (3) Glucose, uric acid의 測定

血清內 glucose, uric acid의 量은 自動生化學 分析機를 使用하여 測定하였다.

#### (4) AChE activity 測定

血清內 AChE activity 測定하기 위하여 test tube와 blank tube를 labeling하고, test tube에 sodium chloride solution (cat. no. 150-3) 0.2ml 과 serum 0.2ml을 넣고 混合하였다. blank tube와 test tube에 3.0ml water, nitrophenol solution (cat. No.420-2) 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 添加하였다. 이후 時間을 正確히 記錄하여 25℃ water bath에서 正確히 30分間 培養시킨 後 ELISA LEADER로 420nm에서 吸光度를 測定하였다. 그 結果를 使用하여  $\Delta A = A_{BLANK} - A_{TEST}$  公式에 의해 검장선에서 活性度를 測定하였다.

### 4) Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐 모델의 Morris water maze 實驗을 통한 記憶力 減退 抑制 效果 測定

#### (1) ICR계 생쥐의 反復 學習 및 藥物 投與

ICR계 생쥐를 1週日間 Morris water maze에서 1日 1回 反復學習을 실시하였다. Morris water maze란 直徑이 90cm이고 높이가 약 30cm인 水槽로 水溫이 28℃인 水돛물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 水槽이다. 1日 1回 學習時 30초 以內에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 選別하였다. 選別된 ICR계 생쥐를 10마리를 한 群으로 하여 對照群, tacrine을 投與한 陽性對照群 (10mg/kg), 天王補心丹 投與群 (250mg/kg)으로 分類하였고 계속 14日間 1日 1回 藥物 投與와 platform에 오르는 反復訓練을 實施하였다.

#### (2) Morris water maze 實驗

훈련과 藥物 投與가 終了된 ICR계 생쥐에 scopolamine (1mg/kg)을 腹腔에 處理한 후 30분 후에 Morris water maze에 생쥐 한 마리씩 넣고 Videotrack (animal and human being behaviour analysis system)으로 行動을 測定하였고 그 缺課를 Videotrack software로 分析하였다.

### 3. 統計 分析

實驗에서 얻은 結果는 mean  $\pm$  standard error로 記錄하였다. 有意性 檢證은 Student's T-test<sup>22)</sup>를 利用하였다.

### III. 成績

1. mLFC과 PC-12 cell에 대한 細胞毒性  
 mLFCs의 生存率은 對照群이  $100 \pm 4.4(\%)$ 로 나타났고 100, 50, 10,  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 CWBD 實驗群이 각각  $98 \pm 4.3(\%)$ ,  $99 \pm 4.1(\%)$ ,  $96 \pm 2.6(\%)$ ,  $94 \pm 4.8(\%)$ 로 細胞毒性이 나타나지 않았고, 400, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 天王補心丹 投與群이 각각  $85 \pm 3.9(\%)$ ,

$77 \pm 3.0(\%)$ 으로 細胞毒性이 나타났다. PC-12의 生存率은 對照群이  $100 \pm 3.5(\%)$ 로 나타났고, 50, 10,  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 CWBD 實驗群이 각각  $102 \pm 5.2(\%)$ ,  $104 \pm 4.8(\%)$ ,  $111 \pm 5.1(\%)$ 로 細胞毒性이 나타나지 않았고, 400, 200,  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 CWBD 投與群이 각각  $63 \pm 4.4(\%)$ ,  $75 \pm 5.3(\%)$ ,  $91 \pm 2.7(\%)$ 로 細胞毒性이 나타났다(Table I).

Table I. Cytotoxic Effects of CWBD Extract on mLFC and PC-12 cell

Group	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viability(% of control)	
		mLFC	PC-12 cell
Control	0	$100 \pm 4.4^{\text{a)}$	$100 \pm 3.5$
	1	$98 \pm 4.3$	$111 \pm 5.1$
	10	$99 \pm 4.1$	$104 \pm 4.8$
	50	$96 \pm 2.6$	$102 \pm 5.2$
	100	$94 \pm 4.8$	$91 \pm 2.7^*$
	200	$85 \pm 3.9^{**}$	$75 \pm 5.3^{***}$
	400	$77 \pm 3.0^{***}$	$63 \pm 4.4^{***}$

<sup>a)</sup> : Mean  $\pm$  Standard error.

Control : Non-treatment group.

CWBD : Group pretreated with various concentration( $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $400 \mu\text{g/ml}$ ) CWBD extract for 72hrs.

\* : Statistically significant value compared with control group data by T test(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

2. PC 12 cell의 APP, PS-1, PS-2, AChE에 대한 영향

1) AChE, NOsII mRNA의 발현

AChE mRNA의 발현에 있어서 정상군은 25(Ht)로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$

만을 처리한 對照群은 58(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 CWBD과 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 을 함께 처리한 實驗群은 각각 23, 56로서 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 만 처리한 對照群에 비해 AChE의 발현이 감소하는 경향이 나타났다(Fig. 1).

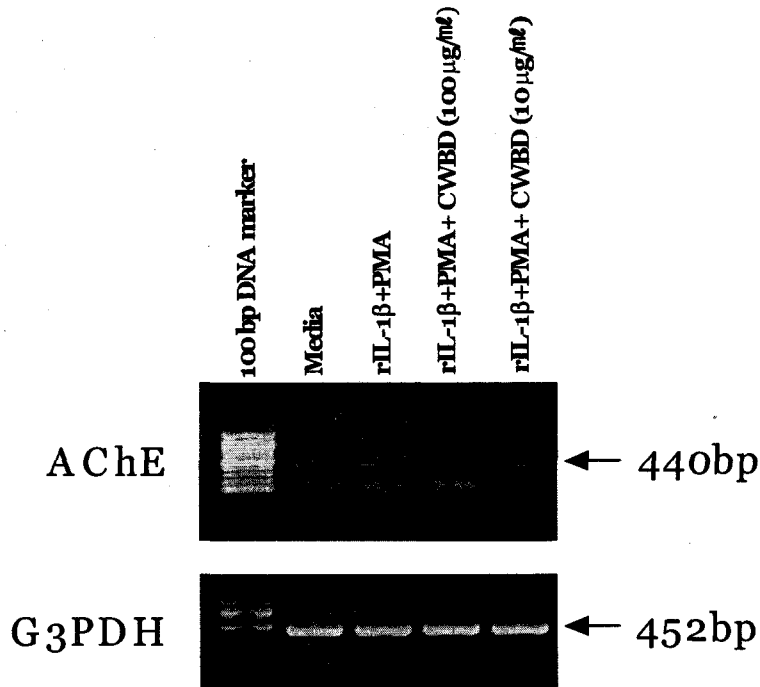


Fig. 1. Inhibitory effects of CWBD extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with PMA and r IL-1 $\beta$ .

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with with PMA and r IL-1 $\beta$  (100ng/ml).

CWBD : Group pretreated with various concentration (10 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ ) of CWBD extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration of CWBD extract in the presence or absence rIL-1 $\beta$  and PMA (100ng/ml) for 6hrs (IL-1 $\beta$  & NOsII mRNA) or 24hrs (AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and analysis(Ht) were used for 1D-density program. Other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.



NOsII mRNA의 發顯에 있어서 正常群은 56(Ht)로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 을 處理한 對照群은 170(Ht)으로 나타났는데 반해, 各各 100, 10 $\mu$ g/ml의 CWBD과 100ng/ml의

PMA와 rIL-1 $\beta$ 를 함께 處理한 實驗群은 各各 80, 114로 100ng/ml의 PMA와 rIL-1 $\beta$ 만 處理한 對照群에 비해 NOsII의 發顯이 抑制되었음을 볼 수 있다(fig. 2).

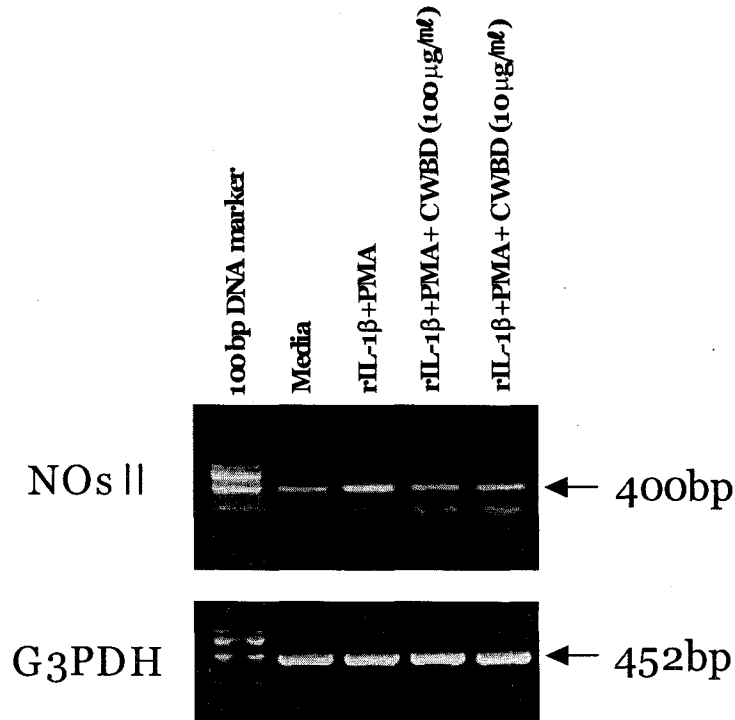


Fig. 2. Inhibitory effects of CWBD extract on NOsII mRNA expression in PC-12 cell cultures after treatment with PMA and r IL-1 $\beta$ .

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with with PMA and r IL-1 $\beta$  (100ng/ml).

CWBD : Group pretreated with various concentration(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml)CWBD extract for 24hrs.

PC-12 cells were pretreated with various concentration of CWBD extract in the presence or absence rIL-1 $\beta$  and PMA (100ng/ml) for 6hrs (IL-1 $\beta$  & NOsII mRNA) or 24hrs (AChE mRNA). Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and analysis (Ht) were used for 1D-density program. Other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

2) AChE activity 抑制

正常群의 AChE activity는  $43 \pm 3.3(\%)$ 이었고  
對照群은  $100 \pm 4.6(\%)$ 으로 나타났는데,  $100, 10\mu\text{g}$

/ml의 天王補心丹 投與群은  $56 \pm 3.4(\%)$ ,  $85 \pm 4.0$   
(%)로 나타나 有意性있게 減少되었다(Fig. 3).

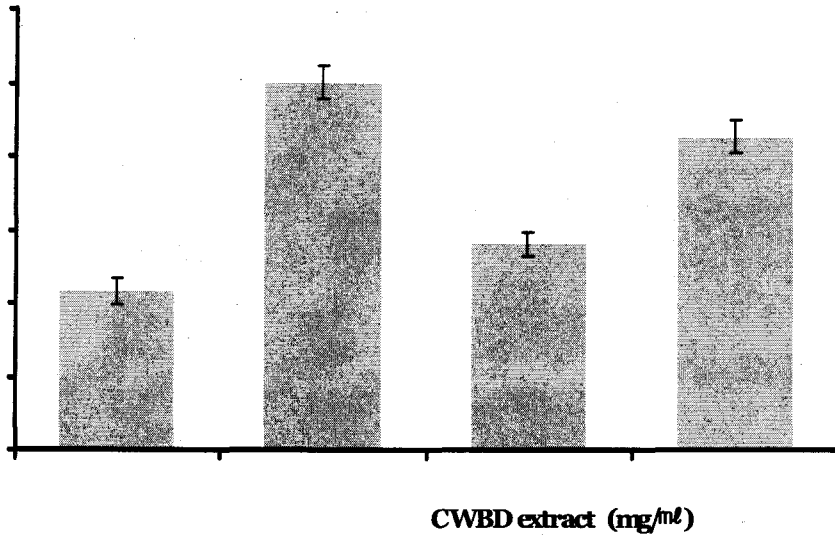


Fig. 3. Inhibitory effect of CWBD extract on the acetylcholinesterase activity in PMA and r IL-1  $\beta$  stimulated PC-12 cell.

Normal : Non-treatment group.

Control : Group pretreated with with PMA and r IL-1  $\beta$  (100ng/ml).

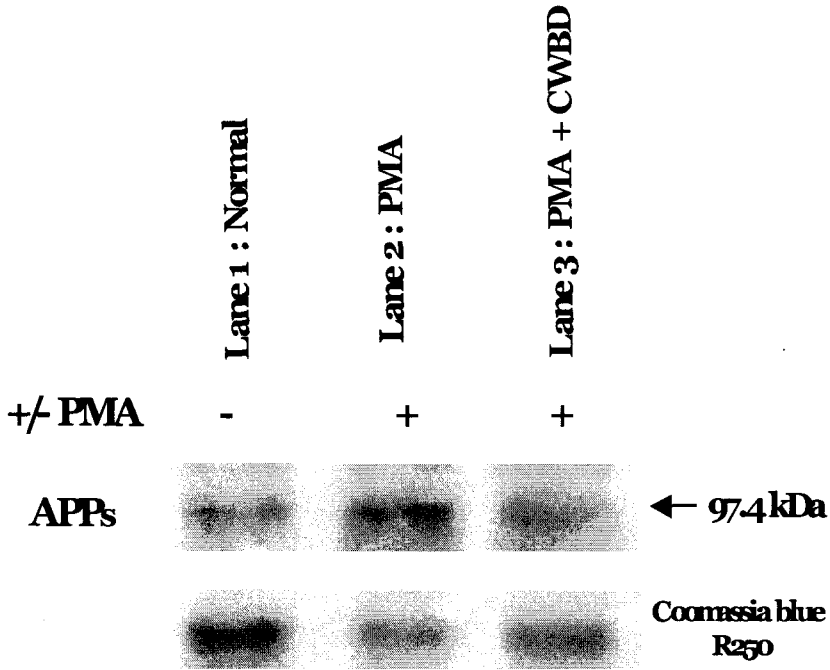
CWBD : Group pretreated with various concentration(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of CWBD extract for 24hrs.

\* : Statistically significant value compared with scopolamine control group data by T test  
(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

PC-12 cells were pretreated with various concentration of CWBD extract in the presence or absence of rIL-1  $\beta$  (100ng/ml) and PMA (100ng/ml) for 24hrs. The lysate were measured using AChE diagnostic kits (Sigma). Other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

### 3) APP 發顯

APP는 正常群에 비해 PMA만을 投與한 對照 群에서 顯著하게 發顯되었으나, PMA와 CWBD 를 함께 處理한 實驗群에서는 減少되었음을 볼 수 있다(Fig. 4).



**Fig. 4.** CWBD inhibits expression of APP secretion in PC-12 cell.  
 Lane 1 : non-treatment  
 Lane 2 : PMA(100ng/ml)  
 Lane 3 : PMA(100ng/ml) + CWBD (100μg/ml)

PC-12 cells were pretreated without or with CWBD (100μg/ml) extract in the presence or absence of PMA (100ng/ml). APP expression was measured by immune Western blot assay. The increase in immunoreactivity of the APP-specific antibody in the presence of PMA was inhibited by CWBD and internal control Coomassia blue R250 staining.

4) PS-1, PS-2 發顯

PS-1과 PS-2는 正常群에 비해 PMA만을 投與한 對照群에서 顯著하게 發顯되었으나, PMA와

天王補心丹 投與群에서는 發顯이 減少하는되었음을 볼 수 있다(Fig. 5).

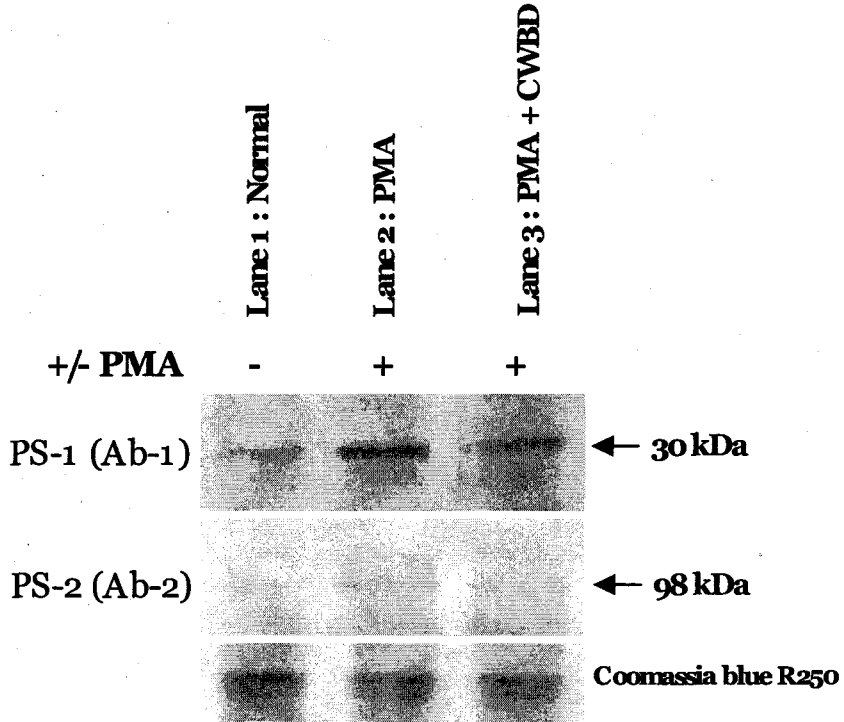


Fig. 5. CWBD inhibits expression of PS-1(Ab-1) and PS-2(Ab-2) secretion in PC-12 cell.

Lane 1 : non-treatment

Lane 2 : PMA(100ng/ml)

Lane 3 : PMA(100ng/ml) + CWBD (100µg/ml)

Representive Western blot of PS-1 and PS-2 secretion released in 12hrs. The increase in immunoreactivity of the PS-1-specific antibody in the presence of PMA was inhibited by CWBD and internal control Coomassia blue R250 staining.

3. Scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠 모델의 血液에 대한 영향

1) WBC, RBC, PLT에 미치는 영향

WBC는 正常群이  $11.8 \pm 0.6 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $11.0 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 CWBD 實驗群은 각각  $11.6 \pm 0.5 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ ,  $10.2 \pm 0.8 (\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 有意性있게 變化되지 않았다. RBC는 正常群이  $8.2 \pm 0.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $8.8 \pm 0.4 (\times$

$10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 CWBD 實驗群은 각각  $8.2 \pm 0.2 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ ,  $8.5 \pm 0.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 모두 有意性 있게 變化되지 않았다. PLT는 正常群이  $771 \pm 13.0 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $984 \pm 47.8 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群은  $955 \pm 75.9 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 有意性 있는 變化를 보이지 않았으며 CWBD 實驗群은  $785 \pm 32.1 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 有意性있게 變化되었으나 安定性에는 異常이 없었다(Table II).

Table II. Effects of CWBD on the Blood cells of Scopolamine-induced Amnesia Rat.

Group	Normal	Control	Tacrine	CWBD
WBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	$11.8 \pm 0.6^{\text{a)}$	$11.0 \pm 0.5$	$11.6 \pm 0.5$	$10.2 \pm 0.8$
RBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	$8.2 \pm 0.1$	$8.8 \pm 0.4$	$8.2 \pm 0.2$	$8.5 \pm 0.9$
PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	$771 \pm 13.0$	$984 \pm 47.8$	$955 \pm 75.9$	$785 \pm 32^{**}$

<sup>a)</sup> : Mean  $\pm$  Standard error (N=5).

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*).

Tacrine : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*) and tacrine (10mg/kg *p.o.*).

CWBD : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*) and CWBD extract (200mg/kg *p.o.*)

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

SD rats were orally administered of CWBD or Tacrine · HCl and injected scopolamine (1mg/kg) once a day for 7 days. Hematologic change was analyzed as described in *Material and Methods*.

2) Glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 영향

Glucose는 正常群이 110.5±7.9(mg/dl), 對照群이 100.5±8.6(mg/dl)으로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 天王補心丹 投與群은 각각 138.7±6.2(mg/dl), 152.5±7.2(mg/dl)로 나타나 모두 有意性있게 上昇되었다.

Uric acid는 正常群이 1.67±0.22(mg/dl), 대조군이 2.29±0.13(mg/dl)으로 나타났고 tacrine을

投與한 陽性對照群은 1.31±0.09(mg/dl)로 有意性있게 減少되었고 天王補心丹 投與群은 2.01±0.11(mg/dl)로 역시 有意性있게 減少되었다.

AChE activity는 正常群이 16.4±1.3(U/ml), 對照群이 35.3±1.5(U/ml)로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 天王補心丹 投與群은 각각 21.2±0.7(U/ml), 27.7±2.8(U/ml)로 나타나 모두 有意性있게 減少되었다(Table III).

Table III. Effects of CWBD on the Serum Level of Scopolamine-induced Amnesia Rat.

Group	Normal	Control	Tacrine	CWBD
Glucose (mg/dl)	110.5±7.9 <sup>a)</sup>	100.5±8.6	138.7±6.2**	152.5±7.2***
Uric acid (mg/dl)	1.67±0.22	2.29±0.13	1.31±0.09***	2.01±0.11
AChE (U/ml)	16.4±1.3	35.3±1.5	21.2±0.7***	27.7±2.8*

<sup>a)</sup> : Mean ± Standard error(N=5).

Normal : Non-treatment group.

Control : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*).

Tacrine : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*) and tacrine (10mg/kg *p.o.*).

CWBD : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CWBD extract (200mg/kg *p.o.*)

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

SD rats were orally administered of CWBD or Tacrine · HCl and injected scopolamine (1mg/kg) once a day for 7 days. Hematology change was analyzed for serum level as described in *Material and Methods*.

4. Scopolamine投與로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모델의 Morris water maze 實驗을 통한 記憶力減退 抑制 效果

ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 時間은 正常群이 11.2±3.4(sec), 對照群이 80.6±3.9(sec)로 나타났고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 15.2±4.0(sec), 天王補心丹 投與群은 16.9±2.0(sec)로 모두 有意性있게 減少되었다. 적은 運動量(small movement ; smlldist)은 正常群

이 182±25.2(cm), 對照群이 1540±187(cm)로 나타났고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 243±42.4(cm), 天王補心丹 投與群은 308±35.9(cm)로 有意性있게 減少되었으며, 많은 運動量(large movement ; lardist)은 正常群이 71±22.7(cm), 對照群이 751±79.2(cm)로 나타났고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 117±42.1(cm), 天王補心丹 投與群은 70±14.3(cm)으로 有意性있게 減少되었다(Table IV).

**Table IV.** Effects of CWBD on the Scopolamine-induced Impairment of Memory in the Morris Water Maze Test

Result captions	Normal	Control	Tacrine	CWBD
Step-through latency(sec)	11.2±3.4 <sup>a)</sup>	80.6±3.9	15.2±4.0***	16.9±2.0***
Smdist(cm)	182±25.2	1540±187	243±42.4***	308±35.9***
Lardist(cm)	71±22.7	751±79.2	117±42.1***	70±14.3***

<sup>a)</sup> : Mean ± Standard error (N=20).

Normal : Pretreated group.

Control : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*).

Tacrine : Group treated with scopolamine (1mg/kg *i.p.*) and tacrine (10mg/kg *p.o.*).

CWBD : Group treated with scopolamine(1mg/kg *i.p.*) and CWBD extract(200mg/kg *p.o.*)

Step-through latency : each time the animal moves from entry to platform.

Lardist : the total distance covered by the animal in large movement.

Smlldist : the total distance covered by the animal in small movement.

\* : Statistically significant value compared with control data by T test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

ICR mice were orally administered of CWBD or Tacrine · HCl and the acquisition training trial was continued once a day for 14 days. The videotracking was initiated at 30 min after the injection of scopolamine (1mg/kg) and the retention trial was carried out.

#### IV. 考 察

生活水準의 向上과 醫學의 發達로 人間의 壽命이 延長됨에 따라 각종 老人性 疾患이 醫學的 社會的 經濟的으로 크게 問題시되고 있다. 가장 두드러지는 疾患중의 하나가 老人性 痴呆이다<sup>23)</sup>.

痴呆는 어떤 疾患에 의해 나타나는 일종의 症候群로서, 大腦半球 특히 大腦 皮質 및 海馬를 侵犯하는 未滿性 疾患에 의해 나타나는 知能, 行動 및 性格 등의 漸進的 荒廢化를 意味한다<sup>24)</sup>. 대개 慢性的으로 進行하여 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등을 包含하는 高度의 大腦機能의 障礙를 나타낸다<sup>9,10)</sup>.

痴呆를 일으키는 各種 疾患은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 血管性痴呆(vascular dementia), 神經退行性 痴呆, 感染性 痴呆, 營養性 痴呆, 慢性 炎症性 痴呆, 代謝性 痴呆, 正常腦壓 水頭證, 外傷, 腦腫瘍 등이 있으나, 發生頻度は AD와 腦血管 疾患의 境遇가 80%정도이고 나머지가 10%를 차지한다. 그리고, 家族內에 遺傳的 要因을 보이는 境遇도 종종 觀察된다<sup>24)</sup>.

痴呆는 韓醫學的으로 “痴呆<sup>6)</sup>”, “呆病<sup>7,8)</sup>”, “健忘<sup>3-5)</sup>” 등의 範疇에 속하며, 痴呆에 대한 最初의 韓醫學的 記載은 明代 張<sup>8)</sup>의 《景岳全書·癡狂痴呆》중에 “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.....”이다.

痴呆의 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠<sup>6,8)</sup> 등이며, 原因은 주로 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다. 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다.

天王補心丹은 終南의 宣律師가 課誦으로 勞心病에 걸려 꿈에 天王이 이 처방을 주었다고 해서 이름이 지어졌는데, 生乾地黃(酒洗), 黃蓮(酒炒), 石菖蒲, 人蔘, 當歸(酒洗), 五味子, 天門冬, 麥門冬, 柏子仁, 酸棗仁(炒), 玄蔘, 白茯苓, 遠志, 丹蔘, 桔梗으로 構成되어 있고, 思慮過度 心血不足 怔忡 健忘 心口多汗 大便 或秘 或瀉 口舌生瘡 등 心虛

를 治療하는 데 活用하는 처방이다<sup>22)</sup>.

天王補心丹 構成藥物들의 效能을 살펴보면 다음과 같다<sup>2,25)</sup>.

心 肝膽에 入하여 涼血瀉火하는 生地黃으로 君을 삼아서 아래쪽 足少陰의 水를 滋養함으로써 火를 制防하도록 하고, 入心하여 養心 潤腎하는 滋潤之品인 柏子仁을 使用하여 氣를 清하도록 하고, 心 肝膽 脾에 대해 斂液固虛之品인 酸棗仁을 사용하여 血을 補하도록 하며, 入心肺하여 補益 元氣하는 人蔘과 入肺腎脾胃하여 補利兼優之品인 茯苓의 甘味로써 心氣를 補益하고, 肺腎에 入하여 收斂滋潤하는 五味子の 酸味로서 心氣를 收斂하며, 肺腎에 入하여 除虛熱하고 潤燥痰하는 天門冬은 苦하여 心에 入하고 寒하여 火를 瀉하면서, 心肺謂에 入하여 清潤하는 麥門冬과 같이 滋水潤燥하는 劑가 되어 氣分의 火를 清하고, 心肝脾에 入하여 養血潤燥 收斂滋潤하는 當歸의 甘味로서 心血을 補하며, 心肝腎에 入하여 祛瘀生新하는 丹蔘의 寒함으로서 心中의 陰血을 生成하게 하고, 入腎하여 壯水制火하는 玄蔘의 鹹味로 血中の 火를 清하게 하고, 心腎에 入하여 洩熱挿邪 安神益志하는 遠志와 酸棗仁과 柏子仁은 心神을 培養하는 바 酸棗仁 五味子는 酸味로 이를 收斂하고, 또 心氣의 耗散을 收斂한다. 入肺心謂하여 開發和解하는 桔梗은 清肺利隔하니 載藥上浮하여 心으로 歸함을 取하는 故로 使로 삼는다. 이에 天王補心丹은 心으로 入하여 神을 安하므로 火는 清해지고 血을 足하여져 補心함으로서 神明이 充暢하여 모든 症勢가 스스로 除去되는 것이라 하였다.

AD는 原因不明의 腦의 全般的 萎縮과 特有的 組織學的 所見, 즉 노인반, Alzheimer형 원섬유변화 및 신경세포의 과립공포변성 등과 함께 知能의 低下를 特徵으로 하며<sup>10)</sup>, 症狀으로는 記憶力의 損失, 抽象的 思考障礙, 判斷 및 衝動自制障礙 또는 人格의 變化가 나타나며, 半身不遂, 語鈍, 步行障礙, 頭痛 등의 症狀도 나타난다<sup>10)</sup>. AD의 代表的인 症狀 중의 하나는 記憶力 障礙인데<sup>63)</sup>, 記憶이란 개체가 精神 活動에 필요한 情報를 받아들여 腦 속에 貯藏하였다가 필요한 때에 意識 世界로 꺼내어 使用하는 能力을 말하는 것이다. 一



般的으로 痴呆에서 보이는 記憶力 障礙는 正常的인 老化過程에 따른 健忘症과는 區分이 되는데 예를 들어, 健忘症에서는 일단 記憶해야 할 內容이 貯藏은 되어 있으나 필요할 때 適材適所에서 꺼내 쓰지를 못하는데 반해, 痴呆의 記憶障礙에서는 記憶해야 할 內容이 머리에 입력되지 않아서, 일반 健忘症의 境遇는 잊고 있는 內容을 다른 사람이 말해 주면 想起를 해내는 반면 痴呆患者의 境遇 內容을 다른 사람이 이야기해 주어도 전혀 모르고 있는 수가 많고 때로는 전혀 엉뚱한 내용으로 잘못 기억하고 있는 수도 있다. 즉, 여기에서는 腦의 老化過程 중 發生하는 生理的인 老化 現狀으로서의 健忘症이 아니라, 病理的 老化現狀인 痴呆에서 오는 健忘症을 말한다. 이는 주로, 腦質量的 減少, 腦神經細胞數의 減少, 神經細胞內的 沈着物 生成, 血管의 老化 등의 形態學的 變化를 나타낸다<sup>13)</sup>.

AD는 여러가지 誘發因子와 關與하는데, amyloid  $\beta$  protein 蛋白質(A $\beta$ ), 에스트로젠(estrogen), 아포리포단백질 E(apolipoprotein E ; apoE), 프리시닐린(presenilin), 酸化劑(oxidants; hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 炎症, 사고에 의한 損傷, 神經傳達物質(neurotransmitter), 神經營養因子(neurotrophic factors) 등이 알려져 있다<sup>27)</sup>. 이 중 amyloid  $\beta$  protein 蛋白質(A $\beta$ )의 沈積(deposition)으로 생기는 SPs의 神經毒性(neurotoxic)으로 神經細胞의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우 蛋白質(hyperphosphorylation tau protein)의 沈積에 의한 NFTs의 作用으로 神經退行(neurodegeneration)이 생기는 것이 대표적이다<sup>12,13)</sup>.

Amyloid cascade hypothesis에 따르면 A $\beta$ 의 蓄積은 AD의 誘發의 central event이다. 이것은 brain에 Amyloid의 蓄積은 cascade에서 始作되어 결국 痴呆의 症狀이 나타나게 된다. Alzheimer's disease에 나타나는 病理學的 所見인 神經섬유다발(Neurofibrillary tangles; NFTs)과 神經반(neuritic plaque)은 amyloid  $\beta$  protein의 沈積에 의하여 생겨나는데, amyloid  $\beta$  protein 蛋白質(A $\beta$ )은 APP의 非正常的인 工程過程으로 생성된다<sup>19)</sup>.

APP는 21번 chromosome의 single gene에 연결되어 있으며<sup>28)</sup> 이 21번 染色體가 3개인 다운증후군 患者도 早期痴呆 現狀을 나타내며 30代와 40代에 이르러 알츠하이머병 患者의 腦에서 發見되는 똑같은 神經섬유다발(Neurofibrillary tangles ; NFTs)와 神經반이 생긴다. 이러한 病變은 遺傳子 數가 增加한 效果에 의한 APP의 過度生成 때문에 일어난다고 推測되고 있다<sup>13)</sup>. 알츠하이머병 患者의 基底 前腦(basal forebrain)와 해마에서 APP의 遺傳子 發顯이 增加되어 있다는 報告와, 老化된 纖維兒細胞에서 APP 遺傳子 發顯이 增加되어 있다는 報告와 amyloid  $\beta$  protein를 직접 腦에 注射하면 注射部位의 神經細胞가 죽는다는 報告로 볼 때 APP가 老化過程, 특히 痴呆形成過程에 直接的인 關聯을 가지고 있을 것으로 推論되고 있다<sup>29)</sup>.

最近에 presenilin 1(PS1)과 presenilin 2(PS2)는 각각 14번과 1번 染色體에 存在하며, 이 遺傳子の 多樣한 突然變異가 早發性, 家族性 알츠하이머병의 70% 以上の 原因이 되는 것으로 報告되었다<sup>30)</sup>. 이들은 서로 아미노산의 67%가 同一하며 7개 前後의 transmembrane domain을 가지고 있는 45-50 KD의 蛋白質로 生覺되고 있다.

以上과 같은 事實에서 볼 때 이 遺傳子들의 突然變異를 가지고 있는 家族性 AD 患者에서도 APP가 PS-1이나 PS-2에 의해  $\beta$ -secretase가 많이 포함되어 있는 細胞內 分割으로 더 많이 移動하여 結局 APP의 處理에 影響을 끼쳐 amyloid  $\beta$  protein가 過量 만들어짐으로써 神經毒性을 나타내고 그에 따라 認知機能 缺損이 同伴되는 것으로 生覺되고 있다<sup>31,32)</sup>. 결국 APP, PS 1, PS 2의 돌연변이는 모두 A $\beta$ 의 量을 增加시키며 이것이 神經細胞 死滅의 主要原因이라고 생각되고 있다. 最近에는 APP와 presenilin 蛋白質이 서로 結合한다는 事實이 立證됨으로서 이 事實을 더욱 더 뒷받침해주고 있다<sup>33)</sup>.

한편, 아세틸콜린(acetylcholine), 도파민(dopamine), 세로토닌(serotonin), GABA의 境遇에는 老化에 따라 減少하는 것으로 알려져 있는데, AD의 1차 症狀인 記憶力 減退現狀은 콜린성 神經系와 密接한 關係가 있다는 證據가 多樣하게 提示되고 있

다<sup>34)</sup>. AD 患者에게서 나타나는 記憶力 喪失과 다른 認識 缺陷이 信號를 傳達해 주는 化學 物質인 아세틸콜린을 만들어 내는 神經 細胞의 退化 때문이라고 說明할 수 있는데, 이 不足 現狀은 아세틸콜린을 分解하는 아세틸콜린에스터라제보다 더욱 深化된다<sup>35)</sup>.

비록 原因인 治療方法은 아니더라도 記憶力과 密接한 關聯이 있는 것으로 알려진 減退된 콜린성 神經系를 補充해주고 改善해 줄 수 있는 開發된 藥物 들에는 아세틸콜린 분해억제제(acetylcholinesterase inhibitor)로 FDA의 承認을 받아 國內에서도 市販 使用중인 tacrine(tacrine)와 最近에 承認된 E2020(aricept)등이 있으며 이런 藥物들은 아세틸 콜린이라고 하는 神經傳達物質의 分해를 막아주어 減退된 認知機能을 改善시켜주는 效果를 가지고 있다<sup>25,36)</sup>.

最近의 韓醫學영역에서의 痴呆研究를 살펴보면 老化和 連繫하여 老化를 誘發하는 抗酸化作用에 對한 研究<sup>5,14)</sup>가 이루어지고 있으며 또한 AD의 또 다른 原因인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 遺傳子의 過多 發顯에 對한 研究<sup>15,37)</sup>가 이루어졌고 補陽還五湯의 記憶과 行動에 關聯된 研究<sup>16)</sup>가 本 敎室에서 이루어졌으나 天王補心丹이 痴呆 모델의 生化學的 變化에 關聯된 研究는 接하지 못 하였다.

따라서, 天王補心丹이 心虛로 인해 健忘症을 誘發하는 痴呆에 治療效果가 있으리라 思料되어 天王補心丹이 痴呆에 미치는 變化에 대하여 實驗 하였다.

이에 著者는 天王補心丹이 痴呆에서 나타나는 毒性變化和 行動變化에 미치는 影響을 糾明하기 위하여, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell에 대한 天王補心丹의 細胞毒性을 측정하였고, PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯과, PC-12 cell의 세포성 단백질에서 AChE의 活性度, APP, PS-1, 2의 發顯을 測定 및 觀察하였고, scopolamine을 腹腔處理한 후 血清 중 acetylcholinesterase의 活性 및 glucose, uric acid를 測定하였으며, 또한 Videotrack (animal and human being behaviour analysis system)을 통해 行動의 變化를 觀察, 測定하여 天王補心丹의 AD에 대한 豫防 및 治療劑

로서의 價値를 評價하고자 하였다.

먼저, 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell을 分離하여 天王補心丹의 細胞毒性(cytotoxicity)을 測定한 결과, mLFC에서는 100, 50, 10, 1 $\mu$ g/ml의 天王補心丹 投與群이 有意性 있는 變化가 없었고, 400, 200 $\mu$ g/ml의 天王補心丹 投與群이 有意性있게 減少되었고, PC-12 cell에서는 50, 10, 1 $\mu$ g/ml의 天王補心丹 投與群이 有意性 있는 變化가 없었고, 400, 200, 100 $\mu$ g/ml의 天王補心丹 投與群이 有意性있게 減少되어 400, 200 $\mu$ g/ml의 天王補心丹은 細胞毒性이 있어 實驗에 使用하지 않고 100 $\mu$ g/ml 이하로 實驗하였다(Table I).

다음은 PC-12 cell에 대해 AChE와 NOsII mRNA의 발현을 測定하였고, Western blot으로 분석하였다. 早期 AD 證候를 보이는 患者의 대부분 原因으로 PS-1과 PS-2의 突然變異를 들고 있고, PS-1은 腦의 記憶과 關聯되어 있는 重要한 神經蛋白質로 PS-1(30kDa, chromosome-14)과 PS-2(98kDa, chromosome-1)에 位置하는 것으로 알려져 있다. PC-12 cell은 PS-1 遺傳子가 突然變異로 過剩發顯(overexpression)되어 AD 研究에 좋은 세포주로 알려져 있다. AChE mRNA의 發顯에 있어서 正常群은 25(Ht)로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 만을 處理한 對照群은 58(Ht)로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 $\mu$ g/ml의 天王補心丹과 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 를 함께 處理한 實驗群은 각각 23, 56으로 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 를 處理한 對照群에 비해 AChE의 發顯이 抑制되었으(Fig. 1), NOsII mRNA의 發顯에 있어서도 正常群은 56(Ht)으로 나타났고 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 만을 處理한 對照群은 170(Ht)으로 나타났는데 반해, 각각 100, 10 $\mu$ g/ml의 天王補心丹과 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 를 함께 處理한 實驗群은 각각 80(Ht), 114(Ht)로 100ng/ml의 PMA와 r IL-1 $\beta$ 를 處理한 對照群에 비해 NOsII의 發顯을 抑制되었음을 볼 수 있다(Fig. 2)

그리고, PC-12 cell에서 AChE activity와 PS-1, PS-2와 APP의 過剩發顯을 觀察하였고, 天王補心丹을 處理하여 發顯을 抑制하는 效果를 Western blot으로 確認하였다. PC-12 cell의

AChE activity는 正常群의 경우  $43 \pm 3.3(\%)$ 이었고 對照群은  $100 \pm 4.6(\%)$ 으로 나타났는데,  $100, 10\mu\text{g/ml}$ 의 天王補心丹 投與群은  $56 \pm 3.4(\%)$ ,  $85 \pm 4.0(\%)$ 로 나타나 有意性있게 減少되었으며, APP 發顯 抑制 效果는 正常群에 비해 PMA만을 投與한 對照群에서 顯著하게 發顯되었으나, PMA와 天王補心丹을 함께 處理한 實驗群에서는 減少되었음을 볼 수 있었고, PS-1, PS-2 發顯 抑制 效果는 正常群에 비해 PMA만을 投與한 對照群에서 顯著하게 發顯되었으나, PMA와 天王補心丹 投與群에서는 發顯이 減少되었음을 볼 수 있었다 (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5).

이번에는 scopolamine投與로 誘導된 健忘症 白鼠의 혈청중 WBC RBC PLT를 분석하였다. WBC는 正常群이  $11.8 \pm 0.6(\times 10^6/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $11.0 \pm 0.5(\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 투여한 陽性對照群과 CWBD 實驗群은 각각  $11.6 \pm 0.5(\times 10^6/\text{mm}^3)$ ,  $10.2 \pm 0.8(\times 10^6/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 有意性 있는 變化를 보이지 않았고, RBC는 正常群이  $8.2 \pm 0.1(\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $8.8 \pm 0.4(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 양성대조군과 CWBD 실험군은 각각  $8.2 \pm 0.2(\times 10^3/\text{mm}^3)$ ,  $8.5 \pm 0.9(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 모두 有意性있게 變化되지 않았다. PLT는 正常群이  $771 \pm 13.0(\times 10^3/\text{mm}^3)$ , 對照群이  $984 \pm 47.8(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群은  $955 \pm 75.9(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비해 有意性있게 變化되지 않았으며 CWBD 實驗群은  $785 \pm 32.1(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 有意性 있는 變化를 보였으나 白鼠의 血液成分이 scopolamine에 의한 acetylcholinesterase와의 相關關係가 없는 것으로 思料된다(Table II).

그리고, scopolamine投與로 誘導된 健忘症 白鼠 血清內 glucose, uric acid, AChE의 變化와, 血清內 glucose, uric acid의 量과 AChE activity를 測定하였다. AD 患者에서 glucose의 增加는 記憶力を 增進시키는 蛋白質로 알려져 있으며 scopolamine을 注射한 흰쥐에서 uric acid의 數值가 增加되었다는 報告가 있고, scopolamine을 白鼠에 注射하면 acetylcholinesterase가 增加하여 acetylcholine의 量이 急激히 減少하여 記憶과 認識의 障得를 誘發하게 되므로 scopolamine으로

誘導된 記憶力 減退 白鼠 血清內 glucose, uric acid, AChE activity에 미치는 效果를 分析하였다. Glucose는 正常群이  $110.5 \pm 7.9(\text{mg/dl})$ , 對照群이  $100.5 \pm 8.6(\text{mg/dl})$ 으로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 天王補心丹 投與群은 각각  $138.7 \pm 6.2(\text{mg/dl})$ ,  $152.5 \pm 7.2(\text{mg/dl})$ 로 나타나 모두 有意性있게 上昇되었고, Uric acid는 正常群이  $1.67 \pm 0.22(\text{mg/dl})$ , 對照群이  $2.29 \pm 0.13(\text{mg/dl})$ 으로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群은  $1.31 \pm 0.09(\text{mg/dl})$ 로 有意性있게 감소되었고 天王補心丹 投與群은  $2.01 \pm 0.11(\text{mg/dl})$ 로 有意性있게 減少되지 않았다. AChE activity는 正常群이  $16.4 \pm 1.3(\text{U/dl})$ , 對照群이  $35.3 \pm 1.5(\text{U/dl})$ 로 나타났고 tacrine을 投與한 陽性對照群과 天王補心丹 投與群은 각각  $21.2 \pm 0.7(\text{U/dl})$ ,  $27.7 \pm 2.8(\text{U/dl})$ 로 나타나 有意性있게 減少되어 血清內 glucose, AChE activity에 미치는 效果가 있음을 觀察할 수 있었다(Table III).

끝으로 scopolamine으로 誘導된 acetylcholine 缺乏(健忘症) 생쥐에서 acetylcholinesterase 抑制에 對한 天王補心丹의 效果는 Morris water maze를 이용하였다.

Morris water maze課題는 動物의 空間學習과 記憶를 檢査하기 위해 使用되며, 空間情報 以外の 端緒들을 統制하기 쉬운 長點이 있다. 이는 주로 長期記憶能力을 測定하는 課題로서 動物이 周邊에 있는 端緒들을 使用하여 記憶하는 能力 즉 空間準據記憶을 測定하는 것이다. 이는 人間의 境遇 外部에서 일어나는 事實들에 대한 情報를 習得하여 記憶하고, 그 事實들의 時 空間의 位置를 根據로 行動하는 能力에 該當한다<sup>35)</sup>.

이 課題에서 動物들은 물로 채워진 커다란 수조내에 숨겨진 逃避臺를 찾는 것을 學習한다. 動物들은 어떤 近接端緒도 利用할 수 없고, 냄새를 追跡端緒로 使用하는 것도 不可能하다. 따라서 檢査環境에서 利用할 수 있는 端緒들의 配列內에서 自身의 位置를 學習하여 숨겨진 逃避臺를 찾아야 한다. 水中迷路 內의 逃避臺가 施行에 無關하게 一定한 位置에 設定되었으므로 이 課題의 解決에는 空間準據記憶이 必要하다<sup>36)</sup>. ICR계 생쥐모델이 pool에서 platform으로 올라가는 時間은

正常群이 11.2±3.4, 對照群이 80.6±3.9로 나타났고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 15.2±4.0, 天王補心丹 投與群은 16.9±2.0로 모두 有意性있게 減少되어, scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果를 나타내었다(Table IV).

訓練 學習된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 運動量을 threshold로 指定하여 적은 運動量(small movement ; smldist)과 많은 運動量(large movement ; lardist)을 分析한 結果를 보면 smldist는 正常群이 182±25.2인 데 반해 scopolamine을 腹腔에 處理한 訓練 學習된 생쥐의 對照群이 1540±187로 顯著하게 運動量이 增加되었고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 243±42.4, 天王補心丹 投與群은 308±35.9로 有意性있게 減少되어 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量이 減少되었으며, lardist도 正常群이 71±22.7, 對照群이 751±79.2로 顯著하게 運動量이 增加되었고, Tacrine을 投與한 陽性對照群은 117±42.1, 天王補心丹 投與群은 70±14.3으로 有意性있게 減少되어 scopolamine에 對한 記憶力 減退 抑制效果와 마찬가지로 運動量이 減少되었다(Table IV).

以上の 實驗結果를 總括 考察한 結果, 天王補心丹이 PC-12 cell에서 AChE, NOsII mRNA의 發顯을 抑制시킴을 RT-PCR을 통하여 確認하였고, APP, PS-1, PS-2의 發顯 抑制 效果를 Western blot을 통하여 確認하였다. 또한 scopolamine投與로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모형을 Morris water maze 實驗으로 分析하여 經口 投與한 天王補心丹이 顯著한 記憶力減退 抑制 效果가 있음을 確認하였다.

이는, 天王補心丹이 항콜린성 藥物로 作用할 수 있음을 말해주는 것으로 scopolamine을 投與한 생쥐의 血清蛋白質을 分析한 結果 scopolamine만 投與한 正常群에 比하여 天王補心丹 投與群에서 glucose의 有意性있는 增加와, AChE 活性度の 有意性있는 減少를 觀察하여 上記의 實驗結果를 證明할 수 있었다.

이러한 實驗結果는 天王補心丹이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 過剩發顯 抑制能力을 보이

는 것으로 AD 治療의 豫防과 治療에 活用될 수 있을 것으로 보이나, scopolamine을 投與한 흰쥐에서 血清蛋白質을 分析한 結果 uric acid의 減少에 있어서 有意性 있는 結果가 나타나지 않은 점 등, 앞으로 더욱 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

天王補心丹의 效果를 檢證하고자, PC-12 cell에서 AChE, NOsII의 遺傳子 發顯 및 AChE의 活性, APP, PS-1, PS-2의 發顯을 觀察하였고, scopolamine을 주사한 白鼠에서 AChE의 活性 및 glucose, uric acid를 測定하였고, Videotrack을 통해 行動의 變化를 觀察한 結果 다음과 같은 有意性있는 結論을 얻었다.

1. 天王補心丹이 PC-12 cell에 AChE, NOsII mRNA의 發顯을 抑制하였다.
2. 天王補心丹이 PC-12 cell에 AChE의 活性을 抑制하였다.
3. 天王補心丹이 PC-12 cell에 APP와 PS-1 PS-2 發顯을 抑制하였다.
4. 天王補心丹은 scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 白鼠의 혈청을 분석한 結果가 有意性 있는 glucose의 增加, uric acid의 減少, AChE 活性의 減少를 보여주었다.
5. 天王補心丹은 scopolamine으로 誘導된 記憶力 減退 생쥐모형에서 유의성있는 記憶力 改善 效果를 보여 주었다.

以上の 結果는 天王補心丹이 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 過剩發顯 抑制能力을 보이는 것으로 AD 治療의 豫防과 治療에 活用될 수 있을 것으로 보이나, scopolamine을 投與한 흰쥐에서 血清蛋白質을 分析한 結果 uric acid의 減少

에 있어서 有意性 있는 結果가 나타나지 않은 점 등, 앞으로 더욱 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. 李載熙. 圖說韓方診療要方. 서울:醫學研究士. 1993:660.
2. 汪昂. 國譯醫方集解. 서울:大成出版社. 1997: 61-62.
3. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:68-70. 79-96. 134-137. 174-175. 217-218. 229. 241-243.
4. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982 :129-135. 534. 545. 550.
5. 趙 佶. 聖濟總錄 43卷. 北京:人民衛生出版社. 1987:822-825.
6. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978: 610-611.
7. 陳士擇. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
8. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990 :222-225. 233-235.
9. 黃義完 외. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:256-271. 327-330.
10. 이근후 외. 최신태상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138. 216-228.
11. Ehlers MR · Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts ; role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. Biochemistry. 30(42). 1991:10065-10074.
12. Baddeley AD · Bressi S · Della Sala S · Logie R and Soinnler H. THE decline of working mememory in Alzheimer's disease. Brain 114. 1991:2521-2542.
13. Borchelt DR · Thinakaren G · Eckman CB · Lee MK · Davenport F · Ratovitsky T · Prada C-M · Kim G · Seekins S · Yager D · Slunt HH · Wang R · Younkin SG · Sisodia SS. Familial Alzheimer's diease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron 17. 1996:1005-1013.
14. Anderson JP · Esch FS · Keim PS · Sambamurti K · Lieberburg I · Robakis NK. Exact

- cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 128. 1991:126-128.
15. Asley S · Fone KC. Galanin fails to alter both acquisition of a two trial per day water maze task and neurochemical markers of cholinergic or serotonergic neurones in adult rats. *Brain Res.* 622(1-2). 1993:330-336.
16. Clark AS · Mitre MC · Brinck-Johnsen T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res.* 679(1). 1995:64-71.
17. Beatty WW · Schavalia DA. Rat Spatial memory ; Resistance to retroactive interference at long retention intervals. *Animal Learning & Behavior.* 8. 1980:550-552.
18. Beatty WW · Schavalia DA. Spatial memory in Rats ; Time course of walking memory and effect of anesthetics. *Behavioral and Neural Biology.* 28. 1980:454-462.
19. Fukuyama R · Chandrasekaran K · Rapoport SI. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation is accompanied by differential induction and localization of the amyloid precursor protein (APP) in PC12 cells and variant PC12S cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 17(1-2). 993:17-22.
20. 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). 1990:1107-1112.
21. Zor T · Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity ; theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 236(2). 996: 302-308.
22. Daniel WW. *Biostatistics ; a foundation for analysis in the health science.* 1983:136-146.
23. 나덕렬. 치매의 접근 방법. 서울:가정의학회지 18(3). 1997:236-248.
24. 이광우. 임상 신경학. 서울:고려의학. 1996: 199. 200-201.
25. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社. 50, 94, 100, 107, 120, 122, 123, 171, 174, 278, 325, 343, 415, 419, 510.
26. 박종한. 노인의 기능 상태 평가. 서울:신경정신의학 34(3). 1995:636-641.
27. Da Cruz e Silva OA · Iverfeldt K · Oltersdorf T · Sinha S · Lieberburg I · Ramabhadran TV · Suzuki T · Sisodia SS · Gandy S · Greengard P. Regulated cleavage of Alzheimer beta-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience.* 57(4). 1993:873-877.
28. Wolf BA · Wertkin AM · Jolly YC · Yasuda RP · Wolfe BB · Konrad RJ · Manning D · Ravi S · Williamson JR · Lee VM. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid beta-protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem.* 270(9). 1995: 4916-4922.
29. Breakefield XO · Geller AI. Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol.* 1(4). 87. :339-371.
30. Kowall NW · Beal MF · Busciglio J · Duffy LK · Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U.S.A..* 88(16). 1991:7247-7251.
31. Yankner BA · Dawes LR · Fisher S · Villa-Komaroff L · Oster-Granite ML · Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.* 245(4916).

1989:417-420.

32. Suh YH. An etiological role of amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 68(5). 1997:1781-1791.
33. Weinstein HC · Scheltens P · Hijdra A · van Royen EA. Neuro-imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease. II ; Positron and single photon emission tomography. *Clin Neurol Neurosurg.* 95(2). 1993:81-91.
34. Pandiella A · Massague J. Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem.* 266(9). 991.:5769-5773.
35. Park CH · Kim SH · Choi W · Lee YJ · Kim JS · Kang SS · Suh YH. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* 62(5). 1996:405-409.
36. 朱豊義. 東洋醫學叢書. 산동:山洞中醫學員. 1990:118-119.
37. 徐敏華. 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1996.
38. 정봉교 외 2인. 흰쥐의 내측중격SRB assay 법칙 손상이 모리스 수중미로과제의 학습에 미치는 효과. 서울:한국심리학회지 5. 1993: 29-44