

# CT105로 유도된 인간신경아세포종 세포주에서 轉呆丹의 항치매 효과

송호상, 박치상, 박창국  
대구한의대 한의과대학 심계내과학교실

## Abstract

### Effect of Anti-Alzheimer's disease by *Jeonmaedan* in CT105-overexpressed SK-N-SH cell lines

Ho-Sang Song, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University

Alzheimer's disease(AD) is a geriatric dementia that is widespread in old age. In the near future AD will be the biggest problem in public health service. Although a variety of oriental prescriptions in study *Jeonmaedan* have been traditionally utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and action mechanisms have not yet fully elucidated.

It has been widely believed that A $\beta$  peptide devided from APP causes apoptotic neurotoxicity in AD brain. However, recent evidence suggests that CT105(carboxy terminal 105 amino acid peptide fragment of APP) may be an important factor causing neurotoxicity in AD. In addition, AD is one of brain degeneration disease. So we studied on herbal medicine that have a relation of brain degeneration. In Oriental Medicine,

---

교신저자 : 박창국

대구시 수성구 상동 165번지 대구한의대 한방병원 2내과교실

전화: 053)770-2104, 011-506-3079

E-mail : stephano@dhu.ac.kr

접수 2003/11/18    수정 : 2003/11/27    채택 : 2003/12/12

*Jeonmaedan* has been used for disease in relation to brain degeneration.

As the result of this study, in *Jeonmaedan* the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of SK-N-SH cell lines by CT105 expression is promoted. So *Jeonmaedan* may be beneficial for the treatment of AD.

**Key Word** : Alzheimer's disease(AD), *Jeonmaedan*, SK-N-SH cell

## I. 緒 論

의학의 발달과 생활환경의 개선으로 인간의 수명이 연장됨에 따라 노인 인구가 차지하는 비율이 점차 높아지는 추세이며, 이에 따라 의학적, 경제적, 사회적으로 문제가 되고 있는 노인성 癡呆는 오늘날 모든 사람의 큰 관심거리로 떠오르고 있어서, 그에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>1-3)</sup>.

癡呆는 여러가지 원인 질환에 의해 야기되는 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해 발생되며, 이로 인해 기억·사고·지남력·이해·계산·학습능력·언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌 피질기능의 장애가 있는 것으로, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 혈관성 癡呆(Vascular dementia, VD), 혼합형 癡呆 등의 유형이 있다<sup>4-6)</sup>. 이 중 AD는 진행성 癡呆로 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(Senile plaque), 신경섬유다발(Neurofibrillary tangles, NFTs) 및 신경세포의 과립공포변성(Granulovascular degeneration) 등을 특징으로 한다<sup>6-9)</sup>. AD의 원인에 대한 가설은 다양하게 제시되고 있는데<sup>10-2)</sup>, 대표적인 원인설로는 신경반구조의 주된 구성성분이며 아밀로이드 전

구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 잘려 나온 amyloid  $\beta$  protein(A $\beta$ )이 뇌에 축적이 되면 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극해 신경세포를 손상시켜 결과적으로 癡呆의 증상을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>13-8)</sup>. 그러나 최근에는 APP의 일부분인 C단 단백질(Carboxy terminal 105 amino acid peptide fragment of APP, CT105)이 A $\beta$ 보다 더 독성이 있다고 알려져 있어서<sup>19-21)</sup>, C단 단백질과 AD에 대한 연구가 활발히 진행중이다<sup>22-4)</sup>.

韓醫學으로 癡呆는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에 속하고, 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, 精神淡薄 등의 증상을 나타내며, 그 원인으로는 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있다<sup>25-30)</sup>.

최근 韓醫學에서도 癡呆, 기억장애 등과 연관된 문헌적 연구<sup>25-7)</sup>, 임상적 연구<sup>31-4)</sup> 뿐만 아니라 癡呆 치료에 대한 많은 연구<sup>35-52)</sup>가 있으며, 鈞鉤藤<sup>53)</sup>, 山楂肉<sup>54)</sup>의  $\beta$  APP 과발현에서의 신경세포사 억제작용에 관한 연구도 있으나 아직 CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서의 抗癡呆 효과에 관한 연구는 미미한 실정이다.

이에 著者는 大補心肝氣血과 祛痰開竅하는 효능이 있어서 腦질환 특히 癡呆에 효과가

있을 것으로 사료되는 《辨證錄·呆病門》<sup>29)</sup>에 수록된 처방인 轉呆丹의 항치매 효과를 규명하기 위하여 신경아세포종 세포주를 pCT105로 처리하여 痴呆와 동일한 신경세포의 세포사 유도에 대한 억제 효과를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

실험동물은 (주)중앙실험동물에서 분양 받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 실온 20±2℃, 습도 40~60%로 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 試料의 調製

본 實驗에 使用한 轉呆丹은 대구한의대학교 부속대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1,000g에 3차 증류수 5ℓ를 첨가하여 85℃에서 12시간 열을 가한후 식혀서 이를 gauze로 1차 여과 후 동결 건조하였다. 동결건조중량 50g을 회수하여 실험전 -80℃에 보관하였다가 실험시 3차 증류수를 이용하여 5mg/ml 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 처방은 《辨證錄·呆病門》에 수록된 것으로 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

#### 3) 試藥

試藥은 Diethyl pyrocarbonate (DEPC),

Table 1. Prescription of *Jeonmaedan*

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
白芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i>	120
人參	<i>Panax ginseng</i>	40
當歸	<i>Angelica gigas</i>	40
半夏	<i>Pinellia ternata</i>	40
酸棗仁	<i>Zizyphus spinosa</i>	40
石菖蒲	<i>Acorus gramineus</i>	40
白茯苓	<i>Poria cocos</i>	40
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i>	32
神麩	<i>Aspergillus oryzae cohn</i>	20
柏子仁	<i>Biota orientalis</i>	20
天花粉	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	12
附子	<i>Aconitum carmichaeli</i>	4
Total amount		448

chloroform, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), formaldehyde, polyacrylamide는 Sigma社(U.S.A.) 제품을, Agarose는 FMC(U.S.A.) 제품을 使用하였다. RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco BRL에서 구입하였으며, ethanol은 Merck에서, Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex kit(ABC kit)는 Vector Lab.에서 구입하였고, 3,3'-diaminobenzidine(DAB)는 Sigma에서 구입하였으며, 2차 항체인 Texas-Red는 Santa Cruze에서 구입하였다.

### 2. 方法

#### 1) pCT105 형질을 조합시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH는 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용

dish에 배양하면서 포유동물세포내에서 CT105 과발현을 유도하는 plasmid인 pCT105를 사용하여 CT105 과발현 세포주를 구축하기 위해 형질이입을 수행하였다.  $10^3$ 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀할 시점에 반응액 A에는 pCT105 2 $\mu$ g와 serum free medium(이하 SFM이라 명명) 100 $\mu$ l을 혼합하고, 반응액 B에는 lipofectin 10 $\mu$ l와 SFM 100 $\mu$ l을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 1.5ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 유지하고 5% FBS를 함유한 RPMI 배지를 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 $\mu$ g/ml로 선별을 2주간 실시하고 단일 클론을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

## 2) CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포사 관찰

정상군(NOR), CT105 과발현 신경아세포종 세포주인 대조군(CT105), 대조군에 轉朶丹을 처리한 군(CT105+*Jeonmaedan*)으로 구분하여  $10^3$ 세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음, 轉朶丹 수 추출물을 25, 50 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. CT105의 신경세포사에 대한 영향과 轉朶丹의 세포사 억제효과를 조사하기 위해 세포사 관찰은 위상차 현미경의 200배율에서 200개정도 세포수를 촬영하여 조사하였으며, 세포사의 억제농도를 조사하기 위해 96-well

plate에  $10^3$ 세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 ELISA(enzyme-linker immunosorbent assay) reader를 이용하여 세포사의 유도양상과 세포사가 억제되는 농도를 조사하였다.

## 3) CT105, 저당 및 저산소조건에 의한 신경세포의 세포사 유도

신경 세포사를 일으키는 요인이 세포사멸에 미치는 영향을 관찰 하기 위해 정상군(NOR), 대조군(CT105), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 轉朶丹을 처리한 군(CT105+*Jeonmaedan*)으로 구분하여  $10^3$ 세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양하였다. 저산소군은 신경세포를 CO<sub>2</sub> 배양기를 이용하여 2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 4hrs 환경하에서 저산소조건을 유도하였으며, 저당군은 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS(Earles Balanced Salt Solution)로 교체하여 2시간 또는 4시간 유지한 후에 25mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 Glucose를 회복시켜준 상태에서 2시간 또는 4시간 유지하여 저당조건을 유도하였다. 轉朶丹 처리군은 가장 강한 세포사 억제효과를 가지는 농도인 50 $\mu$ g/ml에서 본 실험에 사용하여 72시간 배양하였다.

## 4) LDH assay에 의한 신경세포 손상 측정

신경세포의 세포사를 억제하여 생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 정상군(NOR), 대조군(CT), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 轉朶丹을 50 $\mu$ g/ml 농도로 처리한 군(CT105+*Jeonmaedan*)으로 구분하였다. 각각 처리한 세포를 이 들어 있는 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에

penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C에서 12시간 배양하고 그 상층액 20 $\mu$ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/ml)를 20 $\mu$ l씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합 후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 발색 試藥(color reagent, Sigma 505-2)을 20 $\mu$ l씩 가한 후 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 $\mu$ l씩 가하고 ELISA reader로 흡광도(A<sub>570</sub>/A<sub>630</sub>)를 측정하였다.

#### 5) DNA fragmentation 분석

세포사의 일차적인 특징으로 나타나는 세포핵의 변화를 관찰하기 위하여 CT105 과발현 신경아세포종 세포주를 10<sup>3</sup>세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 轉呆丹 수추출물을 50 $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. DNA fragmentation이 유도되는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 $\mu$ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 $\mu$ g/ml)를 첨가하고 50°C에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음 이에 phenol/chloroform 동량을 넣고 잘 혼합한 후 15,000rpm에서 15분간 원심분리한다. 상층액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase(50 $\mu$ g/ml)가 함유한 dH<sub>2</sub>O 35 $\mu$ l를 첨가하여 녹인 후 이 용액을 1.5% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

#### 6) 신경돌기의 분석

CT105 과발현 신경아세포종 세포주를 laminin coated 되어 있는 6-well plate에

10<sup>3</sup>세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 후 NGF(Nerve Growth Factor)를 50ng/ml의 농도로 첨가하고 5시간동안 자극을 가한 다음 정상군(NOR), 대조군(CT105), 그리고 대조군에 轉呆丹 수추출물을 10, 25, 50  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 약물군으로 나누어 100개의 세포에서 신경돌기의 신장 유무를 위상차 현미경으로 관찰하였다. 또한 100개의 세포에서 신경돌기의 伸長 길이를 위상차 현미경하으로 관찰하여 arbitrary ratio로 환산하여 측정하였다.

#### 7) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 이상 수행하였고, 실험 결과는 세포의 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며 통계학적 유의성은 student's t-test에 의한 p<0.05의 유의성으로 나타내었다.

### Ⅲ. 實驗成績

#### 1. CT105 과발현에 따른 세포의 형태학적 관찰

대조군의 경우 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸되는 양상을 보였다. 轉呆丹 처리군은 25 $\mu$ g/ml 농도에서 세포의 생존율이 약하고 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었으며, 50 $\mu$ g/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

#### 2. CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포사에 미치는 영향

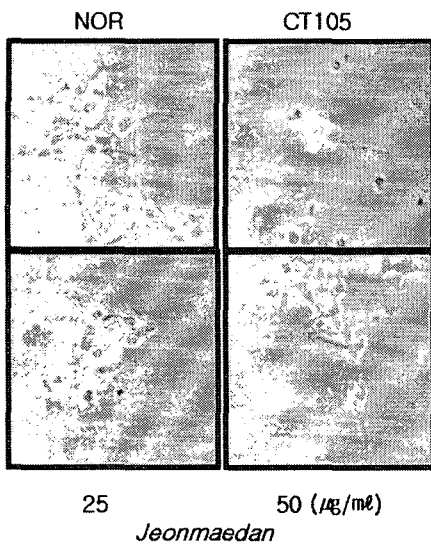


Fig 1. Effect of *Jeonmaedan* water extract on morphological changes

Representative photomicrographs of SK-N-SH cell lines (NOR), CT105-expressed cells (CT105), and CT105 cells treated with *Jeonmaedan* water extract at the concentration of 25 and 50 µg/ml, respectively, are shown (×200). Survival cell was determined by phase-contrast microscope. Similar results were found in at least three separate experiments. Arrow indicated the apoptotic cells by CT105 expression

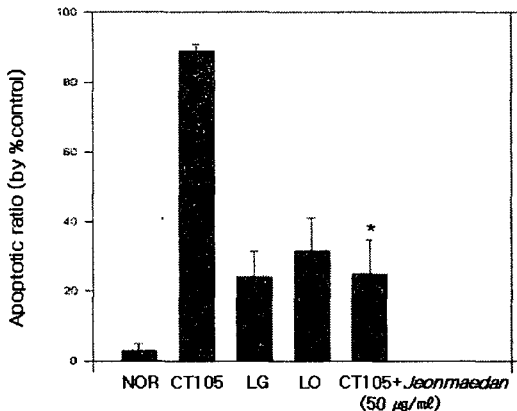


Fig 2. Inhibition of apoptotic ratio by *Jeonmaedan* water extract

Apoptotic ratio of CT105 expressing SK-N-SH cell lines were observed by ELISA reader and phase-contrast microscope in medium, induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments.

Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test (\*p<0.05).

신경세포의 세포사가 轉呆丹에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과 정상군에서는 5.0±2.5%였으나 대조군에서는 92.0±2.0%이고, 저당군은 23.0±2.5%이며, 저산소군은 34.0±5.4%였으나, 轉呆丹 처리군에서는 26.0±6.5%로 나타났다(Fig. 2).

### 3. CT105 과발현 세포주에서 LDH 활성에 미치는 영향

LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과, 정상군에서는 5.0±1.5%이고, 대조군은 87.0±5.0%이고, 저당군은 75.0±4.5%이며, 저산소군은 53.0±5.4%였으나, 轉呆丹 처리군에서는 22.0±4.5%로 나타났다(Fig. 3).

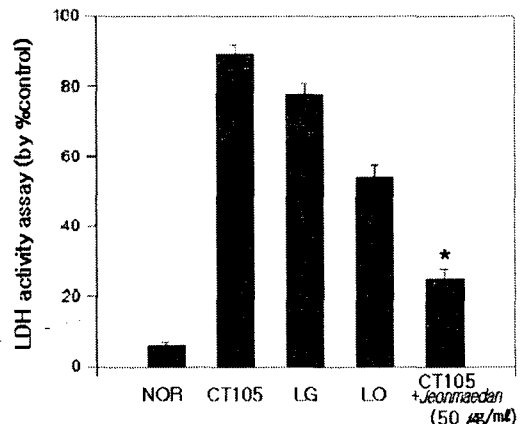


Fig 3. Survival effects of *Jeonmaedan* water extract on LDH activity

Survival cell ratio of CT105 expressing SK-N-SH cell lines were observed by morphological characteristic of survival cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detection kit from ELISA reader.

Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(\* $p < 0.05$ ).

#### 4. CT105 과발현 세포주에서 신경 세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 轉朶丹 처리군 50 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸되는 경향을 보였다(Fig. 4).

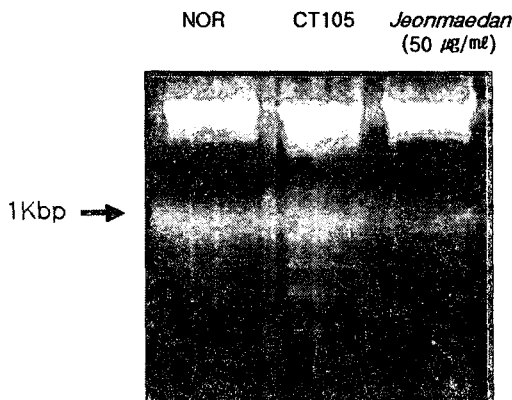


Fig 4. Effects of *Jeonmaedan* water extract on DNA fragmentation

Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$  of *Jeonmaedan* water extract for 12hrs. Cells were incubated for 12hrs necessary to initiate DNA fragmentation. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA

fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

#### 5. 신경세포의 신경돌기에 미치는 영향

정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나(Fig. 5A), CT105 과발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 伸長이 억제되는 상태로 나타나고 있으며(Fig. 5B), 轉朶丹 처리군을 25 $\mu\text{g/ml}$  농도 이상으로 처리시 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다(Fig. 5D,E). 한편 이런 결과를 arbitrary ratio로 환산하여 조사한 결과, 대조군이  $0.6 \pm 0.15$  일때 정상군은  $4.5 \pm 0.15$ 이고 轉朶丹 처리군의 농도가 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면 할수록 각각  $1.5 \pm 0.25$   $2.8 \pm 0.25$   $3.75 \pm 0.15$ 로 나타났다(Fig. 6).

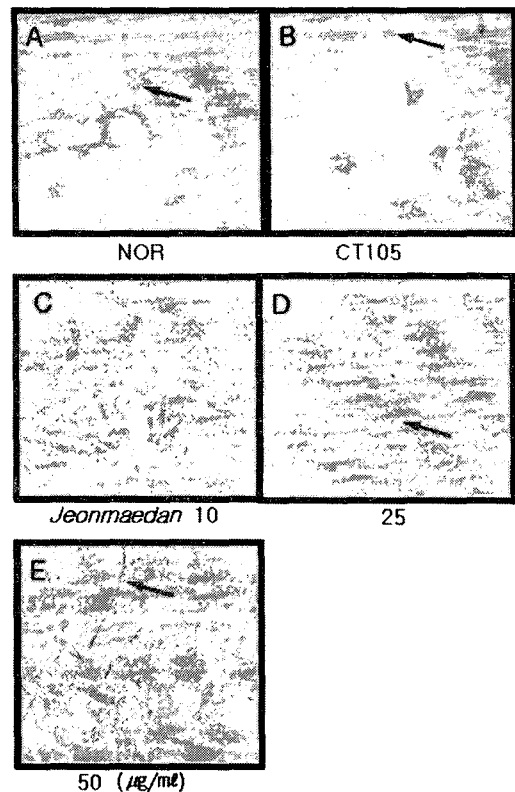


Fig 5. Promotion of neurite outgrowth by *Jeonmaedan* water extract

CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF(50ng/ml) and *Jeonmaedan* water extract. Neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope.

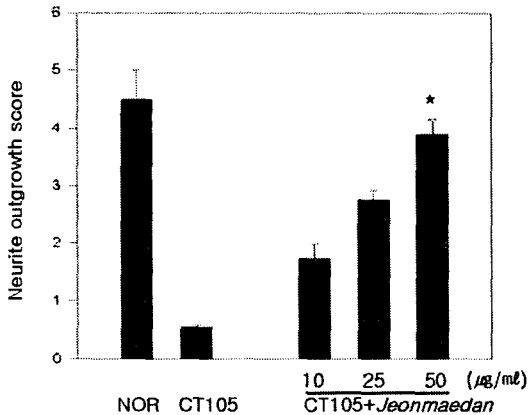


Fig 6. *Jeonmaedan* water extract induces neurite outgrowth

CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5hours in the presence of the NGF(50ng/ml) and *Jeonmaedan* water extract. Neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means±S.D from 200 determination cells.

Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(\*p<0.05).

#### IV. 考 察

痴呆는 여러가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 장애를 특징으로 하는 腦증후군으로<sup>4)</sup>, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며, 높은 유병률과 사망률의 문제 뿐 아니라 일상생활의 영위에서도 심각

한 장애를 초래한다<sup>4,55,56)</sup>. 치매의 유형은 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 痴呆(Vascular dementia; VD) 및 혼합형 痴呆 등이 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다<sup>4-6)</sup>.

AD를 유발시키는 원인에 대한 가설이 다양하게 제시되고 있는데<sup>10-2)</sup>, Aβ의 축적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 대표적이다<sup>13-8)</sup>.

최근에는 C단 단백질이 Aβ보다 독성이 있다고 알려지고 있어서 관심이 모아지고 있는데, 이 단백질은 배양세포내<sup>57)</sup>와 배양액<sup>58)</sup>에서 발견될 뿐만 아니라, 생체 내 실험에서도 가족성 AD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 腦 부위에서도 발견되었다.<sup>59,60)</sup> 또한 이 단백질은 시험관 내 실험에서 또는 세포에 형질이입시켰을 때 amyloid와 유사한 응집체를 형성할 수 있다<sup>61,62)</sup>. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 형질이입 시킬 경우 세포독성을 일으키는데, 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다<sup>63-5)</sup>. 더구나 이렇게 C단 단백질에 형질이입된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고 됨으로써<sup>65,66)</sup> 실제 생체 내 실험에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다.

최근 C단 단백질 자체가 PC12 cells<sup>67)</sup>와 primary cortical neurons<sup>68)</sup>에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, *Xenopus oocytes*<sup>69,70)</sup>과 Purkinje cells<sup>71)</sup>에



서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 생체 내 실험에서 해마에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고 하였다<sup>72)</sup>. 또한 이 단백질은 칼슘 항상성에도 악영향을 미치는데, Rat brain microsome에서는  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  교환활성도에 의해 칼슘유입을 억제함으로써 칼슘 항상성을 손상시키지만 A $\beta$ 는 그렇지 않다고 하여<sup>73,74)</sup>, 기존의 A $\beta$ 보다 더 강력한 독성을 갖는 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다<sup>19-21)</sup>. 최근에는 C단 단백질과 AD의 관련성 뿐만 아니라 치료제 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>22-4)</sup>.

韓醫學에서 痴呆는 明代 張<sup>28)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂痴呆篇에서 “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……”라 하였고, 清代 陳<sup>29)</sup>은 노인성 痴呆의 증상과 유사하게 표현했으며, 錢<sup>30)</sup>은 외부 환경과의 소외, 언어곤란, 식사상태의 변화 등을 언급하는 등 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였으며, 歷代醫書에서 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어졌다<sup>25-30)</sup>.

痴呆의 主要 病因病機로는 張<sup>28)</sup>은 “凡平素無痰而或以鬱結，或以不遂，或以思慮，或以疑貳 或以驚恐而漸致痴呆”라 하여 정서적인 요소로 보고 있으며, 鄭 등<sup>26)</sup>은 역대 문헌적 고찰에서 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등<sup>75)</sup>은 年老氣衰, 久病, 內風卒中, 外傷頭腦, 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善

忘, 痴呆 등의 症狀을 發한다고 하였다. 한편 陳<sup>29)</sup>은 “痴呆無奇法 治痰則治”라 하여 痰이 痴呆의 原因이며 祛痰法을 말하였고, 錢<sup>30)</sup>은 肝氣鬱結과 胃氣衰退로 胸中の 痰이 鬱滯되어 呆病에 이른다고 하여 健胃와 消痰開鬱에 대해 말하였다. 張<sup>76)</sup>도 呆從痰治로 治痰하는 藥物을 사용하여 痴呆를 治療하였다고 보고하였으며, 최근 姜 등<sup>25)</sup>은 痴呆의 병리학적 연구에서 痴呆의 老化和 遺傳的 要因이 韓醫學의 臟腑的으로는 腎虛와 밀접한 關係를 맺고, A $\beta$ 와 tau 단백질과 같은 腦 속의 비정상적인 plaque는 痰濁과 瘀血 등의 韓方的 病理產物과 관련된다고 하였다.

轉呆丹은 清代 陳<sup>29)</sup>의 《辨證錄·呆病門》에 처음으로 기록되었으며, 大補心肝氣血, 祛痰開竅하는 효능으로 呆病을 치료하는 처방이다. 轉呆丹의 처방구성 藥物의 效能을 살펴보면<sup>77,78)</sup>, 白芍藥은 養血斂陰, 平抑肝陽, 柔肝止痛하고, 人蔘은 大補元氣, 補氣益氣, 生津止渴, 安神益智하며, 當歸는 補血活血, 調經止痛, 潤腸通便한다. 半夏는 降逆止嘔, 燥濕化痰, 消痞散結하고, 酸棗仁은 補肝膽, 寧心安神, 斂汗하며 石菖蒲는 化濕開胃, 開竅割痰, 醒神益智한다. 白茯苓은 利水滲濕, 健脾補中, 寧心安神하고, 柴胡는 和解退熱, 疎肝解鬱, 升舉陽氣하며, 神麩은 消食和胃한다. 柏子仁은 養心安神, 止汗, 潤腸通便하고, 天花粉은 清熱生津, 清肺化痰, 消腫排膿하며, 附子는 回陽救逆, 補火助陽, 溫中止痛, 逐風寒濕邪한다.

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 관련 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있다. 七福飲<sup>35)</sup>, 定志丸<sup>36)</sup>, 四物湯<sup>37)</sup>의 뇌조직의 생화학적 변화에 대한 研究, 蔘茸地黃湯<sup>38)</sup>, 洗心湯<sup>39)</sup>, 溫膽湯<sup>40)</sup>, 還少丹<sup>41)</sup>

등의 뇌조직의 抗酸化作用에 대한 研究, 麝香蘇合元<sup>42)</sup>, 調胃升清湯<sup>43)</sup>, 荊防地黃湯<sup>44)</sup>, 香附子八物湯<sup>45)</sup>의 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 研究가 있다. 洗心湯<sup>46)</sup>, 星香正氣散加蒲公英<sup>47)</sup>과 遠志<sup>48)</sup>, 天門冬<sup>49)</sup>이 腦星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質의 分泌를 억제한다는 보고도 있다. 또한 최근에는 AD의 또 다른 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구에서 益精地黃湯<sup>50)</sup>, 導痰益氣活血湯<sup>51)</sup>, 補益清腦湯<sup>52)</sup>이 PC12 cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제 능력과 항콜린작용을 보인다고 보고하였고, 鈞鈎藤<sup>53)</sup>, 山楂肉<sup>54)</sup>의  $\beta$ APP 과발현에서의 신경세포사 억제작용에 관한 연구에 까지 이르렀으나 아직까지 轉呆丹 水추출물을 이용하여 CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서의 抗痴呆 효과에 관한 연구는 보고 되지 않았다.

이에 著者は 腦질환 특히 痴呆에 효과가 있을 것으로 사료되는 轉呆丹의 항치매 효과를 규명하기 위하여 CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 세포사 유도 억제 효과에 대한 형태학적인 변화, 신경세포의 세포사에 미치는 영향, LDH 활성에 미치는 영향, DNA fragmentation에 미치는 영향, 신경돌기 변화 및 면역조직화학분석법을 이용한 단백질 발현 억제 등에 대하여 관찰하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로 APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 과발현으로 인한 신경세포 세포사의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 정상군에 비해 CT105 과발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화가 유도되어 세포사에 관련한 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가

거의 소멸된 양상을 보였으나 轉呆丹 처리군은 50 $\mu$ g/ml 농도에서 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1). 신경세포의 세포사가 轉呆丹에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과, CT105 과발현으로 의한 신경세포 세포사 비율은 92.0 $\pm$ 2.0%였으나 轉呆丹 처리군에서는 26.0 $\pm$ 6.5%로 나타나 轉呆丹 처리군에서 세포사가 현저하게 줄어들었다(Fig. 2). 또한 CT105 과발현으로 의한 신경세포의 세포사로 세포내 LDH 생성이 증가되는지 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과, CT105 과발현으로 인한 LDH 활성도는 87.0 $\pm$ 5.0%, 轉呆丹 처리군에서는 22.0 $\pm$ 4.5%로 나타났다(Fig. 3). 따라서 신경세포의 세포사 유도시 nuclease 효소에 의한 염색체의 DNA 절단으로 유전자에서 mRNA를 통해 단백질 생산이 중단되므로 신경돌기 형성에 관여하는 단백질, 예를 들면 BDNF, NGF 같은 것이 만들어지지 않으므로 신경돌기 형성이 차단된다. 세포사의 억제유무가 신경돌기의 재생이나 회복에 중요한데, CT105 과발현으로 의한 신경세포의 세포사 양상을 볼때 轉呆丹이 신경세포의 생존율을 높이고 세포사를 억제하므로 痴呆 진행과정을 억제시키거나 지연시키는 유효성분이 함유되어 있는 것으로 사료된다.

세포사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되면 약 200-400bp만큼씩 불연속적인 절편이 존재하게 되는데 세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있다. 때문에 세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰하기 위하여 轉呆丹 수추출물을

50 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 6-well plate에 10<sup>3</sup>세포수로 하룻밤 배양한 CT105 과발현 세포를 분주하여 세포사의 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation을 조사한 결과, 대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 轉呆丹 수추출물 농도 50 $\mu$ g/ml에서는 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸되는 경향을 보였다(Fig. 4). 따라서 轉呆丹이 CT105 과발현에 의한 세포사멸 신호체계의 단백질효소 내지 관련 신호체계를 차단하여 세포사를 억제한다고 사료된다.

신경세포의 신경돌기 伸長 상해는 세포사에 영향을 주게 되는데, 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나(Fig. 5A), CT105 과발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 伸長이 억제되는 상태로 나타나고 있으며(Fig. 5B), 轉呆丹 처리군을 25 $\mu$ g/ml 농도 이상으로 처리시에는 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다(Fig. 5D,E). 한편 이런 결과를 arbitrary ratio로 환산하여 조사한 결과, 轉呆丹 처리군의 농도가 증가할수록 신경세포 신경돌기 길이가 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 따라서 轉呆丹은 CT105 과발현에 의한 신경돌기의 신장을 억제시키는 현상을 저해시키거나 伸長을 촉진하는 유효 성분이 함유되어 있는 것으로 사료된다.

이상과 같이 轉呆丹이 CT105 과발현 신경아세포종 세포주에서 세포사에 대한 효과적인 억제효과를 보여 腦의 퇴행성 변화를 지연시키고 신경세포의 보호기능을 수행할 수 있을 것으로 추정되며, 향후 본 연구를 토대로 동물대상 실험연구 및 임상

적 연구가 병행되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

轉呆丹의 항치매 효과를 규명하기 위하여 CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 痴呆와 동일한 신경세포의 세포사를 유도하여 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 轉呆丹은 CT105 과발현에 의한 신경세포의 세포사를 유의성 있게 감소시켰으며, 신경세포 생존율을 증가시켰다.
2. 轉呆丹은 신경세포의 세포사로 유발되는 LDH의 활성도를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 轉呆丹은 DNA fragmentation을 억제하였다.
4. 轉呆丹은 신경세포 신경돌기 伸長을 유의성 있게 촉진시켰다.

이와같이 轉呆丹이 CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 세포사를 효과적으로 억제하고 신경세포를 보호하는 것으로 입증되었다.

## 參 考 文 獻

1. 이근후. 최신정신의학. 서울: 하나의학사. 1988:138, 216-228.
2. 나덕렬. 치매의 접근 방법. 가정의학회지. 1997;18(3):236-248.
3. 우종인, 이정희, 유근영, 홍진표, 김창엽, 김용익, 이강욱. 한국의 한 농촌 지역에 거주하는 노인에서의 치매의 유병률. 신경정신의학. 1997;36(1):92-101.
4. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-66.
5. 배영철 外. 老人醫學. 서울: 高麗醫學. 1996:193-209.
6. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울: 현대의학서적사. 1992:256-271, 327-330, 663-664.
7. 김승업. 치매, 알츠하이머병. 서울: 삶과꿈. 1997:54-80.
8. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutuian V, DeMacro L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain. J Neurogenet. 1998;12(1):55-65.
9. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 1995;11(2):219-222.
10. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. Science. 1982;215(4537):1237-1239.
11. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
12. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰. 대한신경과학회지. 1985;3(1):10-15.
13. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Research. 1992;593(2):299-303.
14. Dickson DW, Ksiazak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH. Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. Acta Neuropathol (Berl). 1992;84(6):596-605.
15. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1-4.
16. Dennis J. Selkoe. The cell biology of  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends in Cell Biology. 1998;8(11):447-453.

17. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem.* 1999;73(2):532-537.
18. Kelly E, Gridley, Pattie S, Green, James W, Simpkins. Low concentrations of estradiol reduce  $\beta$ -amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Research.* 1997;778(1): 158-165.
19. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  gradients. *Neuroreport.* 2000;11(15):3357-3360.
20. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X et al. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med.* 2000;6(4):397-404.
21. Lee JP, Chang KA, Kim HS, Kim SS, Jeong SJ, Suh YH. APP carboxyl-terminal fragment without or with A $\beta$  domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2000;60(4):565-570.
22. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, et al. Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J.* 2000;14(11):1508-1517.
23. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, et al. Effects of nicotine on APP secretion and A $\beta$ -induced toxicity. *Biol Psychiatry.* 2001;49(3):240-247.
24. Suh YH, Kim HS, Lee JP, Park CH, Jeong SJ, Kim SS, et al. Roles of A $\beta$  and carboxyl terminal peptide fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *J. Neural Transm Suppl.* 2000;58:65-82.
25. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 痴呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. *大韓東醫病理學會誌.* 1999;13(1):36-45.
26. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. *東醫神經精神科學會誌.* 1996;7(1):77-94.
27. 김현아. 노인성 치매에 대한 문헌적 고찰. *大韓韓方內科學會誌.* 1992;13(2):57-68.
28. 張介賓. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1985:573-578.
29. 陳士鐸. 辨證錄. 서울: 醫聖堂. 1989:241-246.
30. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書. 台北: 甘地出版社. 1990:222-225.
31. 裴旼星. 노인성 치매에 관한 체질의학적 연구. *大韓韓醫學會誌.* 1992;13(2):101-106.
32. 나창수, 김정상, 채우석, 박석천. 치매에 관한 최근의 연구 동향. *大韓韓方內科學會誌.* 1998;19(1):291-300.

33. 현경철, 김종우, 황의완. Vascular Dementia에 관한 한의학적 임상연구. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):147-158.
34. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 한의학적 임상연구. 東醫神經精神科學會誌. 1996;7(1):1-13.
35. 손정석, 류영수. 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 東醫生理病理學會誌. 1997;8(2):25-38.
36. 최용준, 성강경, 문병순. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌 1998;19(1):392-409.
37. 박종운, 이기상, 문병순. 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 1998;19(1):185-201.
38. 김보경, 이상룡. 蓼茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌 1998;9(1):59-72.
39. 김성현, 이상룡. 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌 1997;8(2):39-50.
40. 정인철, 이상룡. 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌 1997;8(2):51-62.
41. 서원희, 이상룡. 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌 1998;9(1):45-58.
42. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):1-16.
43. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升清湯이 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1997;8(1):69-80.
44. 조윤숙, 황의완, 김현택, 박순권. 荊方地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1998;9(1):1-24.
45. 강현근, 김종우, 황의완, 김현택, 이홍재. 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):39-51.
46. 김태현, 김준한, 강형원, 유영수. 洗心湯에 의한 腦星狀細胞로부터 炎症性細胞活性物質의 分泌 抑制效果. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(1):137-150.
47. 박진성, 강형원, 유영수. 생체의 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(2):157-172.
48. 황시영, 강형원, 유영수. 遠志에 의한 腦星狀細胞로부터 炎症性細胞活性物質 分泌의 억제 효과에 관한 연구. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):95-108.
49. 강형원, 유영수. 天門冬에 의한 腦神經細胞로부터 炎症性細胞活性物質 分泌의 억제 효과에 관한 연구. 東醫神經精神科學會誌. 1998;9(1):73-82.
50. 최병만, 이상룡. 益精地黃湯이 치매병태 모델에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 2000;11(2):23-42.
51. 정인철. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 2001;15(2):260-276.
52. 고태준, 이상룡. 補益清腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(1):151-167.
53. 김상호, 강형원, 유영수. 鈞鉤藤이  $\beta$ APP

- 과발현 인간 신경아세포암에서의 항치매 효과에 관한 연구. 東醫生理病理學會誌. 2002;16(5):960-966.
54. 정인철, 이상룡. 山楂肉이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향. 東醫生理病理學會誌. 2002;16(2):279-288.
55. 郭隆瓌. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27-31.
56. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책 과제. 한국보건사회연구원. 1994:114-132.
57. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. Amyloid beta-peptides is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992;359(6393):322-325.
58. Matsumoto A, Matsumoto R. Familial Alzheimer's disease cells abnormally accumulate beta-amyloid-harboring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid. *Eur J Biochem*. 1994;225(3):1055-1062.
59. Iverfeldt K, Walaas SI, Greengard P. Altered processing of Alzheimer amyloid precursor protein in response to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(9):4146-4150.
60. Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee g, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(19):7341-7345.
61. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J*. 1988;7(4):949-957.
62. Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K. Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid precursor. *Nature*. 1990;347(6293):566-569.
63. 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*. 1989;281(245)(4916):417-420.
64. Fukuchi K, Kamino K, Deeb SS, Smith AC, Dang T, Martin GM. Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182(1):165-173.
65. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM. Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein. *Molecular Brain Res*. 1994;26(1-2):207-217.
66. Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid

- precursor in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(22):10857-10861.
67. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. 1996;67:1172-1182.
68. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH. Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein( $\beta$ APP) in PC12 cells by nicotine. *Molecular Pharmacology*. 1997;52:430-436.
69. Fraser S, Suh YH, Chong YH, and Djamgoz MA. Membrane currents induced in *Xenopus* oocytes by the carboxyl terminal fragment of the amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. 1996;66:2034-2040.
70. Suh YH, Chong YH, Kim SH, Choi W, Kim KS, Jeong SJ et al. Molecular physiology, biochemistry and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein(APP). *Annals of N Y Acad Sci*. 1996;786:169-183.
71. Hartell NA, Suh YH. Effects of fragments of  $\beta$ -amyloid precursor protein on parallel fiber-purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum. *J. Neurochemistry*. 2000;74(3):1112-1121.
72. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*. 1997;8(15):3213-3217.
73. Kim HS, CH Park, YH Suh. C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  ATPase. *Neuroreport*. 1998;9(17):3875-3879.
74. Kim HS, Lee JH, and Suh YH. C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SH cell. *Neuroreport*. 1999;10:113-116.
75. 郭字鵬, 陳廷. 謝海洲治療腦萎縮經驗. 北京: 中醫雜誌. 1997;38(10):586-587.
76. 張覺人. 呆從痰治, 上海: 上海中醫藥雜誌. 1995;3:20-21.
77. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 圖書出版榮林社. 1997:189, 237, 240, 299, 354, 369, 588, 605, 641, 643, 650, 820.
78. 黃宮繡. 本草求真 台北: 宏業書局有限公司. 1982:2-4, 6-7, 17, 24-25, 61-63, 99-100, 116-118, 138, 145, 164.