

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 15. No. 1, 2004

血府逐瘀湯이 세포주의 신경보호 및 재생효과에 관한 연구

정윤관, 김성욱, 공대종, 안현국, 김근우, 구병수*
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

ABSTRACTS

Study on the regenerative and inhibitory effect of CT105-induced neuroblastoma cell lines by Hyeolbuchukeo-tang water extract

Yun-Gwan Jung, Sung-Wook Kim, Dae-Jong Gong, Hyeon-Guk An,
Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine Dong Guk University, Seoul, Korea

Alzheimer's disease(AD) is a geriatric dementia that is widespread in old ages. In the future AD will be the largest problem in public health service. From old times, much medicines have been used for treatment of dementia, but there is no medicine having obvious effects. AD is one of brain retrogression disease. So we studied on herbal medicine that have a relation for brain retrogression. From old times, in oriental medicine, senile disease such as dementia and AD is treated by exclusion of Tan(痰). But Vascular Dementia(VsD) is due to YuXue(瘀血). So in recent studies, Hua Xue Hua Yu(活血化瘀) medicine is used for precautionary and medical treatment.

We studied on the effects for anti-Alzheimer in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by Hyeolbuchukeo-tang(HCT).

As the results of this study, in HCT group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of Neuroblastoma cells by CT105 expression is promoted.

These results indicate that HCT possess strong inhibitory effect of apoptosis in the nervous system and repair effect against the degeneration of neuroblastoma cells by CT105 expression.

Key Words : Hyeolbuchukeo-tang(HCT), Alzheimer's disease, β -amyloid precursor protein. carboxyl-terminal 105(CT105)

* 교신저자 : 구병수, 서울특별시 강남구 논현동 37-21 동국대학교 강남한방병원 신경정신과
Tel. 02-3416-9734 E-Mail : gubs@hitel.net)

◆ 접수: 2004/5/22 수정: 2004/6/14 채택: 2004/6/18

I. 緒論

원발성 퇴행성 대뇌질환¹⁾은 진행성 치매로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하며, 腦 안에 신경반(neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되어지며 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되는 병리학적 특징을 가진다²⁻³⁾.

최근에는 APP의 다른 대사산물중 γ -secretase에 의하여 대사되어 A β 가 되기 직전의 물질로 추정되는 C단 단백질 (carboxy-terminal 105 amino acid fragment of APP, 이하 CT105)이 PC12 cells⁴⁾, primary cortical neurons⁵⁾, Xenopus oocytes⁶⁻⁷⁾, Purkinje cells⁸⁾ 등의 진핵세포와, 형질환 동물모델⁹⁻¹⁰⁾에서 신경독성을 발휘하며, 또한 APP transfection하여 과발현시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것이 보고되었다¹¹⁾. 또한 CT105는 Calcium homeostasis를 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다고 하였다¹²⁻¹³⁾. 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

최 등¹⁴⁾은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH(Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라¹⁵⁾는 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하는 등 CT105와 AD와의 관련성뿐만 아니라 치료제 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다^{12,16)}.

단일 약물¹⁷⁾ 및 복합 처방¹⁸⁾을 이용하여 중추신경계의 항염증작용에 관한 연구¹⁹⁾를 보고한 적이 있으며, AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구²⁰⁻²¹⁾ 및 한약 추출물로 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구²²⁾는 보고 되었으나, 血府逐瘀湯이 항치매에 대한 효과는 보고되지 않았다.

이에 著者は 腦질환에 효과가 있을 것으로 사료되는 血府逐瘀湯²³⁾을 이용하여 항치매 효과를

규명하기 위하여 APP의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 血府逐瘀湯의 水抽出液을 반응시켜 봄으로써 항치매 억제 및 신경재생효과에 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 實驗

1. 材料

1) 試藥 및 기기

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG 및 ECL kit는 Amersham pharmacia에서, 2차 항체인 FITC는 Santa cruse사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기는 CO₂ incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), immunofluorescence microscope (Olympus), FACScan (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 약재는 동국대 강남남방병원에서 엄선한 것을 사용하였다. 처방은 《醫林改錯》²³⁾에 수록된 내용을 준하여 사용하였다.

2. 方法

1) 검액의 제조

실험에 사용된 혈부추출액은 Table 1.에 제시된 약제를 기준으로 900g을 세말한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 조제한 血府逐瘀湯 수추출물을 동결건조한 85g을 사용전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Prescription of Hyeolbuchukeo - tang (HCT)

韓藥名	生藥名	用 量(g)
桃 仁	Persicae Semen	9g
紅 花	Carthami Flos	3g
當 歸	Angelicae Gigantis Rsdix	9g
生地黄	Rehmanniae Radix	9g
牛 膝	Achyranthis Bidentatae Radix	6g
枳 殼	Aurantii Fructus	6g
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	9g
桔 梗	Platycodi Radix	6g
川 芎	Cnidii Rhizoma	3g
柴 胡	Bupleuri Radix	6g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3g
總 量	Total Amount	69g

2) CT 105 형질조합 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask 내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105의 플라스미드를 본 실험에 사용세포주를 구축하기 위해 미리 103 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 반응액 A으로 pCT105 2 μ g와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100 μ l을 혼합하고, 반응액 B으로 lipofectin 10 μ l와 SFM 100 μ l을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액

A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다.

이를 새로운 6 well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 μ g/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) CT105, 저당 및 저산소증에 의한 신경 세포 사유도

배양한 상기 clone된 세포에 상기 약물을 50 μ g/ml 농도로 첨가하고 72시간 처리하였다. 배양 7일 후 CO₂ incubator를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37°C, 4hrs환경에서 저산소증을 유도한 다음 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 교체하여 2시간 또는 4시간 유지한 후에 25 mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 Glucose를 회복시켜준 상태에서 2시간 또는 4시간 저산소 처리하였다.

그 후 원래의 배양액과 새로운 배양액을 등분하여 회복시키고 정상산소환경에서 계속 배양하였다.

3) LDH assay에 의한 신경세포생존율

약물을 50 μ g/ml이 되게 처리후 배양액 20 μ l를 96-wells plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합후 37°C에서 30분간 더 흔들었다.

발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가한후 상온에서 20분간 혼합다음 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합후 ELISA reader로 흡광도(A570/A630)를 측정하였다.

4) CT105 세포주의 NO 생성도 측정

CT 105 세포주내의 NO(nitric oxide)의 생성도를 측정하기 위해 103세포수로 96-wells에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 HCT군에 5, 10, 25, 50 μ g/ml의 농도로 5시간 처리한 후 상등액 100 μ l을 따서 96-wells에 옮기고 Greiss

reagent용액 50 μ l를 첨가하고 실온에서 반응을 시킨 다음 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630 nm 에서 흡광도를 측정하고 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150 μ M sodium nitrite를 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

5) RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 분석

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물농도가 5, 10, 25 그리고 50 μ g/ml농도가 되도록 가한 다음 5시간후에 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNAzol 용액을 200 μ l를 첨가한 다음 chloroform 50 μ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4 $^{\circ}$ C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 μ l을 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 μ l에 10 mM dNTP 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10x RNA PCR buffer 5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, AMV-Optimized Taq 1 μ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 μ l, 20 pM specific primer (sense/ antisense) 1 μ l, RNase free dH₂O 26 μ l을 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 반응을 실시하고, 92 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하였는데 반응조건은 92 $^{\circ}$ C 2min, 92 $^{\circ}$ C 60sec, 54 $^{\circ}$ C 60sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec에서 35 cycles를 진행시켜 72 $^{\circ}$ C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 elute시켜 사이즈 마커를 기준으로 band유무를 확인하였다.

그 결과는 mRNA발현을 확인하여 전사 수준에서 신경재생효과를 분석하였다.

6) Western Blot

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 6 well에 분주하여 상기와 같은 방법으로

실시하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂)로 처리하여 그 추출액 30 μ g을 10% polyacrylamide SDS gels (SDS-PAGE)에 용출한 후 Immobilon-P membrane (Amersham)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색시켜 확인하는데 antibody를 일차적으로 (Santa Cruz, 1:1,000 희석) 일차항체인 β APP, GSK3, Caspase 3 그리고 β -actin를 표지하고 PBS로 세척한 다음 blotting 용액을 첨가하여 부반응을 제거하고 이차항체인 Horseradish Peroxidase-conjugate된 anti-goat IgG (HRP) 항체를 표지하고 ECL blotting reagent로 3분간 배양하고 chemiluminescence은 30 sec에서 20분간 X-ray film에 노출시켜 발색정도를 확인하였다.

7) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 세포의 대조군은 백분율로 (% Control)로 표시하였으며 통계학적 유의성은 t-test에 의한 P<0.05의 유의성으로 나타내었다.

III. 成 績

1. CT105과발현 세포주에 의한 LDH활성도 영향

신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포생존율은 약 6 \pm 2.0이고, 저당군에서는 약 82 \pm 3.5, 저산소군은 약 79 \pm 2.4이고 GOCT군은 약 7 \pm 3.1인 반면 HCT군은 약 80 \pm 1.5였다.

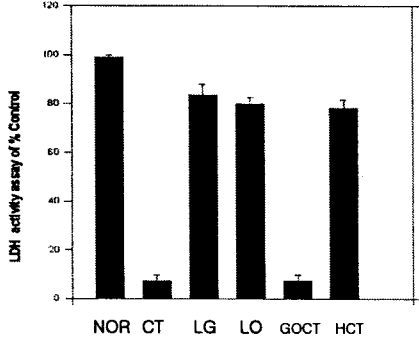


Fig. 1. Survival effects of HCT extract. Survival cell ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by Morphological characteristic of survival cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detection kit from ELISA reader.

2. CT105발현으로 인한 NO생성도에 미치는 영향

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 HCT이 CT105세포주의 NO생성은 정상군에서는 $3.0 \pm 0.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 $93.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 인데 반해 HCT 처리시 5, 10, 25 그리고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 63.3 ± 3.2 , 45.1 ± 5.4 , 35.6 ± 2.4 , $16.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 정도였다.

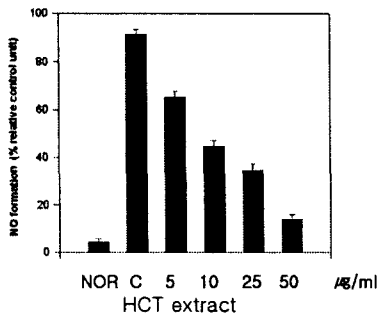


Fig. 2. Inhibitory effect of NO formation by HCT extract. NO formation of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by ELISA reader in medium and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. NO formation was determined by Greiss reagent from ELISA.

Table 2. NO formation in CT105 cell lines

samples	NO formation ratio ($\mu\text{M/well}$)
NOR	3.0 ± 0.82
CON	93.2 ± 3.9
HCT 5	63.3 ± 3.2
10	$45.1 \pm 5.4 *$
25	35.6 ± 2.4
50	16.2 ± 3.9

Values represents the means \pm S.D of performed experiments in triplicants wells ver control.

* : $p < 0.05$

Table 2. NO formation in CT105 cell lines

samples	NO formation ratio ($\mu\text{M/well}$)
NOR	3.0 ± 0.82
CON	93.2 ± 3.9
HEBUCE 5	63.3 ± 3.2
10	$45.1 \pm 5.4 *$
25	35.6 ± 2.4
50	16.2 ± 3.9

Values represents the means \pm S.D of performed experiments in triplicants wells ver control.

* : $p < 0.05$

3. 血府逐瘀湯이 CT105발현으로 인한 mRNA발현에 미치는 영향

HCT가 CT105에 의해 신경세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 βAPP 의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 HCT 물추출물 5, 10, 25 그리고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 신경세포의 세포사에 관여하는 APP와 caspase-3 mRNA발현 경우 $25 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 발현이 억제되었고 신경세포 생존에 관여하는 단백질인 GSK발현은 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 발현이 강하게 유도되었다. 본 약물은 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하여 신경세포의 보호기능을 조절하는 유효성분이 함유하는 것으로 사료된다.

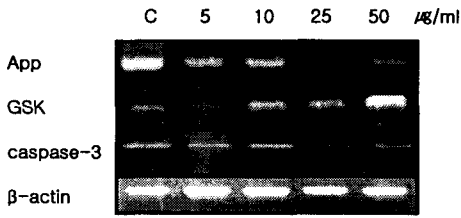


Fig 3. RT-PCR analysis of total RNA from in the CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by HCT extract. Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovin serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific primer. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without HCT treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

4. 血府逐瘀湯이 CT105 발현에 의한 단백질 발현에 미치는 영향

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 HCT가 세포사를 억제하는지 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 5, 10, 25, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 분석한 결과는 APP와 Caspase-3의 발현은 10 μ g/ml 농도이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen syntase kinase(GSK3 β)는 10 μ g/ml이상에서 유도되는 경향을 보였다(Fig. 4).

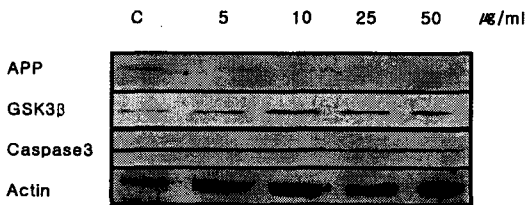


Fig 4. Influence of HCT extract on APP and caspase 3

expression in neuroblastoma cells.

All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for APP, GSK3 β and casapase 3 and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP)

IV. 考 察

Alzheimer's disease(AD)는 인간의 노화 와 뇌 의 퇴행성 병변과 관련되어 있는데 뇌의 노화는 신경세포의 減數 및 위축를 비롯하여 신경원섬유의 엉킴(Neurofibrillary tangles), 노인성 신경반 (Senile plaque), 과립공포변성(Granulovacuolar degeneration) 및 Lewy 小體 등이 출현하는 조직 병리학적 변화 이외에도 Cholinergic 계, Noradrenergic 계, Dopamine 등의 신경전달물질 (neurotransmitters) 감소와 Aluminium 등의 금속 Ion 축적 등과 같은 생화학적 변화를 유발시킨다²⁴⁻²⁶. 이러한 뇌의 퇴행성 질환으로는 대뇌피 질에 침범하여 정신활동장애를 수반하는 노인성 치태(Alzheimer's disease), Pick's disease 등과 기저부 신경절을 침범하여 운동신경계에 장애를 발생시키는 Huntington's disease, Parkinson's disease 등이 있다²⁷.

APP는 21번 염색체의 single gene에 존재하며²⁸, 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 조기치매 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반과 신경섬유다발이 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있다²⁹⁻³⁰. 또한 AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위 에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 치매형성 과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론되고 있다³¹.

Presenilin(PS)는 465개의 amino acid를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형 AD를 일으키는 인자로 알려져 있다³². AD

에 있어서 PS의 역할은 현재 규명 중에 있으나 APP의 형성을 촉진하고 apoptosis 과정에 관여할 것으로 보인다³³⁾. 즉 PS의 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 PS 대사물이 APP의 형성을 촉진하여 AD를 일으킨다는 것이다. 최근에는 APP와 PS 단백질이 서로 결합한다는 사실이 입증됨으로써 이를 뒷받침해주고 있다³⁴⁾.

한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD의 주증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다. 특히 AD환자에게서 나타나는 기억력 상실은 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이라고 설명될 수 있고, 이 현상은 acetylcholine을 분해하는 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다. 비록 원인적인 치료방법은 아니더라도 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성전구체로 lecithin, 수용체 활성제(receptor agonist)로 RS-86, nicotine 등³⁵⁻³⁷⁾과 acetylcholine 분해억제제(AChE inhibitor)로 FDA의 승인을 받은 tacrine과 최근에 승인된 E2020 등이 있다^{33, 35-37)}. 이들은 비록 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 문제가 있지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 AD의 치료제로서 효과가 우수한 것으로 알려져 있다^{35,37,38)}.

치매는 다양한 원인으로 인해 생길 수 있는 하나의 질환명이 아니라 대뇌에 생긴 질환에 의해 발생한 일련의 증상들을 지칭한다. 따라서 치매를 원인별로 분류할 수 있는데, 일차성 치매로 다른 징후가 없는 경우, 혈관질환의 징후가 있는 치매, 만성감염의 증거가 있는 치매, 신경학적 상태를 내재한 징후를 가진 이차성 치매, 미만성 뇌손상후에 생기는 치매, 내분비 질환과 비타민 결핍, 독성질환 또는 가성치매 혹은 정신분열증 등의 정신병으로 인한 경우로 대별할 수 있으나, 일반적인 분류는 ICD-10와 DSM-IV-R에 따라 크게 Alzheimer형 치매와 뇌혈관에 병리적 원인을 둔 혈관성 치매로 나눈다³⁹⁾.

치매의 임상 양상은 뇌의 기질적인 손상으로

인해서 전반적으로 지능, 학습 능력과 기억력, 문제해결 능력, 지남력 등의 인지기능과 고등정신기능이 감퇴하는 복합적인 이상 증후군들인데, 구체적으로는 기억력의 감퇴, 언어장애, 시공간능력장애, 실행능력장애, 행동 및 인격의 변화, 판단력 장애 등이 있다. 이 중에서 진단상 기준이 되는 것은 기억장애를 포함한 지적 기능의 저하로 요약할 수 있다. 그러나 엄밀하게는 사고, 판단, 추리 능력은 보존되어 있으나, 기억력 만이 장애를 보이는 건망증과는 구별되어야 한다⁴⁰⁾.

한의학에서의 痴呆는 明代 張景岳이 처음으로 《景岳全書》⁴¹⁾에서 기록하였으나, 《內經》에 “八十歲 肺氣衰 魄離 故言善誤也”⁴²⁾ “血并於下氣并於上亂而善忘”⁴³⁾이라 한 것과 朱⁴⁴⁾의 “健忘者爲事有始無終言談不知首尾....不能人事也”, 龔⁴⁵⁾의 “健忘者 陡然而忘其事也라”라 하여 일찍이 이미 하나의 병증으로 보아 그 원인과 증상을 상세하고 논하고 있음을 알 수 있다. 또한 《內經》과 역대의서에서 기억력저하의 증상면에서 健忘과 유사한 점을 찾을 수 있다. 현재 치매는 呆病과 健忘을 근거로 변증되며, 원인으로 肝腎不足 心神不交 痰飲 痰火 瘀血 七情傷 등을 들어, 補益 肝腎 滋陰養血 健脾養心 活血化瘀通竅 開竅割痰의 방법으로 치료하고 있다⁴⁶⁾.

血府逐瘀湯은 清代 王清任의 《醫林改錯》²⁴⁾에 처음으로 수록된 이래로, 氣滯血瘀, 瘀血內阻를 원인으로 하는 심뇌혈관질환, 부인과질환, 소화기질환, 중양, 각종 출혈성질환 등을 치료하는데 사용되어왔다⁴⁷⁻⁵³⁾. 혈부축어탕에 대한 실험연구로는 혈정생성인자⁵⁴⁾, 대동맥평활근 세포에서의 NO생성에 대한 연구⁵⁵⁾, 당뇨 백서의 혈청 조성 및 항산화 효능⁵⁶⁾ 등에 대하여 연구되어 왔으며, 치매와 관련된 연구는 없다.

血府逐瘀湯은 胸中の 瘀血이 氣機를 阻滯시켜 肝鬱氣滯의 瘀血症을 겸한 증상을 치료하는 방제이다. 胸中の 瘀血의 阻滯로 인하여 胸痛이 오래도록 치유되지 않고, 肝鬱不舒하여 急躁喜怒하고 瘀血이 化熱하기 때문에 入墓潮熱하고 內熱煩悶하여, 瘀熱이 心神을 上擾하여 心悸失眠 하고, 瘀血이 阻滯하면 清陽이 不升하므로 頭痛이 일어나며 瘀熱이 上沖하면 胃氣를 引動하여 上逆하기 때문에 呃逆의 증상이 나타나게 된다. 통증이 일

정한곳에 있으며,침으로 찌르는 것과 같이 面·脣·舌·脈에 나타나는 증상은 모두가 血瘀의 증상이다. 치료는 마땅히 活血化瘀를 주로 하고 겸하여 行氣를 하여야 한다⁵⁷⁾. 그러므로 본방은 桃紅四物湯에서 熟地黃을 生地黃으로, 白芍藥을 赤芍藥으로 바꾸고 柴胡 桔梗 枳殼 牛膝 甘草를 가하여 구성하였다.

본방은 血分の 瘀滯를 行하게 하는 약물이 대부분을 차지하고 있으면서도 氣分の 鬱結도 능히 解하여 풀어 주므로 活血을 하면서 耗血하지 않고 祛瘀하면서 능히 生新하여, 合用하면 去瘀氣行하여 諸症이 치료된다⁵⁸⁾.

일반적으로 알츠하이머병, 다발성 경화증, 에이즈 등은 腦의 退行性 變化로 인한 痴呆의 原因疾患들로 認識⁵⁹⁻⁶³⁾되고 있는데 이런 다양한 神經病理疾患에는 細胞活性物質들이 關與하는 것으로 알려져 있다^{64,65)}. 血府逐瘀湯이 이런 세포활성물질의 활성화에 미치는 영향에 대하여 고찰함으로써 치매에 대하여 본 研究에서 病理學的 探究에 의한 특별한 腦疾患과의 關聯性 규명이 필요할 것으로 思料되어 본 연구를 실시하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포생존율은 약 6 ± 2.0 이고, 저당군에서는 약 82 ± 3.5 , 저산소군은 약 79 ± 2.4 이고 GOCT군은 약 7 ± 3.1 인 반면 HCT군은 약 80 ± 1.5 이었는데 이는 치매의 발병과정에 유도되는 저산소, 저당수준에 CT105을 복합적인 요인을 포함한 상태에서 HCT 수추출물군에서 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보인 것으로 사료된다. (Fig. 1)

NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 HCT이 CT105세포주의 NO생성은 정상군에서는 $3.0 \pm 0.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 $93.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 인데 반해 HCT처리시 5, 10, 25 그리고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 63.3 ± 3.2 , 45.1 ± 5.4 , 35.6 ± 2.4 , $16.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 정도였다(Fig. 2와 Table 2).

HCT가 CT105에 의해 신경세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적

인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 β APP의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 HCT 물추출물 5, 10, 25 그리고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 신경세포의 세포사에 관여하는 APP와 caspase-3 mRNA 발현 경우 $25 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 발현이 억제되었고 신경세포 생존에 관여하는 단백질인 GSK 발현은 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 발현이 강하게 유도되어 이는 CT105의 발현을 HCT extract가 강하게 억제됨으로 생존에 관여하는 단백질의 발현을 촉진하리라 사료된다(Fig. 3).

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 HCT가 세포사를 억제하는지 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 5, 10, 25, $50 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 APP와 Caspase-3의 발현은 $10 \mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen syntase kinase(GSK3 β)는 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 유도되는 경향을 보였다(Fig. 4).

V. 結 論

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 세포주를 이용한 血府逐瘀湯(HCT)의 물추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 세포사를 유도에 대한 抑制와 신경세포 保護效果를 규명하기 위하여 實驗한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 神經細胞로부터 β APP의 CT105 발현에 의한 세포사 유도는 HCT에 의해 감소했다.
2. HCT은 β APP의 CT105 발현에 의한 세포 생존율을 증가시키는 효과를 나타내었다.
3. CT105로 인한 신경세포의 NO 생성도는 HCT가 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 강하게 저해하였다.
4. 신경세포의 생존에 중요한 GSK 발현을 촉진하였고 caspase 3와 APP mRNA 발현은 HCT 농도 증가에 의해 발현이 감소되며 세포생존을 증가하였다.
5. HCT 농도증가에 의해 APP, Caspase 3 단백질

질의 발현은 감소하고 GSK 3 β 단백질의 발현은 증가되었다.

이상과 같은 결론은 HCT이 β APP의 CT105발현 신경아세포암 세포주의 세포사를 效果的으로 抑制하고 신경세포를 보호하는 것으로 보아 좀더 과학적으로 치매원인 인자를 연결한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 研究를 행하므로 癡呆 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 접목 可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯 : ICD-10 정신행동 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-33, 1994.
2. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutian V, De Macro 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.
3. 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.
4. Kim HS, and Suh YH : Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, J Neurochem 1996;67:1172-1182.
5. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH : Enhanced release of secreted from of Alzheimer's amyloid precursor protein(β APP) in PC12 cells by nicotine, Molecular Pharmacology 1997;52:430-436.
6. 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.
7. 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.
8. Hartell NA, and Suh YH : Effects of fragments of β -amyloid precursor protein on parallel fiber-purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum, J Neurochemistry 2000;74(3):1112-1121.
9. Matsmoto A and Matsumoto R. : Familial Al

- zheimer's disease cells abnormal abnormally accumulate beta-amyloid harbouring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid. *Eur J Biochem* 1997;225:1055-1062.
10. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G et al : Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature*. 1997;387(6632):500-505.
 11. 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.
 12. Kim HS, Park CH, Suh YH : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg^{2+} - Ca^{2+} ATPase. *Neuroreport*. 1998 Dec 1;9(17):3875-9.
 13. Kim HS, Lee JH, and Suh YH : C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SK cell. *Neuroreport*. 1999;10:113-116.
 14. 최세훈 : 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구, 서울대학교대학원, 석사학위논문, 2001.
 15. 라종철 : 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화와 염증반응에 관한 신경독성연구, 서울대학교대학원, 석사학위논문, 2002.
 16. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuro cells vulnerable to excitotoxicity, *FASEB J*. 2000 Aug;14(11):1508-17.
 17. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구, *釜山:釜山大學校 藥學研究誌*, 1995;29(2):49-56.
 18. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去작용과 抗酸化 酸素系의 活性 效果에 대한 연구, *서울:大韓韓醫學會誌*, 1996;17(1):21-36.
 19. 황시영 · 강형원 · 류영수 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果에 관한 연구. *서울, 東醫神經精神科學會誌*. 1990;10(1):95-108.
 20. 최병만 · 이상룡 : 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향, *서울:동의신경정신과학회지*, 2000;11(2):23-42.
 21. 정인철 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, *대전대학교대학원 박사학위논문*, 2001.
 22. 김상호, 강형원, 류영수 : 조구등이 β APP 과 발현 인간세경아세포암에서의 항치매효과에 대한 연구, *동의생리병리학회지*, 2002;16(5):960-966.
 23. 王淸任 : 醫林改錯, 서울, 一中社, p.65, 1990.
 24. 김진수 : Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰, *大韓神經科學會誌*, 1985;3(1):10-15.
 25. 이근후 : 정신과 영역에서의 치매, *大韓神經科學會誌*, 1985;3(1):25-27.
 26. 지제근 : 치매(Dementia)의 병리, *대한신경과학회지*, 1985;3(1):.
 27. 아담스신경과학편찬위원회 : *신경과학*, 서울, 도서출판 정담, pp.957-980, 1998.
 28. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Maritnez A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Grate AM, Sealike DJ, Arrange AC : the E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased $A\beta$ 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 1996;2:1146-1150.
 29. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH,

- Wang R, Younkin SG, Sisodia SS : Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β -42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17:1005-1013.
30. St. George-Hyslop, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Bruni A, Foncin J-F, Salmon D, Frommelt P, Amaducci L, Sorbi S, Piacentini S, Stewart GD, Hobbs WJ, Conneally PM and Gusella JF : The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*. 1987;235:885-890.
31. Breakefield XO, Geller AI : Gene transfer in to the nervous system. *Mol Neurobiol*, 1987;1(4):339-371.
32. 徐敏葉. 聰明湯이 노화백서 뇌조직의 생화학적 변화와 신경세포의 손상에 미치는 영향. 원광대학교대학원. 1996.
33. Olton DS : Mazes, maps, and memory, *American psychologist*, 1992;32:583-596.
34. Miyazaki H, Murayama T, Ono S, Narita H, Nomura Y : Effects of R(-)-1-(benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-N,N-diethyl-amino)ethoxy]ethanol hydrochloride(T-588), a novel cognitive enhancer, on noradrenaline release in rat cerebral cortical slices, *Biochem Pharmacol*, 1997;53(9):1263-1269.
35. Raskind MA, Sadowsky CH, Sigmund WR, Beitler PJ, Auster SB : Effect of tacrine on language, praxis, and noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease, *Arch Neurol*, 1997;54(7):836-840.
36. Cheng DH, Tand XC : Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities, *Pharmacol Biochem Behav*, 1998;60(2):377-386.
37. Chapman CA, Yeomans JS, Blaha CD, Blackburn JR : Increased striatal dopamin efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculo pontine nucleus. *Neuroscience*, 1997;76(1):177-186.
38. 延炳吉 : 치매의 약물요법, 대한의사협회지 42(10):1010-1014, 1999.
39. 조흥건 : 실용한방정신의학, 서울, 유진출판사, p.640, 2001.
40. 조경희 조항석 : 치매의 진단과 관리, 가정의학회지 19(11):1181-1196, 1998.
41. 張景岳 : 張氏景岳全書, 서울, 成輔社, pp.610-611, 1978.
42. 王 冰 : 黃帝內經素問,臺北,臺灣中華書局, p.199, 1972.
43. 王 冰 : 黃帝內經靈樞,臺北,待滿中華書局, p.461, 1972.
44. 朱震亨 : 金櫃鉤玄, 서울, 鼎談出版社, p.727, 1992.
45. 龔廷賢 : 萬病回春, 北京, 人民衛生出版社, p.225, 1984.
46. 이동원 신길조 이원철 : 치매의 치료에 관한 동서의학적 고찰, 동국대학교 한의학연구소 논문집 5권, pp.67-80, 1995.
47. 康舜洙 : 韓醫學에서의 瘀血에 대한 개념, 대한한의학회지 5(1):138-140, 1984.
48. 정우열 안규석 : 韓方臨床病理學, 서울, 永林社, p.353, 1988.
49. 尹吉榮 : 東醫臨床方劑學, 서울, 明寶出版社, p.265-266, 1992.
50. 원광대학교 한의과대학 제18기 졸업준비위원회 역 : 釋中醫方劑問答, 익산, 원광대학교출판국, pp.539-540,602-603, 1995.
51. 康舜洙 : 바른方劑學, 서울, 大星文化社, pp.258-259, 1996.
52. 尹用甲 : 東醫方劑와 處方解說, 서울, 醫聖堂, p.199, 1998.
53. 강혜영 강순수 : 活血祛瘀劑에 대한 文獻의 考察, 서울, 方劑學會誌 2(1):47-58, 1991.
54. 金英宣 : 血府逐瘀湯이 血栓生成關與因子에 미치는 영향, 暎園大學校碩士學位論文, 2000.
55. 한종민 외 5인 : 血府逐瘀湯이 大動脈 平滑筋細胞에서 NO 생성에 미치는 영향, 대한한의학회지 23(2):19-27, 2002.
56. 박선동 주왕석 고원도 : 血府逐瘀湯과 그 構成藥物群이 Alloxan 糖尿 白鼠의 血清 造成 및 抗酸化 效果에 미치는 영향, 大韓本草學會

- 誌, 17(1):93-111, 2002.
59. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH. (2000) C arboxyl-terminal fragment of Alzheimer's A PP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J.* Aug;14(11):1508-17.
 60. Daly J, Lahiri DK, Kotwal GJ.(1999) Examination of the interactions of the amyloid precursor protein carboxyl terminus to intracellular protein: possible role in apoptosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* Jul;23 (5):861-75.
 61. Kim HS, Lee JH, Suh YH.(1999) C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SH cell. *Neuroreport.* Jan 18;10(1):113-6.
 62. Feng X, Jiang H, Baik JC, Edgar C, Eide F F.(2001) BDNF dependence in neuroblastoma. *J Neurosci Res.* May 15;64(4):355-63.
 63. Tiberio A, Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. (1997) Retinoic acid-enhanced invasion through reconstituted basement membrane by human SK-N-SH neuroblastoma cells involves membrane-associated tissue-type plasminogen activator. *Int J Cancer.*
 64. Brosnan, C. F., Selmaj, F. K. and Raine, C. S. (1988) Hypothesis : a role for tumor necrosis factor in immune-related demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 18, 87.
 65. Fillit, H., Ding, W. H., Buce, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B. and Wolf-Klein, G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Lett.* 129, 318D.