

원 저

CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서 洗心湯의 항치매 효과

권형수, 박치상, 박창국

대구한의대 한의과대학 심계내과학교실

Effect on Alzheimer's Disease by *Sesim-tang* in CT105-overexpressed SK-N-SH Cell Lines

Hyeong-Soo Kwon, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park

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

Objectives : 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, including *Sesim-tang*, have been traditionally utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and action mechanisms have not yet been fully elucidated. The present study investigated the effects of *Sesim-tang* on apoptotic cell death induced by CT105 (carboxy terminal 105 amino acid peptide fragment of APP) overexpression in SK-N-SH neuroblastoma cell lines.

Methods : We studied the regenerative and inhibitory effects on Alzheimer's disease in CT105-induced SK-N-SH cell lines by *Sesim-tang* water extract. We examined for cell morphological pattern, DNA fragmentation, LDH activity assay, zymography assay, and immunohistochemistic analysis. Additionally, we investigated the association between the CT105 and neurite degeneration caused by CT105-induced apoptotic response in neurone cells.

Results : Findings from our experiments have shown that *Sesim-tang* inhibits the synthesis or activities of CT105, which has neurotoxicities and apoptotic activities in the cell line. In addition, pretreatment with *Sesim-tang* (>50 μ g/ml for 12 hours) partially prevented CT105-induced cytotoxicity in SK-N-SH cell lines. SK-N-SH cell lines overexpressed with CT105 exhibited remarkable apoptotic cell damage. Based on morphological observations by phase-contrast microscope and LDH activity measurements in the culture media, the CT105-induced cell death was significantly inhibited by *Sesim-tang* water extract. *Sesim-tang* was found to reduce the expression of APP and caspase-3 induced by CT105 in SK-N-SH cell lines and in rat hippocampus.

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

Key Words: Alzheimer's disease(AD), CT105, *Sesim-tang*

서론

치매란 일단 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이 아닌 질병 등 요인에 의해서 기질적으로 손상 또는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지기능과 고도 정신기능이 감퇴하는 복합적인 임

· 접수 : 2004년 4월 19일 · 논문심사 : 2004년 4월 21일
· 채택 : 2004년 4월 29일
· 교신저자 : 박치상, 대구시 수성구 상동 165번지 대구한의대
한방병원 2내과교실
(Tel : 053-770-2104, Fax : 053-770-2169 E-mail :
stephano@dhu.ac.kr)

상증후군을 일괄하여 지칭하는 것이다¹⁾. 치매 치료에 많은 약물들이 평가되었고 그 중의 일부는 아직도 사용되고 있음에도 불구하고 이 질환에 대한 효능이 확립된 약물은 거의 없는 실정이다²⁾.

치매는 일반적으로 Alzheimer's Disease(AD), 혈관성치매, 혼합형치매 등으로 구분되며, AD를 일으키는 Amyloid precursor protein(APP)의 변이는 뇌세포안에서 amyloid β -peptide의 양을 증가시키거나 long(A β 1-42) form의 양을 증가시켜 결국은 더 큰 섬유소를 형성하게 되고 신경독성을 가져와 배양된 뇌세포 연구에서 amyloid β -peptide는 neuron을 죽이거나 손상을 초래하게 된다^{3,4)} 그러나 A β 의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔고 최근에는 APP의 일부분인 C단 단백질(Carboxy terminal 105 amino acid peptide fragment of APP, CT105)이 A β 보다 더 독성이 강하다는 가설이 제시되었으며 C단 단백질과 AD와의 관계에 대한 연구가 진행 중이다^{5,6)}.

韓醫學의으로 치매는 終日愁愁, 忽不言不語, 不食不飲, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 與之所饜則不受, 與之糞則大喜, 與之衣不服, 與之草木之葉則大喜 등의 증상을 보이며, 飲食 혹은 攝生이 適切하지 못하여 濕痰이 阻礙하거나 情緒의 抑鬱 혹은 精神의 쇼크, 打撲損傷 등으로 인해 氣滯血瘀가 발생하거나 大病 혹은 久病 후와 高齡으로 인한 衰弱 등으로 인해 肝腎陰虛하여 발생하거나 先天不足 혹은 遺傳의인 결함으로 인한 髓海不足 등으로 인해 발생되며, 이에 대한 각각의 치법은 濕痰阻礙에는 豁痰開竅하고 氣滯血瘀에는 理氣和血하며 肝腎陰虛에는 滋補肝腎에 息風을 보조하고 髓海不足에는 填精補髓 등이 사용된다^{7,8)}.

본 연구에 사용된 洗心湯은 陣士鐸의 <辨證錄·呆病門>⁹⁾에 기재된 처방으로 開鬱, 逐痰, 健胃의 효능으로 氣를 通暢시켜 다양한 뇌질환에 활용되는 처방이다. 洗心湯에 관한 실험적 연구로는 김등⁹⁾이 洗心湯이 뇌별세포의 염증성 세포활성물질의

분비억제에 효과가 있음을 밝힌 바가 있지만 CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서의 항치매효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 洗心湯을 이용하여 항치매 효과를 규명하기 위하여 pCT105로 처리한 신경모세포종 세포주에서 치매와 동일한 신경세포의 세포자멸사를 유도하여 이에 대한 효과를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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

2) 시료의 조제

본 실험에 사용한 洗心湯은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1,000g에 3차 증류수 5 l를 첨가하여 85℃에서 12시간 가열한 후 식혀서 이를 gauze로 1차 여과 후 동결 건조하였다. 동결건조 중량 50g을 회수하여 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 5mg/ml 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 처방은 <辨證錄·呆病門>⁹⁾을 참조하였으며 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Composition of Sesim-tang

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
人 蔘	<i>Panax ginseng</i>	40
茯 神	<i>Poria cocos</i>	40
酸 棗 仁	<i>Zizyphus spinosa</i>	40
半 夏	<i>Pinellia ternata</i>	20
陳 皮	<i>Citrus unshiu</i>	12
神 麩	<i>Aspergillus oryzae cohn</i>	12
甘 草	<i>Glycyrrhiza unshiu</i>	12
附 子	<i>Aconitum carmichaeli</i>	4
石 菖 蒲	<i>Acorus gramineus</i>	4
Total amount		176

3) 시약

試藥은 Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), formaldehyde, polyacrylamide, 는 Sigma社(U.S.A.)製品을, Agarose는 FMC(U.S.A.)제품을 使用하였고, RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco BRL에서, 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 cruz에서 구입하였다.

2. 방법

1) pCT105 형질을 조합시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH는 서울대학교 암연구소 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아서 계대 배양시켜 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용 dish에 배양하였다. 포유동물세포내에서 CT105 과발현을 유도하는 plasmid인 pCT105를 본 실험에 사용하여 CT105 과발현 세포주의 구축을 위한 형질이입을 수행하였다. 형질 이입은 미리 배양된 세포 10⁵세포수를 6-well plate에 분주하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 한 다음 반응액 A에는 pCT105 2 μ g와 serum free medium(이하 SFM) 100 μ l를 혼합하고, 반응액 B에는 lipofectin 10 μ l와 SFM 100 μ l를 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시켰다. 6-well plate의 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 SFM 1.5ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 유지하고 5% RPMI 배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대 배양하면서 G-418 450 μ g/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 클론을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포자멸사 관찰

정상군(NOR), CT105 과발현 신경모세포종 세포주

인 대조군(CT105) 그리고 대조군에 洗心湯을 처리한 군(CT105+Sesim-tang)으로 구분하여 10⁵세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양하였다. 洗心湯 처리군은 세포독성억제 능력이 25 μ g/ml와 50 μ g/ml에서 나타나므로 이 두 농도로 처리하여 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포들은 현미경하에서 세포자멸사 유무를 관찰하였으며 CT105의 신경세포자멸사에 대한 영향과 洗心湯의 세포자멸사 억제효과를 조사하기 위해 세포자멸사 관찰은 위상차현미경의 200배율에서 세포자멸사가 유도된 200개정도의 세포수를 촬영하여 조사하였으며, 세포자멸사의 억제농도를 조사하기 위해 96-well plate에 10⁵세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader를 이용하여 세포자멸사의 유도양상과 세포자멸사가 억제되는 농도를 조사하였다.

3) CT105, 저당 및 저산소조건에 의한 신경세포의 세포자멸사 유도

신경 세포자멸사를 일으키는 요인이 세포자멸사에 미치는 영향을 관찰하기 위해 정상군(NOR), 대조군(CT105), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 洗心湯을 처리한 군(CT105+Sesim-tang)으로 구분하여 10⁵세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양하였다. 저산소군은 신경세포를 CO₂ incubator를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37℃, 4hrs 환경하에서 유도하였으며, 저당군은 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS(Earle's Balanced Salt Solution)로 교체하여 2시간 또는 4시간 유지한 후에 25mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 Glucose를 회복시켜준 상태에서 2시간 또는 4시간 유지하여 유도하였다. 洗心湯 처리군은 가장 강한 세포자멸사 억제효과를 가지는 농도인 50 μ g/ml에서 72시간 배양하였다.

4) LDH assay에 의한 신경세포의 손상 측정

정상군(NOR), 대조군(CT105), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 洗心湯을 처리한 군(CT105+Sesim-tang)으로 나누었으며 洗心湯 처리군의 경우 50 μ g/ml 농도로 처리하였다. 각각 처리한 세

포를 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하고 그 상층액 20 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음 상온에서 2분간 혼합 후 37℃에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가한 후 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합 후 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 흡광도 (A₅₇₀/A₆₃₀)를 측정하였다.

5) DNA fragmentation 분석

CT105로 과발현 시킨 신경모세포종 세포주를 103세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 洗心湯을 10, 25, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 DNA fragmentation이 유도되는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 μ g/ml)를 첨가하고 50℃에서 5시간동안 항온조에서 유지한 다음 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합한 후 상기와 같이 15,000rpm에서 15분간 원심 분리한다. 상층액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase(50 μ g/ml)가 함유한 dH₂O 35 μ l를 첨가하여 녹인 후 이 용액을 1.5% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

6) MMP-2 단백질 발현 및 Zymography assay

CT105로 과발현 시킨 신경모세포종 세포주를 10³ 세포수로 6-well plate에 분주한 후 洗心湯을 1, 10, 25, 50 μ g/ml을 처리하고 12시간 후에 상층액을 모아서 단백질정량을 실시하여 30 μ g이 되게 하고 샘플 용액 (0.5M Tris-HCl, glycerol, 10% SDS, 0.1% bromophenol blue, dH₂O)에 넣어 0.1% gelatin이 포함된 10% polyacrylamide SDS (40% acryl amide 2ml, 1.5M Tris buffer (pH8.8), dH₂O 2.35ml, 1% gelatin 0.8ml, 10% SDS 80 μ l, 10% APS 28 μ l, TEMED 11 μ l: SDS-PAGE)에 2시간동안 용출한 후 이를 denaturation 용액(증류수에 25% Triton X-100을 녹인 것)에 37℃에서 30분

간 담가둔다. 이를 다시 development 용액(Tris-base 0.65g, Tris-HCl 3.15g, NaCl 5.85g, CaCl₂ 0.37g) 100ml에 담근 후 하룻밤 동안 37℃에 서서히 shaking시킨다. gel을 stain solution (coomassie blue 0.25%, methanol 40%, acetic acid 10%)에 담가두고 30분간 염색시키고 destaining solution인 (95% EtOH 25%, Glacial acetic acid 10%, 증류수 65%)에 담가서 5분간 둔 다음 이를 white box에서 투명밴드유무로 gelatinolytic활성을 확인하여 Zymography assay를 실시하였다.

7) 면역조직화학분석

CT105에 의해 세포자멸사가 일어난 세포잔사를 모아 CT105의 세포자멸사의 능력을 분석하고 洗心湯의 신경세포의 세포자멸사에 대한 억제능력을 파악할 목적으로 200g정도의 흰쥐 6마리를 한 group으로 하여 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame (Stereo, U.S.A.)에 고정된 후 흰쥐 뇌의 피부를 박리한다. AD동물병태를 만들기 위하여 두부를 절개한 후 CT105 잔사를 50 μ g/ml 되게 Hippocampus에 주입하고 그 부위는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽으로) 1.2mm, midline에서 right쪽으로 0.7 mm, pial표면에서 깊이 1.1mm에 microinjector의 injection speed 0.1 μ l/min와 total volume 0.5 μ l로 수행하였다. 주입 후 피부봉합을 실시하고 2주일 후 약물을 투여하고 14일 동안 1일 1회 경구투여하였다. 약물 투여 14일 후 두개골을 절개하고 brain을 적출한 후 PBS로 2회 세척한 다음 Brain의 해마, 시상하부를 절단하여, 이를 4% formalin에 넣고 고정후 paraffin으로 포매하고 blocker을 제작하고 microtome으로 5 μ m 두께로 절단후 paraffin을 제거하기 위해 xylene에 30분간 유지후 탈수과정으로 100, 95, 75%의 알콜에 각각 5분씩 담가둔 다음 이를 조직염색이나 H/E염색을 수행한다. 면역조직화학 염색을 실시하기 위해 조직 slide절편을 4℃에서 2N HCl용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하였으며 0.1M borate 완충액 처리를 하여 안정시킨 후 비 특이적인 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO, Denmark)가 포함된 0.5% bovine serum albumin을 1시간 동안 반응시킨 다음 1차 항

체인 APP를 4℃ 냉장실에서 12시간동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex(ABC : Vector Lab, U.S.A.)에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 발색시킨 후 광학현미경에서 Caspase-3는 상기방법에서 Texas-Red가 표지된 2차 항체로 반응시켜 형광현미경하에서 적색의 형광신호 유무를 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 이상 수행하였고 실험결과는 세포의 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며 통계학적 유의성은 independent t-test에 의한 $p < 0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

결 과

1. CT105 과발현에 따른 세포의 형태학적 관찰

CT105 과발현에 의한 세포자멸사의 결과를 확인하기 위해 위상차현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포자멸사와 연관된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 대조군에 洗心湯을 처리군은 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포의 생존율과 세포자멸사의 회복, 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었고 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도된 것으로 나타났(Fig. 1).

2. CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포자멸사에 미치는 영향

신경세포의 세포자멸사가 洗心湯에 의해서 어느 정도 억제되는지 세포자멸사의 비율을 조사한 결과 CT105 과발현에 의한 신경세포의 세포자멸사는 정상군의 경우는 $5.0 \pm 2.5\%$ 인 것에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포자멸사의 비율은 $92.0 \pm 2.0\%$ 이고 저당군에서는 $23.0 \pm 2.5\%$, 저산소군은 $34.0 \pm 5.4\%$ 인 반면, 대조군에 洗心湯을 처리한 군에서는 $18.0 \pm$

2.5%로 나타났(Fig. 2).

3. CT105 과발현 세포주에서 LDH활성에 미치는 영향

CT105 발현에 의한 세포자멸사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰해본 결과 정상군의 경우에는 $5.0 \pm 1.5\%$ 로 나타난 데 비해 CT105 발현으로 인한 것은 $87.0 \pm 5.0\%$, 저당군에서는 $75.0 \pm 4.5\%$, 저산소군은 $53.0 \pm 5.4\%$ 로 나타났고 대조군에 洗心湯을 처리한 군에서는 $23.0 \pm 2.5\%$ 로 나타났(Fig. 3).

4. CT105 과발현 세포주에서 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 대조군에 洗心湯을 처리한 군에서는 농도가 높아 질 수록 각 lane에서 나타나는 불연속적인 band가 감소하고 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 처리한 것부터는 불연속적인 band가 감소하의 거의 소멸된 것으로 나타났(Fig. 4).

5. Gelatinase 단백질 발현에 미치는 영향

CT105 발현 신경모세포종에서 洗心湯이 gelatinase 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 대조군에 洗心湯을 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석해본 결과 MMP-2의 발현은 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도이상에서 감소되고 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유의하게 억제되는 것으로 나타났(Fig. 5).

6. 면역조직화학 분석법에 의한 단백질발현에 미치는 영향

정상군의 경우에는 해마조직에서 APP발현이 거의 유도되지 않는 반면 대조군에서는 강하게 갈색으로 염색되어 나타나 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 나타났. 이러한 환경에서 洗心湯을 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 경구 투여한 군에서는 신경세포의 세포자멸사에 관여하는 APP의 발현이 감소되는 경향을 보였으며, Caspase-3 발현의 경우에도 정상군은 거의

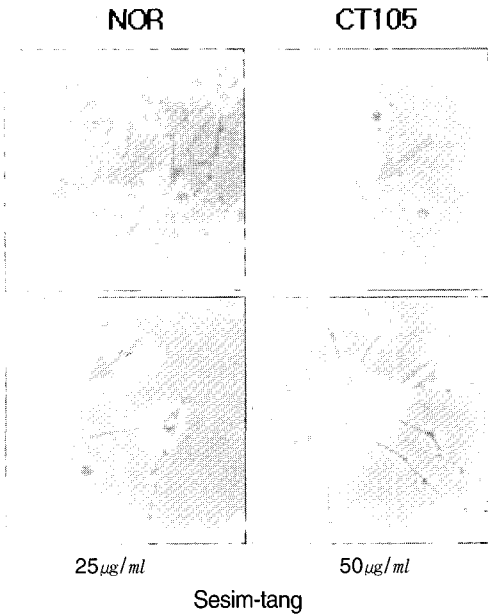


Fig. 1. Effect of *Sesim-tang* Water Extract on Morphological Changes

Representative photomicrographs of SK-N-SH cells(NOR), CT105-expressed cells(CT105), and CT105 cells treated with *Sesim-tang* water extract at the concentration of 25 and 50 µg/ml, respectively, are shown(200X). Survival cell was determined by phase-contrast microscopy. Arrows indicate the apoptotic cells by CT105 expression.

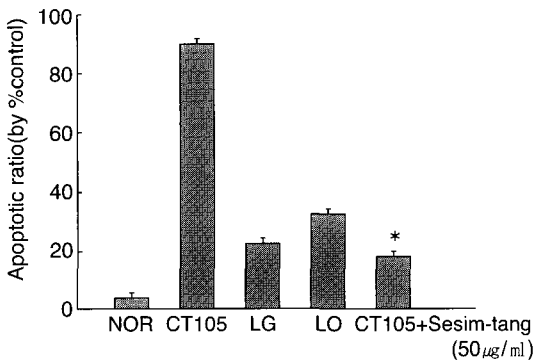


Fig. 2. Inhibition of Apoptotic Ratio by *Sesim-tang* Water Extract

Apoptotic ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by ELISA reader and phase-contrast microscopy 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 (* $p < 0.05$).

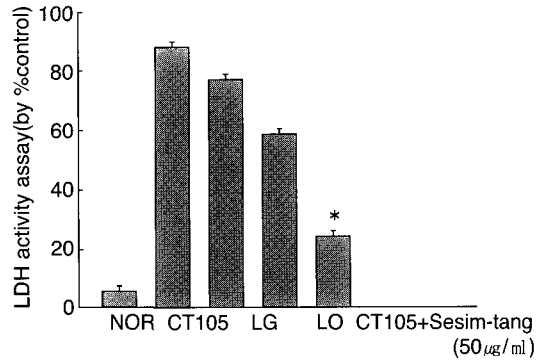


Fig. 3. Survival Effects of *Sesim-tang* Water Extract on LDH Activity

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

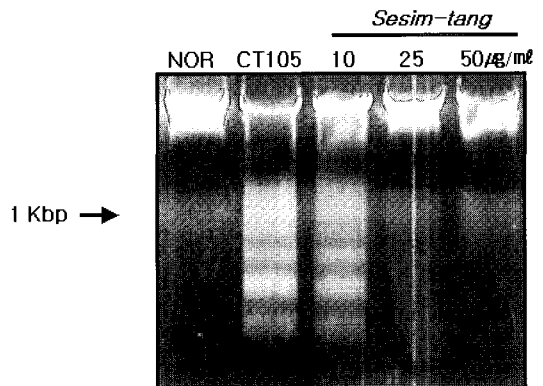


Fig. 4. Effects of *Sesim-tang* Water Extract on DNA Fragmentation

Agarose gel electrophoresis of DNA water extracted from cells. DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 10, 25 and 50 µg/ml of *Sesim-tang* water extract for 12 hrs. 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.

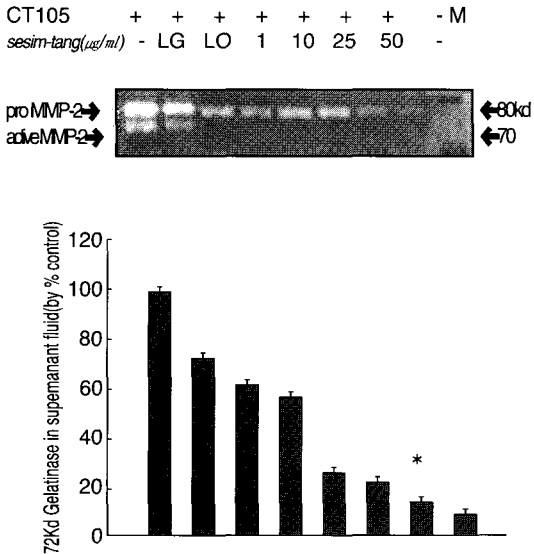


Fig. 5. Influence of *Sesim-tang* Water Extract on Gelatinase Expression in SK-N-SH cell lines
 All supernatants were harvested in FBS-free RPMI medium, zymography assay analyzed for gelatinase and separated by *Sesim-tang* water extract with 10% polyacrylamide SDS gels and detection of the protein were stained with coomassian blue. M: protein molecular weight marker, MMP-2:72Kd. Statistically significant value compared with CT105 control group by *t* test (* $p < 0.05$).

발현이 되지 않은 반면 대조군은 적색으로 강하게 발현되어 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 나타났는데, 이러한 환경에서 洗心湯을 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 경구 투여한 군에서는 발현이 감소되고 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 발현이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 6).

고 찰

치매는 여러 가지의 원인에 의해 일어나는 인지 기능의 장애를 특징으로 하는 뇌중후군으로 과거에는 노화에 따르는 생리적인 현상으로 보았으나 현재에는 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력의 장애를 일으키는 신경계의 질환으로 인식하고 있다³⁾.

AD는 중추신경, 특히 전뇌, 소뇌편도, 해마, 대뇌피질과 변연계의 신경파괴로 일어나는데, 이런 부분들

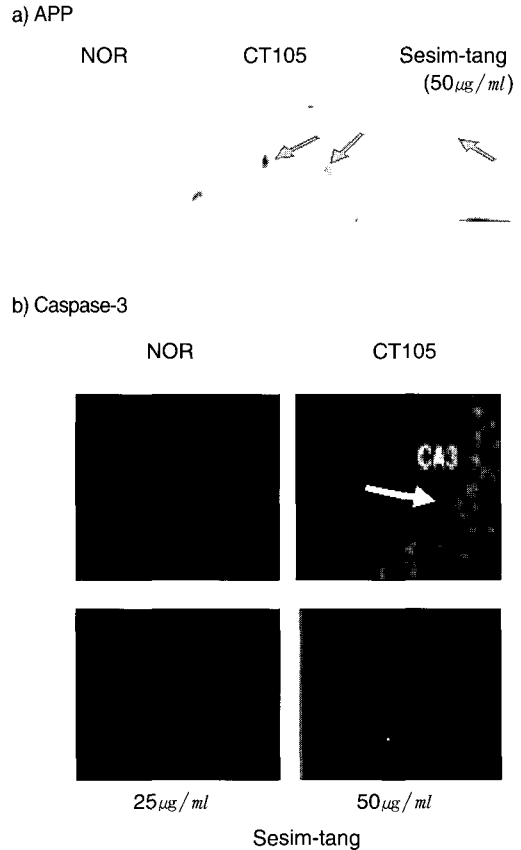


Fig 6. The Immunohistochemical Stain for APP(a) and Caspase-3(b) Expression in Hippocampus Tissue from CT105-injected Rat
 The noticeable increase APP positive tissues(middle panel) in region of hippocampus brains were seen($\times 200$). Immunohistochemistry for detecting APP and Caspase-3 expression in the tissue sections, the indicated cases was performed as described in "Materials and Methods.", APP staining are visualized in heavy brown around apoptotic tissue cells and Caspase-3 staining are visualized in red color around hippocampus tissue cells by CT105.

은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 해마와 대뇌피질의 신경파괴가 AD의 기억력 장애와 사고능력의 저하와 관계가 많다¹⁰⁾. AD의 병리적인 특징으로는 대뇌피질의 위축과 함께 신경섬유다발(Neurofibrillary tangles), 신경반(Neuritic plaque)의 축적을 들 수 있는데, 이 중 신경섬유다발, 신경반은 AD의 지표로 인식되고 있다¹¹⁾.

AD의 중요한 병변은 42~43개의 아미노산으로 구성된 β -amyloid peptide($A\beta$)가 세포 밖에 침착하여 신경반을 형성하는 것인데, $A\beta$ 가 세포독성을 나타내기 때문에 $A\beta$ 는 AD의 발병기전에 있어 많은 관심을 끌고 있다¹³. $A\beta$ 는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 이차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있으며, 최근에는 APP의 c말단 부위인 C단 단백질이 $A\beta$ 보다 더 독성이 강하다고 알려지고 있고 $A\beta$ 와 C단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 연구가 계속 진행 중에 있다¹⁴. 또한 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질은 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, AD의 주 증상인 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 더욱 심화된다^{15,6}.

APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 통로에 의해 진행되는데, 즉 α -secretase에 의해서 $A\beta$ 부위의 안쪽이 잘려지며 amino terminal이 세포 밖으로 분비된다¹⁷. 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고되었다¹⁸. 한편 변형 진행경로에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β -secretase 등에 의해 $A\beta$ 의 N-terminal 주위가 잘라지며 $A\beta$ sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 고정되어 남는다¹⁹. 이 C단 단백질 중 일부는 $A\beta$ 전체 sequence를 가지고 있으며 γ -secretase에 의해 잘려져 $A\beta$ 를 형성하는 것으로 생각되지만 이상과 같이 생체 외 실험에서 $A\beta$ 의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, $A\beta$ 가 독성을 나타내기 위해서는 $20\mu\text{M}$ 이상의 고농도가 필요하고²⁰, 특히 생체 내 실험에서는 $A\beta$ 의 독성에 대해 상반되는 결과가 팽팽히 맞서고 있어 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을

할 것인지 불확실한 실정이다. 따라서 실제 발병과정에는 다른 인자들, 그 중에서도 APP의 다른 중간 대사산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 $A\beta$ 의 최종 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 이 단백질은 배양세포 내와 배양액에서 발견되며 생체 내에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 뇌 부위에서도 발견되었다²¹. 또한 이 단백질은 생체 외 또는 세포에 형질이입 시켰을 때 amyloid와 유사한 응집체를 형성할 수 있다²². 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 형질이입 시킬 경우 세포독성을 일으키는데, 특히 이러한 C단 단백질의 형질이입시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특히 하게 일어난다는 보고가 있다¹⁹. 더구나 이렇게 C단 단백질에 형질이입된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고됨으로써²³ 실제 생체 내에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다.

최근의 C단 단백질에 대한 연구로는 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons에서 직접적인 신경독성을 유발한다는 보고²⁴와 Xenopus oocytes과 Purkinje cells 등의 진핵세포와 형질전환 동물모델²⁵에서 신경독성을 발휘하여 길고 비선택적인 내부전류를 유도하고 생체 내에서 해마에 있는 long-term potentiation를 차단한다는 보고²⁶가 있으며, 또한 APP를 형질이입하여 과발현 시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것이 보고되었다²⁷. 또한 CT105는 Calcium 대사에도 악영향을 미쳐 Rat brain microsome에서 calcium homeostasis을 손상시키지만, $A\beta$ 의 작용은 이와는 다르다고 하여²⁸ 기존의 $A\beta$ 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다²⁶.

또한, 가장 최근에는 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 Pyruvate dehydrogenase의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 인한 것이라는 것과 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 인

해 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하게 되어 주변의 신경세포의 사멸을 유도하는 것을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 뒷받침하고 있다^{28,9)}.

따라서 치매의 진행단계에 CT105의 과발현을 유도하게 되면 촉발인자를 무시한 상황이라 하더라도 신경세포의 파괴를 유도할 수 있어 이를 이용하여 치매의 예방 및 치료에 있어 한약재의 개발에 도움이 될 것으로 思料되어 신경모세포종 세포주에서 APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여 과발현시킨 후 유전자의 작용기전과 신경독성의 억제효과를 통해 항치매 효과에 대해 연구해 보았다.

치매는 明代 張景岳³⁰⁾의 《景岳全書·雜證謨》癲狂篇에서 상세하게 언급되어 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 치매의 病因·病機와 治法·豫後에 대해서 설명하였으며, 이후에 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어졌으며, 陳⁷⁾은 <辨證錄>에서 “大約其始也 起於肝氣之鬱 其終也 由於胃氣之衰 肝鬱則木剋土 而痰不能化 胃衰則土制水 以痰不能消 於是痰積於胸中 盤據於心外 使神明不清 而成其呆病矣”라 하여 呆病의 病因病機에 관하여 비교적 자세한 설명을 하였고, 黃 등⁸⁾의 <實用中醫內科學>에서는 “痴呆 又稱呆病·數日不知飢餓等 此類患者多不能獨子處理日常生活 甚至不能抵禦危險傷害”라 정의하였다. 치매의 주요 病因病機로는 鄭 등³¹⁾이 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등³²⁾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를 發한다고 하였다. 한편 陳⁷⁾은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 최근에는 張³³⁾도 呆從痰治로 治痰하는 藥物을 使用하여 치매를 治療하였다고 報告하였다.

洗心湯은 陳士鐸의 <辨證錄·呆病門>⁷⁾에 기재되어 있는데, “終日愁愁 忽不言不語 不食不飲 忽笑忽歌 忽愁忽哭 與之所饑則不受 與之糞則大喜 與之衣不服 與之草木之葉則大喜” 등의 증상에 대해 “開氣 鬱結 逐其痰 健其胃” 등의 治法을 통해 氣를 通暢하여 治한다고 하였다. 또한 黃⁸⁾ 등의 <實用中醫內

科學>에서는 “本方補精與攻痰病重 補精是益脾胃之氣以生心氣 攻痰是滌蕩干擾心官之濁邪 再加養心至品以治痴呆”라 하였다.

洗心湯의 구성은 人蔘, 白茯苓, 半夏, 神麩, 甘草, 附子, 石菖蒲, 酸棗仁, 陳皮 등으로 이루어져 있는데, 人蔘은 大補元氣, 補脾益肺, 安神益智하고 白茯苓은 寧神定志, 開心益智, 養神하며 半夏는 燥濕化痰, 開竅發表, 和胃健脾하고 神麩은 消食化滯, 健脾暖胃하며 甘草는 補中益氣하고 附子는 補火助陽, 逐風寒濕하며 石菖蒲는 豁痰開竅, 醒神益智, 化濕和胃하고 酸棗仁은 補肝膽, 斂汗寧神, 助陰氣하며 陳皮는 燥濕理氣, 和中消痰하는 효능이 있다^{34,9)}.

韓醫學에서는 치매에 대한 연구가 관련 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있는데, 황 등³⁶⁾은 단일약물인 遠志의 단독 및 복합투여를 통해 뇌의老화를 유발하는 산화작용의 억제에 대한 研究를, 정³⁷⁾ 등은 山查肉이 CT105로 유도된 치매모델에 미치는 영향에 대한 연구를, 김³⁾ 등은 黃芩, 天麻, 玄胡索 등의 약물이 치매에 미치는 영향에 대한 연구를 하였고 정³⁸⁾은 左歸飲 및 右歸飲 등의 복합처방을 이용한 뇌의 老化 억제에 대한 연구를 활발하게 진행하여 왔으며, 박 등³⁹⁾은 생체 외에서 星香正氣散加 蒲公英이 염증을 매개하는 물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 영향을 미치는 것에 근거를 둔 실험을 통해 뇌별세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF- α , IL-1 및 A β 의 생성을 억제하는 것으로 보고하였고, 강⁴⁰⁾은 치매의 병리학적인 연구에서 치매의老化和 遺傳의 要因이 腎虛와 밀접한 관계가 있고 A β 와 tau 단백질과 같은 비정상적인 plaque는 痰濁 및 瘀血 등과 관련된다고 하였다.

한편, 김 등⁹⁾이 洗心湯에 관한 실험적 연구로 洗心湯이 뇌별세포의 염증성 세포활성물질의 분비억제에 관한 연구를 하였고 정³⁷⁾ 등은 山查肉으로 CT105로 유도된 PC-12 cell에서의 항치매 효과에 대한 연구를 하였지만, 복합약물인 洗心湯을 이용하여 CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고되지 않았고 특히 신경모세포종 세포주에서 CT105를 과발현 시켜 항치매

효과를 알아본 실험적 보고는 아직 없다.

이에 著者は 洗心湯의 항치매 효과를 규명하기 위하여 CT105 과발현 신경모세포종 세포주에서 세포자멸사 유도에 대한 형태학적인 변화, 신경세포자멸사 및 DNA fragmentation 억제효과, LDH 분석에 의한 신경세포생존율, Zymography assay, 면역조직화학 분석법을 이용한 단백질 발현 억제에 대한 현미경적 관찰 등으로 분석하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로 APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포자멸사를 확인하기 위해 현미경하에서 관찰한 결과 Fig. 1에서처럼 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포의 세포자멸사는 형태학적으로 큰 변화를 보였는데, 신경세포의 세포자멸사에 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 그러나 洗心湯 처리군에서는 25 μ g/ml 농도에서 신경돌기가 출현되고 50 μ g/ml 농도에서 신경세포의 신경돌기가 정상적으로 유도되는 것이 확인되었다.

신경세포의 세포자멸사가 洗心湯에 의해 얼마나 억제되는지를 세포자멸사의 비율을 조사한 결과 Fig. 2에서처럼 洗心湯을 처리한 군에서는 세포자멸사가 유의하게 억제되었다.

신경세포 손상의 최종적인 현상으로 APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포자멸사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 Fig. 3에서처럼 세포자멸사의 비율이 유의하게 감소되었다. 이상에서 볼 때, 洗心湯이 세포자멸사 유도시의 nuclease효소에 의한 염색체의 DNA 절단으로 유전자에서 mRNA를 통한 단백질 생산중단의 억제 과정에 관여하고 신경돌기의 재생에 관여하는 단백질인 BDNF, NGF 등의 생성에 관여하여 신경세포의 세포자멸사 억제와 신경세포의 재생이 가능하리라 思料되며, CT105에 의한 신경세포의 세포자멸사에서 洗心湯이 치매의 진행과정을 억제 또는 지연시키는 효과를 보이는 것으로 思料된다.

세포자멸사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포

내의 염색체가 잘라지게 되면 약 200~400bp만큼씩 불연속적인 절편이 존재하게 되는데 세포자멸사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있기 때문에 洗心湯을 10, 25, 50 μ g/ml 농도로 해서 6-well plate에 103cell세포수로 하룻밤 동안 배양한 CT105 발현 세포에 분주한 후 세포 DNA를 분리, DNA fragmentation을 조사하여 세포자멸사가 억제되는 정도를 알아보았다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 대조군의 경우에는 1Kbp 이하에서 불연속적인 대(ladder)가 존재하지만 洗心湯 처리군의 농도가 높아질수록 각 lane에서 나타나는 불연속적인 대가 감소하고 25 μ g/ml 이상의 농도에서 처리한 것부터는 불연속적인 대가 감소하여 거의 소멸되는 양상을 나타내므로 洗心湯이 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포자멸사를 억제하는 것으로 思料된다.

신경세포의 세포자멸사에서는 gelatinase와 collagenase 같은 세포외 단백질효소의 분비가 촉진되는데, 洗心湯이 이러한 작용을 억제하므로 신경세포간의 부착분자간 결합이 잘 이루어지게 하여 신경세포간 신호전달을 원활하게 할 것이라는 가능성이 있다. CT105 과발현 신경모세포종 세포주에서 洗心湯이 gelatinase가 세포유착에 어떤 기능을 하는지 확인하기 위해 洗心湯을 1, 10, 25, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 분석한 결과는 Fig. 5에서처럼 MMP-2의 발현은 25 μ g/ml 농도이상에서 감소하고 50 μ g/ml 이상에서 유의하게 억제됨을 알 수 있었다. 신경세포의 Gelatinase인 MMP-2 단백질 발현억제처럼 본 약물은 CT105로 인한 신경세포의 부착에 관계하여 신경전달을 촉진할 것으로 思料된다. 이는 洗心湯 처리군은 세포자멸사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 CT105에 의한 신경세포의 파괴를 막고 재생작용을 유도하는 성분이 있음을 시사하며, CT105에 의한 신경세포의 세포자멸사를 유의성 있게 억제하므로 치매치료에 적용될 수 있을 것으로 思料된다. 이상의 결과에서 보면 洗心湯이 배양된 신경모세포종 세포주에서 CT105 과발현에 의해 유발되는 신경손상을 억제함을 알 수 있다.

다음으로 실험동물을 이용하여 CT105에 의한 신경세포의 세포자멸사에 관여하는 단백질의 발현에 대한 洗心湯의 영향을 알아보기 위해 CT105를 흰쥐의 해마부위에 주입한 후 14일 동안 1일 1회 洗心湯을 경구 투여한 다음 해마를 면역조직화학분석법에 의해 분석해 보았다. 그 결과 Fig. 6a에서와 같이 정상군의 경우에는 해마조직에서 APP의 발현이 거의 유도되지 않는 반면 CT105를 처리한 대조군에서는 강하게 갈색으로 염색되어 나타나므로 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 보인다. 이러한 환경에서 洗心湯을 50 μ g/ml 농도로 경구 투여한 군에서는 신경세포의 세포자멸사에 관여하는 APP의 발현이 감소되는 경향을 보였다. 또한, Fig. 6b에서처럼 Caspase-3 발현의 경우에도 정상군에서는 발현이 거의 유도되지 않은 반면 대조군은 적색이 강하게 발현되어 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 보이는데, 이러한 환경에서 洗心湯을 25 μ g/ml 농도로 경구 투여한 군에서는 발현이 감소되고 50 μ g/ml에서는 발현이 억제되는 경향을 보였다. 이는 洗心湯의 신경보호 및 재생 촉진 작용을 생체 내에서 부분적으로 입증해주는 연구결과로 思料된다.

이상과 같이 洗心湯이 CT105 과발현 신경모세포종 세포주에서 세포자멸사 유도에 대해 뚜렷한 억제효과를 나타내고 있어 β 의 침착에 따른 뇌의 퇴행성 변화를 지연시킬 수 있을 것으로 추정되며, 洗心湯을 이용하여 치매를 유발하는 원인 인자와 연결하여 지속적인 분자생물학적인 연구와 임상실험 연구가 병행되어야 할 것으로 思料된다.

결론

洗心湯의 항치매 효과를 규명하기 위하여 CT105 과발현 신경모세포종 세포주에서 치매와 동일한 신경세포의 세포자멸사를 유도하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 洗心湯은 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포자멸사에서 유의하게 세포생존율을 증가시키고 신경돌기의 생성을 유도하며 신경세포의 세

포자멸사를 유의하게 억제하였다.

2. 洗心湯은 신경세포의 세포자멸사로 인한 LDH의 활성도를 유의하게 감소시켰다.
3. 洗心湯은 DNA fragmentation을 억제하여 세포생존을 촉진하였다.
4. 洗心湯은 MMP-2 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다.
5. 洗心湯은 흰쥐의 해마부위 Caspase-3와 APP 단백질 발현을 억제하여 신경세포의 생존율을 증가시키고 세포자멸사의 진행을 억제하였다.

이상과 같은 결론으로 洗心湯이 CT105 발현 신경모세포종 세포주의 세포자멸사를 효과적으로 억제하고 신경세포의 손상을 방어한다는 것이 입증되었다.

參考文獻

1. 민성길. 최신정신의학. 서울: 一潮閣. 2000:189.
2. 김지현 외. 새로운 제형의 치매치료제제의 효능연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):303-308.
3. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-66.
4. Mattson, M.P., Furukawa, K. Short precursor shortens memory. Nature. 1997;387(29):457.
5. Kim HS, CH Park, and YH Suh. C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg²⁺-Ca²⁺ ATPase. Neuroreport. 1998;9(17):3875-3879.
6. 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.
7. 陳士鐸. 辨證錄. 北京: 人民衛生出版社. 1996:241-3.
8. 黃大東 外. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378-81, 748-91.
9. 김태현, 김준환, 강형원, 유영수. 洗心湯에 의한 뇌 별세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):137-150.
10. Davis, P., Maloney, A.J.F. Selective loss of cholinergic neurones in Alzheimer's disease. Lancet. 1976;2:1403.
11. 김상호. 鈞鈎藤이 β APP 과발현 인간 신경아세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. 동의생리병리학회

- 지 2002;16(5):9640.
12. Ray WJ, Ashall F, Goate AM. Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Mol Med Today*. 1997;25(1):70-84.
 13. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰. *대한신경과학회지*. 1985;3(1):10-15.
 14. Engidawork E, Baiic N, Fountoulakis M, Dierssen M, Greber-Platzer S, Lubec G. Beta-amyloid precursor protein. ETS-2 and collagen alpha 1(IV) chain precursor, encoded on chromosome 21, are not overexpressed in fetal Down syndrome : further evidence against gene dosage effect. *J Neural Transm Suppl*. 2001;61:335-346.
 15. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52(4):691-699.
 16. Almeida OP. Treatment of Alzheimer's disease ; critical evaluation of the use of anticholinesterase, *Arch Neuropsychiatr*. 1998;56(313):688-696.
 17. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 1995;65(4):1431-1444.
 18. Barger SW, Fiscus RR, Ruth P, Hofmann F, Mattson MP. Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of beta-amyloid precursor. *J. Neurochem*. 1995;64(5):2087-2096.
 19. Shoji M, Glode TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 1992;258(2057):2.
 20. Games D, Khan KM, Soriano FG, Keim PS, Davis DL, Bryant K, Lieberburg I. Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injection in rat brain. *Neurobiol Aging*. 1992;13(5):569-576.
 21. Clemens JA, Stephenson DT. Implants containing beta-amyloid protein are not neurotoxic to young and old rat brain. *Neurobiol Aging*. 1992;13(5):581-566.
 22. 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.
 23. 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. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;26(1-2):207-217.
 24. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxyl terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. 1996;67:1172-1182.
 25. Matsmoto A and Matsumoto R. Familial Alzheimer'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.
 26. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, and Rowan MJ. Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*. 1997;8:3213-3217.
 27. 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.
 28. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, Choi SH, Chang K, Rah J, Koo J, Kim E, Suh. Effects of nicotine on APP secretion and Aβ- or CT(105)-induced toxicity. *Biol Psychiatry*. 2001;49(3):240.
 29. Suh YH, Kim HS, Lee JP, Park CH, Jeong SJ, Kim SS, Rah JC, Seo JH, Kim S. Roles of Aβ and carboxyl terminal peptide fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *J. Neural Transm Suppl*. 2000;58:65-82.
 30. 張景岳. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1985:573-578.
 31. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. *동의신경정신과학회지*. 1996;7(1):77-94.
 32. 郭字鵬 外. 謝海洲治療腦萎縮經驗. *中醫雜誌*. 1997;38(10):586-587.
 33. 張覺人. : 呆從痰治. 上海, 上海中醫藥雜誌. 1995;3:20-21.
 34. 강병수 외. 本草學. 서울: 영림사. 1991:137, 303, 348, 350, 448, 467
 35. 서부일, 김상찬 監修. 本草集成. 서울: 목과토. 2000:741, 319, 408, 319, 448, 741.
 36. 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 抑制 效果에 關한 研究. *東醫神經精神科學會誌*. 1999;10(1):95-108.

(370) 대한한의학회지 제25권 제2호(2004년 6월)

37. 정인철, 이상룡. 山查肉이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279-286.
38. 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 活性增加 효과에 대한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1996;17(1):21-36.
39. 박진성, 강형원, 유영수. 생체의 알츠하이머병 실험 모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):157-172.
40. 강형원 외. 치매의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.