

CT99 발현 신경 세포주에서 益氣安神湯의 신경보호 및 항치매 효과

황연규, 이소연, 윤현덕, 신오철, 박창국, 박치상
대구한의대학교 한의학과 내과학전공

Abstract

Effect of the neuroprotection and anti-Alzheimer's disease in CT99-induced Neuro 2A cells by Ikgiansintang water extract

Yeon-kyu Hwang , So-Yeon Lee, Hyeon-Deok Yoon, Oh-Chul Shin,
Chang-Gook Park, Chi-Sang Park
Department of Oriental Medicine Graduate school of Daegu Haany 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.

It has been widely believed that A β peptide devided from APP causes apoptotic neurotoxicity in AD brain. However, recent evidence suggests that CT99 may be an important factor causing neurotoxicity in AD. Mouse Neuro 2A cells expressed with CT99 exhibited remarkable apoptotic cell damage.

We invesgated the protective effects of Ikgiansintang water extract(IGA). Findings from our experiment have shown that IGA inhibits the activities of CT99, which has neurotoxicities and apoptotic activities in cell line. In addition treatment of IGA(50 μ g/ml

교신저자 : 박 치 상

대구광역시 수성구 상동 대구한의대학교 심계내과학 교실

Tel : 053-770-2179 E-mail : stephano@dhu.ac.kr

접수 : 2005/ 05/ 30 수정 : 2005/ 06/ 03 채택 : 2005/ 06/ 05

for 24 hours) partially prevented CT99-induced cytotoxicity in Neuro 2A cells.

As the result of this study, In IGA group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of Neuro 2A cells by CT99 expression is promoted. Base on these findings, IGA may be beneficial for the treatment of AD.

Key Word : CT99, Ikgiansintang, Alzheimer's disease

I. 緒 論

치매란 기억력감퇴, 학습장애, 언어장애, 시공간 기능장애, 실행증과 판단력의 저하, 무관심 및 행동장애 등의 임상증상을 포괄하는 뇌질환이며, Alzheimer's disease(A-D), Vascular dementia(VD), 혼합형 치매 등의 유형이 있다¹⁻³⁾.

이 중 AD는 진행성치매로 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovascular degeneration) 등을 특징으로 한다³⁻⁶⁾.

AD의 원인에 대한 가설은 다양하게 제시되고 있는데⁷⁻⁹⁾, 대표적인 원인설로는 신경반 구조의 주된 구성성분이며 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 잘려 나온 amyloid β protein(A β)이 뇌에 축적이 되면 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극해 신경세포를 손상시켜 결과적으로 치매의 증상을 유발시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻⁵⁾.

그러나 최근에는 베타 아밀로이드 전구 단백질의 대사물인 c단 단백질(carboxyl terminal fragment of APP)이 A β 보다 더 독성이 있다고 알려져 있어서¹⁶⁻⁸⁾, c단 단

백질과 AD에 대한 연구가 활발히 진행 중이다¹⁹⁻²¹⁾.

한의학에서 치매는 明代 《景岳全書》²²⁾와 清代 《辨證奇門》²³⁾에 상세하게 기술되어 있으며, 역대문헌에서는 呆病, 癡狂症, 虛勞, 健忘 등의病症에서 찾아 볼 수 있으며²⁴⁾, 稟賦不足, 肝腎虧虛, 情志所傷, 痰濁阻竅, 瘀阻腦臟 등의 원인에 의해 발생되고, 神志淡漠, 寡言小語, 終日不語, 閉戶獨處, 言辭顛倒, 忽笑忽哭 등의 증상을 나타내며 각각의 원인에 따라 補益精氣, 益腎健腦, 化痰宣竅, 活血通竅 등의 치법이 응용된다^{23,25-9)}.

이에 저자는 《東醫寶鑑》³⁰⁾에 수록되어 心虛로 인한 多夢, 恍惚, 驚悸 등을 치료하는 益氣安神湯의 수추출물을 이용하여 CT99 발현 신경 세포주에서 치매와 동일한 신경상해를 유발하고 이에 대한 신경보호 및 항치매 효과에 관한 실험연구를 수행하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試料의 調製

실험에 사용한 益氣安神湯은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1000g에 증류수 10 l를 넣고 2~4회 용매 추출하고 분리된 수추출액을 증발 농축한 후 동결건조 분말상태로 만들어 165g을 회수하여 사용 전 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며, 처방의 구성은 《東醫寶鑑》³⁰⁾을 기준으로 하였고 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Ikgiansintang

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix from China</i>	4.0
茯神	<i>Poria</i>	4.0
生地黄	<i>Rehanniae Radix</i>	3.2
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	3.2
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	3.2
遠志(蜜炙)	<i>Polygalae Radix</i>	3.2
人參	<i>Ginseng Radix</i>	3.2
黃芪(蜜炙)	<i>Astragali Radix</i>	3.2
天南星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	3.2
竹葉	<i>Phyllostachys Folium</i>	3.2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix from Vietnam</i>	1.6
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	1.6
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	4.0
大棗	<i>Jujubae Fructus from Korea</i>	4.0
Total amount		44.8

2) 試藥 및 機器

실험에 사용된 시약중 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin, lipofectin은 Gibco BRL Co.(USA)에서, MTT(3-[4,5-dimethiozol-2-y]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), 1,1--diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), sodium nitrite는 Sigma Co.(USA)에서, N',N--dimethyl formamide는 Amresco Co.(USA)에서, H2DCFDA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein)는 Molecular Probes Co.(-

USA)에서, MeOH는 Merck(Germany)에서 구입하여 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기 중에서 CO2 incubator(VS-9108 MS)는 Vision scientific Co.(Korea), phase-contrast microscope는 Olympus Co.(Japan)와 GEMINI avoidance system Co.(USA), confocal microscope는 Leica Microsystems Heidelberg GmbH Co.(Germany), evaporator는 Elyla Co.(Japan), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader는 B-

io-Red Co.(USA), Fluorescan Ascent FL 은 Thermo Lab system Co.(Finland)의 제품을 사용하였다.

2. 方法

1) pCT99 형질을 이입시킨 세포주의 배양

실험에 사용한 Neuro 2A 세포주는 서울대학교 암연구소 세포주 은행(서울, 한국)으로부터 분양 받아 계대 배양시켜 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT99의 플라스미드를 본 실험에 사용할 세포주에 구축하기 위해 형질이입을 수행하였다. 형질이입은 103 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 한 다음 반응액 A로 pCT99 2 μ g과 serum free medium(SFM) 100 μ l를 혼합하고 반응액 B로 lipofectin 10 μ l와 SFM 100 μ l을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시켰다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간 정도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 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 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 세포 생존도 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 103세포수로 9-6-well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 다음 益氣安神湯군은

15, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 6시간 후에 MTT(3-[4,5-dimethiazol-2y]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 20 μ l를 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50 μ l를 첨가하고 실온에서 30분 이상 반응을 시켜 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA reader의 A570/A630nm에서 흡광도를 측정하였고 상기 세포가 배양된 48-well plated에 0.4% trypan blue 염색액을 첨가하여 5분후 hemacytometer에 분주하여 dye uptake된 세포수를 조사하였다.

3) 신경세포의 peroxynitrite 생성도 측정

정상군(NOR), CT99 형질을 이입시킨 대조군(CT99), 대조군에 益氣安神湯 수추출물을 처리한 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 益氣安神湯군은 15, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 peroxynitrite의 세포내 생성도를 검정하기 위해 형광물질인 DHR123를 사용하였다. DHR123가 산화되면 형광물질인 rhodamine이 되는데 이 경우 DHR123는 NO에 의해 산화되지 않으나 peroxynitrite에 의해 산화가 일어나기 때문에 rhodamine이 형성되는 것을 대상으로 CT99에 의한 세포내의 peroxynitrite의 생성정도를 측정할 수 있다. 반응 후 공초점 현미경(488nm/525nm)으로 관찰하고 양적 측정은 형광 microplate reader로 492nm/535nm에서 시행하였다.

4) 세포내 nitrotyrosine 생성도 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 104세포수로 4--well chamber slide에 분주하고, 하룻밤 배

양한다. 益氣安神湯군은 $50\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 nitrotyrosine의 세포내 생성도를 측정하기 위해 세포를 실온에서 10% neutral-buffered formalin용액으로 30분간 고정한 다음 TBST용액으로 blocking시켰다. 일차 항체인 antinitrotyrosine antibody로 표지하고 PBS로 세척한 다음 2차 항체인 FITC-conjugated antibody로 1시간 반응시켜 공초점 현미경($492\text{nm}/535\text{nm}$)으로 관찰하였다.

5) 신경세포의 미토콘드리아 막전위 ($\Delta\Psi\text{m}$) 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 104세포수로 4-well chamber slide에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 益氣安神湯군은 $50\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였다. 세포의 미토콘드리아 막전위를 측정하기 위해 소수성 탐지자인 $10\mu\text{g/ml}$ JC-1이 막전위에 응집이 일어나 적색으로 나타나는지의 유무를 37°C 에서 10분간 공초점 현미경으로 관찰하였고, $\Delta\Psi\text{m}$ 의 양을 측정하기 위해 150nM TMRE(tetramethylrhodamine ethylester)를 104세포수에 처리하고 30분간 37°C 에서 배양하여 세포를 공초점 현미경($488\text{nm}/590\text{nm}$)으로 측정하였다.

6) 세포내 ROI(Reactive Oxygen Intermediates)의 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 益氣安神湯군은 $50\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 103세포수로 6-well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 후 99.9%의 에탄올에 용해한 $10\mu\text{M}$ DCFDA와 6U/esterase를 혼합하

여 N',N-dimethyl formamide에 용해된 H2DCFDA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein)를 최종농도가 $50\mu\text{M}$ 이 되도록 37°C 에서 15분간 배양한다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받으면 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되고 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 된다. 이 발광된 형광을 공초점 현미경(excitation 488nm /emission 530nm , 200mW)을 이용하여 측정하였다.

7) 세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)의 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 益氣安神湯군은 15 , $50\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 103세포수로 6-well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 후 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase를 -20°C 에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 $10\mu\text{M}$ DCFDA와 6U/esterase를 혼합하여 N',N-dimethyl formamide에 용해된 H2DCFDA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein)를 최종 농도가 $50\mu\text{M}$ 이 되도록 22°C 에서 20분간 배양한 후 실험에 사용하기 전까지 암소에 보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되면 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되는데, 이 발생된 형광을 fluorescent FL(excitation 485nm /emission $5-30\text{nm}$)을 이용하여 측정하였다.

8) 단백질 발현 분석

정상군(NOR), CT99 형질을 이입시킨 대조군(CT99), 대조군에 益氣安神湯을 처리한 益氣安神湯군(IGA)으로 구분하여 益氣安神湯군은 15, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 103세포수로 6-well plate에 분주하고 lysis buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 1%(v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂)로 처리하고 추출액 30 μ g을 10% polyacrylamide SDS gels(SDS-PAGE)로 용출한 후 Immobilon-P membrane에 옮겼다. 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence(ECL)로 발색시켜 확인하는데, antibody를 일차적으로 일차항체인 APP, Bcl-X, AKT, tubulin으로 표지하고 PBS로 세척한 다음 blotting 용액을 첨가하여 부반응을 제거한 후 이차항체인 Horseradish Peroxidase-conjugate anti-goat IgG(HRP) 항체를 표지하고 ECL blotting reagent로 3분간 배양하고 chemiluminescence은 30-sec에서 20분간 X-ray film에 노출시켜 발색정도를 통해 단백질의 발현을 확인하였다.

9) 통계처리

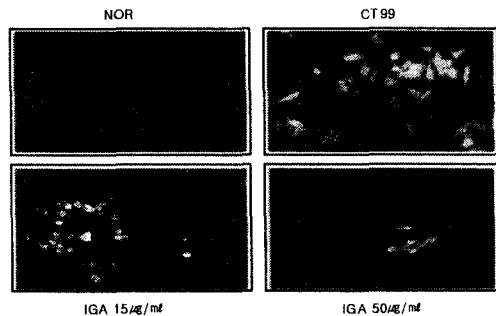
모든 실험은 3회 이상 수행하였고, 실험 결과는 대조군에 대한 백분율 및 mean \pm -S.D로 나타내었고, 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. CT99 발현에 의한 신경세포의 형태학적 변화

정상군에 비해 대조군에서 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. GFP(grafted) 융합시킨 상태에서 형광현미경으로 관찰한 결과 정상군에서는 발현된 것이 거의 없으나 대조군에서는 강하게 발현되었으며, 益氣安神湯군에서는 15, 50 μ g/ml 농도에서 발현이 감소되었다. 특히 50 μ g/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 녹색형광의 발현이 크게 감소되었다(Fig. 1).

Fig 1) Protective effects of IGA on the CT99-induced apoptosis



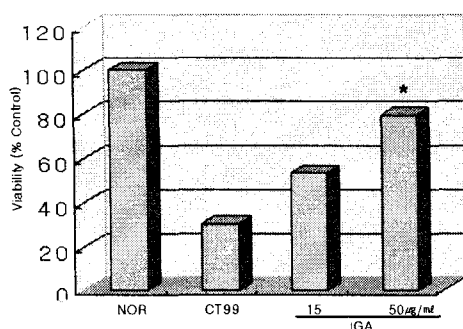
NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA15 μ g/ml(CT99+IGA15 μ g/ml); IGA50 μ g/ml(CT99+IGA50 μ g/ml). Representative images from three independent experiments are shown.

2. CT99 발현이 신경세포의 세포사에 미치는 영향

신경세포의 세포사가 益氣安神湯에 의

해 어느 정도 억제되는가를 알아본 결과 생존율이 정상군과 대조군에서 각각 97.0 ± 2.0 , $25.0 \pm 3.0\%$ 로 나타난 반면, 益氣安神湯군은 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 47.0 ± 2.0 로 나타났고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $77.0 \pm 1.0\%$ 로 유의성 있게 나타났다(Fig. 2).

Fig 2) Survival ratio on the CT99-induced apoptosis by IGA

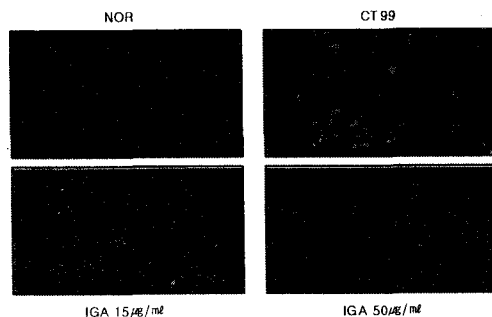


Quantitative data on the proportion of CT99-GFP positive cells are provided on the histogram. Significantly different between the groups(* $p < 0.05$). Representative images from three independent experiments are shown.

3. CT99 발현이 신경세포의 peroxynitrite 발생에 미치는 영향

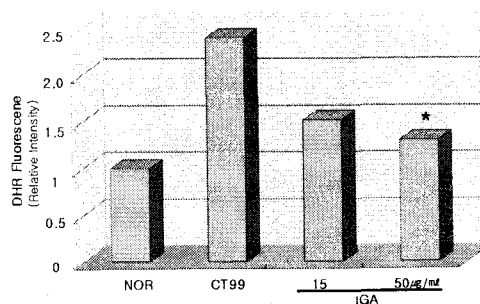
정상군에서는 반응된 것이 없으나 대조군은 강한 녹색형광을 나타내었고 益氣安神湯군에서는 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 녹색형광이 감소하고 특히 $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는 크게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 양적인 변화는 peroxynitrite 발생이 정상군과 대조군에서 각각 0.85 ± 0.02 , 2.35 ± 0.01 이었으며, 益氣安神湯군에서는 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 1.35 ± 0.05 로 나타났고 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 1.21 ± 0.02 로 유의성 있게 나타났다(Fig. 4)

Fig 3) Effect of IGA on the CT99-induced peroxynitrite production.



NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA15($\mu\text{g/ml}$)(CT99+IGA15 $\mu\text{g/ml}$); IGA50($\mu\text{g/ml}$)(CT99+IGA50 $\mu\text{g/ml}$). Representative images from three independent experiments are shown. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods.

Fig 4) Production of peroxynitrite by relative intensity of DHR fluorescense

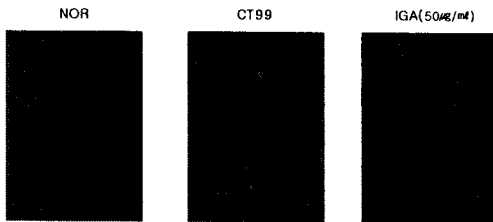


Quantitative analysis of the of the DHR fluorescence intensity after each treatment. Representative images from three independent experiments are shown. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods. Data are means \pm S.D(n=6).

4. CT99 발현이 신경세포의 nitrotyrosine에 미치는 영향

정상군에서는 녹색형광의 발현이 전혀 나타나지 않았으나 대조군은 nitrotyrosine의 생성을 나타내는 녹색형광의 발현이 증가하였으며, 益氣安神湯군은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 녹색형광의 발현이 크게 감소하였다 (Fig. 5)

Fig 5) Effect of IGA on the CT99-induced nitrotyrosine formation

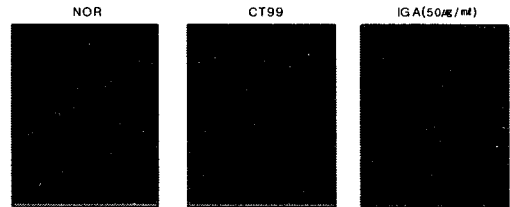


NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CT99+IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Representative confocal micrographs of nitrotyrosine-derived fluorescence. Representative images from three independent experiments are shown.

5. CT99 발현이 신경세포의 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

정상군에서는 약하게 적색형광이 관찰되었으나 대조군에서는 세포사가 일어나기 위한 환경으로 미토콘드리아 막전위의 교란으로 생기는 탈분극으로 적색형광이 소실되었다. 반면 益氣安神湯군에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 적색형광의 발현이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6).

Fig 6) Effect of IGA on the mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)

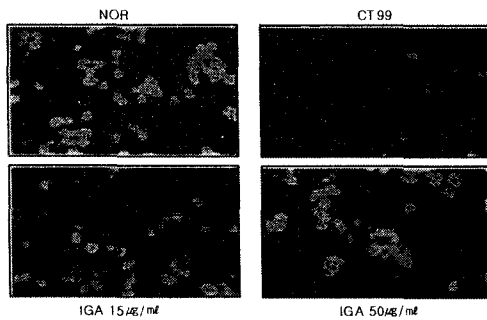


$\Delta\Psi\text{m}$ was assessed with the signal from J-aggregate JC-1 fluorescence, as described in materials and methods. Neuro 2A cells as Normal; CT99-induced; CT99-induced+IGA(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6. CT99 발현이 신경세포내 TMRE 생성에 미치는 영향

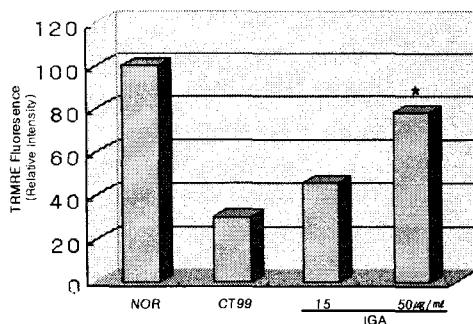
정상군에서는 TMRE에 의한 적색형광이 강하게 보인 반면 대조군에서는 막전위가 탈분극화 되면서 기능이 소실되므로 TMRE의 유입이 감소되어 적색형광이 감소하였다. 益氣安神湯군은 15, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 적색형광이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7). 또한 형광강도는 정상군에서 97.0 \pm 2.0으로 나타났고 대조군에서는 26.0 \pm 2.0이었으며, 益氣安神湯군은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 41.0 \pm 1.0으로 나타났고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 77.0 \pm 1.0으로 유의성 있게 나타났다(Fig. 8)

Fig 7) Effect of IGA on TMRE fluorescence by mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$)



TMRE fluorescence was monitored to confirm the changes in $\Delta\Psi_m$. $\Delta\Psi_m$ was assessed with the signal from J-aggregate JC-1 fluorescence, as described in materials and methods. NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CT99+IGA 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$); IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CT99+IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Fig 8) Relative intensity of TMRE fluorescence on CT99-induced neuro 2A cells



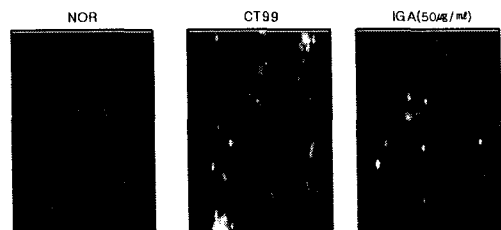
$\Delta\Psi_m$ was assessed based on the TMRE fluorescence as described under

material and methods. Quantitative analysis of the TMRE fluorescence intensity after treatment with CT99 induction in the absence or presence of IGA. Representative images from three independent experiments are shown. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods. Statistically significant value compared with CT99 control group. data by t-test(* $p < 0.05$).

7. CT99의 발현이 신경세포의 ROI 발생에 미치는 영향

정상군에서는 녹색형광이 관찰되지 않았고 대조군은 녹색형광의 발현이 많이 일어났으며, 益氣安神湯군은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 녹색형광의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 9).

Fig 9) Protective effect of IGA on CT99-induced intracellular ROI accumulation

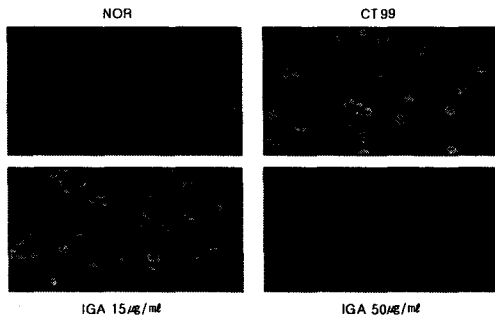


Intracellular peroxide levels were determined based on the DCF fluorescence, as described in material and methods. NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CT99+IGA50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

8. CT99의 발현이 신경세포의 ROS 발생에 미치는 영향

정상군에서는 녹색형광이 관찰되지 않았고 대조군은 녹색형광이 크게 나타났으며, 益氣安神湯군은 15 μ g/ml에서 녹색형광이 다소 감소하였고, 특히 50 μ g/ml에서는 녹색형광이 많이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 10).

Fig 10) Effects of IGA on the CT99 induced intracellular ROS accumulation

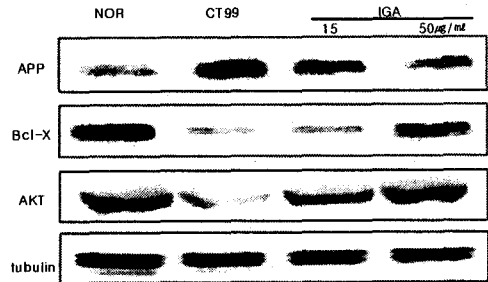


NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA15 μ g/ml(CT99+IGA15 μ g/ml); IGA50 μ g/ml(CT99+IGA50 μ g/ml). Those images show DCF-derived fluorescence in each group. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods. Photographs are representative of three independent experiments.

9. CT99 발현이 신경세포의 단백질 발현에 미치는 영향

정상군에서는 Bcl-X, AKT, tubulin 단백질이 강하게 발현되는데, 대조군은 발현이 억제되었으며, 益氣安神湯군은 15, 50 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 11).

Fig 11) Effects of IGA on the induction of apoptosis in CT99-induced neuro 2A cells



NOR(normal); CT99(Neuro 2A cells induced to CT99 for 24hrs); IGA15 μ g/ml(CT99+IGA15 μ g/ml); IGA50 μ g/ml(CT99+IGA50 μ g/ml). They harvested for Western blot analysis. Effects of IGA on the levels of APP, Bcl-X and AKT. Tubulin levels measured to ensure equal amounts of protein loading. Representative blots from three independent experiments are shown. Representative images from three independent experiments are shown.

IV. 考 察

인구증가와 인류의 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환을 비롯한 여러 가지 의학적 문제점들이 사회문제로 대두되고 있다³¹⁻²⁾.

치매는 인간의 노화와 뇌의 퇴행성 병변과 관련되어 있는데, 뇌의 노화는 신경세포수의 감소 및 위축과 함께 신경원섬유의 조직병리학적 변화가 나타나며, 이외에

도 신경전달물질 감소와 금속이온 축적 등과 같은 생화학적 변화를 일으킨다^{9,33)}.

Alzheimer's disease(AD)는 노인성 치매의 높은 비율을 차지하고 있으며, 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견인 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration) 등을 특징으로 한다^{3, 6)}.

AD는 중추신경, 특히 전뇌, 소뇌편도, 해마, 대뇌피질과 변연계의 신경과피로 일어나는데, 이런 부분들은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 해마와 대뇌피질의 신경과피가 AD의 기억력 장애와 사고능력의 저하와 관계가 많다³⁴⁾.

AD의 중요한 병변은 42~43개의 아미노산으로 구성된 β -amyloid peptide(A β)가 세포 밖에 침착하여 신경반을 형성하는 것인데, A β 가 세포독성을 나타내기 때문에 A β 는 AD의 발병기전에 있어 많은 관심을 끌고 있다³⁵⁾.

A β 는 21번 chromosome의 single gene에 encode된 amyloid precursor protein(APP) family로부터 유래되는데, APP는 다양한 molecular weight form이 있으며 A β sequence를 포함한 가장 풍부한 APP는 함유하고 있는 amino acid의 수에 따라 명칭이 결정된다. 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질의 일부가 β -secretase나 γ -secretase에 의해 잘라져서 A β 가 생성 되는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다³⁶⁾. A β 는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 이차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극

하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있으며, 최근에는 APP의 c말단 부위인 c말단 단백질(carboxy-terminal amino acid peptide fragment of APP)이 A β 보다 더 독성이 강하다고 알려지고 있고 A β 와 c말단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 연구가 계속 진행 중에 있다^{37, 43)}.

최근의 연구에서는 c단 단백질 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고⁴⁴⁻⁵⁾, 생체내 실험에서 해마에 있는 long-term potentiation(LTP)을 차단한다고 보고 하였다⁴⁶⁾. 또한 이 단백질은 칼슘 항상성에도 악영향을 미치는데, rat brain microsome에서는 Mg²⁺-Ca²⁺ ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는 Na⁺-Ca²⁺ 교환활성도에 의해 칼슘유입을 억제함으로써 칼슘 항상성을 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다고 하여^{47, 8)}, 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 c단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다^{16, 8)}. 최근에는 c단 단백질과 AD와의 관련성뿐만 아니라 치료제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{19, 21)}.

한의학적으로 치매는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등과 유사한 概念으로 표현되다가²⁴⁻⁵⁾, 明代의 《景岳全書·雜證謨》²²⁾ 癡狂篇에서 구체적으로 病因, 病機 및 治法, 豫後에 대해서 기술되었다⁴⁹⁾. 또한 清代 陳士澤은 현대의학에 말하는 치매와 유사한 개념으로 상세히 기술하였다^{28, 49)}.

치매의 원인은 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 나누어 볼 수 있으며, 善忘善恐, 語辭顛倒, 舉動不經, 默

默不言, 不飲不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등의 증상을 나타낸다. 이러한 치매의 다양한 원인 및 증상에 대해 각각 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益腎 등의 처방을 응용한다^{22, 3, 26, 49-51)}.

益氣安神湯은 《東醫寶鑑》³⁰⁾에 수록되어 있는 처방으로 七情六淫의 相感으로 心虛하여 나타나는 多夢, 恍惚, 驚悸 등의 증상을 치하는 처방으로 當歸, 茯神, 生地黃, 麥門冬, 酸棗仁, 遠志, 人蔘, 黃芪, 南星, 竹葉, 甘草, 黃連, 生薑, 大棗 등으로 구성되어 있는데, 當歸는 補血和血하고 茯神은 滲濕利水, 寧心安神하며, 生地黃은 清熱滋陰하고 麥門冬은 清心除煩, 益胃生津하며, 酸棗仁은 養心安神하고 遠志는 寧心安神, 祛痰利竅하며, 人蔘은 大補元氣, 安神益智하고 黃芪는 益氣升陽하며, 南星은 燥濕化痰하고 竹葉은 清熱除煩하며, 甘草는 補中益氣하고 黃連은 清熱燥濕하며, 生薑은 緩解藥毒하고 大棗는 補脾和胃한다⁵²⁻³⁾. 위의 약물들 중 當歸, 茯神, 酸棗仁, 遠志, 人蔘, 黃芪, 黃連 등은 뇌세포의 허혈 및 퇴화로 인한 손상에 효과가 있는 것으로 알려져 있어 益氣安神湯이 신경보호 및 항치매에 대한 의의가 있을 것으로 생각된다.

최근의 치매에 대한 한의학적 기초연구에서 단일약물로는 石菖蒲와 遠志, 山查肉, 黃芩, 天麻, 玄胡索 등이 각각 항치매 및 항노화에 효과가 있음을 규명하였다⁵⁴⁻⁷⁾. 또한 복합처방을 이용한 연구로 정⁵⁸⁾과 황⁵⁹⁾은 左歸飲 및 右歸飲, 蘇合香元 등이 뇌의 노화에 미치는 영향에 대한 연구를 진행하여 왔고, 轉呆丹⁶⁰⁾, 指迷湯⁶¹⁾의 CT105로 유도된 치매 병태 모델에 대한 연구, 蔘茸地黃湯⁶²⁾, 洗心湯⁶³⁾, 溫膽湯⁶⁴⁾, 還少丹⁶⁵⁾ 등의 뇌조직의 抗酸化作用에 대한 연구

및 調胃升清湯⁶⁶⁾, 荊防地黃湯⁶⁷⁾, 香附子八物湯⁶⁸⁾의 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 연구가 있다. 또한 치매의 병리학적인 연구에서 강²⁵⁾은 치매의 老化和 遺傳的 要因이 腎虛와 밀접한 관계가 있고 Aβ와 tau 단백질과 같은 비정상적인 plaque는 痰濁 및 瘀血 등과 관련된다고 하였다. 이 외에도 노화를 억제하는 항산화작용에 대한 연구⁶⁹⁻⁷⁰⁾, 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 연구⁶²⁾, 腦성상세포로부터 분비되는 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1의 억제연구 및 Aβ의 생성억제에 관한 연구⁶⁴⁻⁵⁾가 보고되었으며, AD의 관련인자인 APP와 presenilin(PS)유전자의 과다발현세포주를 이용한 한약물 연구⁶⁵⁾에 까지 이르렀으나 益氣安神湯 수추출물을 이용하여 CT99 발현 신경 세포주에서의 신경보호 및 항치매 효과에 대한 연구는 아직 수행되지 않았다.

이에 저자는 치매 및 퇴행성 뇌질환에 효과가 있을 것으로 생각되는 益氣安神湯의 항치매 효과를 규명하기 위해 CT99 발현 신경세포주에서 신경세포의 형태학적 변화, 세포사에 미치는 영향, peroxynitrite 발생에 미치는 영향, nitrotyrosine에 미치는 영향, 미토콘드리아 막전위 및 T-MRE 생성에 미치는 영향, ROI 발생에 미치는 영향, ROS 발생에 미치는 영향 및 단백질발현에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

CT99 발현으로 인한 신경세포의 형태학적변화를 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군에서는 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. GFP(green fluorescence prot-

ein) 형광유전자를 융합시킨 상태에서 형광현미경하에서 관찰한 결과 정상군에서는 발현된 것이 거의 없으나 대조군에서는 강하게 발현되었으며, 益氣安神湯군에서는 15, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 발현이 감소되었다. 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 녹색형광의 발현이 크게 감소하였다(Fig. 1).

신경세포의 세포사가 益氣安神湯에 의해 어느 정도 억제되는가를 알아본 결과 생존율이 정상군과 대조군에서 각각 97.0 \pm 2.0, 25.0 \pm 3.0%로 나타난 반면, 益氣安神湯군은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 47.0 \pm 2.0%로 나타났고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 77.0 \pm 1.0%로 유의성 있게 나타났다(Fig. 2). 이상에서 볼 때 益氣安神湯은 신경세포사의 세포사를 억제하고 생존을 유도하는 것으로 생각된다.

세포내 peroxynitrite 생성은 세포사를 유도한다. DHR123은 소수성으로 세포막으로 쉽게 확산해서 들어갈 수 있는데, 이것이 산화되면 형광물질인 rhodamine이 되며 DHR123은 NO에 의해 산화되지 않으나 peroxynitrite에 의해 산화가 일어나기 때문에 rhodamine이 형성되는 것이다. 세포내 peroxynitrite의 생성정도를 측정할 결과 정상군에서는 반응된 것이 없으나 대조군은 강한 녹색형광을 나타내었고 益氣安神湯군에서는 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 녹색형광이 감소하고 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 크게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 양적인 변화는 peroxynitrite 발생이 정상군과 대조군에서 각각 0.85 \pm 0.02, 2.35 \pm 0.01이었으며, 益氣安神湯군에서는 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 1.35 \pm 0.05로 나타났고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 1.21 \pm 0.02로 유의성 있게 나타났다(Fig. 4).

이는 益氣安神湯이 신경세포의 세포사를 유도하는 peroxynitrite의 생성을 저해하여 세포사를 억제하는 것으로 생각된다.

신경세포의 nitrotyrosine 발생을 측정할 결과 정상군에서는 녹색형광의 발현이 전혀 나타나지 않았지만 대조군은 nitrotyrosine의 생성을 나타내는 녹색형광의 발현이 증가하였으며, 益氣安神湯군은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 녹색형광의 발현이 크게 하게 감소하였다(Fig. 5). 이는 益氣安神湯이 막 단백질의 인산화를 방해하여 세포사를 억제하는 것으로 생각된다.

소수성 탐지자인 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ JC-1는 정상 세포에서 막전위에 응집을 일으켜 적색을 나타내는데, 세포사가 일어나기 위한 환경으로 미토콘드리아의 막전위가 교란되면 탈분극으로 인해 적색이 소실된다. 정상군은 약하게 적색형광이 관찰되지만 대조군은 형광이 소실된 반면, 益氣安神湯군은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 전위가 회복되어 적색형광이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6).

TMRE는 미토콘드리아의 막의존성으로 축적되는데, 정상세포는 막전위의 교란이 발생되지 않으므로 미토콘드리아로의 TMRE의 유입이 원활하나 세포사가 진행되면 세포의 생존에 치명적인 세포소기관의 파괴를 야기하므로 TMRE의 유입이 일어나지 않게 된다. 정상군에서는 TMRE에 의한 적색형광이 강하게 보인 반면 대조군에서는 막전위가 탈분극화 되면서 기능이 소실되므로 TMRE의 유입이 감소되어 적색형광이 감소하였으나, 益氣安神湯군은 15, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 적색형광이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7). 또한 형광강도는 정상군에서 97.0 \pm 2.0으로 나타났고 대조군에서는 26.0 \pm 2.0이었으며, 益氣安神湯

군은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 41.0 \pm 1.0으로 나타났고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 77.0 \pm 1.0으로 유의성 있게 나타났다(Fig. 8). 이상에서 보면 益氣安神湯이 세포의 손상으로 인한 미토콘드리아 및 세포소기관의 손상을 저해하여 신경세포의 세포사를 억제하는 것으로 생각된다.

신경세포가 손상되면 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되고 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로 발광되는데, 세포내 ROI를 측정할 결과 정상군에서는 녹색형광이 관찰되지 않았고 대조군은 산화가 강하게 일어나 녹색형광의 발현이 크게 나타났으며, 益氣安神湯군은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 녹색형광의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 9). 또한 ROS를 측정한 결과 정상군에서는 녹색형광이 관찰되지 않았고 대조군은 산화가 일어나 녹색형광이 크게 나타났으며, 益氣安神湯군은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 녹색형광이 다소 감소하였고, 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 녹색형광이 강하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 10). 이는 ROI 및 ROS의 발생에 억제효과를 보인 것으로 益氣安神湯이 신경세포에 대한 항산화효과를 가진 것으로 생각된다.

신경세포의 생존에 관여하는 Bcl-X, AKT, tubulin 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 정상군에서는 신경세포의 성장에 관여하는 Bcl-X, AKT, tubulin 단백질이 강하게 발현되는데, 대조군은 발현이 억제되었으며, 益氣安神湯군은 15, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 11). 이는 益氣安神湯

이 세포사의 진행을 억제하여 세포막 주변 소기관의 기능을 회복시켜 신경세포의 파괴를 억제하고 세포사를 보호하는 것으로 생각된다.

V. 結 論

益氣安神湯의 신경세포 상해와 치매에 대한 효과를 규명하기 위해 CT99 발현 신경 세포주를 이용하여 치매와 동일한 신경 세포사를 유도한 후 얻은 실험결과는 다음과 같다.

1. 益氣安神湯은 신경세포의 세포사를 감소시키고 신경세포의 생존율을 유의성 있게 증가시켰다.
2. 益氣安神湯은 신경세포의 세포사를 유도하는 peroxynitrite의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
3. 益氣安神湯은 nitrotyrosine의 발생을 방해하여 막 단백질의 인산화로 인한 세포사를 억제하였다.
4. 益氣安神湯은 미토콘드리아와 세포소기관의 손상을 저해하여 신경세포의 세포사를 유의성 있게 억제하였다.
5. 益氣安神湯은 ROI 및 ROS의 생성을 억제하여 신경세포에 대한 항산화 효과를 나타내었다.
7. 益氣安神湯은 Bcl-X, AKT, tubulin 단백질 발현을 촉진하여 신경세포의 파괴

와 세포사를 억제하였다.

이상을 종합해 보면 益氣安神湯은 C-T99 발현 신경 세포주에서의 세포사에 대해 뚜렷한 억제효과를 보이고 있어 치매 및 기타 뇌의 퇴행성 변화에 대해 효과가 있을 것으로 추정되며, 향후 益氣安神湯을 이용한 임상 및 실험적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣. 1994:63-6.
2. 배철영. 老人醫學. 서울:高麗醫學. 1996 :193-209.
3. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256-71, 327-30, 663-4.
4. 김승엽. 치매, 알츠하이머병. 서울:삶과꿈. 1997:54-80.
5. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutouian 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.
6. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1(SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. *Nat Genet.* 1995;11(2):219-22.
7. 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):12-37-9.
8. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 1998;33(5):371-8.
9. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, OSSa J, Hincapie L, et al. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation producers increased A β 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996;2(10):114-6-50.
10. Tabaton M, Cammarata S, Mandylbur T, Richy 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.
11. Dickson DW, Ksiezak-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.
12. 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.
13. Dennis J. Selkoe. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*. 1998;8(11):447-53.
 14. 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):5-32-7.
 15. Kelly E. Gridley, Pattie S. Green, James W. Simpkins. Low concentrations of estradiol reduce β -amyloid(25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Research*. 1997;778(1):158-65.
 16. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djangoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ gradients. *Neuroreport*. 2000;11(15):3-357-60.
 17. 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.
 18. Lee JP, Chang KA, Kim HS, Kim SS, Jeong SJ, Suh YH. APP carboxyl-terminal fragment without or with Abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2000;60(4):565-70.
 19. 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):1508-17.
 20. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, et al. Effects of nicotine on APP secretion and A beta or CT(105)-induced toxicity. *Biol Psychiatry*. 2001;49(3):240-7.
 21. 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.
 22. 張介賓. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社. 1985:573-8.
 23. 錢鏡湖. 辨證奇門全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
 24. 정인철. 이상룡. 癡呆에 대한 文獻的 考察. 東醫神經精神科學會誌. 1996;7(1):77-94.
 25. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 癡呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 서울:동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.
 26. 黃大東. 實用中醫內科學. 上海:上海科學

- 技術出版社. 1989:378-81.
27. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 韓醫學적 임상연구. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):1-13.
 28. 陳士鐸. 辨證錄. 서울:醫聖堂. 1989:24-1-6.
 29. 全國韓醫科大學心系內科學教室 編. 心系內科學. 서울:서원당. 1999:481-5.
 30. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1998:115.
 31. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-8.
 32. 李東垣 外. 痴呆에 關한 東西醫學의 比較 考察. 大韓韓方內科學會誌 1995;16(1):2-5, 11, 14.
 33. 이근후. 精神科 영역에서의 痴呆. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):25-7.
 34. Davis, P., Maloney, A.J.F.. Selective loss of cholinergic neurones in Alzheimer's disease, Lancet. 1976;2:1403.
 35. Ray WJ, Ashall F, Goate AM. Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease, Mol Med Today, 1977;25(1):70-84.
 36. Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, et al. Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid β -protein production in human neural NT2N cells. J Biol Chem. 1995;270:4916-22.
 37. 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;61:33-5-46.
 38. Russo C, Salis S, Dolcini V, Venezia V, Song XH, Teller JK, Schettini G. Amino-terminal modification and t-tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. Neurobiol Dis. 2001;8(1):173-80.
 39. SP Fraser, YH Suh, YH Chong and M.B.A. Djamogz. Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the C-terminal fragment of the beta-amyloid precursor protein. J. Neurochemistry. 1996;66:2034-40.
 40. SP Fraser, YH Chong and M.B.A. Djamogz. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and metabolic fragment, Trends Neurosci. 1997;20:67-72.
 41. SJ Jeong, HS Kim, KA Chang, DH Geum, CH Park, JH S대, JC Choi, SG Lee, K kim, and YH Suh. Involvement of Presenilin 1&2 in cell cycle : association with tublin- β . F-ASED. 2000;14(14):2171-6.
 42. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. Immunological aspects of Alzheimer's disease : therapeutic implications, Biodrugs, 2001;15(5):325-7.
 43. Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid

- catabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 20-00:924:81-90.
44. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 1996;67:1172-82.
 45. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH. Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein(β APP) in PC12 cells by nicotine. *Molecular Pharmacology.* 1997;52:430-6.
 46. 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):3213-7.
 47. 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):38-75-9.
 48. 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;10:113-6.
 49. 閔孝誠 主編. 實用中醫腦病學, 北京:學苑出版社. 1993;242-54, 784-91.
 50. 楊思澎 외. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:224-30.
 51. 中醫研究院 主編. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京:人民衛生出版社. 1987:73.
 52. 이상인 외. 本草學. 서울:永林社. 1994:136, 166, 180, 190, 302, 450, 493, 496, 531, 534, 540, 542, 578, 588.
 53. 서부일, 김상찬 감수. 本草集成. 서울:목과토. 2000:31, 88, 111, 130, 319, 600, 676, 680, 741, 758, 761, 820, 840.
 54. 이금주, 정현우, 강성용. 石菖蒲가 白鼠의 腦연막동맥의 직경에 미치는 기전 연구. 대한본초학회지. 2000;15(2):4.
 55. 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):95-1-08.
 56. 정인철, 이상룡. 山查肉이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):279-86.
 57. 김지현 외. 새로운 제형의 치매치료제의 효능연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):303-8.
 58. 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 效果에 대한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1996;17(1):21-36.
 59. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
 60. 송호상, 박치상, 박창국. CT105로 유도된 인간신경아세포종 세포주에서 轉呆丹의 항치매효과. 대한한의학 방제학회지. 2003;11(2):95-105.
 61. 강승준, 박치상, 박창국. CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 指迷湯의 항치매효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):482-91.

62. 김보경, 이상룡. 蓼苳地黄湯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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 조윤숙, 황의완, 김현택, 박순권. 荊方地黄湯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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.