

# CT99 발현 PC12 세포주에서 가감고본환의 신경보호 및 항치매 효과

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

## Abstract

### Effect of the neuroprotection and anti-Alzheimer's disease in CT99-induced PC12 cells by *Gagamgobonhwan* water extract

Dae-Gwang Ahn, So-Yeon Lee, Hyeon-Deok Yoon, Wo-Cheol Shin, Chang-Gook  
Park, Chi-Sang Park

Department of Oriental Medicine Graduate school of Daegu Haany University  
Gyeongbuk, Korea

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 $\beta$  peptide devided from APP causes apoptotic neurotoxicity in brain. However, recent evidence suggests that CT99 may be an important factor causing neurotoxicity in AD. Mouse PC12 cells expressed with CT99 exhibited remarkable apoptotic cell damage.

We invesgated the protective effects of Gagamgobonhwan water extract(GKG). Findings from our experiments have shown that GKG inhibits the activities of CT99, which has neurotoxicities and apoptotic activities in cell line. In addition, treatment of GKG(75 $\mu$ 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/ 13 수정 : 2005/ 05/ 16 채택 : 2005/ 05/ 25

for 24 hours) partially prevented CT99-induced cytotoxicity in PC12 cells.

As the result of this study, in GKG group the apoptosis in the nervous system was inhibited, the repair against the degeneration of PC12 cells by CT99 expression is promoted. Taken together, GKG exhibited inhibition of CT99-induced apoptotic cell death. GKG may be beneficial for the treatment of AD.

Key Word : Sodium Cyanide, *Gakamgobonhwan*, Anti-Dementia, CT99, PC12 cells, anti-Alzheimer's disease

## I. 緒 論

치매는 여러 가지 원인에 의해 야기되는 지능저하를 특징으로 하는 중후군으로 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포괄하는 고도의 대뇌기능 장애를 말하는 것으로 Alzheimer's disease, 혈관성 치매(Vascular dementia), 혼합형 치매 등의 유형이 있다<sup>1-3)</sup>.

Alzheimer's disease(AD)는 치매 중에 많은 비중을 차지하며 뇌의 전반적 위축과 뇌조직의 세 가지 특징적인 병리학적 소견, 즉 노인반(senile plaque)과 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 과립공포 변성(granulovascular degeneration) 등의 조직학적 소견을 보이고 초로기에 발생하는 진행성 치매, 양호한 人格의 保持, 病所 증상과 椎體外路증상을 특징으로 한다<sup>4-6)</sup>.

AD의 원인에 대한 가설은 다양하게 제시되고 있는데(7-9), 대표적인 원인설로는 신경반 구조의 주된 구성성분이며 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 잘려 나온 amyloid  $\beta$  protein(A $\beta$ )이 뇌에 축적이 되면 glucose

의 부족이나 amino toxicity를 자극해 신경세포를 손상시켜 결과적으로 치매의 증상을 유발시키는 것으로 알려져 있다(10-5). 그러나 최근에는 APP의 일부분인 c단 단백질(carboxy terminal amino acid peptide fragment of APP)이 A $\beta$ 보다 더 독성이 있다고 알려져 있어서(16-8), c단 단백질과 AD에 대한 연구가 활발히 진행 중이다<sup>19-21)</sup>.

한의학에서는 치매를 呆病이라고도 하며 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 증상으로 설명하고 있고 모든 의욕이 癡症보다는 능하지 못하며 心欲이 狂症과 같이 난폭하지 못한 것이라고 하였다<sup>1,22)</sup>.

이에 저자는 《東醫寶鑑·神門》<sup>23)</sup>의 노인의 昏忘과 中風 후의 健忘을 치료하는 加減固本丸이 치매 및 퇴행성 뇌혈관질환에 효과가 있을 것으로 생각되어 이를 규명하기 위해 pCT99로 처리한 PC12 세포주에 치매와 동일한 신경세포의 세포사를 유도하여 이에 대한 효과를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

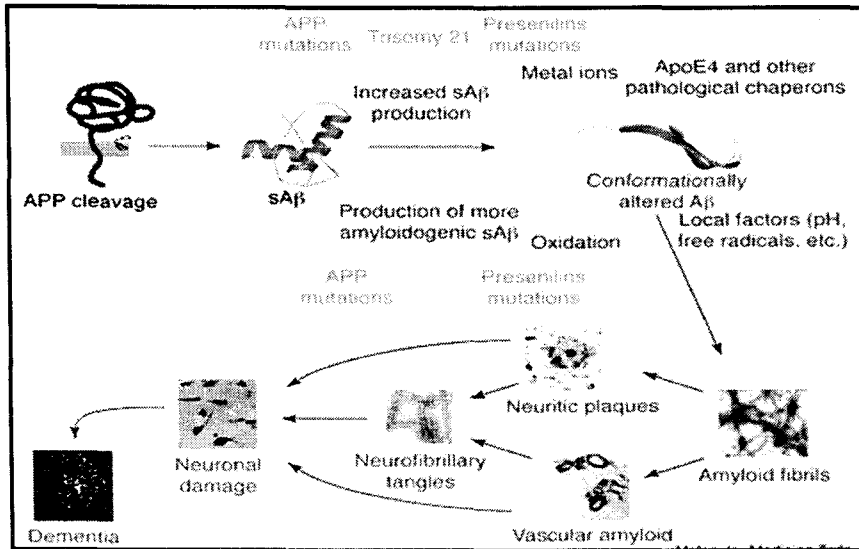


Fig. 1. Production of A $\beta$  from APP and process of causing dementia

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 試料의 調製

실험에 사용한 加減固本丸은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1000g에 증류수 10 l를 첨가 하고 2~4회 용매 추출하고 분리된 수추출액을 증발 농축한 후 동결건조하여 분말상태로 만든 후 126g을 회수하여 사용 전에 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며, 처방의 구성은 《東醫寶鑑》<sup>29)</sup>을 기준으로 하였고 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Gakamgobonhwan*

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
丹 參	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	60
熟地黃	<i>Rehmannie Radix Preparat</i>	60
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	60
白茯苓	<i>Poria</i>	40
麥門冬	<i>Liriopis Tuber</i>	40
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	40
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	20
遠 志	<i>Polygalae Radix</i>	20
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	20
朱 砂	<i>Cinnabaris</i>	20
Total amount		380

## 2) 試藥 및 機器

실험에 사용된 시약 중 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin, lipofectin은 Gibco BRL(USA)에서, MTT(3-[4,5-dimethiozol-2y-]2,5-diphenyltetrazoliumbromide), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), sodium nitrite는 Sigma(USA)에서, MeOH는 Merck(Germany)에서, N',N-dimethyl formamide는 Amresco(USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기 중에서 CO<sub>2</sub> incubator(VS-9108 MS)는 Vision scientific(Korea), phase-contrast microscope는 Olympus(Japan)와 GEMINI avoidance System(USA), confocal microscope는 Leica Microsystems Heidelberg GmbH(Germany), evaporator는 Elyla, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader는 Bio-Red(USA)의 제품을 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) pCT99의 형질을 이입시킨 세포주의 배양

실험에 사용한 PC12 세포주는 서울대학교 암연구소 한국 세포주 은행으로부터 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 미리 10<sup>3</sup> 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 한 다음 반응

액 A로 pCT99 2 $\mu$ g와 serum free medium(SFM) 100 $\mu$ l을 혼합하고 반응액 B로 lipofectin 10 $\mu$ l와 SFM 100 $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> incubator에서 유지하고 5% RPMI 배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대 배양하면서 G-418 450 $\mu$ g/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

### 2) 신경세포의 생존도 측정

정상군(NOR), CT99 발현 PC12 세포주인 대조군(CT99), 대조군에 加減固本丸을 처리한 加減固本丸군(GKG)으로 구분하여 10<sup>3</sup>세포수로 96-well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 다음 加減固本丸군은 加減固本丸 수추출액을 25, 75 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 6시간후 MTT-(3-[4,5-dimethiozol-2y-]2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20 $\mu$ l을 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50  $\mu$ l을 첨가하고 실온에서 30분 이상 반응을 시켜 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA reader의 A570/A630nm에서 흡광도를 측정하였고 상기 세포가 배양된 48-well plate에 0.4% trypan blue 염색액을 첨가하여 5분 후 hematocytometer에 분주하여 dye uptake된 세포수를 조사하였다.

### 3) TUNEL assay에 의한 신경세포 손상 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 加減固本

丸군(GKG)으로 구분하여  $10^3$ 세포수로 4--well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 다음 加減固本丸군은 加減固本丸 수추출액을 25, 75 $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. 세포주내의 CT99 발현에 의한 DNA 절편화를 in situ death detection kit로 탐지하기 위한 과정으로 실온에서 10% neutral-buffered formalin용액으로 30분간 고정한 다음 실온에서 0.3% NaOH에 반응시키고 4°C에서 0.1% S. citrate와 0.1% Triton X-100이 함유한 TUNEL 반응액으로 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 30분간 peroxidase-conjugated anti-fluorescein anti-goat antibody (Fab fragment)로 표지한 다음 diaminobenzidine으로 염색하고 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척한 후 50% glycerol로 마운팅한 다음 현미경으로 관찰하였다.

#### 4) 신경세포의 peroxynitrite 생성도 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 加減固本丸군(GKG)으로 구분하여  $10^3$ 세포수로 6--well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 다음 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 peroxynitrite의 세포내 생성도를 검정하기 위해 형광물질인 DHR123을 사용하였다. DHR123이 산화되면 형광물질인 rhodamine이 되는데 이 경우 DHR123은 NO에 의해 산화되지 않으나 peroxynitrite에 의해 산화가 일어나기 때문에 rhodamine이 형성되는 것을 대상으로 CT99에 의해 세포내의 peroxynitrite의 생성정도를 측정할 수 있는데, 반응 후 공초점현미경(488nm/525nm)으로 관찰하고 양적 측정은 형광

microplate reader로 492nm/535nm에서 시행하였다.

#### 5) 신경세포의 미토콘드리아 막전위 ( $\Delta\Psi$ m) 및 TMRE 측정

정상군(NOR), 대조군(CT99), 加減固本丸군(GKG)으로 구분하여  $10^4$ 세포수로 4-well chamber slide에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. 세포의 미토콘드리아 막전위를 측정하기 위해 소수성 탐지자인 10 $\mu$ g/ml JC-1이 막전위에 응집이 일어나 적색으로 나타나는지의 유무를 37°C에서 10분간 공초점현미경으로 관찰하였고,  $\Delta\Psi$ m의 양을 측정하기 위해 150nM TMRE(tetramethylrhodamine ethylester)를  $10^4$ 세포수에 처리하여 30분간 37°C에서 배양하고 세포를 공초점 현미경(488nm/590nm)으로 측정하였다.

#### 6) 통계처리

모든 실험의 결과를 세포의 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. 신경세포의 형태학적 변화

정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하였고 GFP(green fluorescence protein)형광유전자를 융합시

킨 상태에서 관찰한 결과 정상군에서는 발현이 전무한 것에 반해 대조군에서는 강한 녹색형광을 보였으며, 加減固本丸군에서는 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 GFP 발현정도와 세포사가 감소되었다. 특히 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 녹색형광이 크게 감소하였다(Fig. 2).

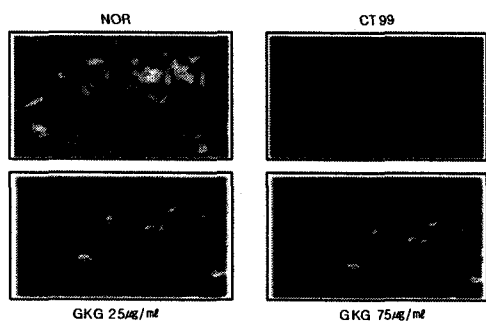
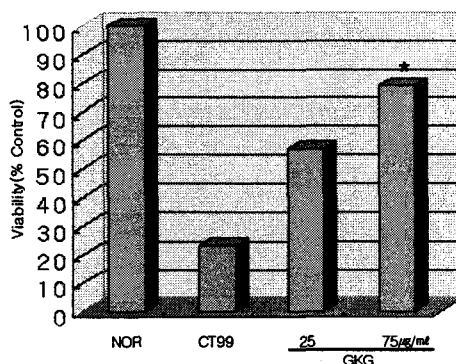


Fig. 2. Protective effect of GKG on the CT99-induced apoptosis. Viable cells determined using trypan blue staining. GKG was added to the medium 12hrs before the CT99 induction. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods. Representative images from three independent experiments are shown.

## 2. 신경세포의 세포사에 미치는 영향

신경세포의 세포사가 加減固本丸에 의해 어느 정도 억제되는 지를 알아본 결과 생존율이 정상군에서는  $97.0 \pm 1.0\%$ 였고 대조군에서는  $21.0 \pm 2.0\%$ 로 나타났으며, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $53.0 \pm 1.0\%$ ,  $76.0 \pm 2.0\%$ 로 나타났다(Fig. 3)

Fig. 3. Survival ratio on the CT99-induced apoptosis by GKG. Quantitative data on



the proportion of trypan blue-positive cells are provided Fig 1. Significantly different between the groups (\* $p < 0.05$ , data are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ )).

## 3. 신경세포의 세포사의 TUNEL assay를 통한 측정

TUNEL assay로 세포사의 보호효과를 확인한 결과 정상군에서는 세포생존이 강하여 반응이 전무하지만 대조군에서는 강한 적색반응이 나타났다. 加減固本丸군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 적색반응이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 강하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

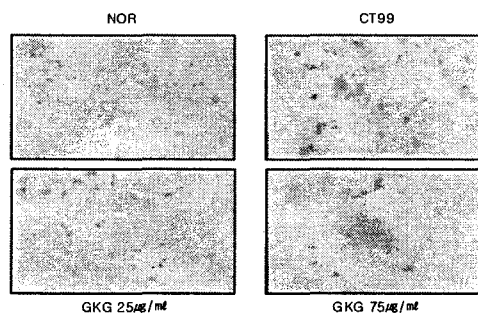


Fig. 4. Protective effects of GKG on the CT99-induced apoptosis by tunnel assay. Effect of GKG on TUNEL assay. Normal,

PC12 cells induced to CT99 for 24hrs; CT99+GKG(25, 75 $\mu$ g/ml). Representative images from three independent experiments are shown. Illumination and image acquisition conditions are given under Material and Methods. Representative images from three independent experiments are shown.

#### 4. 신경세포의 peroxynitrite 발생에 미치는 영향

신경세포의 peroxynitrite 생성 정도를 측정 한 결과 정상군에서는 0.87 $\pm$ 0.03인데 비해 대조군에서는 2.32 $\pm$ 0.02였으며, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 1.58 $\pm$ 0.25, 1.35 $\pm$ 0.05로 나타났다(Fig. 5)

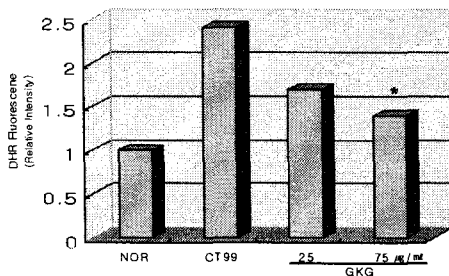


Fig. 5. Relative intensity of DHR fluorescence by peroxynitrite production. Quantitative analysis of the of the DHR fluorescence intensity after treatment with vehicle or CT99-induced in the absence or in the presence of 25 or 75 $\mu$ g/ml GKG for 24 hrs. Representative images from three independent experiments are shown. Illumination and image acquisition conditions are given under material and methods. Significantly different between the groups(\* $p$ <0.05, data are mean-

s $\pm$ S.D(n=6)).

#### 5. 신경세포의 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

정상군에서는 약하게 형광이 관찰되지 만 대조군에서는 세포사가 일어나기 위한 환경으로 미토콘드리아 막전위의 교란으로 생기는 탈분극으로 적색이 소실되었다. 반면 加減固本丸군에서는 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 적색형광이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 6).

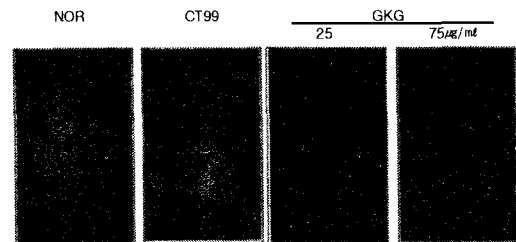


Fig. 6. Change of JC-1 fluorescence on the mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\Psi_m$ ) by GKG.

$\Delta\Psi_m$  was assessed with the signal from J-aggregate JC-1 fluorescence, as described in materials and methods. PC12 cells as Normal;CT99-induced;CT99-induced + GKG (25, 75 $\mu$ g/ml).

## 6. 신경세포내 TMRE 생성에 미치는 영향

정상군에서는 TMRE에 의한 적색형광이 강하게 보인 반면 대조군에서는 막전위가 탈분극화 되면서 기능이 소실되므로 TMRE의 유입이 감소되어 적색형광이 감소하였다. 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 적색형광이 증가하는 경향을 보였다. 형광강도는 정상군에서 96.0 $\pm$ 2.0으로 나타났고 대조군에서는 21.0 $\pm$ 1.0이었으며, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 42.0 $\pm$ 1.0, 63.0 $\pm$ 1.0으로 나타났다(Fig. 7).

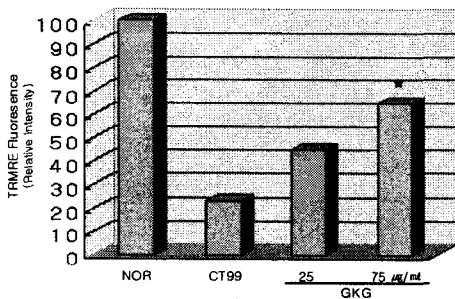


Fig. 7. Relative intensity of TMRE fluorescence on the mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\Psi_m$ ) by GKG. was monitored to confirm the changes in  $\Delta\Psi_m$ .  $\Delta\Psi_m$  was assessed with the signal from J-aggregate JC-1 fluorescence, as described in materials and methods. PC12 cells as Normal; CT99-induced; and CT99-induced + GKG(25, 75 $\mu$ g/ml). Quantitative data on the proportion of TMRE fluorescence cells are provided Fig. 6. Significantly different between the groups(\* $p$ <0.05, data are means $\pm$ S.D.(n=6)).

## IV. 考 察

인간의 수명이 연장됨에 따라 노인 인구가 차지하는 비율이 점차 높아지는 추세이며, 이에 따라 의학적, 경제적, 사회적으로 문제가 되고 있는 노인성 치매는 오늘날 큰 관심거리로 떠오르고 있으며, 그에 따른 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

AD의 중요한 병변은 42~43개의 아미노산으로 구성된  $\beta$ -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 있다<sup>24)</sup>. 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 c말단 단백질이 A $\beta$ 보다 더 독성이 강하다고 알려지고 있고 A $\beta$ 와 c말단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 연구가 계속 진행 중에 있다<sup>25-31)</sup>.

한의학적으로 치매는 張介賓<sup>32)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 상세하게 언급되기 시작하여 이후에 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어 졌으며, 주요病因病機로는 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足, 瘀血內阻, 心肝火盛 등으로 크게 나눌 수 있고 각각의 원인에 따라 豁痰開竅, 理氣和血, 滋補肝腎, 填精補髓, 活血去瘀, 清熱瀉火 등의 치법이 적용된다<sup>22,33-8)</sup>.

치매에 대한 한의학에서의 최신 연구를 보면 관련된 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있다. 蓼茸地黃湯<sup>39)</sup>, 洗心湯<sup>40)</sup>, 溫膽湯<sup>41)</sup>, 還少丹<sup>42)</sup> 등의 뇌조직의 항산화 작용에 대한 연구와 麝香蘇合元<sup>43)</sup>, 香附子



八物湯<sup>44)</sup> 調胃升清湯<sup>45)</sup>, 荊防地黃湯<sup>46)</sup> 등은 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향에 관한 연구, 그리고 指迷湯<sup>47)</sup>, 轉呆丹<sup>48)</sup> 등은 CT105로 유도된 치매 모델에 대한 연구가 있었다.

加減固本丸은 《東醫實鑑》<sup>23)</sup>의 神門 및 風門에 수록된 처방으로 異名은 二參丹이며, 처방의 구성은 丹參, 熟地黃, 天門冬, 白茯苓, 麥門冬, 甘草, 人蔘, 遠志, 石菖蒲, 朱砂로 되어 있다. 丹參은 活血祛瘀, 清心除煩, 養血安神하고 熟地黃은 補陰滋血, 益精填髓하며, 天門冬은 養陰清熱, 滋陰潤燥하고 白茯苓은 寧心安神, 健脾利水하며, 麥門冬은 清熱除煩, 潤肺養陰하고 甘草는 補中益氣, 清熱除毒하고 人蔘은 大補元氣, 補脾益氣하며, 遠志는 寧心安神, 祛痰利竅하며, 石菖蒲는 除痰開竅, 醒神益智하고 朱砂는 鎮心安神, 定驚解毒하는 효능이 있어 老人의 昏忘과 中風 후의 健忘 등에 적용된다<sup>49-50)</sup>.

이에 저자는 치매 및 퇴행성 뇌질환에 효과가 있을 것으로 생각되는 加減固本丸의 항치매 효과를 규명하기 위해 CT99 발현 PC12 세포주에서 신경세포의 형태학적 변화, 세포사에 미치는 영향, Tunel assay, peroxynitrite 발생에 미치는 영향, 신경세포의 미토콘드리아 막전위 및 TMRE 생성에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

CT99의 발현으로 인한 신경세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하였고, GFP 형광유전자를 융합시킨 상태에서 관찰한 결과 정상군에서는 발현이 전무한 것에 반해 대조군에서는 강하게 녹색형광을 보였고, 加減固本丸군에서는

25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 GFP 발현정도와 세포사가 감소되었다. 특히 75 $\mu$ g/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 녹색형광이 크게 감소하였다(Fig. 2).

신경세포의 세포사가 加減固本丸에 의해 어느 정도 억제되는지를 알아본 결과 세포생존율이 정상군에서는 97.0 $\pm$ 1.0%였고 대조군에서는 21.0 $\pm$ 2.0%로 나타났으며, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 53.0 $\pm$ 1.0%, 76.0 $\pm$ 2.0%로 나타났다(Fig. 3). 이상에서 볼 때 加減固本丸은 신경세포사의 세포사를 억제하고 생존을 유도하는 것으로 생각된다.

세포핵에 존재하는 DNA말단의 dT를 탐지하여 세포핵의 절단으로 일어나는 신경세포의 세포사를 Tunel assay로 확인한 결과 정상군에서는 세포생존이 강하여 반응이 전무하지만 대조군에서는 강한 적색반응이 나타났다. 加減固本丸군은 25, 75 $\mu$ g/ml 농도에서 적색반응이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 75 $\mu$ g/ml 농도에서는 강하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 이는 加減固本丸이 세포사로 인한 자가효소의 작용으로 일어나는 세포핵의 절단을 저해하여 세포사를 억제하는 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. 신경세포의 peroxynitrite 생성 정도를 측정 한 결과 정상군에서는 0.87 $\pm$ 0.03인데 비해 대조군에서는 2.32 $\pm$ 0.02였으며, 加減固本丸

군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $1.58\pm 0.25$ ,  $1.35\pm 0.05$ 로 나타났다(Fig. 5). 이는 加減固本丸이 신경세포의 세포사를 유도하는 peroxynitrite의 생성을 저해하여 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 막전이가 교란되면 탈분극으로 인해 적색이 소실된다. 정상군은 약하게 적색형광이 관찰되었지만 대조군은 적색형광이 소실되었고, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 전위가 회복되어 적색형광이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6).

TMRE는 미토콘드리아의 막 의존성으로 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 보였고 대조군에서는 막전위가 탈분극화 되면서 기능이 소실되므로 TMRE의 유입이 감소되어 적색형광이 감소하였으나, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 적색형광이 증가하는 경향을 보였다. 형광강도는 정상군에서  $96.0\pm 2.0$ 로 나타났고 대조군에서는  $21.0\pm 1.0$ 이었으며, 加減固本丸군은 25, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $42.0\pm 1.0$ ,  $63.0\pm 1.0$ 로 나타났다(Fig. 7). 이상에서 보면 加減固本丸이 세포의 손상으로 인한 미토콘드리아 및 세포소기관의 손상을 감소시켜 신경세포의 세포사를 억제하는 것으로 생각된다.

이상에서와 같이 加減固本丸은 CT99 발현 PC12 세포주에서의 세포사에 대해 뚜렷한 억제효과를 보이고 있어 치매 및 기타 뇌의 퇴행성 변화에 대해 효과가 있을 것으로 추정되며, 향후 加減固本丸을 이용한 다각적인 임상 및 실험적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

加減固本丸의 신경세포 상해와 치매에 대한 효과를 규명하기 위해 CT99 발현 PC12 세포주를 이용하여 치매와 동일한 신경세포사를 유도한 후 얻은 실험결과는 다음과 같다.

1. 加減固本丸은 신경세포의 세포사를 감소시키고 신경세포의 생존율을 유의하게 증가시켰다.
2. 加減固本丸은 세포핵의 절단을 저해하여 신경세포의 세포사를 억제하였다.
3. 加減固本丸은 신경세포의 세포사를 유도하는 peroxynitrite의 생성을 유의하게 억제하였다.
4. 加減固本丸은 미토콘드리아와 세포소기관의 손상을 감소시켜 신경세포의 세포사를 유의하게 억제하였다.

이상과 같은 결론으로 加減固本丸이 C-T99 발현 PC12 세포주에서 신경세포의 세포사를 효과적으로 억제하고 신경세포 상해에 대한 보호효과가 있는 것이 입증되었다.

## 參 考 文 獻

1. 황의환, 김지혁. 동의정신의학. 서울: 현대의학서적사. 1992:256-71, 327-30, 663-4.
2. 배영철 외. 老人醫學. 서울: 고려의학. 1996:192-209.
3. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-6.
4. 김승업. 치매, 알츠하이머병. 서울: 삶과 꿈. 1997:54-80.
5. 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.
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):1237-9.
8. Mcgeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 1998;33(5):371-8.
9. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰. *대한신경과학회지.* 1985;3(1):10-5.
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, Ksiazek-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  $\beta$ -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 syna-

- ptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem.* 1999;73(2):532-7.
15. 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):158-65.
  16. 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):3357-60.
  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. 陳士鐸. 辨證錄. 北京: 人民衛生出版社. 1996:241-3.
  23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1994:98.
  24. 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.
  25. 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;61:335-46.
  26. Russo C, Salis S, Dolcini V, Venezia V, Song XH, Teller JK, Schettini G. Amino-terminal modification and 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.
27. 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.* 2996;66:2034-40.
28. 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.
29. 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- $\beta$ . *FASED.* 2000;14(14):2171-6.
30. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. Immunological aspects of alzheimer's disease : therapeutic implications, *BioDrugs.* 2001;15(5):325-37.
31. Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism, *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924:81-90.
32. 張介賓. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1985:573-8.
33. 이봉교. 症狀鑑別治療. 서울: 정보사. 1991:122-6.
34. 陳輝. 實用中醫腦科學. 北京: 學苑出版社. 1993:242-51.
35. 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.
36. 劉冠軍. 中醫學叢書(4). 서울: 일중사. 1994:147-51.
37. 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.
38. 中醫研究阮 主編. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京: 人民衛生出版社. 1987:73.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.

47. 강승준, 박치상, 박창국. CT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 指迷湯의 항치매효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):482-91.
48. 송호상, 박치상, 박창국. CT105로 유도된 인간신경아세포종 세포주에서 轉呆丹의 항치매효과. 대한한의학 방제학회지. 2003;11(2):95-105.
49. 이상인 외. 本草學. 서울: 永林社. 1994:302, 419, 486, 496, 523, 531, 540, 580, 588, 589.
50. 서부일, 김상찬 감수. 本草集成. 서울: 목과토. 2000:319, 544, 668, 680, 727, 741, 758, 823, 840, 843.