

원 지

半夏가 CT105에 의한 신경세포 상해 및 白鼠의 기억에 미치는 영향

강상렬, 이소연, 윤현덕, 신오철, 박창국, 박치상

대구한의대학교 한의학과 내과학전공

Neuroprotective and Memory Enhancing Effects of *Pinelliae rhizoma* Extract

Sang-Yeol Gang, 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
Gyeongbuk, Korea

Objectives : Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by amyloid plaques and neurofibrillary tangles. These plaques are associated with degenerating neuronal processes and consist primarily of fibrillary aggregates of β -amyloid protein, generated from amyloid precursor protein (APP). Another amyloidogenic fragment, the carboxyl terminus (CT) of APP, which is composed of 99-105 amino acid residues containing the complete A β sequence, also appears to be toxic to neurones. Recent evidence suggests that CT105, carboxy terminal 105 amino acids peptide fragment of APP, may be an important factor causing neurotoxicity in AD.

Methods : Although a variety of oriental prescriptions including *Pinelliae rhizoma* have traditionally been utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and action mechanisms have not yet been fully elucidated. In the present study, we investigated effects of the dichloromethane extract of *Pinelliae rhizoma* (PINR) on neurotoxicity and the formation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in SK-N-SH cells overexpressed with CT105. In addition, we evaluated its radical scavenging activity and effects on acetylcholinesterase (AChE) activity. Furthermore, effects on cognitive deficits induced by scopolamine treatment in rats were evaluated.

Results : We found in this study that PINR significantly inhibited apoptotic neuronal death induced by CT105 overexpression in SK-N-SH cells. Based on morphological examinations by phase-contrast microscopy, PINR reversed apoptotic changes of CT105-expressed cells. It was also found that PINR significantly promoted neurite outgrowth and inhibited formation of ROS and NO. PINR was shown to scavenge DPPH radicals and noncompetitively inhibit AChE activity. Furthermore, it reduced scopolamine-induced memory impairment in rats, assessed by passive avoidance test.

Conclusions : Taken together, these results demonstrate that PINR exhibits neuroprotective, antioxidant, and memory enhancing effects, and therefore may be beneficial for the treatment of AD.

Key Words: CT105, *Pinelliae rhizoma*, Alzheimer's disease.

緒 論

痴呆는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 지능저하를 특징으로 하는 고도의 대뇌기능 장애를 나타내는 뇌 증후군으로, 腦의 退行性變化에 의한 Alzheimer's Disease(이하 AD)와 腦梗塞 등으로 誘發

· 접수 : 2005년 1월 27일 · 논문심사 : 2005년 3월 28일
· 채택 : 2005년 4월 30일
· 교신저자 : 박치상, 대구광역시 수성구 상동 대구한의대학교
심계내과학 교실
(Tel : 053-770-2179, E-mail : stephano@dhu.ac.kr)

된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混在된 混合型 痴呆가 있는데, 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다¹²⁾. AD는 진행성 痴呆로 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견과 함께 주위에 대한 無關心, 자발성의 결여, 記憶力低下, 指南力減退, 情緒不安, 憂鬱, 無言, 無反應, 大小便失禁 등의 증상을 보이며^{2,3)}, 기억력 장애는 가장 현저한 증상으로 보통 초기에 나타난다⁴⁾.

AD의 원인으로 병리학적 특징 중 하나인 노인반(senile plaques)의 주성분인 β -amyloid protein(A β)이 지목되어 왔으나^{5,6)}, A β 의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표^{7,8)}와 함께, 최근에는 APP의 일부분인 Carboxyl terminus (CT) protein이 A β 보다 더 신경독성을 발휘한다고 알려져 있어서⁹⁾ AD와 CT protein에 대한 연구 및 이를 바탕으로 한 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다¹⁰⁾.

痴呆는 韓醫學에서 張景岳의 <景岳全書 雜證謨>에서 '痴呆'라는 병명이 언급된 이후로 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루고 있으며, 그 원인은 痰飲, 痰火, 七情傷, 肝腎不足, 稟賦不足, 心腎不交, 瘀血 등으로 요약 할 수 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾胃等이 주로 사용되고 있다^{16,17)}.

半夏는 健脾燥濕化痰, 祛痰止咳, 消痞散結, 開心竅 등의 效能으로 痰飲眩暈, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 痰多喘咳 등 症의 治療에 상용하고 있어¹⁸⁾ 痰飲停滯, 濕痰으로 인한 痴呆 治療에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

최근 韓醫學에서도 痴呆, 기억장애 등과 연관된 여러 가지 연구가 다양하게 진행되고 있으나^{19,20)}, 아직半夏가 AD와 연관된 생화학적 변화 및 행동 양태에 미치는 영향에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는半夏가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자半夏를 치료로 하여 신경독성을 나타내는 CT protein의 일원인 CT105로 형질전환시킨 신경세포주에서 세포형태학적 변화 및 세포 생존율, 신경돌기 신장 변화, ROS 발생 및 NO 생성도,

항산화 효과, acetylcholinesterase(AChE)의 활성 저해도 및 scopolamine을 투여한 白鼠에서의 기억개선 효과에 대해 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

동물은 (주)중앙실험동물에서 분양 받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 6주령 수컷 白鼠를 사용하였으며, 실험당일까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 온도 20±2℃, 습도 40~60%로 사육실 안을 유지하면서 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였으며, 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 試料의 調製

半夏(Pinelliae rhizoma) 1kg을 대구한의대학교 부속대구한방병원 약제과에서 엄선하여 잘게 분쇄한 후 메탄올(MeOH) 수용액 5 l 를 넣고 2~4회 용매 추출하고 분리된 알콜 추출액을 50~60 mmHg 및 60℃의 조건하에서 감압농축기 evaporator로 증발 농축하여 추출액 내의 알콜을 제거하여 350g을 회수하여 이 회수 추출액에 대해서 동결건조하여 분말상태 건조물 225g을 얻었다. 농축분말 중에 함유된 불필요한 성분을 정제하기 위하여, 디클로로메탄과 물이 5:1 부피비로 혼합되어 있는 혼합액에 농축분말을 1:1 부피비로 투입하고 전탕하여 디클로로메탄층 용매분획(이하 PINR라 명명)을 얻은 다음 용매 분획물에 대해서 동결건조시켜 분말상태로 75g을 회수하였다. 이와 같이 추출·정제 공정을 수행하여 회수된 디클로로메탄 분획물을 사용전에 미리 1,000mg/ml 농도로 제조한 후 희석하여 10, 25, 50 및 100 μ l/ml의 농도로 실험에 사용하였다.

3) 試藥 및 機器

實驗에 사용된 試藥 중 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin, lipofectin 은 Gibco-BRL(USA)에서, MeOH는 Merck(Germany)

에서, dichloromethane, Acetylcholin esterase(AChE), 3-[4,5-dimethiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), Scopolamin e, butylated hydroxytolulene(BHT), Griess reagent, sodium nitrite는 Sigma Co.(USA)에서 구입하였고, N',N-dimethyl formamide는 Amresco사(USA)에서, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA-DA)는 Molecular Probes(USA)에서 구입하였다.

機器는 CO₂ incubator(VS-9108 MS, Vision Scientific Co.), phase-contrast microscope(Olympus), GEMINI avoidance System(San Diego Instruments, USA), evaporator(Elyla, Japan), ELISA reader(Bio-Rad, USA), Fluoroskan Ascent FL(Thermo LabSystem, Finland) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) pCT105 플라스미드 제작

본 실험에 사용된 pCT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital의 Center for Neurologic Diseases 소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양받은 痴呆 유발 유전자 APP695로부터 포유동물세포주인 SK-N-SH 내에서 발현이 되도록 PCR을 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질전환시켜 이 플라스미드를 추출하여 BamH I/Hind III의 제한효소를 처리하여 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamH I/Hind II에 삽입하여 cloning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 pCT105 플라스미드를 분리하여 본 실험에 사용하였다.

2) pCT105 형질을 조합시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH는 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105를 사용하여 CT105 발현 세포주를 구축하기 위해 미리 103세포

수를 6-well plate에 분주하고 37°C incubator에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀할 시점에 반응액 A에는 pCT105 2 μ g와 serum free medium(이하 SFM이라 명명) 100 μ l을 혼합하고, 반응액 B에는 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 1.5ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지하고 5% FBS를 함유한 RPMI 배지를 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 μ g/ml로 선별을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

3) 세포의 형태학적 관찰

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 6-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한 다음 CT105가 없는 vector만 형질이입시킨 정상군(NOR), CT105를 삽입시켜 형질이입시킨 대조군(CON), 대조군에 10, 25, 50 및 100 μ g/ml 농도의 PINR 100 μ l를 처리한 실험군(PINR)으로 구분하여 수행하였다. 실험군이 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 12시간 배양하여 세포사의 억제유무를 관찰하였다. 세포사 관찰은 위상차 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개정도 세포수를 촬영하여 조사하였다.

4) 세포 생존율 분석

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 96-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한 다음 실험군에는 배양한 세포에 농도별로 약물을 처리하고 6시간이 지난 후에 MTT 용액 20 μ l을 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50 μ l를 첨가하고 실온에서 30분이상 반응을 시켜서 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA reader의 A570/A630nm에서 흡광도를 측정하여, 결과는 대조군과 실험군과의 차이를 백분율로 나타내었다. 실험식은 다음과 같다.

$$\text{생존율(\%)} = [1 - (A - C) / (B - C)] \times 100$$

A : 실험군 평균 O.D B : 대조군 평균 O.D
C : background 평균 O.D O.D : optical density

5) 신경돌기 신장 측정

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 laminin coated 되어 있는 6-well plate(BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음, 세균에 모두 NGF(Nerve growth factor)를 50ng/ml 농도로 첨가하고 6시간동안 자극을 가하였다. 정상군, 대조군에는 무혈청배지(serum free medium)로 처리하고, 실험군에는 PINR을 10, 25, 50 및 100 μ g/ml 농도로 각각 처리하여 12시간 배양후 100개의 세포에서 신경돌기의 신장 길이를 위상차 현미경하에서 정상군과 상호 비교하여 관찰하였으며, 신경돌기의 신장 길이 수치는 대조군을 임의의 수치인 0.5로 설정하고, 실험군의 결과치를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 측정하였다.

6) 신경세포의 reactive Oxygen Species(ROS) 측정

ROS 측정은 Zhang 등²³⁾의 방법을 응용하여 실시하였다. CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 96-well plate에 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양하고 실험군에는 PINR을 10, 25, 50 및 100 μ g/ml 농도로 배지에 처리한 후 12시간 배양하였다. Hanks' balanced salt solution(HBSS)용액으로 세척한 후 0.5% Trypsin-EDTA 1ml를 첨가하여 세포를 떼어낸 다음 5ml HBSS용액을 넣어서 pipetting하여 50ml tube에 옮긴 후 2,500rpm에서 3분간 원심분리시킨 다음 상층액을 제거한 후 세포에 1ml Krebs Ringer 완충액 (NaCl 119mM/l, KCl 4.7mM/l, CaCl₂ 2.5mM/l, MgSO₄ 1.2mM/l, KH₂PO₄ 1.2mM/l, NaHCO₃ 25mM/l, HEPES 10mM/l at pH 7.4 and 0.1% bovine serum albumin)을 넣고 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA-DA를 최종농도가 5 μ M이 되도록 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase (-20 $^{\circ}$ C에 저장 보관)와 함께 희석하여 첨가하였다. 알루미늄 호일에 싸서 vortex mixer로 잘 혼합해 준 다음 22 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리 후 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 7ml의 Krebs Ringer 완충액을 넣어 흔든 다음 얼음에 꽂아준 후 세포내에 생성된 ROS의 양을

측정하였다. 지용성의 DCFDA-DA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로 발생된 형광은 Fluoroskan Ascent FL(Thermo Labsystem, Finland)을 이용하여 excitation 485nm/emission 530nm에서 측정하였다.

7) 신경세포의 nitric oxide(NO) 생성도 측정

CT105 발현 세포주내의 NO의 생성도를 측정하기 위해 10³세포수로 96-well plate에 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한 다음 실험군에 PINR을 10, 25, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 6시간 처리한 후, 상층액 100 μ l를 96-well plate에 옮기고 griess reagent액 50 μ l를 첨가하고 실온에서 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 A₅₇₀/A_{630nm}에서 흡광도를 측정하고 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150 μ M sodium nitrite를 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

8) 항산화 효과 측정

항산화력을 측정하기 위해 Takao(1994) 등의 방법²⁴⁾을 약간 수정하여 실험을 실시하였다. 즉, 에탄올에 용해시킨 80 μ g/ml의 DPPH 1ml와 PINR을 10, 25, 50 및 100 μ g/ml의 농도 각각을 혼합하여 반응시킨후 DPPH의 색깔 변화를 관찰하여 개략적인 항산화 활성 여부를 U.V spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도(O.D)로 판정하였으며, 항산화제 표준품인 20 μ M BHT를 대조군으로 사용하였다. 항산화 능력은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - \text{SA/CA}] \times 100$$

CA : absorbance of control, SA : absorbance of test sample

9) Acetylcholinesterase(AChE)의 활성 저해도 측정

PINR을 5% dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후 200 μ g/ml 농도가 되도록 희석 하고, 이를 10, 25, 50 및 100 μ g/ml 농도의 PINR 1.5ml, 100mM 인산염 (pH 7.0) 1.5ml, 75mM 아세틸티오콜린요오드 용액 20 μ l 및 완충엘만시약 [Buffered Ellman's reagent; 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 10mM,

NaHCO₃ 17.85mM] 100 μ l를 혼합하고 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 그리고, AChE 효소 20 μ l를 넣고 흔들여 섞어준 다음 30초 간격으로 5분 동안 U.V spectrophotometer 하에서 흡광도를 측정하였는데 acetylthiocholine(ATCh)이 AChE에 의해 acetic acid와 thiocholine으로 가수분해되어 생성된 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성된 노란색 음이온인 5-thio-2-nitrobenzoate의 증가를 410nm에서 활성도를 측정하여 선형반응(Lineweaver-Burk plot, linear reaction)식으로 확인하였다. 블랭크(blank)에는 효소 대신 식염수를 넣어주었다. 또한, 아세틸티오콜린요오드 용액을 넣지 않고 흡광도를 측정하여 PINR과 효소활성 측정시 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음도 확인하였다. 또한, PINR을 넣지 않았을 때를 대조군(CON)으로 하고 이때의 AChE 활성도를 100%로 하였을 때, PINR농도에 대한 AChE 활성저해도를 '%억제'로 나타내었다. 효소활성도는 대조군에서 Km값은 0.006이고 Vmax값은 5.43인데 Lineweaver-Burk plot으로부터 PINR을 처리한 실험군의 AChE 활성을 5회 반복하였다.

10) 수동 회피 테스트

동물의 인지능력을 확인하기 위한 방법으로 수동 회피(Passive avoidance test)를 관찰하기 위해 실험기구인 왕복상자는 GEMINI avoidance System의 모델을 바탕으로 크기로는 가로疏섭愧높이가 50 \times 15 \times 40 cm이고, 바닥에는 전기 전도성 망이 깔려져 있는 Shuttle box(정도산업, Seoul, Korea)를 제작하였다. 또한, 상자는 칸막이문(10 \times 10cm)을 사용하여 반으로 나누어 25 \times 15cm의 방을 2개 만들었다. 각 방에는 20W 전구로 조명할 수 있도록 하였다. 소음이 60dB 이하이고, 조명을 어둡게 한 방에서 실험을 실시하였다. 칸막이로 나누어진 방 2개중 한쪽(A)에 白鼠를 넣고 1,500lux의 조명을 켜면서 칸막이를 열어주었다. 그러면, 白鼠는 방안을 여기저기 살피다가 조명이 없는 건너편 방(B)으로 들어가게 되는데, 이때 자동적으로 칸막이가 닫히도록 하였다. 불을 켜면서 칸막이가 열릴 때부터 칸막이가 닫힐 때까지의 시간을 측정함으로써 도달시간을 측정하는데, 이러

한 과정을 반복 수행하면 白鼠는 방 A에서 방 B로 넘어간다. 이와 같은 시도를 계속하여, 白鼠가 20초 이내에 방 A에서 방 B로 건너가게 되면 훈련과정을 완료하였다. 다시 1일 후에 상기 훈련을 거친 白鼠를 방 A에 넣고 白鼠가 방 B로 넘어가면 불이 꺼진 상태에서 방 밑의 스테인레스 망을 통해 2mA의 전류를 5초 동안 흘려 白鼠의 발바닥에 쇼크를 주었다. 白鼠는 어두운 방과 발바닥 쇼크와의 관계를 기억하게 되며, 24시간 후에 방 A에 넣어주면 조명이 들어와도 방 B에 들어가기에 망설이게 된다. 이때의 도달시간을 비교하였다. 인식시행이 끝난 후 아무런 처치를 하지 않은 정상군(6마리), scopolamine을 피하 주사한 대조군(6마리), scopolamine을 피하 주사 하여 PINR을 1, 2.5, 5, 10 \times 100 μ g/ml/체중100g의 농도로 투여한 실험군(각 농도별 6마리)으로 나누었다. 대조군과 실험군에는 scopolamine(1mg/kg)을 복강내로 투여하고, 실험군에는 다시 30분 후에 PINR을 1, 2.5, 5, 10 \times 100 μ g/ml/체중100g의 농도로 경구투여하고 1일 후에 다시 이 白鼠들을 방 A에 넣고 불을 켜 주었을 때 방 B로 넘어가기 전까지의 시간을 측정하였다. 5분을 최대 측정시간으로 하였다.

11) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 수행하였고, 실험 결과들은 mean \pm S.D로 나타내었고 통계처리는 Student's *t*-test 와 one-way ANOVA test를 실시하여 *p*<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

結果

1. 신경세포의 세포형태학적 관찰

정상군에 비해 대조군에서는 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상이 관찰되어 현저한 세포사가 유발되었다.

PINR을 처리한 실험군에서는 25 μ g/ml 농도에서 세포의 생존율이 대조군보다 약간 증가하였으며, 미약한 신경돌기의 신장이 관찰되었고, 50 μ g/ml 이상 농도에서는 신경세포의 생존이 현저히 증가함과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

2. 신경세포의 생존율에 미치는 영향
신경세포의 생존율은 대조군에서는 $6.0 \pm 2.0\%$ 이
었으나 PINR을 10, 25, 50 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한

군에서는 각각 $18.1 \pm 3.1\%$, $39.1 \pm 0.2\%$, $53.1 \pm 0.3\%$,
 $87 \pm 0.5\%$ 로 나타났고, 특히, 신경세포에 대한 IC50
은 $53 \mu\text{g/ml}$ 로 측정되었다. PINR 50, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도

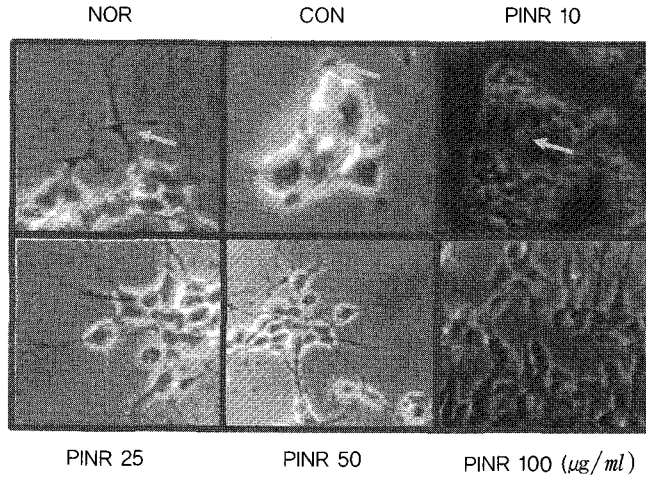


Fig. 1. Effect of PINR on morphological changes. Representative photomicrographs of SK-N-SH cell lines(NOR), CT105-expressed cells(CON), and CT105 cells treated with PINR at the concentrations of 10, 25, 50 and $100 \mu\text{g/ml}$ are shown ($\times 200$). Similar results were observed in at least three separate experiments. The photomicrographs were taken with an Olympus optical inverted phase-contrast microscope model I $\times 45$ ($\times 200$ magnification).

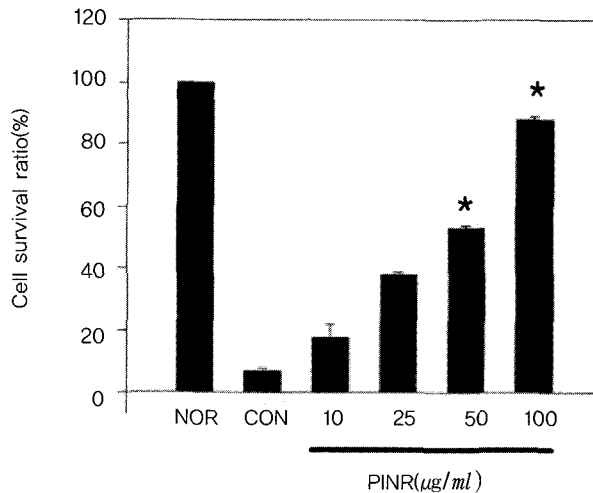


Fig. 2. Effects of PINR on survival of CT105-expressed SK-N-SH cell lines. CT105-expressed SK-N-SH cell lines were treated with PINR at the indicated concentrations, and cell survival was determined by MTT assays as described in the Materials and methods. Each value represents mean \pm S.D of three to five independent experiments performed in triplicate. * : Statistically significant value compared with CT105-expressed group ($p < 0.05$, Student's *t*-test).

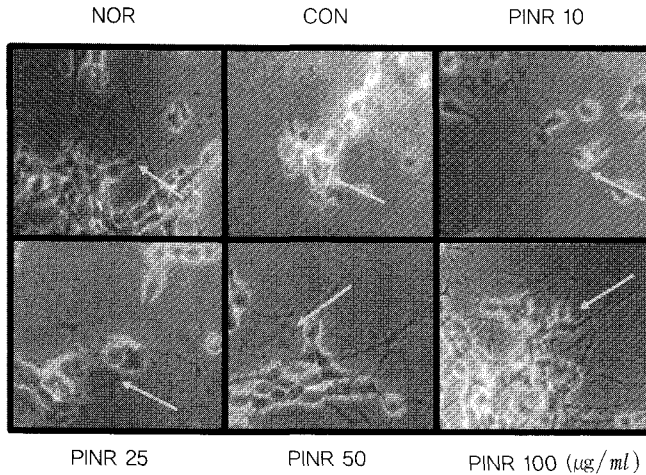


Fig. 3. Promotion of neurite outgrowth by PINR. CT105-expressed SK-N-SH cell lines were cultured for 6hrs in the presence of the NGF(50ng/ml) and 12hrs in the PINR. Neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope.

에서 유의성($p < 0.05$) 있는 세포 생존율을 보였다 (Fig. 2).

3. 신경돌기 신장에 미치는 영향

신경돌기 신장에 미치는 영향을 알아본 결과, 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되었으나, CT105가 발현된 대조군의 경우는 신경돌기가 손상을 입어서 성장이 억제되는 상태로 나타났으며, PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리시 신경돌기가 잘 신장되는 양상을 나타내었다(Fig. 3). 이런 결과를 임의의 값으로 환산하여 조사한 결과, 대조군을 0.5 기준으로 할 때 정상군은 4.95 ± 0.5 , PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리한 군에서는 각각 0.90 ± 0.5 , 2.20 ± 2.5 , 3.13 ± 1.5 , 3.70 ± 0.1 의 수치로 나타나 농도가 증가할수록 신경돌기의 신장도 증가하였는데, PINR 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 신경돌기가 유의성($p < 0.05$) 있게 신장되었다(Fig. 4).

4. 신경세포의 ROS 발생에 미치는 영향

정상군의 $17 \pm 2.4\%$ 에 비해 대조군은 약 100%, PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 실험군에서는 각각 $84 \pm 1.5\%$, $62 \pm 1.5\%$, $34 \pm 1.3\%$, $24 \pm$

1.8%로 나타났으며, PINR 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 ROS 발생이 유의성($p < 0.05$) 있게 억제되었다 (Fig. 5).

5. 신경세포의 NO 생성에 미치는 영향

정상군에서는 $7.0 \pm 1.82 \mu\text{M}$ 이 생성된 반면, 대조군에서는 $85.2 \pm 4.9 \mu\text{M}$ 이 생성되었으며, PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 각각 $73.1 \pm 4.8 \mu\text{M}$, $52.3 \pm 2.4 \mu\text{M}$, $28.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$, $19.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 이 생성되어 PINR의 농도가 증가할수록 NO 발생이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 PINR 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 NO 생성이 유의성($p < 0.05$) 있게 억제 되었다(Fig. 6).

6. 항산화에 미치는 영향

대조군인 BHT로 처리한 경우를 100%로 하였을 때 PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 각각 $18 \pm 1.5\%$, $34 \pm 2.5\%$, $54 \pm 2.3\%$, $78 \pm 1.4\%$ 로 나타났으며, PINR 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 자유라디칼 생성이 유의성($p < 0.05$) 있게 억제 되었다(Fig. 7).

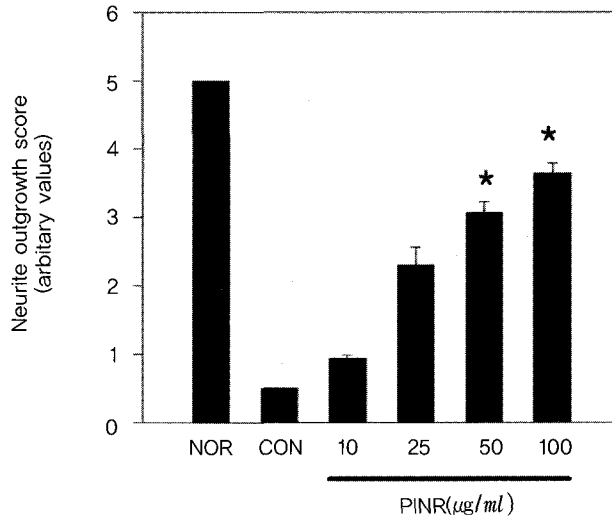


Fig. 4. PINR induces neurite outgrowth length in CT105-expressed SK-N-SH cell lines. CT105-expressed SK-N-SH cell lines were cultured for 6 hrs in the presence of the NGF(50ng/ml) and 12hrs in the PINR. Neurite outgrowth was scored under phase-contrast microscope. All results are the Means \pm S.D from 100 determination cells.

* : Statistically significant value compared with CT105-expressed group ($p < 0.05$, Student's *t*-test).

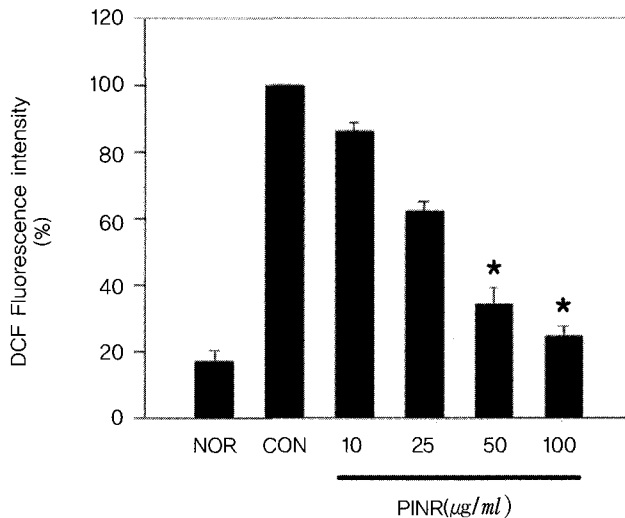


Fig. 5. Effects of PINR on ROS production in CT105-expressed SK-N-SH cell lines. CT105-expressed SK-N-SH cell lines were treated with the indicated concentrations of PINR, and the production of ROS was determined by the measurement of DCF fluorescence intensity. Data are expressed as mean \pm S.D from three measurements.

* : Statistically significant value compared with CT105-expressed group ($p < 0.05$, Student's *t*-test).

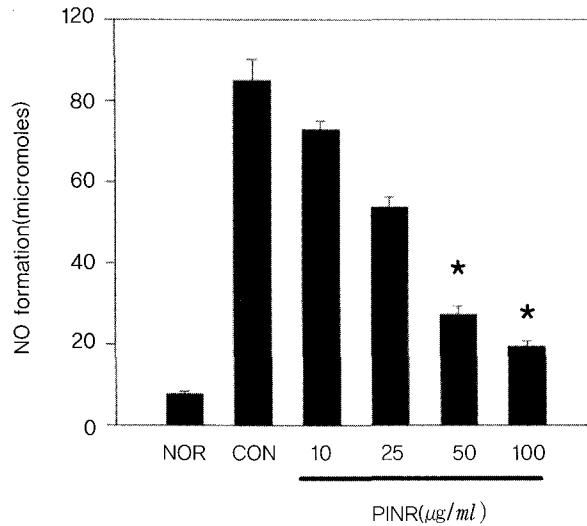


Fig. 6. Inhibition of NO formation by PINR in CT105-expressed SK-N-SH cell lines. CT105-expressed SK-N-SH cell lines were treated with the indicated concentrations of PINR, and the NO formation was quantified by measuring the absorbance using ELISA reader.

* : Statistically significant value compared with CT105-expressed group ($p < 0.05$, Student's *t*-test).

7. Acetylcholinesterase(AChE) 활성에 미치는 영향

PINR을 1, 2.5, 5, 10 × 100 μg/ml의 농도에서 효소를 반응시켜, AChE의 활성저해도를 측정한 결과, 각각 44.0 ± 1.5%, 51.0 ± 2.5%, 64.5 ± 0.5%, 76.0 ± 2.5%를 나타내었고, PINR의 IC₅₀은 약 1.5 × 100 μg/ml였다 (Fig. 8). PINR 2.5, 5, 10 × 100 μg/ml 농도에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 AChE 활성저해를 나타내었다. 한편, PINR의 작용 양상중 기질인 acetylthiocholine(ATCh)과의 경쟁관계를 알아보기 위하여 농도를 달리하면서 그 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하여 본 결과, Km 값은 PINR 무첨가시 0.006에서 PINR 첨가시 0.0068로 거의 변하지 않는 반면에 Vmax 값은 5.53에서 6.78(mol%)로 나타나, PINR이 비경쟁적으로 AChE의 활성을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 9).

8. 기억개선 효과에 미치는 영향

신경세포의 인지능력에 영향을 주는 scopolamine을 투여한 白鼠에 수동회피테스트를 실시하여 기억

개선 효과를 관찰한 결과, 정상군에서는 275 ± 45sec, 대조군은 24 ± 2sec이고, PINR을 1, 2.5, 5, 10 × 100 μg/ml/체중100g의 농도로 투여한 군에서는 각각 25 ± 1sec, 61 ± 2sec, 68 ± 1sec, 70 ± 1sec로 나타나 PINR 5, 10 × 100 μg/ml 농도에서 유의성($p < 0.05$) 있는 기억개선 효과를 나타내었다(Fig. 10).

考 察

노인에게 痴呆를 발생하게 하는 대표적인 질환인 AD는 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 老人癡, 신경섬유다발 및 신경세포의 과립공포변성 등을 특징으로 하고, 증상으로 기억력과 지능의 감퇴, 추상적 사고 및 판단의 장애가 발생하며 때로는 성격변화, 불면, 행동장애 등을 나타내는 노년기의 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이다²³⁾. 기억력 장애는 가장 현저한 증상으로 보통 초기에 나타나며, 발병은 서서히, 경과가 점진적인 것이 특징이다⁴⁾.

AD를 유발시키는 원인에 대한 가설이 다양하게

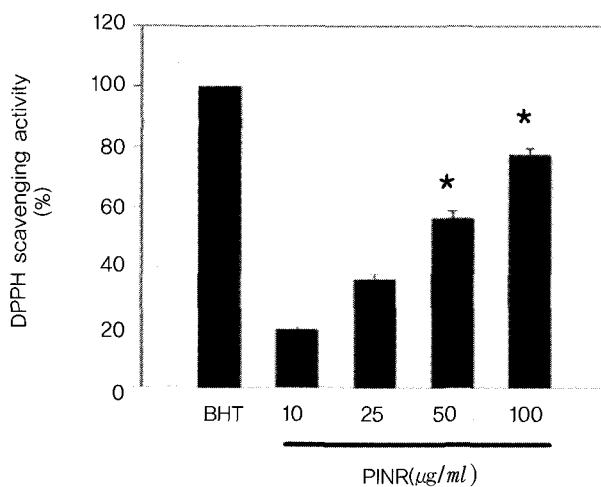


Fig. 7. Effect of PINR on DPPH free radical scavenging activity. DPPH free radical scavenging activity for test sample was determined with $80\mu\text{g/ml}$ DPPH ethanolic solution. Free radical formation was quantified by U.V spectrophotometer. *: Statistically significant value compared with control group(BHT) ($p<0.05$, Student' s t-test).

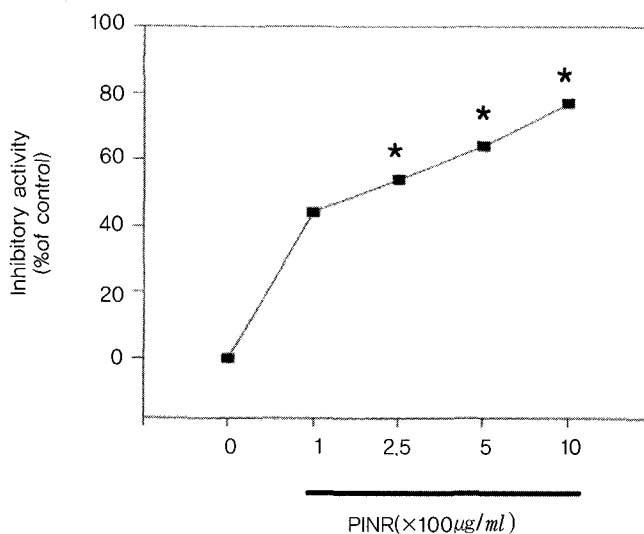


Fig. 8. Inhibition of human acetylcholinesterase activity by PINR. The activity of human acetylcholinesterase was determined in the absence or presence of PINR at the indicated concentrations. All results are the Means \pm S.D from five experimental values. *: Statistically significant value compared with CT105-expressed group ($p<0.05$, one-way ANOVA test).

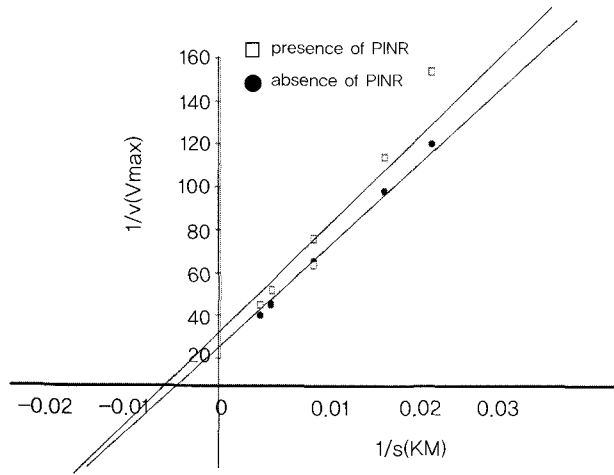


Fig. 9. Noncompetitive inhibition of AChE activity by PINR. AChE activity was determined in the absence(●) or presence(□) of PINR as described in the Materials and methods. The slopes of the Lineweaver-Burk plots reveal that inhibition of AChE by PINR is noncompetitive.

제시되고 있는데, A β , estrogen, apolipoprotein E, PS(Presenilin), 산화제, 염증, 사고에 의한 손상, 신경 전달물질의 불균형, 신경영양인자 감소 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다²⁴. 이 중 A β 의 침적으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이 대표적이다²⁵.

A β 는 APP라는 type 1 내재성 막단백질에서부터 유래된 단백질 분해효소에 의한 대사산물로서 세포 외부위와 막부위로 이루어져 있는 39-43개의 펩타이드이다. A β 의 전구대사단백물질인 APP는 염색체 21번에 위치하고 있으며, 이 위치는 다운증후군의 21번째 염색체의 삼염색체성(trisomy)에 의한 유전자 공여 효과를 나타내는 위치와 중첩 된다²⁶. 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 조기痴呆 현상을 나타내며 30~40대에 이르러서는 AD에서 발현되는 노인반과 신경섬유다발이 형성되는데, 이러한 病變은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있다²⁷. APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 경로에 의해 진행되는데²⁸, 즉 α -secretase에 의해서 A β 부위 안쪽이 잘려지며 amino

terminal이 세포 밖으로 분비된다. 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고 되었다²⁹. 한편 변형진행경로에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β -secretase 등에 의해 A β 의 N terminal 주위가 잘라지며 A β 염기서열 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22Kd) CT protein이 세포막에 고정 되어 남는다^{30,31}.

APP는 여러 isoforms로 이루어져 있는데, Amino acid의 수에 따라 APP695, APP714, APP751, APP770 이라고 불리며, 이 중 뇌에 분포하고 있는 형태는 주로 APP695이다. 그러나 아밀로이드 전구 단백질이 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사 과정에 의해서 잘라져서 A β 를 만들어 내는지는 아직 알려져 있지 않지만, APP의 대뇌침착은 AD시 가장 처음에 나타나는 특징적인 병리학적 소견으로 알려져 있다³². 따라서 A β 의 형성을 촉진하는 프로테아제(protease)와 이 프로테아제의 유전자를 발현하려는 노력이 현재 연구의 핵심이 되었다.

한편 최근에는 CT protein이 PC12 cells³³와 primary

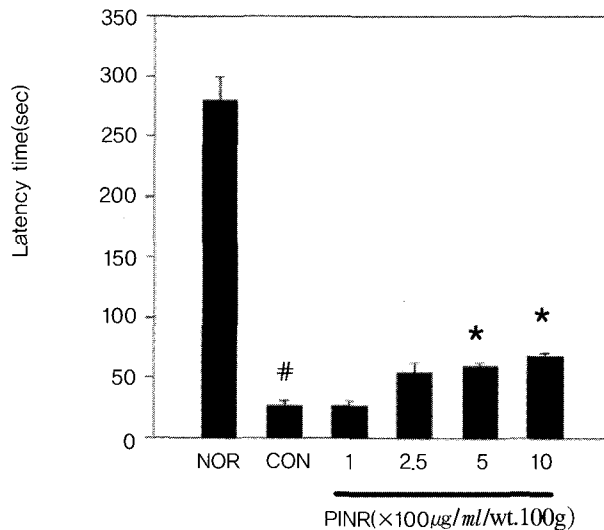


Fig. 10. Effects of PINR on the latency time in rats assessed by passive avoidance test.

The latency time in rats treated with PINR was determined after 24 hrs of training session. NOR: groups of rats without any treatment (n=6), CON: groups of rat with scopolamine treatment(1mg/kg)(n=6), PINR: groups of rats administered with 1, 2.5, 5, 10 $\times 100\mu\text{g}/\text{ml}$ wt.100g of PINR treatment. All results are the Means \pm S.D from five experimental tests.

: Statistically significant value compared with NOR group ($p < 0.05$, one-way ANOVA test).

* : Statistically significant value compared with CON group ($p < 0.05$, one-way ANOVA test).

cortical neurons³⁴)에서 직접적인 신경독성을 나타내었고, Purkinje cells³⁵)에서도 길고 비선형적인 내부전류를 유도하여 독성 효과를 나타낸다고 하였다. CT protein이 기존의 A β 보다 더 강력한 신경독성을 갖고 있다고 알려지고 있어서 새로운 관심을 끌고 있다⁹). 또한 산소는 유기호흡을 하는 생물에게 있어서 필수적인 존재이지만 에너지 대사 과정에서 불완전하게 환원되어 ROS를 발생시킨다. ROS는 단백질, DNA 및 지질과 같은 세포내 중요 구성성분을 산화시킴으로써 세포의 항상성을 파괴시켜 종래에는 사멸을 유도하고, 이러한 세포 손상의 누적은 노화 및 다양한 퇴행성 질환의 원인으로 알려져 있다³⁶).

한편, 기억기능 손상은 해마에서의 콜린신경계 활성이 감퇴되는 것과 관련이 있고 동시에 norepinephrine, serotonin, dopamine, glutamate, somatostatin 등의 신경전달물질도 감소되는데, 이러한 변화들은 뇌혈류가 줄어들고 산소 및 당대사량이 감소되는 것과 수반되

어 나타난다³⁷).

痴呆는 韓醫學에서 歷代醫書에서 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어졌으며¹¹⁻⁵⁾ 明代張¹³⁾은 《景岳全書·雜證謨》癡狂癡獸篇에서 “癡獸症凡平素無痰而或以鬱結, 或而不遂, 或而思慮, 或而疑貳, 或而驚恐而漸致癡獸, 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常…別無虛脫等證, 則悉宜服鬱煎治之……”이라 하여 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 痴呆의 病因·病機, 그리고 治法·豫後에 대해서 설명하였다.

痴呆의 主要病因病機로는 張¹³⁾은 “凡平素無痰而或以鬱結, 或以不遂, 或以思慮, 或以疑貳 或以驚恐而漸致癡獸”라 하여 정서적인 요소로 보고 있으며, 陳¹⁴⁾은 “痴呆無奇法 治痰則治”라 하여 痰이 痴呆의 原因이라고 하였고, 錢¹⁵⁾은 肝氣鬱結과 胃氣衰退로 胸中の 痰이 鬱滯되어 呆病에 이른다

하였다. 최근 姜 등¹¹⁾은 韓醫學의 臟腑的으로는 腎虛와 밀접한 關係를 맺고, 원인은 痰濁과 瘀血 등과 관련된다고 하였다. 따라서 痴呆의 원인은 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등으로 볼 수 있고¹¹⁻¹⁵⁾, 그 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 사용되고 있다¹⁶⁻⁷⁾.

半夏(*Pinelliae rhizoma*)는 천남성과(Araceae) 반하屬(*Pinellia Tenore*)에 속한 다년생 草本인 半夏의 塊莖을 乾燥한 것으로, <神農本草經> 下品에 “味辛平, 主傷寒寒熱, 心下堅, 下氣, 咽喉腫痛, 頭眩胸脹, 咳逆, 腸鳴, 止汗”이라고 처음 기재 되어 있다³⁸⁾. 性味는 燥辛溫有毒하고 歸經은 脾, 胃, 肺이며, 健脾燥濕化痰, 祛痰止咳, 消痞散結, 開心竅 등의 效能으로 痰飲眩暈, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 痰多喘咳 등 症의 治療에 상용하고 있어¹⁸⁾ 痰飲停滯, 濕痰으로 인한 痴呆 治療에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

半夏에 대한 연구로는 嘔吐中樞 抑制³⁹⁾, 鎮咳祛痰作用⁴⁰⁾ 등에 대한 약리 작용에 관한 연구가 있으나半夏를 이용한 抗酸化, 抗痴呆 효과에 대한 연구는 없었다.

최근 韓醫學에서의 痴呆에 대한 연구 동향을 살펴보면 뇌조직의 생화학적 변화에 대한 研究¹⁹⁾, 뇌의 노화와 연관된 뇌조직의 抗酸化作用에 대한 研究²⁰⁾가 있다. 또한 최근에는 鈎鈎藤²¹⁾의 β APP 과발현에서의 신경세포사 억제작용에 관한 연구에까지 이르렀으나 單味 藥物인半夏가 AD에 미치는 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는半夏가 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자半夏 디클로로메탄분획(이하 PINR)의 첨가에 의하여 CT105로 유도된 SK-N-SH cell lines에서 세포 형태학적인 변화 및 세포 생존율, 신경돌기 신장 변화, 신경세포의 ROS 발생 및 NO 생성도, 항산화효과, AChE의 활성 저해도 및 scopolamine을 투여한 白鼠에서의 기억개선 효과에 대해 관찰하였다.

CT105의 발현으로 인하여 일어나는 신경세포의 세포사를 형태학적으로 관찰하기 위하여 CT105로 유도된 SK-N-SH cell line에 PINR을 처리하여 12시

간 배양한 뒤에 위상차 현미경으로 관찰하였다. 정상군에 비해 대조군의 경우 형태학적으로 큰 변화가 나타났는데 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. PINR 처리군은 25 μ g/ml 이상 농도에서 세포의 생존율과 세포사의 회복, 신경돌기의 신장이 증가되는 것이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 1). 신경세포의 세포사가 PINR에 의해 얼마나 억제되는지 세포 생존율을 조사한 결과, PINR에 의해 50 μ g/ml 이상농도에서 신경세포의 생존율이 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2). 이는半夏가 신경세포사 억제와 신경 보호 및 세포사 회복에 효과가 있는 것으로 사료되며, 농도에 비례적으로 작용하는 것으로 보인다.

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 주기 때문에 CT105 발현으로 인한 신경돌기 신장에 미치는 영향을 알아본 결과, CT105가 발현된 대조군에서는 신경돌기가 손상을 입고 성장이 억제되는 상태로 나타났고, PINR을 처리한 실험군에서는 농도가 증가할수록 신경돌기가 잘 신장되어 자라는 것으로 나타났다(Fig. 3, Fig. 4). 특히 PINR 50 μ g/ml 농도 이상에서 유의성 있게 신경돌기의 신장을 증가시키는 것으로 나타났는데, 이는 신경세포의 재생에半夏가 효과적으로 역할을 할 것으로 사료된다.

CT105 발현으로 H₂O₂가 생성되고 세포독성을 일으키게 되는데, PINR이 신경세포에서 CT105 발현에 의한 ROS 발생 억제효과를 관찰한 결과, PINR 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였고, 50 μ g/ml 이상 농도에서 유의성 있게 ROS 발생 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5).

CT105 발현으로 인한 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포배양시 배지내로 분비되는 NO량을 griess시약으로 발색시켜 본 결과, PINR 처리군에서 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 50 μ g/ml 이상 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Fig. 6). 일반적으로 NO 생성은 iNOS에 의해서 유도되는데, CT105에 의해 NO 생성이 증가되지만 본 약물에 의해 NO 생성이

억제됨을 알 수 있었다. 이런 결과로 볼 때 NO 생성을 유도하는 iNOS의 발현에 半夏가 억제효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

또한 半夏가 어느 정도로 산화의 억제 효과를 가지는지를 조사하기 위해 자유라디칼(free radical)인 DPPH를 PINR을 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리해서 측정한 결과, PINR 처리군에서 농도 의존적으로 자유라디칼 발생이 현저히 억제되는 것으로 나타났는데 농도가 증가할수록 억제되는 경향이 증가하였다. 특히 PINR 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 유의성 있게 자유라디칼 생성을 억제 하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 따라서 본 약물이 충분히 항산화력을 가짐을 알 수 있는데, 산화적 스트레스로 인해 발생하는 痴呆의 발병기전과 관련되어 일정한 치료 및 예방 효과가 있을 것으로 사료된다.

신경세포의 상해는 인지능력에 영향을 주게 되는데, AD의 주증상인 기억력 감퇴는 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이며, 이는 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 기억과 인지결함이 더욱 심화된다. CT105로 신경손상을 입은 세포의 인지 능력 장애에 대한 PINR의 효과를 알아보기 위해 AChE의 활성저해도를 측정한 결과, PINR 처리군에서 AChE의 효소 활성을 저해시킴을 알 수 있었다(Fig. 8). 한편, PINR의 작용양상중 기질인 acetylthiocholine(ATCh)과의 경쟁관계를 알아보기 위하여 농도를 달리하면서 그 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하여 본 결과, Km 값은 PINR 무첨가시 0.006에서 PINR 첨가시 0.0068로 거의 변하지 않는 반면에 Vmax 값은 5.53에서 6.78로 변함을 확인하였고, 이로부터 PINR은 비경쟁적으로 AChE의 활성을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 9). AChE 활성실험을 5회 반복하여 약 1.5 \times 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도이상에서 효소활성저해에 대한 유의성이 있었다. 이는 AChE의 활성으로 acetylcholine이 감소되어 기억력이 감퇴된 것을 회복시켜주는데 半夏가 일정한 효과가 있을 것으로 사료된다.

신경세포의 인지능력에 영향을 주는 scopolamine을 白鼠에게 투여하여 신경세포 손상을 통한 기억

력 감퇴를 유도한 후 PINR을 경구투여 하여 수동회피테스트를 통해 기억개선 효과를 관찰한 결과, PINR의 농도 의존적으로 scopolamine 투여에 의한 신경세포의 상해로 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 나타남을 알 수 있었는데, 특히 PINR 5 \times 100 $\mu\text{g/ml}$ 체중100g 농도 이상에서 유의성 있는 기억개선효과를 나타내었다(Fig. 10). 이는 scopolamine 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜주는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 半夏가 뇌에서 AChE의 활성을 억제하여 acetylcholine의 분해를 막아 농도를 유지시키는 작용을 하여, 痴呆 질환에서 감퇴된 기억력을 증진시켜주는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상과 같이 半夏가 CT105 발현 세포주의 세포사를 효과적으로 억제하고 신경세포를 보호하며, 白鼠의 기억력 감퇴를 개선시켜 주는 것을 알 수 있었다.

結 論

半夏의 抗痴呆 효과를 규명하기 위하여 CT105 발현 세포주를 이용하여 치매와 유사한 신경세포사를 유도한 후, 세포 형태학적 변화 및 세포 생존율, 신경 돌기 신장 변화, 신경세포의 ROS 및 NO 생성도, 항산화효과, AChE 활성 저해도 및 scopolamine을 투여한 白鼠에서의 기억개선 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 半夏는 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사를 감소시키고 세포 생존율을 유의성 있게 증가시켰다.
2. 半夏는 CT105 발현에 의해 손상된 신경세포에서 신경돌기의 신장을 유의성 있게 증가시켰다.
3. 半夏는 CT105 발현에 의한 신경세포에서 ROS 및 NO 생성을 유의성 있게 억제하였다.
4. 半夏는 유의성 있는 항산화효과를 나타내었다.
5. 半夏는 AChE의 효소활성을 유의성 있게 억제하였다.
6. 半夏는 scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴를

유의성 있게 개선시켰다.

참고문헌

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-6.
2. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울: 현대의 학서적사. 1992:256-71, 327-30, 663-4.
3. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울: 고려의학. 1997:199-210.
4. 김승업. 치매, 알츠하이머병. 서울: 삶과 꿈. 1997:54-80.
5. Selkoe DJ. Alzheimer's disease : a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(5):438-47.
6. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias : amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci.* 1998;1(5):355-8.
7. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 1990;250:279-82.
8. Fukuchi K, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Kamino K, Ogburn CE, Furlong CE et al. Overexpression of a C-terminal portion of the beta-amyloid precursor protein in mouse brains by transplantation of transformed neuronal cells, *Exp Neurol.* 1994;127:253-64.
9. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na⁺/Ca²⁺ gradients. *Neuroreport.* 2000;11(15):3357-60.
10. 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.
11. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 痴呆의 病理에 대한 동서의학적 고찰. *大韓東醫病理學會誌.* 1999;13(1):36-45.
12. 김현아. 노인성 치매에 대한 문헌적 고찰. *大韓韓方內科學會誌.* 1992;13(2):57-68.
13. 張介賓. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1985:573-8.
14. 陳士鐸. 辨證錄. 서울: 醫聖堂. 1989:241-6.
15. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書. 台北: 甘地出版社. 1990:222-5.
16. 楊思澎, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大典. 北京: 北京科學技術出版社. 1991:224-30.
17. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378-81.
18. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울: 永林出版社. 1989:556-8.
19. 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.
20. 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.
21. 김상호, 강형원, 유영수. 釣鉤藤이 βAPP 과발현 인간 신경아세포암에서의 항치매 효과에 관한 연구. *東醫生理病理學會誌.* 2002;16(5):960-6.11.
22. Zhang HY, Tang XC, Huperzine B. A novel acetylcholinesterase inhibitor attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neuroscience Letters.* 2000;292:41-4.
23. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci Biotech Biochem.* 1994;58:1780-3.
24. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease.

- Exp Gerontol. 1998;33(5):371-8.
25. 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.
 26. George-hyslop, PH. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*. 1987;235:885-90.
 27. Neve RL, McPhie DL, Chen Y. Alzheimer's disease : a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res*. 2000;886(1-2):54-66.
 28. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 1995;65(4):1431-44.
 29. 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):2087-96.
 30. 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(5079):126-9.
 31. Tamaoka A, Kalaria RN, Lieberburg I, Selkoe DJ. Identification of a stable fragment of the Alzheimer amyloid precursor containing the beta-protein in brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(4):1345-9.
 32. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron*. 1993;10:243-54.
 33. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. 1996;67:1172-82.
 34. 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.
 35. Hartell NA, 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):1112-21.
 36. Bulkley GB. The role of oxygen radicals in human disease process. *Surgery*. 1983;94(3):407-11.
 37. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 한의학적 임상 연구. *東醫神經精神科學會誌*. 1996;7(1):1-13.
 38. 徐樹楠, 牛兵占 編著. *神農本草經*. 河北: 河北科學技術出版社. 1994:118-9.
 39. 王新志, 韓群暎, 陳賀華 主編. *中華實用中風病大全*. 北京: 人民衛生出版社. 1996:887-93.
 40. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. *中藥大辭典*. 서울: 도서출판정담. 1998:1961-71.