

## 加味寧神丸이 CT105로 유도된 Neuro2A 세포주에서의 抗痴呆 效果

방재선, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상  
대구한의대학교 한의과대학 심계내과학교실

### Study on the Inhibitory Effect of Anti-Alzheimer in CT105-induced Neuro 2A Cell Lines by *Gamiyaungshinhwan* Water Extract

Jae-Sun Bang, Hyun-Duk Yoon, Oh-Chul Shin, Yoo-jung Shin, Chi-Sang Park  
Department of Internal Medicine,  
College of Oriental medicine, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

The water extract of *Gamiyaungshinhwan* (GYH), has been used *in vitro* tests for its beneficial effects on neuronal survival and neuroprotective functions, particularly in connection with CT105-related dementias and Alzheimer's disease(AD). CT105 derived from proteolytic processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP), including the amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), plays a critical role in the pathogenesis of Alzheimer's dementia. We determined that transfected overexpressing APP695 and  $A\beta$  CT105 have a profound attenuation in the increase in CT105 expressing neuro2A cells from GYH.

Experimental evidence indicates that GYH protects against neuronal damage from cells, but its cellular and molecular mechanisms remain unknown. Using a neuroblastoma cell line stably expressing CT105-associated neuronal degeneration, we demonstrated that GYH inhibits formation of amyloid- $\beta$  fragment ( $A\beta$  CT105), which are the characteristic, and possibly causative, features of AD. The decreased CT105  $A\beta$  in the presence of GYH was observed in the conditioned medium of this CT105-secreting cell line under *in vitro*. In the cells, GYH significantly attenuated mitochondrion-initiated apoptosis and decreased the activity of Bax, a key enzyme in the apoptosis cell-signaling cascade.

These results suggest that neuronal damage in AD might be due to two factors: a direct CT05 toxicity and the apoptosis initiated by the mitochondria. Multiple cellular and molecular neuroprotective mechanisms, including attenuation of apoptosis and direct inhibition of CT105 aggregation, underlie the neuroprotective effects of GYH.

**Key words:** *Gamiyaungshinhwan*, Alzheimer's disease

#### 1. 서론

치매는 뇌의 만성 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 증후군이며, 이로 인해 기억·사고·지남력·이해·계산·학습능력·언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애가 있는 것을 말한다<sup>1</sup>.

· 교신저자: 윤현덕 대구 수성구 상동 165  
대구한방병원 심계내과학교실  
Tel: 053-770-2178  
E-mail: wkfgoeh2@hanmail.net

이 중 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 진행성 치매로 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovascular degeneration) 등을 특징으로 한다<sup>2</sup>.

AD의 원인에 대한 가설은 다양하게 제시되고 있는데<sup>3</sup>, 대표적인 원인설로는 신경반 구조의 주된 구성 성분이며 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 잘려 나온 amyloid β protein(Aβ)이 뇌에 축적이 되면 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극해 신경세포를 손상시켜 결과적으로 치매의 증상을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>.

그러나 최근에는 베타 아밀로이드 전구단백질의 대사물인 c말단 단백질(carboxyl terminal fragment of APP)이 Aβ보다 더 독성이 있다고 알려져 있어서<sup>5</sup>, c말단 단백질과 관련한 AD에 대한 연구가 활발히 진행 중이다<sup>6</sup>.

한의학에서 치매는 呆病, 癲狂症, 虛勞, 健忘 등의 病證에서 찾아 볼 수 있으며, 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<sup>7</sup>.

최근 한의학에서도 치매에 대해 老化를 억제하는 항산화 작용에 대한 研究<sup>8</sup>, 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 研究<sup>9</sup>, 腦성상세포로부터 분비되는 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1의 억제연구 및 Aβ의 생성억제에 관한 研究<sup>10</sup>, AD의 관련인자인 APP와 presenilin(PS)유전자의 과다발현세포주를 이용한 한약물 연구<sup>11</sup> 등 다양한 연구가 진행되고 있다. 아울러 조구등<sup>12</sup>, 전매단<sup>13</sup>, 세심탕<sup>14</sup>, 지미탕<sup>15</sup>, 산조인<sup>16</sup>이 pCT105로 유도된 신경아세포종 세포주에서 항치매 효과가 규명되어 한약물 항치매 치료제가 개발 연구 중에 있다.

이에 저자는 《東醫寶鑑》<sup>17</sup>에 수록된 心血不足으로 인한 驚悸怔忡, 健忘恍惚 등을 치료하는 加味寧神丸의 抗痴呆 효과를 규명하기 위하여 신경아세포종 세포주를 pCT105로 처리하여 치매와 유사한 신경세포사를 유도하여 이에 대한 효과를 비교 관찰한바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 材料

#### 1) 試料의 調製

실험에 사용한 加味寧神丸은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1000g을 3차 증류수에 85℃에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후, 加味寧神丸 수추출물을 동결건조 하여 220g을 회수하였다. 실험전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 희석하여 실험에 사용하였으며, 처방의 구성은 《東醫寶鑑》<sup>38)</sup>에 수록된 것으로 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Gamiyoungshin-hwan

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
生乾地黃	<i>Rehanniae Radix</i>	6.0
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.0
白芍藥	<i>Paeonia japonica</i>	4.0
白茯苓	<i>Poria</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriope Tuber</i>	4.0
陳皮	<i>Citrus unshiu</i>	4.0
貝母(炒)	<i>Fritillaria ussuriensis</i>	4.0
遠志(薑製)	<i>Polygalae Radix</i>	2.8
川芎	<i>Cnidium officinale</i>	2.8
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	2.0
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	2.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
Total amount		41.6

## 2) 試藥

실험에 사용된 fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco BRL Co.에서, Ethanol은 독일의 Merck Co.에서, anti-rabbit IgG conjugated fluorescein isothiocyanate(FITC), anti-Alexa Fluor568 mouse IgG 및 ECL kit는 Amershm phamacia Co.에서 구입하였다. 2차 항체인 FITC와 Alexa Fluor 568는 Molecular Probe Co.에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) pCT105 플라스미드의 제작

pCT105 플라스미드의 구축은 치매 유발 유전자 APP695를 가지고, 포유동물 세포주인 Neuro 2A 세포주내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하였다. APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질 전환시켜 플라스미드를 추출하였다.

### 2) pCT105 형질조합 시킨 세포주의 배양

세포주인 Neuro 2A를 계대배양 시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 배양하였다. 반응액 A로 pCT105 2 $\mu$ g와 serum free medium(이하, SFM) 100 $\mu$ l을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10 $\mu$ l와 SFM 100 $\mu$ l을 혼합하고 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후, SFM 배지 1.5ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 하룻밤 배양하였다. 다시 계대배양하면서 G-418 450 $\mu$ g/ml로 selection을 2주간 실시하고, 단일 clone을 선정하여 사용하였다. CT105 발현 Neuro 2A cell line을 배양한 다음, 加味寧神丸약물군 0, 5, 10, 25, 50 $\mu$ g/ml 농도별로 4일간 배양한 후 TT(3-[4,5-dimethiazol-2y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)용액 20 $\mu$ l을 첨가하여 배

양한 다음 dimethyl sufoxide(DMSO) 50 $\mu$ l을 첨가하였다.

### 3) 세포 형태학적 관찰

CT105 발현 Neuro2A를 10<sup>3</sup>세포수로 하룻밤 배양한 다음, 加味寧神丸 약물군의 10, 50  $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. 상기 세포주의 세포사 억제를 조사하기 위해 5% FBS가 함유한 RPMI medium, penicillin/streptomycin이 함유한 배지를 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다.

### 4) NO 생성도 측정

APP가 발현되지 않는 정상적인 대조군, APP695를 과발현시킨 군, CT105를 과발현시킨 군의 3군으로 구별하였다. 加味寧神丸을 처리하지 않은 군과 50  $\mu$ g/ml의 농도로 3일간 加味寧神丸을 처리한 약물군으로 나누어 실온에서 반응을 시킨 후, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A<sub>570</sub>/A<sub>630</sub> nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) 공초점 형광현미경 측정

Nerve growth factor(NGF)를 50ng/ml가 되게 첨가하고 5시간동안 처리한 후, 약물 무처리군, CT105 처리군 그리고 CT105에 加味寧神丸 50 $\mu$ g/ml농도로 처리한 군으로 구별하여 100개의 세포에서 공초점 현미경(Confocal laser screening microscope, Olympus)의 excitation 488 nm, emission 568 nm하에서 관찰하여 정상군과 서로 비교하여 단백질발현을 관찰하였다.

### 6) Western blot을 이용한 단백질발현 분석

CT105 발현 Neuro 2A cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 배양한 다음 세포를 lysis buffer에 용해하였다. 단백질량은 Pierce Micro-BCA Protein Assay로 측정하였다. Membranes을 mouse monoclonal APP, Bax, actin antibody(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA)로 표지하기 위해 1시간 동안 반응시켰다. anti-mouse or anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibodies로 1시

간 반응시킨 후, ECL chemiluminescence detection reagent 로 발색시켰다.

7) Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) 측정

1 x PBS로 mitosensor reagent(BD Biosciences)인 Rhodamin 123을 5 $\mu$ g/ml되게 처리한 후, flow cytometry를 이용하여 측정하였다. Ratio는 590(590/530 ratio)에서  $\Delta\Psi_m$ 수치를 얻었다. CT105 발현 Neuro 2A cell lines를 glass coverslips 위에 분주하고 加味寧神丸 무처리, 5, 10, 25, 50 $\mu$ g/ml을 15분간 각각 2 $\mu$ M Rhodamin 123으로 처리하였다. 세포는 microscope로 관찰한 후, 세포내의 isotonic buffer로 Rhodamin 123 형광량을 측정하였다. 이상과 같은 방법으로 加味寧神丸을 10, 50 $\mu$ g/ml로 처리하여 ATP량을 측정하기 위해 luminator로 측정하였다.

8) 통계처리

Membrane potential은 5회 반복 측정하였고, 그 이외의 실험은 3회 이상 수행하였다. 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. 성 적

1. 시간별 세포형태학적인 변화

$\beta$ APP의 c말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 加味寧神丸(Gamiyoungshin-hwan, GYH)을 10, 50 $\mu$ g/ml농도로 처리하여 생존율을 확인하였다. 시간별로 세포에 처리한 다음 세포형태학적 변화를 관찰한 결과 대조군은 세포사멸이 거의 형성된 반면, 加味寧神丸을 10, 50 $\mu$ g/ml를 처리한 경우 세포사멸이 지연되거나 세포증식을 회복하는 양상이 관찰되었다(Fig. 1). 加味寧神丸 50 $\mu$ g/ml를 처리한 세포에서 3일 경과 후 정상세포의 세포 형태와 유사할

정도로 잘 증식되는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

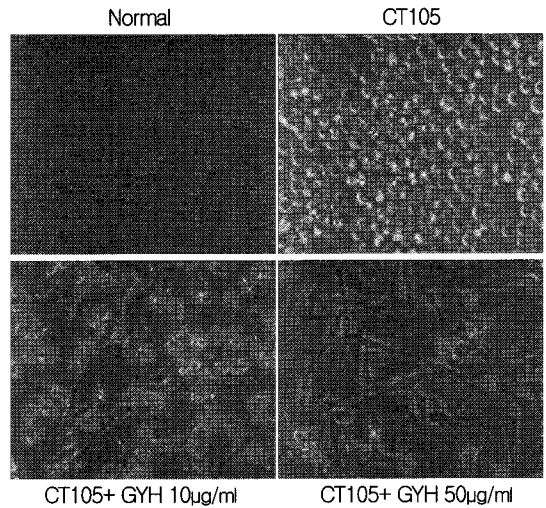


Fig. 1. Morphological characterization of cell death from CT105 overexpressed neuro 2A neuroblastoma.

Similar results were found in at least three separate experiments. Fresh cells resuspended in RPMI medium were incubated with prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by invert microscopy.  
GYH : Gamiyoungshin-hwan

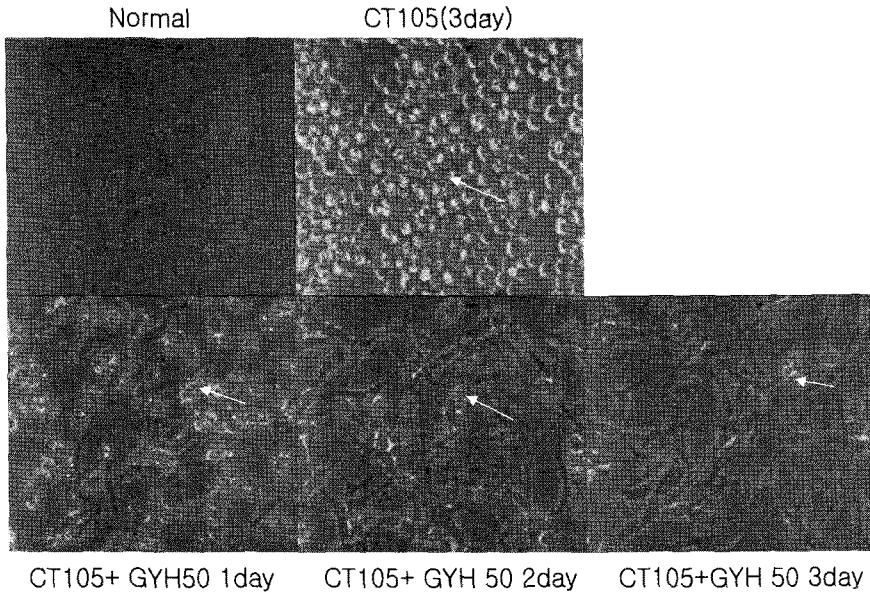


Fig. 2. Phase-contrast microphotographs of CT 105 expressing cells by GYH.

Cells were incubated in 5% FBS with RPMI medium. Cells were observed after treat with GYH. Morphological characteristic of apoptosis induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Apoptotic cells were indicated by the arrows. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy.  
 GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

## 2. 신경세포의 생존을 변화

CT105발현이 확인된 신경세포에서 加味寧神丸이 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 생존율의 변화를 관찰하였다. 정상군은 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 났어 자랐으나, CT105가 발현된 대조군은 세포사가 거의 유도되었을 뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났다. 이에 반해 加味寧神丸 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서는 신경세포의 형태가 정상적이며 신경돌기가 잘 발달되어 있는 것으로 나타났다. 이 가운데 加味寧神丸 50 $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에서  $88 \pm 3$ 의 생존율이 나타나, 신경세포의 재생유도가 가장 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 나타났다(Fig. 3, Table 2).

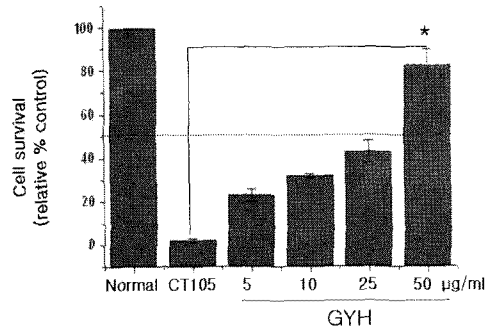


Fig. 3. GYH inhibits neuronal cell death induced by CT105.

The data represent mean values  $\pm$  S.D. of three different experiments performed in triplicate ( $p < 0.05$ ). GYH inhibits cell death with an IC50 value about 50  $\mu\text{g/ml}$ . A dotted line represented from IC50 value by MTT assay.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

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

Table 2. In Vitro Time Course of Neuro2A Cell Viability within CT105 Cells.

	Time of Treatment	Survival ratio
Normal	3day	100
CT105	3day	0
CT105+GYH	1day	43±5
	2day	76±3*
	3day	88±3*

\* Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(p<0.05).

3. NO생성도에 미치는 영향

CT105발현이 확인된 신경세포에서 加味寧神丸이 신경세포주 내의 NO생성을 억제 하는지를 加味寧神丸 50µg/ml 농도로 처리하여 관찰하였다. 대조군에서는 100±2에서 95±2로, APP695 발현군에서는 106±2에서 97±2로, 加味寧神丸 50µg/ml 처리군에서는 113±3에서 100.5±2로 나타나 유의성(p<0.05) 있게 억제 하였다(Fig. 4).

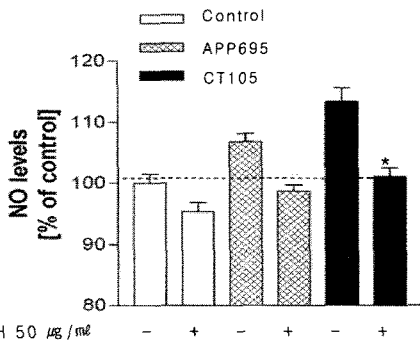


Fig. 4. GYH inhibits NO formation from CT105-induced neuronal cells.

The data represent mean values ± S.D. of three different experiments performed in triplicate (p<0.05). GYH inhibits NO formation by iNOS. A dotted line represented with IC50 value by NO formation assay.

GYH : Gamiyoungshin-hwan

\* Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(p<0.05).

4. ATP 생성도에 미치는 영향

加味寧神丸 처리군이 CT105로 인한 신경세포의 미토콘드리아 막전위에 의해 발생하는 ATP량을 측정 한 결과, 정상군이 100±0에 비해 CT105 발현세포주에서는 52±1로 나타났으며, 加味寧神丸 10, 50 µg/ml 처리군에서는 각각 77±1, 83±1로 나타나 加味寧神丸 처리군 모두 유의성(P<0.05)있게 ATP량을 증가시켰다(Fig. 5).

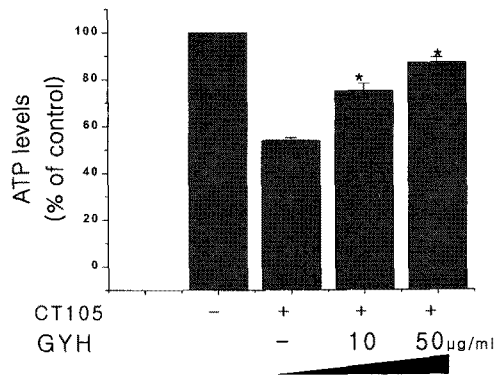


Fig. 5. Effects of long term exposure to CT105 on mitochondrial membrane ATP level.

Measurement of  $\Psi_m$  in Neuro2A cells stably transfected with human CT105 cells. Polarization of mitochondrial membrane ATP level in CT105 Neuro2A cells (p<0.05 versus normal Neuro2A cells). Mitochondrial membrane ATP level is significantly decreased in APP CT105 Neuro2A cells compared with normal neuro2A.

GYH : Gamiyoungshin-hwan

\* Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(p<0.05).

5. Membrane potential에 미치는 영향

CT105발현이 확인된 신경세포에서 加味寧神丸 처리군이 막전위의 개선 효과를 측정 하였다. 정상군이 100±0.0에 비해, 대조군인 CT105 발현세포주에서는 67±1로 나타났으며, 加味寧神丸 5, 10, 25, 50µg/ml를 처리한 군에서는 각각 75±0.5, 81±1, 80.5±1, 87±0.5로 나타났다. 따라서 加味寧神丸이 각각의 모든 농도에서 유의성(p<0.05) 있는

membrane potential의 개선효과가 있었다(Fig. 6)

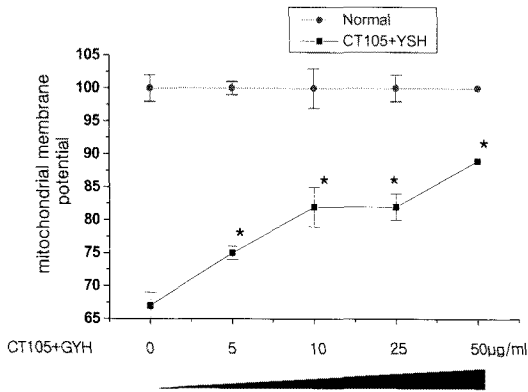


Fig. 6. Rh123 accumulates ATP level in mitochondria from CT105 - induced neuronal cells.

Images showing Rh123 fluorescence in N2a detected by FLOW CYTOMETRY and Confocal laser scanning microscopy. Cells were loaded with Rh123, respectively (n = 3 for Rh123 concentration) for 30 min of incubation. Cells were incubated at different concentrations of GYH, and ATP content was measured by flow cytometry. The scale representing Rh123 fluorescence have been inverted to give a more intuitive representation of mitochondrial membrane of ATP level. This is a representative experiment from a series of three.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

\* Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(p<0.05).

## 6. 단백질발현에 미치는 영향

막전위에 미치는 영향을 파악하기 위해 CT105 발현세포주에 加味寧神丸 50µg/ml를 3일간 처리하여 APP, housekeeping 단백질인 actin, 미토콘드리아 세포사에 관여하는 Bax를 대상으로 단백질 양상을 조사하였다. 대조군인 경우 APP 단백질이 시간 경과에 따라 강하게 발현되었고, 아울러 Bax 단백질 역시 발현되는 것을 보아 CT105에 의해 세포사가 일어남을 알 수 있었다. 加味寧神丸 50 µg/ml를 처리한 경우 APP 단백질 발현이 소실되었고, 또한 Bax 단백질 발현도 소실되는 것이 관찰되었다(Fig. 7).

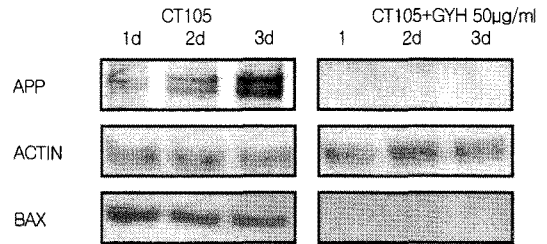


Fig. 7. Western blot analysis of human APP expression in mitochondria of transfected Neuro 2A cells.

Western blot analysis of APP (human CT105), actin, and Bax in mitochondrial and cytosolic fraction. The pellet contains all of the cellular compartments with the exception of mitochondrial and cytosolic fraction. APP is present in mitochondria of APP (CT105) neuro2A cells. The purity of cellular fractions was evaluated by Western blot analysis of cellular fractions using antibodies to Bax (mitochondria-specific) as markers. Actin serves as a marker for equal loading and neuronal cells by Western blot analysis. CT105 + GYH 50 µg/ml was loaded in each lane, except the lane for the cell sample, which contained CT105 + GYH 50 µg/ml.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

## 7. 공초점 형광현미경하에서 단백질발현 측정

정상군은 APP가 기존에 발현된 단백질의 분포를 나타내고 있고, 대조군인 CT105 처리군에서는 강하게 발현됨을 알 수 있으며, 특히 Mito-DsRed 단백질발현과 merge 시켜 보면 동시에 미토콘드리아에서 APP가 발현되는데 이는 CT105가 미토콘드리아 부근에서 막전위 장애가 유도됨을 확인할 수 있었으며, 加味寧神丸을 처리한 경우 다시 감소함을 알 수 있었다(Fig. 8).

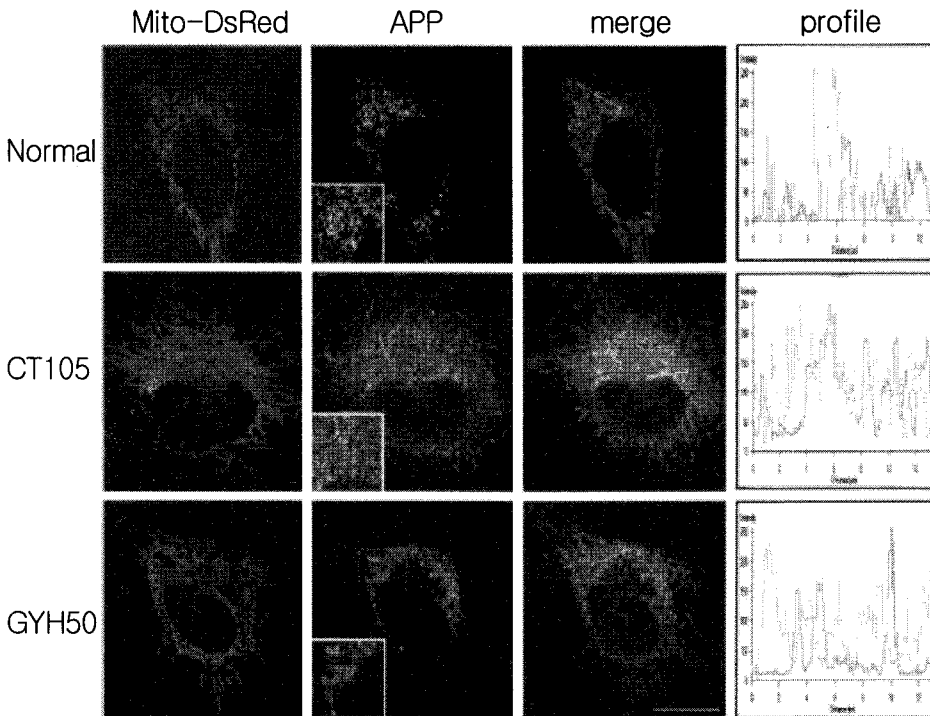


Fig. 8. Immunolocalization of APP and Ds red-mito in mouse N2a neuroblastoma cells.

The panels show confocal laser immunofluorescence staining for human APP. Merged panels are indicated. Scale bar, 20  $\mu$ m. Intracellular localization of human CT105 is shown as follows (middle parts). Neuro2A cells that express stably transfected pCT105 were stained with APP antibody (green) and observed under a confocal laser scanning microscope. The cells were also expressed with Mito-Ds red (red) to identify the location of mitochondria region (red) to identify the location of mitochondria in cells stably transfected with pCT105.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

### 8. APP단백질 발현에 미치는 영향

APP단백질(Alexa-Fluor568 :적색형광), 세포 막단백질(FITC: 녹색형광)를 관찰한 결과, 정상군에서는 녹색형광이 Z-section에서도 강하게 나타내지만, 대조군의 경우 APP가 강하게 적색형광을 나타내었는데 이는 분석 Z-section에서도 APP가 막 부근에 국재함을 알 수 있고, 加味寧神丸 처리군에서는 크게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 加味寧神丸이 CT105의 발현을 억제하는 물질을 함유하고 있음을 예측할 수 있었다(Fig. 9).

형광강도를 측정하기 위해 fluorescence intensity(이하 FI)와 미토콘드리아 막 전위차의 관계를 분석한 결과, CT105에 의해 막전위(membrane potential, 이하 MP)가 감소하였다(Fig. 10).

정상군에서는 APP의 단백질발현에 의해 형광의 FI 양이 약하게 나타났고, CT105 경우 강하게 FI 값을 나타냈다. 이에 반해 加味寧神丸 처리군에서는 감소함을 알 수 있었다. 이 상태에서 미토콘드리아 막전위를 관찰한 경우, CT105를 처리하지 않을 때의 APP 양은  $20 \pm 2\%$ , CT105 처리군의 경



우는  $230 \pm 12\%$ . 加味寧神丸 처리군에서는  $59 \pm 5\%$  정도 였다. 따라서 CT105에 의해 발현된 단백질은 加味寧神丸에 의해 억제되었고, 미토콘드리아의 막

전위차가 장애로 인해 ATP 고갈을 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 10, Table 3).

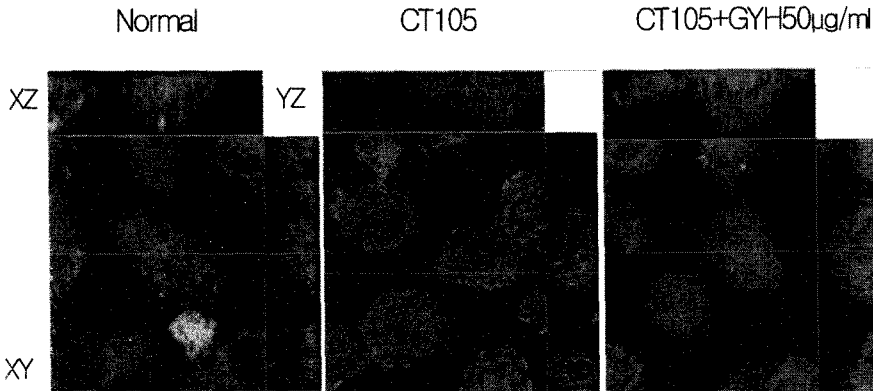


Fig. 9. Immunolocalization by confocal laser-scanning microscopy of membrane and APP CT105 in NeuroA2 cells. wild-type membrane BODIPY 505/515 (phosphatidylinositols) and APP695 (CT105)(red).

The two proteins were detected by indirect immunofluorescence (membrane: green signal) with BODIPY505/515 probe and APP(CT105: red signal). Antibody-antigen interactions were detected with a fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibody. The upper part of each panel shows a top (x/z) view of the cell monolayer: the sider part shows a vertical (y/z) section. The red indicate APP protein of the position where the x/z section was made.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

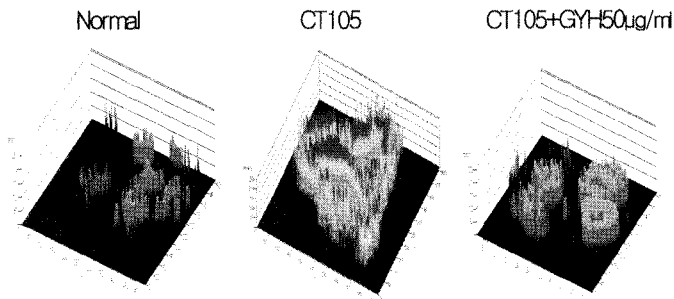
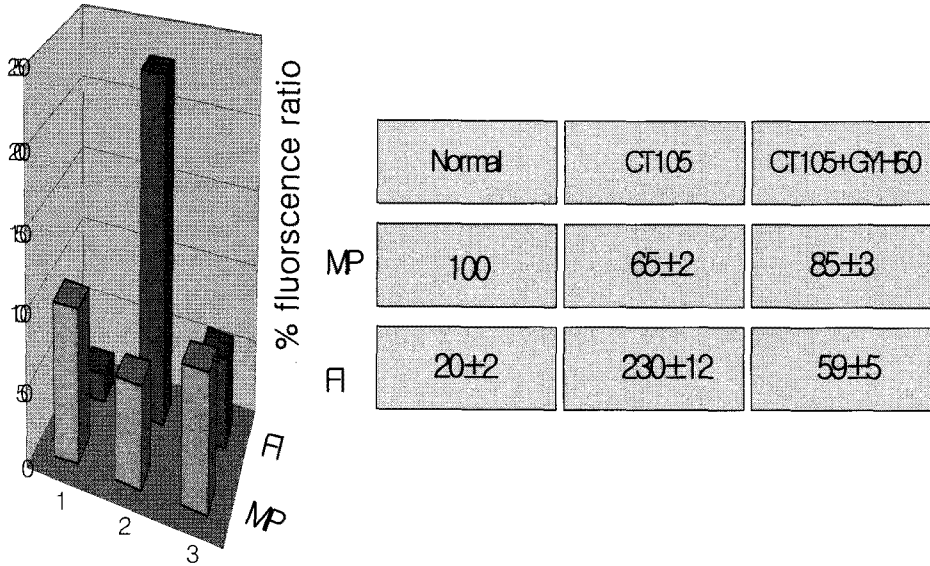


Fig. 10. Fluorescence intensity of confocal laser-scanning microscopy of APP CT105 in NeuroA2 cells.

APP695 (CT105)(red) were detected by immunofluorescence of APP(CT105: red signal). Antibody-antigen interactions were detected with a fluorescence isothiocyanate-labeled secondary antibody. Each panel shows fluorescence intensity of the cell monolayer: the part shows a horisonal (x/y) section. The red indicate APP intensity of the position where the x/y section was made.

GYH : *Gamiyoungshin-hwan*

Table 3. Membrane Potential and Fluorescence Intensity in Neuro2A Cell within CT105 Cells.



#### IV. 고찰 및 결론

치매는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 뇌 질환과 같은 병적인 노화로 인한 뇌 증후군으로<sup>1</sup> 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)과 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매 그리고 양자가 혼재된 혼합형 치매가 있는데, 이 중에서 가장 높은 비율을 차지하는 것이 AD이다<sup>1-2</sup>.

알츠하이머병의 중요한 병변은 42~43개의 아미노산으로 구성된 β-amyloid peptide(Aβ)가 세포 밖에 침착하여 신경반을 형성하는 것인데, Aβ가 세포독성을 나타내기 때문에 AD의 발병기전에 있어 많은 관심을 끌고 있다<sup>18</sup>.

Aβ는 21번 chromosome의 single gene에 encode된 amyloid precursor protein(APP) family로부터 유래되는데, APP는 다양한 molecular weight form

이 있으며 Aβ sequence를 포함한 가장 풍부한 APP는 amino acid의 수에 따라 명칭이 결정된다. 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질의 일부가 β-secretase나 γ-secretase에 의해 잘라져서 Aβ가 생성 되는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다<sup>19</sup>. Aβ는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 이차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있으며, 최근에는 APP의 c말단 부위인 c말단 단백질(carboxy-terminal amino acid peptide fragment of APP)이 Aβ보다 더 독성이 강하다고 알려지고 있고, Aβ와 c말단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 연구가 계속 진행 중에 있다<sup>20</sup>.

최근의 연구에서는 c말단 단백질 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고<sup>21</sup>, 생체내 실험에서 해

마에 있는 long-term potentiation(LTP)을 차단한다고 보고하고 있다<sup>22</sup>. 또한 이 단백질은 칼슘 항상성에도 악영향을 미치는데, rat brain microsome에서는  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  교환활성도에 의해 칼슘유입을 억제함으로써 칼슘 항상성을 손상시키지만 A $\beta$ 는 그렇지 않다고 하여<sup>52-53</sup>, 기존의 A $\beta$ 보다 더 강력한 독성을 갖는 c말단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 한다는 가설이 제시 되고 있다<sup>5</sup>.

그리고 c말단 단백질이 신경교세포의 활성화로 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발시켜 CT105와 AD의 관련성을 증명해주고 있다<sup>6</sup>.

현재에는 c말단 단백질과 AD와의 관련성 뿐만 아니라 치료제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어서 한의학계에서도 한약을 이용한 치료제 개발이 시급히 이루어져야 한다고 생각되어 본 연구를 하게 되었다<sup>6</sup>.

한의학에서 痴呆는 明代《景岳全書·雜證謨》<sup>23</sup>癡狂篇에서 “痴狀證。凡平素無痰而或以鬱結。或而不遂。或而思慮。或而疑貳 或而驚狂而漸致痴。言辭顛倒。舉動不經。…… 此其逆氣在心。或肝膽二經……”으로 기록되었고, 歷代醫書에서 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 範疇이다<sup>7</sup>.

痴呆의 原因은 稟賦不足, 肝腎虧虛, 情志所傷, 痰濁阻竅, 瘀阻腦臟 등으로 크게 나눌 수 있다<sup>23-4</sup>. 主要 病因病機로는 郭 등<sup>25</sup>은 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀을 發한다고 하였고, 張<sup>26</sup>은 呆從痰治로 治痰하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였다. 이와 같이 腦의 退行性病變과 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 臟腑的으로는 肝腎不足이 重要하게 作用하고 痰飲과 瘀血의 生成이 腦에 停滯됨으로 인해 各種 症狀이 나타나는 것임을 알 수 있다<sup>7</sup>.

痴呆의 臨床的 研究로는 補益精氣, 益腎健腦, 化痰宣竅, 活血通竅<sup>24</sup>의 治法을 應用함으로써 病情의 發展을 防止하고 病人의 體質을 增強하며 腦機

能의 衰退를 緩慢하게 늦추는 方法으로 治療하고 있다.

加味寧神丸은 《東醫寶鑑》<sup>17</sup>에 수록되어 있는 처방으로 心血不足으로 인한 驚悸怔忡, 健忘恍惚 등의 症狀을 治療하는 처방으로 生乾地黃, 當歸, 白芍藥, 白茯苓, 麥門冬, 陳皮, 貝母, 遠志, 川芎, 酸棗仁, 黃連, 甘草 등으로 구성되어 있는데, 生乾地黃은 清熱滋陰하고, 當歸는 補血和血하고 白芍藥은 養血柔肝하고, 白茯苓은 滲濕利水, 寧心安神하며, 麥門冬은 清心除煩, 益胃生津하며, 陳皮는 理氣調中, 化痰燥濕하고, 貝母는 化痰止咳하며, 遠志는 寧心安神, 祛痰利竅하며, 川芎은 活血行氣하며, 酸棗仁은 養心安神하고, 黃連은 清熱燥濕하며, 甘草는 補中益氣한다<sup>27</sup>.

최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구로는 益精地黃湯<sup>11</sup>, 補益清腦湯<sup>28</sup>, 遠志<sup>29</sup>, 石菖蒲<sup>30</sup> 등이 있었으며, 치매 치료제 개발의 일환으로 한약제를 이용한 CT105로 유도된 신경세포주의 항치매 효과 연구<sup>12-6</sup>를 계속하고 있다.

이에 著者는 임상에서 腦神經계 질환에 사용되고 있는 加味寧神丸의 抗痴呆 效果를 규명하기 위하여 CT105로 유도된 Neuro2A 세포주에서 신경세포의 세포사 유도 및 加味寧神丸 처리로 인한 형태학적인 변화 및 생존율, 신경세포의 NO 및 ATP의 생성도에 미치는 영향, 공초점 형광현미경 측정, Western blot을 이용한 단백질발현 분석, 신경세포의 membrane potential에 미치는 영향 등을 분석하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로  $\beta$ APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 CT105의 발현을 加味寧神丸 수추출물 10, 50 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 세포에 생존율을 확인한 결과 IC<sub>50</sub> = 50 $\mu$ g/ml 이었다. 이를 근거로 시간별로 세포에 처리한 다음 세포형태학적 변화를 관찰한 결과 대조군은 세포사멸이 거의 형성된 반면, 加味寧神丸을 10와 50  $\mu$ g/ml를 처리

한 경우 세포사멸이 지연하거나 세포증식을 회복하는 양상을 3일 경과에서 관찰되었고, 특히 加味寧神丸 50 $\mu$ g/ml를 처리한 세포에서 가장 우수하게 정상세포의 세포 형태와 유사할 정도로 유지하는 것을 관찰하였다.

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 加味寧神丸이 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 생존율의 변화를 관찰한 결과, 加味寧神丸 농도가 IC50 인 50 $\mu$ g/ml을 처리시 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면, CT105가 발현된 세포 대조군은 거의 세포사 유도가 이루어진 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났다. 이에 반해 加味寧神丸 처리군은 신경세포가 잘 성장하는 것과 신경돌기가 잘 발달되어 재생이 유도된 것으로 나타났다. 이 결과로 볼 때 加味寧神丸이 신경세포사를 억제하며 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하여 신경세포의 재생을 유도하며 또 그 정도는 농도의 존적이라고 생각되어진다.

다음으로 CT105 발현이 확인된 신경세포에서 치매단백질인 APP695의 CT105에 의해 iNOS가 발현되면서 유도되리라 예측되는 NO양을 확인하였다. 즉 加味寧神丸이 iNOS에 의해 유도되는 CT105 세포주 내의 NO생성 억제를 조사하였다. 정상군에서는 100 $\pm$ 2%이었으며, APP695발현군에서는 106 $\pm$ 2%이고, CT105처리군은 113 $\pm$ 3%인데 반해 加味寧神丸 50 $\mu$ g/ml농도에서 각각 약 95 $\pm$ 2, 97 $\pm$ 2, 100.5 $\pm$ 2 %정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현은 加味寧神丸이 유의성 있게 억제하였고, NO 생성도는 50 $\mu$ g/ml에서 가장 강하게 억제되는 것으로 나타났다(p<0.05).

그리고 CT105발현이 확인된 신경세포에서 CT105로 인한 신경세포의  $2 \times 10^7$  세포수의 미토콘드리아막 전위에 의해 발생하는 ATP량을 측정하였다. 정상군에 비해 CT105발현 세포주는 거의 52 $\pm$ 1%이내에서 ATP level를 유지하는데 이는 미

토콘드리아의 장애에 의한 결과로 나타났고, 加味寧神丸 10, 50 $\mu$ g/ml 처리시 77 $\pm$ 1%와 83 $\pm$ 1%로 나타났는데, 이는 대조군에 비해 加味寧神丸이 약 25~31% ATP level를 증가 시킨다는 것을 기능함을 알 수 있었다 따라서 ATP증가는 加味寧神丸에 의해 유의성 있게 나타내었다.

다음으로 CT105 발현이 확인된 신경세포에서 미토콘드리아막 전위에 의해 발생하는지를 Rhodamin 123 (2  $\mu$ M = 0.8  $\mu$ g/ml)를 이용하였다. 여러 자극을 주어서 mitochondria의 과분극이 일어나면 membrane potential이 감소하게 되어 탈분극이 일어나는데 이를 확인하기 하기 위해 fluorescence를 측정하였다. 정상군은 약 100% membrane potential인데 반해 대조군인 CT105 발현세포주는 약 67 $\pm$ 1정도였다. 加味寧神丸 5, 10, 25, 50 $\mu$ g/ml 처리시 75 $\pm$ 0.5, 81 $\pm$ 1, 80.5 $\pm$ 1, 87 $\pm$ 0.5로 membrane potential의 개선효과뿐만 아니라 신경재생에도 관여한다고 생각된다.

막전위에 미치는 영향을 파악하기 위해 APP의 CT105에 의한 세포사를 파악할 필요가 있어서 단백질차원에서 발현양상을 분석하였다. CT105 발현 Neuro 2A cell lines를 6 well에 분주하고 加味寧神丸 50 $\mu$ g/ml을 3일간 처리하여 APP, housekeeping 단백질인 actin, 미토콘드리아 세포사에 관여하는 Bax를 대상으로 단백질을 양상을 조사하였다. 대조군 경우 APP가 시간이 경과하면 할수록 강하게 발현되고 이에 Bax도 역시 발현되는 것을 보아 CT105에 의해 세포사가 일어남을 알 수 있었다. 加味寧神丸을 처리한 경우 APP 발현이 소실되었고, Bax 역시 소실되는 것을 관찰하였다. 따라서 加味寧神丸이 APP발현 및 Bax 모두 감소 또는 억제시키는 것으로 보아 미토콘드리아의 기능 회복에 관여함을 알 수 있었다.

CT105발현이 확인된 신경세포에서 미토콘드리아막 전위에 의해 발생하는지를 파악하기 위해 Mito-DsRed 단백질발현을 유도하여 APP와의 발현양상을 공초점현미경 하에서 분석하였다. 정상군

은 APP가 기존에 발현된 단백질의 분포가 나타났고, 대조군에서는 Mito-DsRed 단백질발현과 동시에 미토콘드리아에서 APP가 발현되는데 이는 CT105가 미토콘드리아 부근에서 막전위 장애를 유도함을 알 수 있었다. 加味寧神丸을 처리한 경우 APP 발현이 감소하는 것을 알 수 있었고, 이는 단백질분포 profile을 통해 더욱 확실히 APP 발현 억제를 알 수 있었다.

CT105발현이 확인된 신경세포에서 APP단백질의 발현 분포를 파악하기 위해 Z-section을 통해 단백질 발현을 관찰하였다. APP단백질(Alexa-Fluor568 :적색형광), 세포막단백질(FITC:녹색형광) 관찰시 정상군에서는 녹색형광이 Z-section에서도 강하게 나타났고, 대조군에서는 적색형광안이 강하게 나타나 APP단백질이 막부근에 국재하고 있음이 관찰되었고, 加味寧神丸 처리군에서 크게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 加味寧神丸이 CT105의 발현을 억제하는 물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

형광강도인 fluorescence intensity를 측정할 결과, 정상군에서는 APP의 단백질발현에 의해 형광의 FI양이 약하게 나타났고, CT105 경우 강하게 FI값을 나타내는데 반해 加味寧神丸 처리군에서는 감소함을 알 수 있었다. 이 상태에서 미토콘드리아 막전위를 관찰한 경우 CT105를 처리하지 않는 경우 APP양은 약  $20\pm 2\%$ 이었고, CT105 경우  $230\pm 12\%$ 이었으며, 加味寧神丸 처리군에서는 약  $59\pm 5\%$ 정도였다. 따라서 CT105에 의해 발현된 단백질은 미토콘드리아의 막 전위차가 장애를 받아 ATP고갈을 야기하지만 加味寧神丸에 의해 억제되는 것이 관찰되었다.

이상의 결과를 통하여 加味寧神丸은 세포사를 유도하는 단백질의 발현과정을 억제하고, 신경세포 손상을 회복시키는 효능 관찰되었다. 향후 加味寧神丸을 이용한 다양한 실험 및 임상적인 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. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사, 1992:256-71, 327-30, 663-4.
3. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 1998;33(5):371-8.
4. 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.
5. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and  $Na^+/Ca^{2+}$  gradients. *Neuroreport.* 2000;11(15):3357-60.
6. 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.
7. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 痴呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 서울:동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.
8. 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. 서울, 大韓韓醫學會誌. 1996;17(1):21-36.
9. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 서울, 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
10. 김태현, 김준한, 강형원, 유영수 : 세심탕에 의한 뇌성상세포로부터 염증성세포활성물질의

- 분비 억제 효과, 동의신경정신과학회지, 2001;12(1):137-50.
11. 최병만, 이상룡 : 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 2000;11(2):23-42.
  12. 강승준, 박창국 : 鈞鉤藤이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향, 대한분초학회지, 2003;18(2):157-67.
  13. 송호상, 박창국 : CT105로 유도된 인간 신경아세포종 세포주에서 轉呆丹의 항치매 효과, 대한방제학회지, 2003;11(2):95-110.
  14. 권형수, 박창국 : CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서 洗心湯의 항치매 효과, 대한한의학회지, 2004;25(2):138-50.
  15. 강승준, 박창국 : CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서 指迷湯의 항치매 효과, 대한한의학회지, 2004;25(3):482-91.
  16. 정정욱, 박창국 : 酸棗仁이 CT105에 의한 신경세포 상해 및 백서의 기억에 미치는 영향, 대한분초학회지, 2005;20(1):19-33.
  17. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1998:115.
  18. 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.
  19. 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  $\beta$ -protein production in human neural NT2N cells. *J Biol Chem*. 1995;270:4916-22.
  20. 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.
  21. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH. Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) in PC12 cells by nicotine. *Molecular Pharmacology*. 1997;52:430-6.
  22. 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.
  23. 張介賓. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社. 1985:573-8.
  24. 閻孝誠 主編 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, 1993:242-54, 784-91.
  25. 郭宇鵬, 陳延 : 海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 1997;38(10):586-7.
  26. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 1995;3:20-1.
  27. 서부일, 김상찬 감수. 本草集成. 서울:목과토. 2000:31, 88, 111, 130, 319, 600, 676, 680, 741, 758, 761, 820, 840.
  28. 고태준, 이상룡 : 補益清腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 2001;12(1):151-67.
  29. 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, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 1999;10(1):95-108.
  30. 이금주, 정현우, 강성용 : 石菖蒲가 白鼠의 腦 연막동맥의 직경에 미치는 기전연구, 대한분초학회지, 2000;15(2):4.