

遠志와 石菖蒲 混合抽出液의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과

이성률 · 강형원* · 김상태¹ · 류영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 1: 지젠바이오/주암생명공학연구소

The Effects of anti-Alzheimer in pCT105-induced Neuroblastoma cell lines by Radix Polygalae and Rhizoma Acori Graminei mixture extract

Sung Ryull Lee, Hyung Won Kang*, Sang Tae Kim¹, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: JuAm of Research Institute Bioscience & Biotechnolo

Numerous lines of evidence indicate that some of the neurotoxicity associated with Alzheimer's disease (AD) is due to proteolytic fragments of the amyloid precursor protein (APP). Most research has focused on the amyloid β ($A\beta$). However, the possible role of other cleaved products of APP is less clear. Lately It has been reported that a recombinant carboxy-terminal 105 amino acid fragment (CT105) of APP induced strong nonselective inward currents in *Xenopus* oocyte. In a brain with Alzheimer's disease (AD), to investigate the roles of carboxyl-terminal fragment (CT105) of amyloid precursor protein (APP) in apoptosis processes possibly linked to neurodegeneration associated with AD, we examined the effects of the CT of APP with 105 amino acid residues (CT105) on the alteration of apoptosis triggers in neuroblastoma cells. We have investigated whether Radix Polygalae and Rhizoma Acori Graminei mixture extract (RP+RAG) inhibits CT105-induced apoptosis of neuroblastoma cells. We found that RP+RAG inhibits CT105-induced apoptosis in SK-N-SH cells. Treatment of the cells with RP+RAG inhibited CT105-induced DNA fragmentation and TUNEL assay of nuclear chromatin and inhibited the caspase-3 expression in SK-N-SH cells. As the result of this study, In RP+RAG group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of neuroblastoma cells by CT105 expression is promoted. These results indicate that RP+RAG possess strong inhibitory effect of apoptosis in the nervous system and repair effect against the degeneration of neuroblastoma cells by CT105 expression

Key words : Radix Polygalae (RP), Rhizoma Acori Graminei (RAG), Alzheimer's disease (AD), beta-amyloid precursor protein (APP), carboxyl-terminal 105 (CT105), senile plaque

서 론

痴呆는 보통 腦의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 腦 증후군이며, 이로 인해 기억·사고·지남력·이해·계산·학습능력·언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애가 있는 것을 말한다¹⁾. 이 중 Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로

한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로²⁾, 腦 안에 신경반 (neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발 (neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되어지며 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되어지는 병리학적 특징을 가진다^{3,4)}. AD의 정확한 병리학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein (APP)으로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein ($A\beta$)이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 그러나 $A\beta$ 의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관

* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포한방병원
· E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2762
· 접수 : 2003/04/24 · 수정 : 2003/06/18 · 채택 : 2003/07/24

련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔다^{8,9)}. 최근에는 APP의 다른 대사산물 특히 γ -secretase에 의하여 대사되어 A β 가 되기 직전의 물질로 추정되는 C단 단백질 (carboxy-terminal 105 amino acid fragment of APP, CT105)이 PC12 cells¹⁰⁾, primary cortical neurons¹¹⁾, Xenopus oocytes^{12,13)}, Purkinje cells¹⁴⁾ 등의 진핵세포와, 형질환 동물모델^{15,16)}에서 신경독성을 발휘하며, 또한 APP transfection하여 과발현시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것으로 보고 되었다¹⁷⁾. 또한 CT105는 Calcium homeostasis를 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다고 하여 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다¹⁸⁾. 이어서 최¹⁹⁾는 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH(Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라²⁰⁾는 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하는 등 CT105와 AD와의 관련성뿐만 아니라 치료제 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다^{21,22)}. 최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 문헌적^{23,24)}, 임상적 연구^{25,26)}이외에 관련 원인설에 기초를 둔 실험적 연구가 다양하게 진행되어 왔다^{27,34)}. 즉 단일약물²⁷⁾ 및 복합처방²⁸⁾을 이용하여 腦의 老化와 연계하여 老化를 유발하는 항산화작용에 대한 研究를 활발하게 진행하여 왔고, 그 외에도 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향에 대한 研究²⁹⁾와 腦상상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF- α , IL-1 및 A β 의 생성의 억제에 관한 연구^{30,31)}가 보고되었으며, 최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현세포주에서 한약물에 대한 연구^{32,33)}와 β APP 과발현에서의 신경세포사 억제작용에 관한 연구³⁴⁾에까지 이르렀으나, 아직 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고되지 않았다.

본 연구에 사용된 遠志와 石菖蒲는 두 종류의 효능이 서로 비슷한 약물을 함께 사용하여 상호작용을 증강하는 相須의 대표적인 혼합배합으로³⁵⁾, 遠志의 疏散氣滯 및 祛痰作用과 石菖蒲의 開竅醒神作用이 배합되어 心竅를 通利하고 心氣의 鬱滯를 散하게 하여 腦의 작용을 활발하게 하고 의식장애를 제거할 목적으로 다양한 腦질환에 널리 활용되고 있는 약재들이다³⁶⁾. 이에 저자는 遠志와 石菖蒲 혼합추출액을 이용하여 항치매 효과를 糾明하기 위하여 APP의 pCT105로 유도된 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma 세포에서 치매와 동일한 신경세포의 細胞死 誘導에 대한 抑制 效果를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), ethanol (Merck, Germany), anti-rabbit IgG , anti-mouse IgG 및 ECL kit는 Amersham pharmacia에서, 2차 항체인 FITC, Texas Red는

Santa cruse사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다. 본 實驗에 사용된 기기는 CO₂ incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), immunofluorescence microscope (Olympus), FACScan (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2. 試料의 조제

遠志와 石菖蒲 혼합추출액 조제 : 본 實驗에 使用한 遠志(RP)와 石菖蒲(RAG) 총 1.5kg을 원광대 군포한방병원에서 엄선하여 세말한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 조제한 遠志와 石菖蒲 혼합추출액(이하 RP+RAG라 명명)을 동결건조한 300g을 사용전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 방법

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 치매 유발 유전자 APP695로부터 Fig. 3 에서처럼 포유동물세포주인 SK-N-SH 내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695 부분의 CT105 절편만을 분리하여, 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질전환시켜 이 플라스미드를 추출하여 BamHI/HindIII의 제한효소를 처리하고 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamHI/HindIII에 삽입하여 cloning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 pCT105 플라스미드를 분리하여 본 실험에 사용하였다.

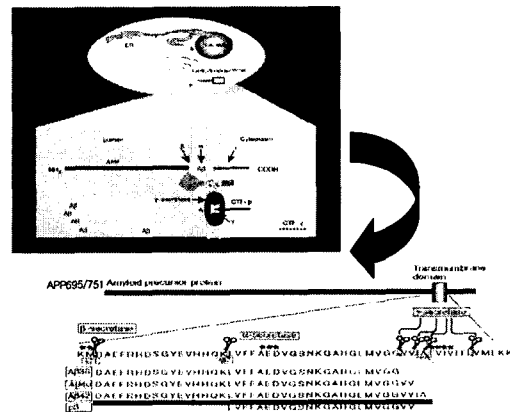


Fig. 3. Construction of pCT105 expression plasmid for Alzheimer's disease(AD) like cell line model.

2) pCT105 형질조합시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양 받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105의 플라스미드를 본 실험에 사용세포주를 구축하기 위해 미리 10³ 세포를

6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 반응액 A로 pCT105 2 μ g와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100 μ l을 혼합하고, 반응액 B로 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 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 μ g/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

3) 세포생존율에 미치는 영향

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 RP+PAG 약물군의 5, 10, 15, 20, 25 μ g/ml농도 별로 처리하여 약물 처리시간 별 MTT (3-[4,5-dimethiazol-2y-]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20 μ l을 첨가하여 3시간동안 배양한 다음 DMSO 50 μ l을 첨가하고 실온에서 30분이상 반응을 시켜서 심홍색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포 형태학적 관찰

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물군의 5, 10, 15, 20, 25 μ g/ml 농도별로 처리하여 상기 세포주의 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 5% FBS가 함유한 RPMI medium, penicilin / streptomycin이 함유한 배지를 37°C에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개정도 세포수를 촬영하여 조사하였으며 세포사의 유도양상을 보기 위해 세포사가 억제되는 농도를 선정하여 조사하였다.

5) DNA fragmentation 억제효과 측정

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 RP+RAG의 5, 10, 25 μ g/ml농도별로 처리하여 DNA fragmentation을 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 μ g/ml)를 첨가하고 50°C에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음, 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합한 후, 상기와 같이 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한다. 상등액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜, 이를 RNase(50 μ g/ml)가 함유한 dH₂O 35 μ l를 첨가하여 녹인 후, 이 용액을 1.5% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사한다.

6) CT105 세포주의 NO 생성도 측정

CT105 세포주내의 NO (nitric oxide)의 생성도를 측정하기 위해 103세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 RP+RAG 군에 5, 10, 15, 25 μ g/ml의 농도로 5시간 처리한 후 상등액 100 μ l을 따서 96-well에 옮기고 Greiss reagent용액 50 μ l을 첨가하고 실온에서 반응을 시킨 다음 ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630nm에서 흡광도를 측정하고 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150 μ M sodium nitrite를 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

7) Neurite outgrowth의 길이 측정

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50 ng/ml이 되게 하여 첨가하고 5시간동안 자극을 가한 다음 약물군의 무혈청 내지 5, 10, 15, 25 μ g/ml농도별로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth length를 현미경 하에서 관찰하여 정상군과 상호 비교하여 neurite length score를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 통계처리하였다.

8) RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 분석

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물농도가 5, 10, 15, 25 μ g/ml농도가 되도록 가한 다음 5시간후에 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNAzol 용액을 200 μ l를 첨가한 다음 chloroform 50 μ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4°C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4°C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 μ l를 넣고 60°C에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 μ l에 10mM dNTP 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10x RNA PCR buffer 5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, AMV-Optimized Taq 1 μ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 μ l, 20pM specific primer (sense/antisense) 1 μ l, RNase free dH₂O 26 μ l를 첨가하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 실시하고, 92°C에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR(polymerase chain reaction)를 실시하였는데 반응조건은 92°C 2min, 92°C 60sec, 54°C 60sec, 72°C 60sec에서 35 cycles를 진행시켜 72°C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 elute시켜 사이즈 마커를 기준으로 band유무를 확인하였다. 그 결과는 mRNA발현을 확인하여 전사 수준에서 신경재생효과를 분석하였다. 상기 반응에 사용한 primer로는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. primers used in RT-PCR reaction. Primer sequences, annealing temperature(Ta), the number of cycles, and product size are indicated.

Target mRNA		Primer sequences	Ta (°C)	cycles	product size(bp)
BDNF	uper	5'- agtga(gaccatccttttc -3'	56	30	320
	reverse	5'- ctaatacctgtcacacg -3'			
APP	uper	5'- aggtctagaa(gctgcccgg -3'	55	35	280
	reverse	5'- ataggcccctagttctgcat -3'			
cdc42	uper	5'- gatacgtgttgacgtccaga -3'	57	35	300
	reverse	5'- aalatgtaccgactgttt -3'			
iNOS	uper	5'- gataggctctgtttgtt -3'	54	30	340
	reverse	5'- gaggggtgaa(tccaga -3'			
caipain	uper	5'- taaactataaaccactagc -3'	55	35	289
	reverse	5'- tctatatlgaacacg99ga -3'			
kinesin	uper	5'- taaactataaaccactagc -3'	54	35	250
	reverse	5'- tctatatlgaacacg99ga -3'			
β -actin	uper	5'- ccaaggccaaccgccgc -3'	54	35	450
	reverse	5'- agggatcatggtgcccgc -3'			

9) 형광현미경 분석

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 slide glass위에 laminin coated 된 slide round cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물농도가 5, 10, 15, 25 µg/ml농도가 되도록 가한 다음 5시간 후에 세포사를 유도하는지 TUNEL assay방법으로 조사하였다. 10³세포수를 분주하고 하룻밤 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포를 4% p-formaldehyde로 12시간동안 4°C에서 고정시킨 다음 0.5% Tween 20, 0.2% BSA (bovine serum albumin)을 첨가하여 실온에서 15분간 침투과정을 실시하고 PBS로 3회 세척을 실시하고 세포내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)용액 (TdT완충액, biotin-dUTP, TdT=18:1:1) 5 µl를 떨어뜨려서 37°C에서 1시간 유지하고 증류수로 3회 세척한 다음 blocking 용액인 0.5% BSA를 50µl정도 첨가하여 실온에서 10분간 정치하여 놓은 다음 avidine-FITC용액 50µl첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척한 다음 slide glass 위에 mounding 용액을 약간 떨어뜨리고 얹어놓고 형광현미경하에서 관찰한다. acridine orange 시약 1µg/ml으로 세포사가 유도시 핵 응축이 일어날 경우에 염색을 하면 응축성 염색질에 오렌지색 내지 적색으로 염색유무를 판정하여 세포사를 확인하였다.

10) Western Blot

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 6-well에 분주하고 상기와 같은 방법으로 실시하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂)로 처리하여 그 추출액 30µg을 10% polyacrylamide SDS gels (SDS-PAGE)에 용출한 후 Immobilon-P membrane (Amersham)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색시켜 확인하는데 antibody를 일차적으로 (Santa Cruz, 1:1,000 희석) 일차항체인 iNOS, p42/44, MAPK, APP, GSK3β, caspase-3을 표지하고 PBS로 세척한 다음 blotting 용액을 첨가하여 부반응을 제거하고 이차항체인 Horseradish Peroxidase-conjugate anti-goat IgG (HRP) 항체를 표지하고 ECL blotting reagent로 3분간 배양하고 chemiluminescence은 30 sec에서 20분간 X-ray film에 노출시켜 발색정도를 확인하였다.

11) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의성적은 P값이 0.05미만인 경우로 하였다.

성 적

1. CT105 과발현 세포주에 의한 시간별 CT105 발현 변화

치매는 신경세포가 어떤 원인으로 세포사가 발생하기 때문에 일어나는 신경계의 퇴행화의 일부분으로 보통 신경세포의 세포사는 운동신경 및 감각신경의 장애를 초래하는데 치매에 의한 신경세포의 세포사는 곧 언어장애와 운동장애로 심각한 생활에 장애를 초래한다. 따라서 신경세포사의 최종적인 현상으로 β

APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보고자 CT105의 발현을 FITC형광체로 확인한 결과 12시간부터 발현이 진행되어 48시간 시점에 발현정도가 가장 강하게 나타났다.(Fig. 4) 이는 시간이 지나면서 CT105 과발현으로 인한 세포독성이 시간 의존적으로 더 강해짐을 의미한다.

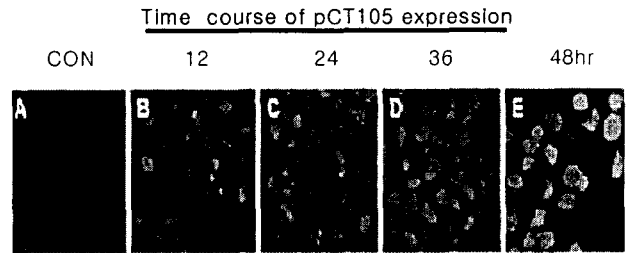


Fig. 4. Morphological pattern of apoptotic body from CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma. Similar results were found in at least three separate experiments. Fresh cells resuspended in RPMI medium were incubated with, prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by fluorescence microscopy.

2. CT105 발현에 의한 신경세포의 형태학적 변화

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP+RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 遠志(RP), 石菖蒲(RAG) 단독투여시와 혼합투여시의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, Fig. 5에서처럼 RP+RAG 농도 25 µg/ml을 처리시, 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면(Fig. 5A), CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났으며(Fig. 5B), 이에 반해 RP 단독 처리군에서는 신경돌기가, RAG 단독 처리군에서는 세포증식이 잘 이루어지는 것을 볼 수 있는데, RP+RAG 처리군에서는 신경세포가 잘 성장하는 것과 동시에 신경돌기가 잘 발달되어 단독투여때보다 신경재생이 더 잘 유도된 것으로 사료되어진다(Fig. 5C).

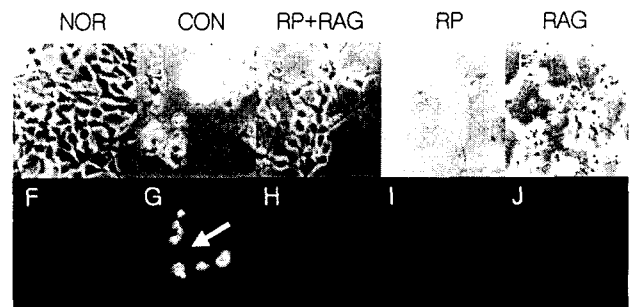


Fig. 5. Phase-contrast microphotographs of CT105 expressing cells by RP+RAG. Cells were incubated in 5% FBS with RPMI medium. Cells were observed after treat with RP+RAG. Morphological characteristic of apoptosis induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Apoptotic cells were indicated by the arrows. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy.

한편 세포사가 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105에 의해 세포사가 일어남을

의미하고(Fig. 5G), RP+RAG 처리경우 세포증식이 크게 증가하면서 신경돌기도 재생되어지는 것은 CT105의 발현이 감소된 결과로 사료된다(Fig. 5H). 이 결과로 볼 때 RP+RAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하여 신경세포의 재생을 유도하리라 사료되어진다(Fig. 5).

3. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 신경세포에 미치는 영향

βAPP의 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사는 형태학적 변화로 표현되지만 일반적으로 세포사가 유도시 염색체내의 nuclease에 의한 염색체의 상해로 유도되므로 CT105와의 관계를 糾明하기 위해 세포사의 표식자인 caspase-3 발현 유무를 확인하므로 입증 가능한 방법인 TUNEL assay로 조사한 결과 Fig. 6에서처럼 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 전무한 상태인 반면(Fig. 6A), 대조군 경우에는 CT105의 발현이 강하여 적색 내지 노란색의 형광체를 띠므로 CT105가 신경세포내에서 강한 신호를 나타냄을 나타내고 있다(Fig. 6B). RP+RAG 처리 경우 형광신호가 거의 감소한 상태를 나타냄으로 CT105의 발현이 억제됨을 시사해주고 있다(Fig. 6C). 마찬가지로 caspase-3의 발현은 정상군에서는 전무한 반면(Fig. 6D), 대조군에서는 CT105 발현이 강하게 나타났고(Fig. 6E), RP+RAG 처리군에서는 거의 소멸된 상태를 나타내고 있다(Fig. 6F).

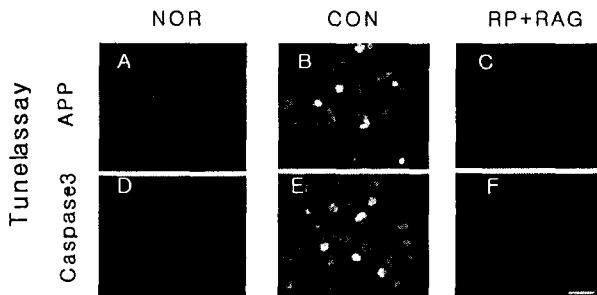


Fig. 6. Fluorescence Micrograph of FITC-avidine staining of TUNEL assay. Fresh cells resuspended in RPMI medium were incubated with prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by fluorescence microscopy. The Texas-Red-avidine fluorescence was observed in regions adjacent to the nucleus and Fluorescence images and simultaneously obtained transmission images of the cells labeled with Red.

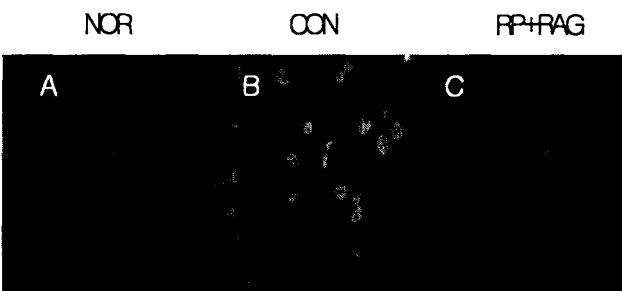


Fig. 7. Labeling of CT105 expressing cells with acridine orange. Overlay images of the red-orange fluorescence in nucleus. Green represent a transmission image corresponding to the cell survival. The orange image represent an overlay image of the acridine orange fluorescence in a early apoptotic cells.

한편 살아 있는 세포에서만 녹색 내지 무색으로 염색되고 세포사가 일어난 세포경우에는 적색 내지 오렌지색으로 염색되는 acridine orange 염색시약 (1 μg/ml)으로 염색시 Fig. 7에서처럼 살아있는 세포에서는 녹색내지 무색으로 (Fig. 7A), CT105로 인한 세포사가 유도된 세포에는 적색으로 염색되었으며(Fig. 7B), CT105로 발현된 세포에 RP+RAG로 처리한 상태에서 염색시 녹색으로 보이는 세포가 존재한다는 것은 RP+RAG로 인한 세포사가 지연 내지 억제가 되면서 생존세포가 증가된다는 것을 시사해 주고 있다고 사료된다(Fig. 7C).

4. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 신경세포의 생존도에 미치는 영향

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP+RAG가 신경세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 Fig. 8에서처럼 MTT assay로 확인한 결과, RP+RAG 농도 5, 10, 15, 20, 25 μg/ml을 처리시 대조군에서는 약 10±1.5%의 생존도를 나타내었으며, IC50의 농도는 15 μg/ml로 나타났으며, 25 μg/ml농도에서는 생존도가 약 89±2.4%였다.

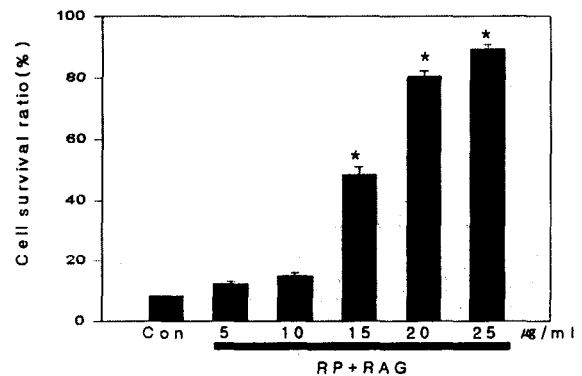


Fig. 8. Cell Survival effects of RP+RAG. The proliferation rates of CT105 expressing SK-N-SH cells were determined by MTT assay. Cells were cultured in 96-well microtiter plates filled with 100 μl complete medium, treated with RP+RAG treatment. Relative % values, proportionally related to the number of visible cells, were measured and plotted against RP+RAG concentration. The results are expressed as mean values of relative absorbance in at least 4 wells.

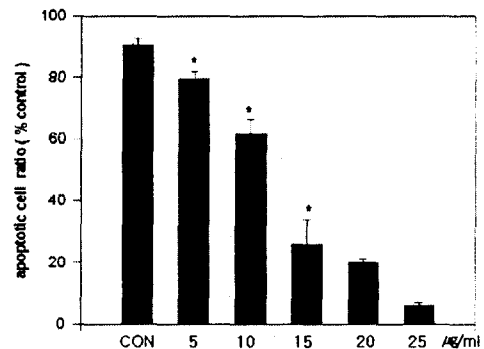


Fig. 9. Apoptotic effects of RP+RAG. The apoptotic cell ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by Morphological characteristic of apoptotic cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy. Values significantly different from the control at P<0.05 are indicated with asterisks. *: P<0.05.

한편 Fig. 9에서처럼 상대적으로 CT105가 발현된 신경세포에서의 세포사를 현미경하에서 관찰하여 세포사의 비율을 조사해 본 결과 CT105만이 발현된 세포인 대조군은 약 90±0.5%였으며 25 µg/ml농도에서는 약 8±0.5%였는데, 본 연구에는 상기 결과와 관련해서 CT105의 세포사를 유도하는 것을 억제시키는 농도로 약 15 µg/ml하여 사용하였다. 따라서 RP+RAG가 βAPP의 CT105로 인한 신경세포의 세포사를 억제하고 생존도를 증가시키는 가능성을 시사해주고 있다.

5. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

세포사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되면 약 200-400 bp만큼씩 불연속적인 절편이 존재하게 되는데 세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있기 때문에 RP+RAG를 5, 10, 25 µg/ml농도로 해서 6-well에 10⁵ cell수로 분주하여 하룻밤 배양한 βAPP의 CT105 발현 세포에 첨가하여 세포사가 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과 Fig. 10에서처럼 대조군 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 RP+RAG 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 25 µg/ml 처리에서부터 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보임으로 해서 RP+RAG가 βAPP의 CT105 발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료되어진다(Fig. 10).

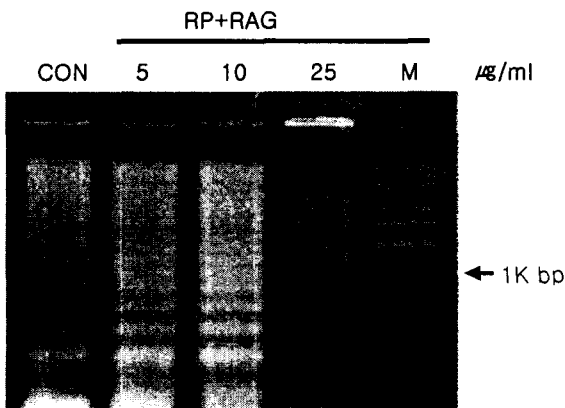


Fig. 10. Effects of RP+RAG on DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. M, DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 5, 10 and 25 µg/ml POTEN for 12h. Cells were incubated for 12hrs necessary to initiate DNA fragmentation. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

6. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 NO생성도에 미치는 영향

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 RP+RAG가 CT105 세포주의 NO생성을 억제하는지 조사하기 위해 Table 2.에서처럼 정상군에서는 3.0±0.82 µM이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 89.2±3.9 µM인데 반해 RP+RAG 처리시 5, 10, 15, 25 µg/ml농도에서 각각 약 39.3±1.8, 24.3±3.4, 15.6±2.4, 6.3±2.9 µM정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 RP+RAG가 관여하리라 사료된다.

Table 2. NO formation in pCT105 cell lines.

samples	NO formation ratio(µM/well)
NOR	3.0 ± 0.82
CON	89.2 ± 3.9*
RP + RAG 5	39.3 ± 1.8
10	24.3 ± 3.4**
15	15.6 ± 2.4**
25	6.3 ± 2.9**

Values represents the means ± S.D of performed experiments in triplicants wells ver control. *p<0.05, **p<0.005

7. RP+RAG가 neurite outgrowth 성장에 미치는 영향

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 주기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 Fig. 11에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나 (Fig. 11A), CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우 성장이 안 되는 상태를 나타내고 있으며(Fig. 11B), RP+RAG 5, 25 µg/ml으로 처리시 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다(Fig. 11C, D). 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 12에서처럼 대조군을 기준으로 0.85±0.5으로 환산시 정상군은 4.85±1.5이고 RP+RAG의 농도 5, 10, 15, 25 µg/ml으로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.75±0.5 2.45±0.5 3.25±0.5 4.65±1.5의 수치를 보였는데 RP+RAG의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 한편 CT105로 인한 신경돌기의 상해는 신경돌기 말단에 함몰되는 양상을 관찰한 결과 Fig. 13에서처럼 대조군에서 돌기 말단에 함몰되어 있는 양상으로 보인 반면(Fig. 13A), RP+RAG 농도가 5, 10, 25 µg/ml에서는 서서히 함몰이 억제되고 신경돌기의 재생으로 인한 신장이 촉진되는 양상을 보였다 (Fig. 13B, C, D). 따라서 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 길이를 감소시키거나 신장을 제한하여 함몰을 유도하고 기능을 상실하게 되는데 아마도 RP+RAG가 이런 현상을 억제시키는 기능의 성분을 함유할 것으로 사료된다.

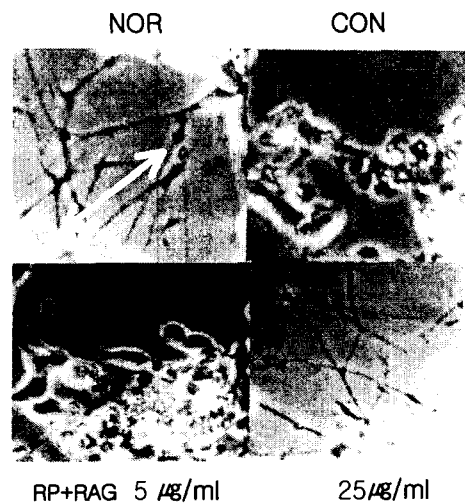


Fig. 11. RP+RAG induces neurite outgrowth. CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RP+RAG. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope.

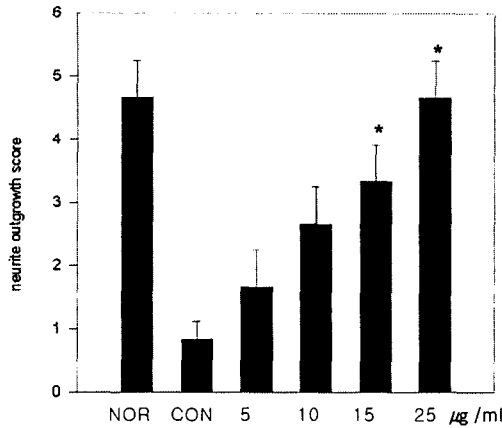


Fig. 12. RP+RAG induces neurite outgrowth length. CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RP+RAG neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means±S.D from 200 determination cells. Those values significantly different from control are indicated ($p < 0.05$, students two-tailed t test)

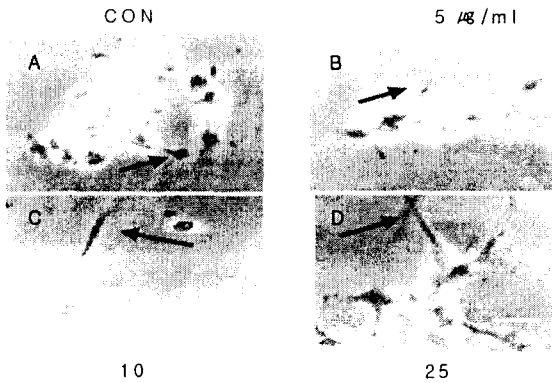


Fig. 13. RP+RAG represses axonal collapses cones. CT105 transfected SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RP+RAG. Axonal collapses cones was visualized by phase-contrast microscope. All results are observed from 200 determination cells.

8. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 mRNA 발현에 미치는 영향

RP+RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 β APP의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 RP+RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 Fig. 14에서처럼 신경 돌기의 신장에 중요한 인자인 BDNF, kinesin mRNA 발현 경우 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 발현이 유도되고, 세포사 경우에만 발현되는 calpain은 RP+RAG의 농도가 증가할수록 발현양이 감소하는 양상을 보였다.

한편 Fig. 15에서처럼 iNOS mRNA 발현은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 감소되는데, 이는 Table 2와 유사한 결과이었고, 신경세포의 형태학적인 모양에 관여하는 cdc42 mRNA 발현 경우 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 발현이 되었고, 이에 반해 β APP의 C말단은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 억제되었다. 세포의 전사수준에서 단백질 발현에 표준의 지표인 β -actin mRNA 발현 경우, 모든 군에서 일정하게 발현되었다. 본 약물은 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하여 신경세포의 파괴를 조절하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다(Fig. 15).

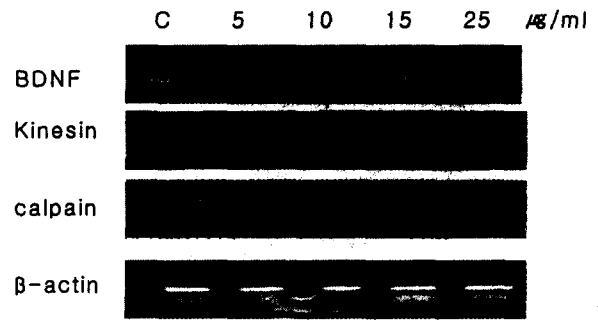


Fig 14. RT-PCR analysis of total RNA from in the CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by RP+RAG. Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovine serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific primer. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without RP+RAG treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

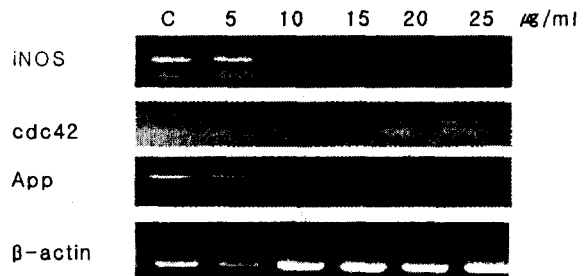


Fig 15. RT-PCR analysis of total RNA from in the CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by RP+RAG. Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovine serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific primer. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without RP+RAG treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

9. RP+RAG가 CT105 발현에 의한 단백질 발현에 미치는 영향

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RP+RAG가 세포사를 억제하는지 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RP+RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 Fig. 16에서처럼 APP의 발현은 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen syntase kinase (GSK3 β)는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유도되고 caspase-3의 발현은 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 감소하는 경향을 보였다. 한편 Fig. 17에서처럼 iNOS 단백질 발현은 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 감소되는데, 이는 Table 2와 유사한 결과이었으며 신경세포의 생존에 관여하는 p42/44 단백질의 발현은 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 발현이 되었고 마찬가지로 MAPK 단백질 역시 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 발현이 진행되었다. 신경세포의 단백질 발현에서처럼 본 약물은 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분이 함유하는 것으로 사료된다(Fig. 17). 따라서 RP+RAG 처리군은 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 β APP의 CT105에 의한 신경 세포의 세포사를 유의성 있게 억제하므로 치매치료에 적용될 수 있으리라 사료되어진다.

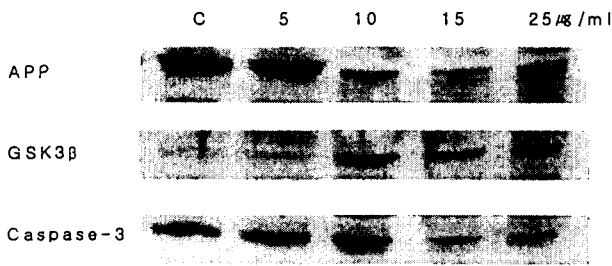


Fig 16. Influence of RP+RAG extract on APP, GSK3β and caspase-3 expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMi medium, lysate analyzed for APP, GSK3β and caspase-3 and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

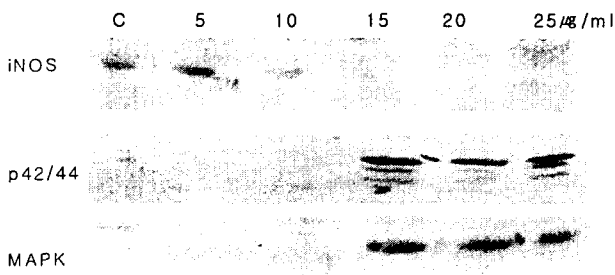


Fig 17. Influence of RP+RAG extract on iNOS, p42/44 and MAPK expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMi medium, lysate analyzed for iNOS, p42/44 and MAPK and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

고찰

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 老化로 인한 腦 증후군으로¹⁾ 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 腦梗塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混在된 混合型 痴呆가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다^{2,25)}. AD의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되어지는 노인반(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실물치처럼 보이는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)을 들 수 있다⁵⁻⁸⁾. 노인반은 신경반(neuritic plaques) 또는 아밀로이드반(amyloid plaques)이라고도 하며 파괴된 축삭돌기와 수상돌기들이 엮힌 덩어리가 Aβ를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 엮히게 된다³⁷⁾. 이러한 병리학적 특징은 FAD와 SAD의 모든 경우에 다 나타나며 그 결과 신경세포의 사멸에 의해 결국 인지기능의 손상을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다³⁸⁻⁴¹⁾. AD의 원인에 대한 여러 가설들이 있으나, Aβ가 AD의 발병원인으로 작용할 것이라는 베타아밀로이드 가설은 1980년대 초에 아세틸콜린의 저하가 AD의 병인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설이후에 가장 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여지고 있다⁴²⁾. Aβ는 APP라는 type I integral membrane protein에서부터 유래된 단백질 분해효소에 의한 대사산물로서 extracellular domain과 membrane

domain으로 이루어져 있는 39-43개의 펩타이드이다. Aβ의 전구 대사단백물질인 APP는 염색체 21번에 위치하고 있으며, 이 위치는 다운증후군의 21번째 염색체의 trisomy에 의한 gene dosage effect를 나타내는 위치와 overlap이 되고 있다⁴³⁾. APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 pathway에 의해 진행되는데⁴⁴⁾, 즉 α-secretase에 의해서 Aβ domain 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 되었다⁴⁵⁾. 한편 alternative processing pathway에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β-secretase 등에 의해 Aβ의 N terminal 주위가 잘리며 Aβ sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 anchor되어 남는다^{46,47)}. 이 C단 단백질 중 일부는 Aβ 전체 sequence를 가지고 있으며 γ-secretase에 의해 잘려져 Aβ를 형성하는 것으로 생각된다. 하지만 이상과 같이 in vitro에서 Aβ의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, Aβ가 독성을 나타내기 위해서는 20μM이상의 고농도가 필요하고 일부 연구에서는 Aβ의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데⁴⁸⁻⁵⁰⁾, 특히 in vivo 실험에서는 Aβ의 독성에 대해 상반되는 결과가 팽팽히 맞서고 있어, 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을 할 것인지 불확실한 실정이다. 따라서 실제 pathogenesis에는 다른 인자들, 그 중에서도 APP의 다른 중간대사산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 Aβ의 직전 대사물질로 생각하고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내⁵¹⁾와 배양액¹⁵⁾에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 腦 부위에서도 발견되었다⁴⁷⁾. 또한 이 단백질은 in vitro에서 또는 세포에 transfection시켰을 때 amyloid와 유사한 aggregate를 형성할 수 있다⁵²⁾. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 transfection 시킬 경우 세포독성을 일으키는데⁵³⁾, 특히 이러한 C단 단백질의 transfection시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다⁵³⁾. 더구나 이렇게 C단 단백질에 transfect된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고 됨으로써^{54,55)} 실제 in vivo에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다. 미국의 Neve 박사 group에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데⁵⁵⁾, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고⁵⁶⁾ 인지기능의 결손이 동반됨이 보고 되어 C단 단백질이 과도하게 발현되면 신경세포에 유해한 영향을 끼쳐 인지기능을 손상시킬 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다.

최근 C단 단백질에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons^{10,11)}에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, xenopus oocytes^{12,13)}과 purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고하였다⁵⁷⁾. 또한 CT105는 calcium homeostasis에도 악

영향을 미치는데, rat brain microsome에서는 Mg^{2+} - Ca^{2+} ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는 Na^{+} - Ca^{2+} exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로써 calcium homeostasis을 손상시키지만, A β 는 그렇지 않다고 하여¹⁸⁾ 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C β 단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다. 또한 가장 최근에 최¹⁹⁾는 C β 단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라²⁰⁾는 C β 단 단백질이 신경교세포의 활성으로 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 더욱 증명해주고 있다. 따라서 촉발 인자를 무시하더라도痴呆의 진행단계에 CT105의 과발현을 유도하게 되면 신경세포의 파괴를 유도할 수 있어 이를 이용한 한약재의 치매 예방 및 치료제 개발에 도움이 있을 것으로 사료되어 APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여 SK-N-SH cell line인 neuroblastoma 세포주에서 과발현시켜 CT105 유전자의 기능과 작용기전 그리고 신경독성억제효과로 항치매효과를 알아보았다. 최근 韓醫學에서도痴呆에 대한 연구가 관련 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있다. 李⁵⁸⁾는 침구자극이 치매와 연관된 melatonin 분비와 superoxide dismutase (SOD) 합성에 미치는 영향에 대한 보고에서 침구자극이 melatonin 분비와 SOD 합성에 영향을 주어 AD 치료에 도움이 되는 치료방법임을 확인한 바 있고, 백 등²⁷⁾이 녹차 등의 단일약물을, 복합처방에 대한 연구는 정²⁸⁾이 左歸飲, 右歸飲 등을 이용하여 腦의 老化와 연계하여 老化를 유발하는 항산화작용에 대한 研究를 활발하게 진행하여 왔고, 황²⁹⁾은 nbM을 전기적으로 손상시켜 유발된 AD모델 白鼠의 학습과 기억에 대한 Morris water maze와 radical arm maze과제를 이용한 실험에서 麝香蘇合元이 白鼠의 학습과 작업 기억의 결합을 개선시키는 유의성은 없으나 경향성은 있는 것으로 보고하였으며, 염증매개물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 역할을 하는 것에 근거를 둔 실험에서는 洗心湯²⁶⁾, 星香正氣散加菖蒲公英³¹⁾이 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF- α , IL-1 및 A β 의 생성을 억제하는 것으로 보고하였다. 최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구에서 益精地黃湯³²⁾, 導痰益氣活血湯³³⁾, 補益清腦湯⁶⁰⁾이 PC12 cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제 능력과 항콜린작용을 보이는 것으로, 鈞鈞藤³⁴⁾이 β APP 과발현에서 신경세포사 억제작용이 있는 것으로 보고한 연구에까지 이르렀으나, 아직까지 한약의 추출물로서 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고 되지 않았다. 遠志와 石菖蒲는 두 종류의 효능이 서로 비슷한 약물을 함께 사용하여 상호작용을 증강하는 相須의 대표적인 혼합배합으로³⁵⁾, 石菖蒲의 開竅醒神작용과 遠志의 疏散氣滯 및 祛痰作用이 배합되어 心竅를 通利하고 心氣의 鬱滯를 散하게 하여 腦의 작용을 활발하게 하고 의식장애를 제거할 목적으로 널리 활용되고 있다³⁶⁾. 遠志와 石菖蒲의 각각의 약물에 대한 實驗의 연구로는 遠志가 利尿效果와 中樞神經抑制효과⁶¹⁾, 腦 성상세포에서 TNF- α 생

성 및 TNF- α mRNA의 발현을 억제하는 효과⁶²⁾가 있다고 보고한 바 있고, 石菖蒲가 국소 腦혈류량을 농도 의존적으로 증가시킨다고 보고⁶³⁾하였으며, 특히 康⁶⁰⁾은 遠志와 石菖蒲를 단독, 및 혼합 투여하고 N₂ 및 CO₂가스로 무산소 부하상태를 만들었을 때, 이들 약물이 乳酸의 생성을 억제하고 뇌세포의 sodium-potassium pump가 정지하는 것을 지연시켜 세포손상을 막아 생존시간을 연장하여 뇌손상 보호기능을 가진다는 유의성 있는 결과를 얻은 바 있지만, SK-N-SH cell line인 neuroblastoma 세포주에서 CT105를 과발현시켜서 항치매효과를 알아본 실험적 보고는 없다. 이에 著者는 임상에서 腦神經계 질환에 대응하는 遠志와 石菖蒲의 혼합 추출액(이하 RP+RAG)의 항치매 효과를 詳細히 하기 위하여 pCT105 과발현 SK-N-SH 세포주에서 세포사 유도의 억제효과에 대한 형태학적인 변화, DNA fragmentation 억제효과, NO 생성도, neurite outgrowth length 측정, RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 분석, 그리고 TUNEL assay와 Western Blot를 이용한 단백질 발현 억제에 대한 형광현미경적 관찰 등으로 분석하였다.痴呆는 신경세포가 어떤 원인으로 세포사가 발생하기 때문에 일어나는 신경계 퇴행화의 일부분으로 보통 신경세포의 세포사는 문동신경 및 감각신경의 장애를 초래하는데, 치매에 의한 세포사는 곧 언어장애와 운동장애로 심각한 생활의 장애를 초래한다. 이러한 신경세포사의 최종적인 현상인 β APP의 C β 단 단백질 펩티드인 CT105발현을 확인하기 위해 CT105의 발현을 FITC형광체로 확인한 결과 12시간부터 발현이 진행되어 48시간에 발현정도가 가장 강하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4).

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP+RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 遠志(RP), 石菖蒲(RAG) 단독투여시와 혼합투여시의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, Fig. 5에서처럼 RP+RAG 농도 25 μ g/ml을 처리시, 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면(Fig. 5A), CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났으며(Fig. 5B), 이에 반해 RP 단독 처리군에서는 신경돌기가, RAG 단독 처리군에서는 세포증식이 잘 이루어지는 것을 볼 수 있는데, RP+RAG 처리군에서는 신경세포가 잘 성장하는 것과 동시에 신경돌기가 잘 발달되어 각각 단독 투여때보다 신경재생이 더 잘 유도된 것으로 사료되어진다(Fig. 5C). 한편 세포사가 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105에 의해 세포사가 일어남을 의미하고(Fig. 5G), RP+RAG 처리경우 세포증식이 크게 증가하면서 신경돌기도 재생되어지는 것은 CT105의 발현이 감소된 결과로 사료된다(Fig. 5H). 이 결과로 볼 때 RP+RAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하여 신경세포의 재생을 유도하리라 사료되어진다(Fig. 5). 이같은 遠志, 石菖蒲의 단독투여시와 혼합투여시의 구체적인 실험적 결과는 추후 비교실험을 통하여 詳細히 하고 본 연구에서는 임상에서 한약 배합원리 중 相須의 대표적인 배합인 遠志, 石菖蒲를 혼합투여하여 CT105 과발현 세포주에서의 변화를 위주로 분석하였다. 한편, β APP의 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사는 형태학적 변화

로 표현되지만 일반적으로 세포사를 유도시 염색체내의 nuclease에 의한 염색체의 상해로 유도되므로 CT105와의 관계를 糾明하기 위해 세포사의 표식자인 caspase-3 발현 유무를 확인하므로 입증 가능한 방법인 TUNEL assay로 조사한 결과, Fig. 6에서 처럼 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 전무하였고(Fig. 6A), 대조군 경우에는 CT105의 발현이 강하여 적색 내지 노랑색의 형광체가 나타났다(Fig. 6B). 그렇지만 RP+RAG 처리 경우 형광신호가 거의 감소한 상태로 나타남으로 CT105의 발현이 억제됨을 시사해주고 있다(Fig. 6C). 마찬가지로 caspase-3의 발현은 정상군에서는 전무한 반면(Fig. 6D), 대조군에서는 CT105발현이 강하게 나타났고(Fig. 6E), RP+RAG 처리군에서는 거의 소멸된 상태를 나타내고 있다(Fig. 6F). 한편 살아 있는 세포에서만 녹색 내지 무색으로 염색되고 세포사가 일어난 세포경우에는 적색 내지 오렌지색으로 염색되는 acridine orange 염색시약 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 염색시 CT105로 발현된 세포에 RP+RAG로 처리한 상태에서 염색시 녹색으로 보이는 세포가 존재한다는 것은 RP+RAG로 인한 세포사가 지연 내지 억제가 되면서 생존세포가 증가된다는 것을 시사해 주고 있다고 사료된다(Fig. 7C). CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP+RAG가 신경세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay로 확인한 결과, 대조군에서는 약 $10 \pm 1.5\%$ 의 생존도를 나타낸 반면, RP+RAG 농도 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리시, 생존도가 약 $89 \pm 2.4\%$ 였다(Fig. 8). 한편 상대적으로 CT105가 발현된 신경세포에서의 세포사가 현미경하에서 관찰하여 세포사의 비율을 조사해 본 결과, CT105만이 발현된 세포인 대조군은 약 $90 \pm 0.5\%$ 인데 반해, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 약 $8 \pm 0.5\%$ 로 RP+RAG가 βAPP 의 CT105로 인한 신경세포의 세포사를 억제하고 생존도를 증가시키는 가능성을 시사해주고 있다(Fig. 9). RP+RAG가 CT105에 의한 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향을 알아보기 위해, 세포사를 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과, 대조군 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만, RP+RAG 농도가 증가할수록(5, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 각 lane에 보이는 band가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서부터 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보였다. 이는 RP+RAG가 βAPP 의 CT105 발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료되어진다(Fig. 10). 또 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에 RP+RAG가 어떻게 작용하는지 알아보았는데, 정상군에서는 $3.0 \pm 0.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 $89.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 인데 반해 RP+RAG 처리시 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 약 39.3 ± 1.8 , 24.3 ± 3.4 , 15.6 ± 2.4 , $6.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ 정도였다(Table. 2). 이로써 RP+RAG가 CT105 세포주의 NO 생성을 억제하는 것으로 보아 iNOS의 발현에도 관여함을 알 수 있다.

세포사에 영향을 주는 신경세포의 신경돌기 신장 상해와 RP+RAG와의 관계를 알아보았는데, RP+RAG의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 13). 이로써 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth length를 감소시키거나 제한시켜 함몰을 유도하고 기능을 상실하게 하는데, 아마도 RP+RAG가 이런 현상을 억제시키는 기능

의 성분을 함유할 것으로 사료된다. RP+RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 βAPP 의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 RP+RAG를 처리하여 분석한 결과, 신경돌기의 신장에 중요한 인자인 BDNF, kinesin mRNA 발현 경우 RP+RAG 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 발현이 유도되고 세포사 경우에만 발현되는 calpain은 RP+RAG의 농도가 증가할수록 발현양이 감소하는 양상을 보였으며(Fig. 14), 한편 iNOS mRNA 발현은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 감소되는데(Fig. 15), 이는 Table 2와 유사한 결과이었으며 신경세포의 형태학적인 모양에 관여하는 cdc42 mRNA 발현 경우 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 발현이 되었고, 이에 반해 βAPP 의 C말단은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서부터 억제되었다. 세포의 전사수준에서 단백질 발현에 표준의 지표인 $\beta\text{-actin}$ mRNA 발현 경우 모든 군에서 일정하게 발현되었다. RP+RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하여 신경세포의 파괴를 조절하는 유효성분이 함유된 것으로 사료된다. 한편 βAPP 의 CT105 발현 신경아세포인 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RP+RAG가 세포사를 억제하는지, 또 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RP+RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과, APP의 발현은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen synthase kinase (GSK3 β)는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 유도되고 caspase-3의 발현은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서부터 감소하는 경향을 보였다(Fig. 16). 그리고 iNOS 단백질 발현은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 감소되는데, 이는 Table 2와 유사한 결과였으며 신경세포의 생존에 관여하는 p42/44 단백질의 발현은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 발현이 되었고 마찬가지로 MAPK 단백질 역시 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서부터 발현이 진행되었다(Fig. 17). 신경세포의 단백질 발현에서처럼 RP+RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다(Fig. 17). 따라서 RP+RAG 처리군은 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 βAPP 의 CT105에 의한 신경 세포의 세포사를 유의성 있게 억제하므로 癡呆治療에도 적용될 수 있으리라 사료되어진다.

이상과 같이 遠志와 石菖蒲 혼합투여가 pCT105 과발현 신경아세포인 세포주에서 細胞死 誘導에 대한 뚜렷한 抑制效果를 보여 A β 침착에 따른 腦의 퇴행성 변화를 지연시킬 수 있을 것으로 추정되며, 향후 遠志와 石菖蒲를 이용하여 癡呆 원인 인자를 연결한 지속적인 분자생물학적인 研究를 시행하여 AD 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 적용 可能할 것으로 사료된다.

결론

βAPP 의 CT105 발현 신경아세포인 세포주를 이용한 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 세포사 유도에 대한 抑制와 신경세포 保護效果를 糾明하기 위하여 實驗한 결과, 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물은 βAPP 의 CT105 발현에 의한

세포사 유도를 농도 의존적으로 抑制하였고, CT105로 인한 신경 세포의 NO 생성도는 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물의 25 μ g/ml에서 가장 강하게 억제하였으며, CT105로 인한 신경세포로부터 DNA fragmentation의 유도 억제는 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다. 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물은 neurite outgrowth length의 길이신장을 유도하고 axonal collapses cone을 억제하였고, 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물 농도 증가에 의해 신경세포에 중요한 영양인자인 BDNF와 뉴우런의 신경전달인자의 수송에 관여하는 kinesin mRNA 발현은 증가하였으며, iNOS, calpain, APP의 CT105의 발현량은 점차적으로 감소하였으며, 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물 농도 증가에 의해 APP, Caspase-3 그리고 iNOS단백질의 발현은 감소하였고, GSK3 β , p42/44 그리고 MAPK단백질의 발현은 증가되었다.

이상과 같은 結論으로 보아 遠志와 石菖蒲 혼합 추출물은 β APP의 CT105 발현 신경세포암 세포주의 세포사를 效果적으로 抑制하고 신경세포를 보호하는 것으로 보아 좀 더 과학적으로 치매원인 인자를 연결한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 研究를 행하므로 痴呆 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 적용할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
2. 대한신경정신의학회 편 : 신경정신과학, 서울 하나의학사, pp.211-220, 1997.
3. 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, 12(1):55-65, 1998.
4. Alzheimer's disease collaborative group : The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families, Nat Genet, 11(2):219-222, 1995.
5. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur 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 Res, 593(2):299-303, 1992.
6. 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), 84(6):596-605, 1992.
7. 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, 95(1)1-4, 2000.
8. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA : Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250: 279-282, 1990.
9. Fukuchi K, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Kamino K, Ogburn CE, Furlong CE, and Martin GM : Overexpression of a C-terminal portion of the beta-amyloid precursor protein in mouse brains by transplantation of transformed neuronal cells, Exp Neurol 127: 253-264, 1994.
10. Kim SH, and Suh YH : Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, J. Neurochem 67: 1172-1182, 1996.
11. 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 52: 430-436, 1997.
12. Fraser S, Suh YH, Chong YH, and Djamgoz MA : Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the carboxyl terminal fragment of the amyloid precursor protein, J. Neurochem 66:2034-2040, 1996.
13. Suh YH, Chong YH, Kim SH, Choi w, Kim KS, Jeong SJ et al. : Molecular physiology, biochemistry and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein(APP), Annals of N Y Acad Sci 786:169-183, 1996.
14. Hartell NA, and Suh YH : Effects of fragments of β -amyloid precursor protein on parallel fiber-purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum, J. Neurochemistry 74(3):1112-1121, 2000.
15. Matsmoto A and Matsumoto R : Familial Alzheimer's disease cells abnormal abnormally accumulate beta-amyloid harbouring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid, Eur J Biochem 225:1055-1062, 1997.
16. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G et al. : Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein, Nature 387(6632):500-505, 1997.
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 6(4):397-404, 2000.
18. Kim HS, CH Park, and YH Suh : C-terminal fragment of

- amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg^{2+} - Ca^{2+} ATPase, *Neuroreport* 9(17):3875-3879, 1998.
19. 최세훈 : 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구, 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2001.
 20. 라종철 : 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화 과 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2002.
 21. Kim HS, Park CH, Suh YH : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg^{2+} - Ca^{2+} ATPase, *Neuroreport*, 1;9(17):3875-9, 1998.
 22. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity, *FASEB J*, Aug;14(11):1508-17, 2000.
 23. 강형원 외 : 癡呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰, 서울, 동의 병리학회지, 13(1), pp.36-45, 1999.
 24. 정인철, 이상용 : 치매에 대한 문헌적 고찰, 서울, 동의신경정신과학회지, 7(1), pp.77-94, 1996.
 25. 김지혁, 황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327-330, 663-664, 1992.
 26. 나창수 외 : 치매에 관한 최근의 연구 동향, 서울, 대한한방내과학회지, 19(1), pp.291-317, 1998.
 27. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구, 釜山, 釜山大學校 藥學研究誌, 29(2), pp.49-56, 1995.
 28. 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, 17(1), pp.21-36, 1996.
 29. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 10(1), pp.1-16, 1999.
 30. 김태현, 김준한, 강형원, 류영수 : 세심탕에 의한 뇌성상세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과, 동의신경정신과학회지, 12(1), pp.137-150, 2001.
 31. 박진성, 강형원, 류영수 : 생체외 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구, 동의신경정신과학회지, 12(2), pp.157-172, 2001.
 32. 최병만 · 이상률 : 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향, 서울, 동의신경정신과학회지, 11(2), pp.23-42, 2000.
 33. 정인철 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, 대전대학교 대학원(박사), 2001.
 34. 김상호, 강형원, 류영수 : 鈞鉤藤이 β APP 과발현 인간세경아 세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 16(5), pp.960-966. 2002.
 35. 전통의학연구소 편 : 동양의학대사전, 서울, 성보사, pp.1083, 1682-1683, 2000.
 36. 辛民教 編著 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp.646-647, 604-606, 2000.
 37. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky : Alzheimer's Disease In Pharmacotherapy; a pathophysiologic approach, Dipiro J. T. et al. Ed., New York; Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
 38. 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*, 10:243-254, 1993.
 39. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED : The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis, *Apple Pathol.* 2(6):357-369, 1984.
 40. Wang GP, Grundke-Iqbal I, Kascsak RJ, Iqbal K, Wisniewski HM : Alzheimer neurofibrillary tangles: monoclonal antibodies to inherent antigen(s), *Acta Neuropathol (Berl)*, 62(4):268-275, 1984.
 41. Selkoe DJ : Alzheimer's disease, A central role for amyloid, *J. Neuropathol Exp Neurol*, 53(5):438-447, 1994.
 42. 정창환, 정민환, 목인희 : 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향, 한국뇌학회지, 1(1), pp.45-52. 2001.
 43. George-hyslop, PH. et al : The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21, *Science* 235: 885-890, 1987.
 44. Checler F : Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease, *J. Neurochem* 65(4):1431-1444, 1995.
 45. 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*, 64(5):2087-2096, 1995.
 46. 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*, 2;258(5079):126-129, 1992.
 47. 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*, 15;89(4):1345-1349, 1992.
 48. Games D, Khan KM, Soriano FG, Keim PS, Davis DL, Bryant K, Lieberburg I : Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injection in rat brain, *Neurobiol*

- Aging, 13(5):569-576, 1992.
49. Podlisny MB, Stephenson DT, Frosch MP, Tolan DR, Lieberburg I, Clemens JA, Selkoe DJ : Microinjection of synthetic amyloid beta-protein in monkey cerebral cortex fails to produce acute neurotoxicity, *Am J Pathol*, 142(1):17-24, 1993.
 50. Clemens JA, Stephenson DT : Implants containing beta-amyloid protein are not neurotoxic to young and old rat brain, *Neurobiol Aging*, 13(5):581-586, 1992.
 51. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. : Amyloid beta-peptides is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature*, 24;359(6393):322-325, 1992.
 52. Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K : Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid precursor, *Nature*, 11;347(6293):566-569, 1990.
 53. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL : Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease, *Science*, 28;245(4916):417-420, 1989.
 54. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM : Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein, *Brain Res Mol Brain Res*, 26(1-2):207-217, 1994.
 55. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C, Vaught JL, Neve RL : Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice. expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain, *Proc Natl Acad Sci USA*. 15;89(22):10857-10861, 1992.
 56. Lacey-Casem ML, Oster-Granite ML : The neuropathology of the trisomy 16 mouse, *Crit Rev Neurobiol*, 8(4):293-322, 1994.
 57. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, and Rowan MJ : Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments, *Neuroreport* 8:3213-3217, 1997.
 58. 이건목 : 침구자극이 치매와 연관된 melatonin 분비와 SOD 합성에 미치는 영향, *대한침구학회지*, 16(1), pp.403-426, 1999.
 59. 고태준, 이상용 : 補益清腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향, *동의신경정신과학회지*, 12(1), pp.151-167, 2001.
 60. 康永祿 : 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향, *대전대학교 대학원*, p.1, 1997.
 61. 朴大圭 : 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制 作用에 관한 研究, *成均館大學校 大學院 博士學位論文*, 1983.
 62. 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 관한 研究, *서울, 東醫神經精神科學會誌*, 10(1), pp.95-108, 1999.
 63. 이금주, 정현우, 강성용 : 石菖蒲가 白鼠의 腦연막동맥의 직경에 미치는 기전연구, *대한본초학회지*, 15(2), p.4, 2000.