

CT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서 指迷湯의 항치매 효과

강승준, 박치상, 박창국

대구한의대 한의과대학 심계내과학교실

Effects on Alzheimer's disease by *Jimitang* in CT105-overexpressed SK-N-SH cell lines

Sung-Jun Kang, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University

Alzheimer's disease(AD) is a geriatric dementia that is widespread in old age. In the near future AD may be the biggest problem in public health service. Although a variety of oriental therapies in the study of *Jimitang* have been traditionally utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and active mechanisms have not been fully elucidated.

This study is an investigation of effects of *Jimitang* on apoptotic cell death induced by CT105 overexpression in SK-N-SH neuroblastoma cell lines

DNA fragmentation, neurite outgrowth assay and LDH activity assay were examined. The regenerative and inhibitory effects on Alzheimer's disease in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by *Jimitang* water extract were examined. Findings from these experiments have shown that *Jimitang* inhibits the synthesis or activities of CT105, which has neurotoxicities and apoptotic activities in cell lines. In addition, pretreatment of *Jimitang*(>50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 hours) partially prevented CT(105)-induced cytotoxicity in SK-N-SH cell lines, and were inhibited by pretreatment. *Jimitang*(>50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 hours) repaired CT(105)-induced neurite outgrowth when SK-N-SH cell lines were transfected with CT(105).

Results of this study show that, in the *Jimitang* group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of neuroblastoma cells by CT105 expression is promoted. In addition, *Jimitang* was found to inhibit DNA fragmentation induced by CT105 overexpression, and promote neurite outgrowth. These findings suggest that *Jimitang* is beneficial for the treatment of AD.

Key Words: *Jimitang*, CT105, SK-N-SH cell lines, Alzheimer's disease.

1. 緒 論

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 말한다. 이 중 Alzheimer's disease(AD)는 진행성 痴呆로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로^{1,2}, 腦 안에 신경반(neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되고, 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되는 병리학적 특징을 가진다

· 접수 :2004년 7월 19일 채택 :2004년 8월 5일
· 교신저자 : 박치상, 대구시 수성구 상동 165번지 대구한의대 한방병원 2 내과
(Tel : 053-770-2104, H.P : 011-506-3079, E-Mail : stephano@dhu.ac.kr)

AD의 대표적인 원인설로 현재까지 정확한 병리학적 기전이 완전히 밝혀지지 않았으나, 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein(APP)으

로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein(A β)이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁵. 그러나 A β 의 침착과 환자에게서 보이는 인지 기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이痴呆症狀의 발병과 관련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔다⁴⁶.

최근에는 APP의 카복시말단 105개 아미노산으로 구성된 C단 단백질(carboxy-terminal 105 amino acid peptide fragment of APP, CT105)이 신경독성을 발휘하며 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었으며^{7,9}, 이를 바탕으로 한 치료제 연구 또한 활발히 진행되고 있는 실정이다.

韓醫學에서痴呆는歷代醫書에서呆病,癡狂,健忘,虛勞 등의 유사한概念으로 표현되다가¹⁰¹,明代에 이르러《景岳全書·雜證謨》癡狂痴癱篇에痴呆의病因,病機,治法,豫後에 대해서 구체적으로 표현되었다¹²³.

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 나누어 볼 수 있으며^{11,214},主要症狀으로는神志淡漠,寡言小語,終日不語,閉戶獨處,言辭顛倒,忽笑忽哭 등이^{11,2156} 있고,治法으로는補益精氣,益腎健腦,化痰宣竅,活血通竅 등^{11,214}이 주로 사용되고 있다.

최근韓醫學에서도痴呆에 대한 여러 가지 연구가 다양하게 진행되어 왔다^{15,17}.老화를 억제하는 항산화작용에 대한研究¹⁸,白鼠의記憶과行動에 미치는 영향에 대한研究¹⁹,腦별세포로부터 분비되는 염증성 세포활성물질인 TNF- α , IL-1의 억제연구 및 A β 의 생성억제에 관한研究²⁰⁻¹가 보고 되었다. 또한 AD의 관련인자인 APP와 presenilin(PS)유전자의 과다발현세포주를 이용한 한약물 연구²²에까지 이르렀으나, 아직 pCT105로 유도된 신경모세포종 세포주에서의抗痴呆 효과에 관한 연구는 미미한 실정이다.

이에 저자는補中益氣,化痰宣竅의 효능이 있어 임상에서痴呆治療에 응용되어온《辨證錄·呆病門》¹⁶에 수록된 처방인指迷湯의抗痴呆 효과를 규명하기 위하여 신경모세포종 세포주를 pCT105로 처리하여 치매와 유사한 신경세포자멸사를 유도하여 이에 대

한 효과를 비교 관찰한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

(주)중앙실험동물에서 분양받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 실온 20 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 40~60%로 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 試料의 調製

本實驗에 사용한指迷湯은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 세말한 다음 1,000g에 3차 증류수 5L를 첨가하여 85 $^{\circ}$ C에서 12시간 열을 가한 후 식혀서 gauze로 1차 여과 후 동결 건조하였다. 동결건조중량 약 50g을 사용전 -80 $^{\circ}$ C에 보관하여 3차 증류수로 5mg/mL농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 처방은《辨證錄·呆病門》¹⁶에 수록된 것으로 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

3) 試藥

試藥은 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), formaldehyde,

Table 1. Prescription of Jimitang

Herbs	Scientific Name	Dose (g)
人 蔘	<i>Panax ginseng</i>	20
白 朮	<i>Atractylodes macrocephala</i>	40
半 夏	<i>Pinellia ternata</i>	12
神 麩	<i>Aspergillus oryzae cohn</i>	12
南 星	<i>Arisaema amurense var. serratum</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4
陳 皮	<i>Citrus unshiu</i>	2
石菖蒲	<i>Acorus gramineus</i>	2
附 子	<i>Aconitum carmichaeli</i>	1
肉豆蔻	<i>Myristica fragrans</i>	0.6
Total Amount		97.6

polyacrylamide는 Sigma社(U.S.A.)製品을, Agarose는 FMC社(U.S.A.)제품을 使用하였다. RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco BRL에서 구입하였으며, ethanol은 Merck로부터, Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex(ABC) kit는 Vector Lab.에서 구입하였고 3,3'-diaminobenzidine(DAB)는 Sigma에서 구입하였으며, 2차 항체인 Texas-Red는 Santa Cruze에서 구입하였다.

2. 方法

1) pCT105 형질을 조합시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH는 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture 용 dish에서 배양하였다. CT105 과발현 세포주를 구축하기 위해 포유동물세포내에서 CT105 과발현을 유도하는 plasmid인 pCT105를 사용하여 형질이입을 다음과 같이 수행하였다. 즉 well당 10^5 세포를 6-well plate에 분주하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀할 시점에 반응액 A에는 pCT105 2 μ g와 serum free medium(SFM) 100 μ L을 혼합하고, 반응액 B에는 lipofectin 10 μ L와 SFM 100 μ L을 혼합하여 45분간 각각 반응시킨 다음, 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5mL와 반응 혼합액을 넣고 분주한 다음 6시간정도 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 유지하고 5% FBS를 함유한 RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 μ g/mL로 선별을 2주간 실시하고 단일 클론을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포자멸사 관찰

정상군(NOR), CT105 과발현 신경모세포종 세포주인 대조군(CT105) 그리고 대조군에 指迷湯을 처리한 군(CT105+Jimitang)으로 구분하여 신경세포의 세포자멸사에서 나타나는 형태학적 변화를 조사하기 위

해 well당 10^5 세포수로 6-well plate에 분주하여 하룻밤 배양하였다. 指迷湯 수주출물의 효과를 알아보기 위해 25, 50 μ g/mL 농도로 처리하여 penicillin/streptomycin이 들어 있는 5% FBS의 RPMI 배지에서 37℃에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포의 형태학적 변화 관찰은 위상차 200배율의 현미경에서 각 군당 200개 정도의 세포를 촬영하여 조사하였으며, 세포자멸사의 억제농도를 분석하기 위해 96-well plate에 10^3 세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 ELISA(enzyme-linker immunosorbent assay) reader를 이용하여 세포자멸사가 억제되는 농도를 조사하였다.

3) CT105, 저당 및 저산소조건에 의한 신경세포의 세포자멸사 유도

신경 세포자멸사를 일으키는 요인이 세포자멸사멸에 미치는 영향을 관찰하기 위해 정상군(NOR), 대조군(CT105), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 指迷湯을 처리한 군(CT105+Jimitang)으로 구분하였다. 저산소군은 신경세포를 CO₂ 배양기를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37℃, 4hrs 환경하에서 저산소조건을 유도하였으며, 저당군은 1.1mM D-(+)-glucose를 포함한 EBSS(Earles balanced salt solution)로 교체하여 2시간 또는 4시간동안 유지한 후에 25mM D-(+)-glucose를 포함한 EBSS로 glucose를 회복시켜준 상태에서 2시간 또는 4시간동안 유지하여 저당조건을 유도하였다. 指迷湯 처리군은 가장 강한 세포자멸사 억제효과를 가지는 농도인 50 μ g/mL에서 본 실험에 사용하여 72시간 배양하였다.

4) LDH assay에 의한 신경세포 손상측정

신경세포의 세포자멸사를 억제하여 생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 정상군(NOR), 대조군(CT105), 저당군(LG), 저산소군(LO) 그리고 대조군에 50 μ g/mL의 指迷湯을 처리한 군(CT105+Jimitang)으로 구분하여 위에 기술한 바와 같이 각각 처리한 세포를 5% FBS를 함유한 RPMI medium, penicillin/streptomycin이 함유된 배지에서 37℃에서 12시간 배양하고 그 상층액 20 μ L를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/mL)를 20 μ L씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합 후 37℃에서 30분간 더 혼

들었다. 發色試藥(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ L씩 가한 후 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 μ L씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합 후 ELISA reader로 흡광도(A570/A630)를 측정하였다.

5) DNA fragmentation 분석

세포자멸사의 일차적인 특징으로 나타나는 세포핵의 변화를 관찰하기 위하여 CT105 과발현 신경모세포종 세포주를 well당 10³세포수로 6-well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 다음 指迷湯 수추출물을 10, 25, 50 μ g/mL 농도로 처리하였다. 이후에 세포 용해액인 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ L를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 μ g/mL)를 첨가하고, 50 $^{\circ}$ C에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음 이에 phenol/chloroform 동량을 넣고 잘 혼합한 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase(50 μ g/mL)를

함유한 dH₂O 35 μ L를 첨가하여 녹인 후 이 용액을 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

6) 통계 처리

모든 실험은 최소한 3회 이상 수행하였고, 실험결과는 세포의 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며, 통계학적 유의성은 t-test에 의한 P<0.05의 유의성으로 나타내었다.

III. 實驗成績

1. CT105 과발현에 따른 세포의 형태학적 관찰

CT105 과발현에 의한 세포자멸사를 확인하기 위해 위상차현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군은 세포자멸사에 관련한 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 대조군에 指迷湯을 처리한 군은 25 μ g/mL의 농도에서는 세포의 생존율이 약하고, 세포자멸사의 회복이 미진하며, 신경돌기의 신장이 매우 저조한 상태인 반면 50 μ g/mL의 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타나고,

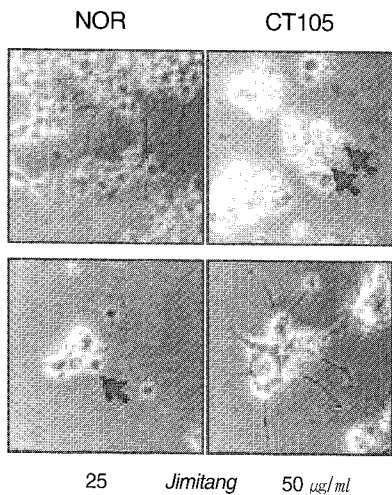


Fig. 1. Effect of *Jimitang* water extract on morphological changes

Representative photomicrographs of SK-N-SH cell lines(NOR), CT105-expressed cells(CT105), and CT105 cells treated with *Jimitang* water extract at the concentration of 25 and 50 μ g/ml, respectively, are shown(200X). Survival cell was determined by phase-contrast microscopy. Similar results were found in at least three separate experiments. Arrow indicated the apoptotic cells by CT105 expression.

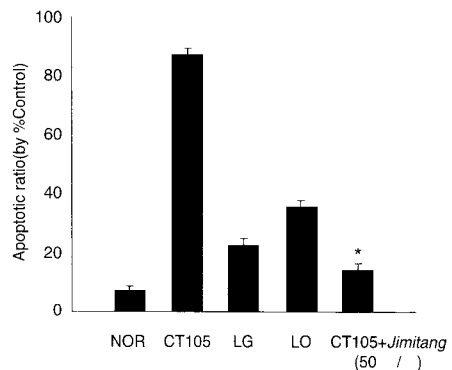


Fig. 2. Inhibition of apoptotic ratio by *Jimitang* water extract

Apoptotic ratio of CT105-overexpressing SK-N-SH cells were observed by ELISA reader and phase-microscopy in medium, induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(*p<0.05).

신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

2. CT105 과발현으로 인한 신경세포의 세포자멸사에 미치는 영향

신경세포의 세포자멸사가 指迷湯에 의해 얼마나 억제되는지 세포자멸사의 ratio를 조사한 결과 정상군에서는 $5.0 \pm 2.5\%$ 이고, 이에 비해 대조군에서는 $86.0 \pm 3.0\%$ 이며, 저당군에서는 $23.0 \pm 2.5\%$ 이고, 저산소군에서는 $34.0 \pm 5.4\%$ 이며, 대조군에 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 指迷湯을 처리한 군에서는 $12.0 \pm 4.5\%$ 이었다(Fig. 2).

3. CT105 과발현 세포주에서 LDH활성에 미치는 영향

LDH의 활성도를 측정한 결과, 정상군에서는 $5.0 \pm 1.5\%$ 이고, 대조군에서는 $87.0 \pm 5.0\%$ 이며, 저당군에서는 $75.0 \pm 4.5\%$ 이고, 저산소군에서는 $53.0 \pm 5.4\%$ 이며, 대조군에 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 指迷湯을 처리한 군에서는 $23.0 \pm 2.5\%$ 이었다(Fig. 3).

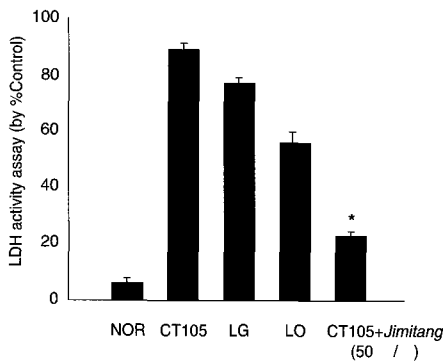


Fig. 3. Survival effects of *Jimitang* water extract on LDH activity

Survival cell ratio of CT105-overexpressing SK-N-SH cells were observed by Morphological characteristic of survival cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detection kit from ELISA reader. Statistically significant value compared with CT105 control group by t-test(*p<0.05).

4. CT105 과발현 세포주에서 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

DNA fragmentation을 조사한 결과 대조군에서는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만, 대조군에 指迷湯을 처리한 군에서는 指迷湯의 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 감소하고, 특히 指迷湯의 농도가 $50 \mu\text{g/mL}$ 에서는 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸되는 경향을 보였다(Fig. 4).

IV. 考 察

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 老化로 인한 腦 증후군으로 腦의 退行性變化에 의한 AD와 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 AD이다²⁾.

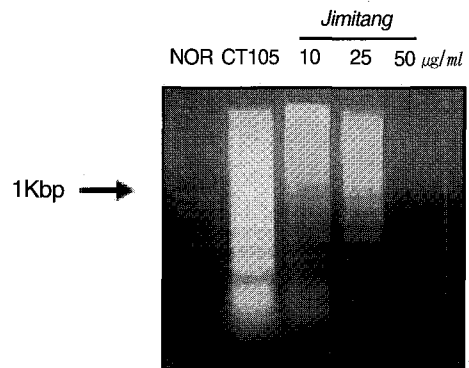


Fig. 4. Effects of *Jimitang* water extract on DNA fragmentation

Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 10, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of *Jimitang* water extract for 12 hrs. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

최근 AD는 가족성 AD(Familial Alzheimer's disease, FAD)와 산발성 AD(Sporadic Alzheimer's disease, SAD)로 크게 분류되는데, 전체 AD 환자의 5-10% 정도를 차지하는 FAD의 경우 원인유전인자로 알려진 presenilin 1(PS1), APP 그리고 presenilin 2(PS2)에 돌연변이가 일어났을 경우 100% AD로 진단되는 것으로 보고 되었다²³. AD 환자의 대부분을 차지하는 SAD의 경우는 현재까지는 특정 유전자의 돌연변이에 의해 발병하는 경우는 발견되지 않았으며 apolipoprotein E(ApoE), α -2-macroglobulin(A2M)과 같은 위험인자는 알려져 있으나 FAD에서 보이는 것과 같은 전체의 경우를 설명할 수 있는 유전학적 근거들은 보고된 바가 없다²⁴.

AD의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되는 노인반(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실뭉치처럼 보이는 신경섬유다발을 들 수 있다⁴⁵. 노인반은 신경반 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축삭돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 $A\beta$ 를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다²⁵. 이러한 병리학적 특징은 FAD와 SAD의 모든 경우에 나타나며 그 결과 신경세포의 사멸에 의해 결국 인지 기능의 손상을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다²⁶. AD의 원인에 대한 여러 가설들이 있으나, $A\beta$ 가 AD의 발병원인으로 작용할 것이라는 베타아밀로이드 가설은 1980년대 초에 아세틸콜린의 저하가 AD의 병인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설이후에 가장 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여지고 있다²⁷.

$A\beta$ 는 APP라는 type 1 integral membrane protein에서부터 유래된 단백질 분해효소에 의한 대사산물로서 extracellular domain과 membrane domain으로 이루어져 있는 39-43개의 펩타이드이다. APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 경로에 의해 대사가 진행되는데, 즉 α -secretase에 의해서 $A\beta$ domain 안쪽이 잘려지며 N-terminal이 세포 밖으로 분비된다. 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음

이 보고 되었다²⁸. 한편 alternative processing 경로에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β -secretase 등에 의해 $A\beta$ 의 N-terminal 주위가 잘라지며 $A\beta$ sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 고정되어 남는다²⁹. 이 C단 단백질 중 일부는 $A\beta$ 전체 sequence를 가지고 있으며 γ -secretase에 의해 잘려져 $A\beta$ 를 형성하는 것으로 생각된다. 하지만 이상과 같이 in vitro에서 $A\beta$ 의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, $A\beta$ 가 독성을 나타내기 위해서는 20 μ M이상의 고농도가 필요하고 일부 연구에서는 $A\beta$ 의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데³⁰, 특히 in vivo 실험에서는 $A\beta$ 의 독성에 대해 상반되는 결과가 팽팽히 맞서고 있어, 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을 할 것인지 불확실한 실정이다. 따라서 실제 병인에서는 다른 인자들, 그 중에서도 APP의 다른 중간대사산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 $A\beta$ 의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내와 배양액에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 뇌 부위에서도 발견되었다^{29,31,2}. 또한 이 단백질은 in vitro에서 또는 세포에 transfection시켰을 때 amyloid와 유사한 집합체를 형성할 수 있다³³. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 transfection 시킬 경우 세포독성을 일으키는데, 특히 이러한 C단 단백질의 transfection시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다³⁴. 더구나 이렇게 C단 단백질에 transfect된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고됨으로써^{35,6} 실제 in vivo에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다. 미국의 Neve 박사 팀에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데³⁶, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고 인지기능의 결손이 동반됨이 보고 되어 C단 단백질이 과도하게 발현되면 신경세포에 유해한 영향을 끼쳐 인지기능을 손상시

킬 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다.

최근 C단 단백질에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 세포와 일차배양한 대뇌피질 신경세포에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, *Xenopus oocytes*와 Purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고하였다³⁷. 또한 CT105는 calcium homeostasis에도 약영향을 미치는데, Rat brain microsome에서는 Mg²⁺-Ca²⁺ ATPase에 의해, 신경모세포종 세포주에서는 Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로써 calcium homeostasis을 손상시키지만, Aβ는 그렇지 않다고 하여³⁸ 기존의 Aβ보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

韓醫學에서 痴呆는 明代《景岳全書·雜證謨》癲狂 痴 猥篇에서 “痴 猥證, 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……” 이라 하여 기록되었고, 또한 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 설명하였으며^{12,3}, 清代 陳¹⁶에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술되었고, 歷代醫書에서 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 概念이다¹⁰.

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^{11,2,14,6}. 主要病因病機로는 郭³⁸은 年老氣衰, 久病, 內風卒中, 外傷頭腦, 邪毒內竅 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀를 發한다고 하였고, 張³⁹은 呆從痰治으로 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의 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 있다¹⁰.

痴呆의 臨床的 研究로는 四象體質 醫學的 治療^{15,17}와 韓醫學的인 固有 辨證論治에 의한 治療^{12,14}로 크게

대별되는데, 그 중 韓醫學的인 辨證論治에서는 補益精氣, 益腎健腦, 化痰宣竅, 活血通竅^{12,14}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.

指迷湯은 補中益氣, 化痰宣竅의 效능¹²으로 痴呆의 治療에 응용된 處方으로 《辨證錄·呆病門》¹⁶에 최초로 수록되었다. 指迷湯의 처방구성약물의 效능을 살펴보면⁴⁰, 人蔘은 大補元氣, 安神益智, 健脾益氣, 生津止渴하고, 白朮은 補裨益氣, 燥濕利水하며, 半夏는 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫하고, 神麩은 消食行氣, 健胃止瀉하며, 南星은 祛風痰, 鎮瘳하고, 甘草는 補裨益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳하며, 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰하고, 石菖蒲는 芳香開竅, 逐痰祛濁하며, 附子는 回陽救逆, 溫脾腎, 散寒止痛하고, 肉豆蔻는 瀉腸止瀉, 溫中行氣한다.

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 침구치료를 이용한 연구를 비롯하여 단일약물과 복합처방을 이용한 연구가 보고되었다.

최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구에서 益精地黃湯²², 補益清腦湯⁴²이 PC12 cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제능력과 항콜린작용을 보고하였고, 遠志가 腦 別세포에서 TNF-α 생성 및 TNF-α mRNA의 발현을 억제하는 효과⁴³가 있음을 보고하였고, 石菖蒲가 국소 腦혈류량을 농도 의존적으로 증가시킨다는 보고⁴⁴가 있었으나, 아직까지 指迷湯의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 抗痴呆 效果에 관한 연구는 보고 되지 않았고, 신경모세포종 세포주에서 CT105를 과발현시켜서 抗痴呆 效果를 알아본 실험적 보고는 없다.

이에 著者는 임상에서 腦신경계 질환에 사용되고 있는 指迷湯의 抗痴呆 效果를 규명하기 위하여 pCT105를 과발현시킨 신경모세포종 세포주에서 세포자멸사 유도에 대한 형태학적인 변화, 신경세포자멸사, LDH 활성도 및 DNA fragmentation 억제효과 등을 분석하였다.

APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105과발현에 의

한 신경세포의 세포자멸사를 위상차현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군의 신경세포 세포자멸사는 형태학적으로 큰 변화가 유도되었는데 세포자멸사에 관련한 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였으나 대조군에 50 μ g/mL의 指迷湯을 처리한 군에서는 신경세포의 생존이 확인됨과 동시에 신경돌기의 출현이 유도되었다(Fig. 1). 그리고 신경세포의 세포자멸사가 指迷湯에 의해 얼마나 억제되는지 세포자멸사의 ratio를 조사한 결과 세포자멸사는 대조군에서는 저당군, 저산소군에 비해 훨씬 높았으나, 指迷湯을 처리한 군에서는 세포자멸사가 현저하게 줄어들었다. 이와같이 CT105가 과발현되었으나 指迷湯을 처리할 경우 신경 세포의 세포자멸사를 유의성 있게 억제하므로 痴呆 치료에 적용될 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 2).

指迷湯이 CT105 과발현에 의한 신경세포의 세포자멸사를 어느 정도억제하는지 확인하기 위해 배양액으로 유리된 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 LDH의 활성도의 비율은 대조군에서는 저당군, 저산소군에 비해 높았으나, 대조군에 指迷湯을 처리한 군에서는 세포자멸사가 현저하게 줄어들었다. 이와같이 指迷湯처리군에서 LDH의 활성도를 유의성 있게 억제하므로 指迷湯에 CT105로 유발되는 세포손상을 억제하는 유효성분이 있는 것으로 사료된다(Fig. 3).

한편 세포자멸사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘려지게 되면 약 200-400bp만큼 씩 불연속적인 절편이 존재하게 된다. 이와 같은 세포자멸사의 일차적인 특징인 세포핵의 변화에 대한 指迷湯의 영향을 관찰하기 위하여 指迷湯 수추출물을 10, 25, 50 μ g/mL 농도로 해서 6-well plate에 10⁵ 세포수의 하룻밤 배양한 APP의 CT105 발현 세포를 분주하여 세포자멸사가 억제되는 정도를 세포의 DNA를 분리하여 DNA fragmentation으로 조사하여 본 결과, 대조군에서는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 指迷湯처리군에서는 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 감소하고, 특히 指迷湯의 농도가 50 μ g/mL에서 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸

되는 경향을 보였다(Fig. 4). 따라서 指迷湯이 APP의 CT105 과발현에 의한 세포자멸사멸 신호체계의 단백질효소 내지 관련 신호체계를 차단하여 세포자멸사를 억제하는 것으로 사료된다.

이상과 같이 指迷湯은 pCT105 과발현 신경아세포 암 세포주에서 세포자멸사 유도에 대한 뚜렷한 억제 효과를 보여 AD환자의 뇌에서 나타나는 퇴행성 변화를 지연시킬 수 있을 것으로 추정되며, 본 연구를 토대로 앞으로 동물대상 실험연구 및 임상실험연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

指迷湯의 항치매 효과를 규명하기 위하여 신경모세포종 세포주를 pCT105로 처리하여 치매와 유사한 신경세포자멸사를 유도하여 실험한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 指迷湯은 CT105과발현에 의한 신경세포의 세포자멸사를 유의성있게 감소시켰으며, 세포생존율을 증가시켰다.
2. 指迷湯은 신경세포 배양액 중 LDH 활성도를 유의성 있게 감소시켰으며, DNA fragmentation을 억제하였다.

이상의 결과에서 指迷湯은 CT105 과발현 신경모세포종 세포주의 세포자멸사를 효과적으로 억제하고 신경세포를 보호하는 것으로 입증되었다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣;1994, p.63-6.
2. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사;1992, p.256-71, 327-30, 663-4.
3. 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. 1995; 11(2):219-22.
4. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richy P, Kawai M, Perry G et al. Senile plaques in cerebral amyloid angio

- pathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. *Brain Res.* 1992; 593(2):299-303.
5. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 1990;250:279-82.
 6. 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.
 7. Matsmoto A, 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.* 1997;225:1055-62.
 8. 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.* 1998; 9(17):3875-9.
 9. Kim HS, Lee JH, Suh YH. C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SK cell. *Neuroreport.* 1999; 10:113-6.
 10. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 痴呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. *동의병리학회지.* 1999;13(1):36-45.
 11. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. *동의신경정신과학회지.* 1996;7(1):77-94.
 12. 閻孝誠 主編. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社;1993, p.242-54, 784-91.
 13. 張介賓. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社;1985, p.573-8.
 14. 黃大東. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社; 1989, p.378-81.
 15. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 韓醫學적 임상연구. *동의신경정신과학회지.* 1996; 7(1):1-13.
 16. 陳士鐸. 辨證錄. 서울:醫聖堂;1989, p.241-6.
 17. 裴旼星. 노인성 치매에 관한 체질의학적 연구. *大韓韓醫學會誌.* 1992;13(2):101-6.
 18. 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. *大韓韓醫學會誌.* 1996;17(1):21-36.
 19. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지.* 1999;10(1):1-16.
 20. 김태현, 김준한, 강형원, 유영수. 세심탕에 의한 뇌혈 세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과. *동의신경정신과학회지.* 2001;12(1):137-50.
 21. 박진성, 강형원, 유영수. 생체외 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. *동의신경정신과학회지.* 2001;12(2):157-72.
 22. 최병만, 이상룡. 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지.* 2000;11(2):23-42.
 23. Translating Selkoe, DJ. Cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399. 1999;A23-A31.
 24. Trembath Y, Rosenberg C, Ervin JF, Schmechel DE, Gaskell P, Pericak-Vance M et al. Lewy body pathology is a frequent co-pathology in familial Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2003;105(5):484-8.
 25. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease In Pharmacotherapy; a pathologic physiologic approach, Dipiro J. T. et al. Ed.. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc.;1996, p.1325-44.
 26. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Apple Pathol.* 1984;2(6):357-69.
 27. 정창환, 정민환, 목인희. 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향. *한국뇌학회지.* 2001;1(1):45-52.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Clemens JA, Stephenson DT. Implants containing beta-amyloid protein are not neurotoxic to young and old rat brain. *Neurobiol Aging.* 1992;13(5):581-6.
 31. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL et al. Amyloid beta-peptides is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992;359(6393):322-5.
 32. Iverfeldt K, Walaas SI, Greengard P. Altered processing of Alzheimer amyloid precursor protein in response to

- neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(9):4146-50.
33. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J et al. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. EMBO J. 1988;7(4):949-57.
 34. 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. 1989;281245(4916):417-20.
 35. 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. 1994;26(1-2):207-17.
 36. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C et al. 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. 1992;89(22):10857-61.
 37. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments. Neuroreport. 1997;8:3213-7.
 38. 郭宇鵬, 陳延. 海洲治療腦萎縮經驗. 中醫雜誌. 1997;38(10):586-7.
 39. 張覺人. 呆從痰治. 上海中醫藥雜誌. 1995;3:20-1.
 40. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李映鍾, 金先熙. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社;1990, p. 166-7, 172-3, 175-7, 263-5, 374-5, 380-1, 424-5, 556-8, 583-4, 624-7.
 41. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林出版社;1989, p.199-203, 225-8, 308-13, 320-7, 393-4, 426-8, 463-8, 488-9.
 42. 고태준, 이상용. 補益清腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):151-67.
 43. 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. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):95-108.
 44. 이금주, 정현우, 강성용. 石菖蒲가 白鼠의 腦연막동맥의 직경에 미치는 기전연구. 대한본초학회지. 2000;15(2):4.