

원 지

## 산화적 손상에 의한 Neuro 2A 치매모델에서 石菖蒲遠志散의 방어효과

임준모<sup>1)</sup>, 이민구<sup>1),2)</sup>, 윤종민<sup>1),2)</sup>, 이인<sup>2)</sup>, 문병순<sup>1),2)</sup>

원광대학교 한의학전문대학원<sup>1)</sup>  
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실<sup>2)</sup>

### The Protective Effects of *Seokchangpowonji-san* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Cell Death of Neuro 2A as an Alzheimer Model System

Jun-Mo Yim<sup>1)</sup>, Min-Goo Lee<sup>1),2)</sup>, Jong-Min Yun<sup>1),2)</sup>, In Lee<sup>2)</sup>, Byung-Soon Moon<sup>1),2)</sup>

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University<sup>1)</sup>  
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University<sup>2)</sup>

**Objective :** The water extract of *Seokchangpowonji-san* (SWS) has traditionally been used for treatment of dementia in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of SWS rescues cells from neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

**Methods & Results :** This study was designed to investigate the protective mechanisms of SWS on  $\beta$ -amyloid or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in neuro 2A cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> markedly decreased the viability of neuro2A cells, which was characterized by apparent apoptotic features such as membrane blebbing as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei. However, the water extract of SWS significantly reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and apoptotic characteristics through reduction of intracellular peroxide generation. Also, the extract prevented the mitochondrial dysfunction including the disruption of mitochondria membrane permeability transition (MPT) and the modulation in expression of Bcl-2 family proteins in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated neuro 2A cells. Furthermore, pretreatment with SWS inhibited the activation of caspase-3, and in turn, degradation of ICAD/DFF45 was completely abolished in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.

**Conclusion :** Taken together, the data suggest that the protective effects of the water extract of SWS against  $\beta$ -amyloid induced oxidative injuries may be achieved through modulation of mitochondrial dysfunction.

**Key Words:** *Seokchangpowonji-san*, Alzheimer, neuro 2A cells

### 緒 論

- 접수 : 2004년 9월 15일 · 논문심사 : 2005년 1월 19일
- 채택 : 2005년 2월 19일
- 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의  
산한방병원 내과2  
(Tel : 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail :  
mbs@wonkwang.ac.kr)

\* 이 연구는 보건복지부 뇌질환 한방연구센터 연구비(03-PJ9-PG6-SO02-0001)에 의해서 수행되었습니다.

石菖蒲遠志散은 遠志와 石菖蒲를 同量으로 배합한 방제이며 『東醫四象新編』에 “사람으로 하여금 耳目을 聰明하게 한다(令人耳目聰明)”고 기록되어 있다. 본 처방은 遠志의 祛痰利竅, 安神益智의 作用과 石菖蒲의 開竅豁痰, 醒神益智의 作用이 배합되어 뇌의 작

용을 활발하게 하는 開發의 효능으로 의식장애를 제거하고, 益智健腦시키는 효능으로 痴呆 등의 인지장애를 개선시키는데 널리 활용되고 있다<sup>2)</sup>.

痴呆는 일반적으로 뇌의 만성 또는 진행성 질환에서 발생한 뇌 증후군이며, 이로 인해 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습능력, 언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질의 장애가 있는 것을 말한다<sup>3)</sup>.痴呆를 야기하는 원인질환은 뇌의 퇴행성 변화, 뇌혈관장애, 뇌의 염증성장애, 대사성질환, 내분비질환, 외상, 중독 등으로 다양하지만<sup>4)</sup>, 이 중 뇌의 퇴행성 변화에 의한 Alzheimer형 치매와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매, 그리고 양자가 혼합된 혼합형 치매가 많은 비율을 차지하고 있다<sup>5)</sup>.

알츠하이머병은 진행성 치매로 점진적인 뇌의 위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로<sup>6)</sup>, 뇌 안에 축색반(neuritic plaques)와 신경원섬유농축제(neurofibrillary tangles)의 구조가 침착되고, 노인반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되는 병리학적 특징을 가진다<sup>7)</sup>. 이 2가지 구조물이 어떻게 만들어 졌는가를 중심으로 많은 연구가 이루어지고 있으며, 최근 알츠하이머병에서 뇌 세포의 퇴행성 변화의 분자생물학적 연구가 진행되고 있는데, 현재까지 밝혀진 원인으로는 성장인자 결핍, 신경독성, 흥분성 아미노산의 과다, 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 작용, 에너지 신진대사의 변화, free radical의 형성 등이다. 알츠하이머병에 대한 정확한 발생기전은 아직 밝혀지지 않아 근본 치료에 대한 대책은 없고 증상에 대한 치료가 대부분이다. 약물요법은 주로 부족한 신경전달 물질(neurotransmitter; 콜린계, 모노아민계)의 보충과 남아있는 뇌신경 세포의 대사 항진을 목적으로 콜린계에 작용하는 약물이 주를 이루고 있으나 알츠하이머병에서 인지 기능의 개선에 대한 효과는 일부의 연구에서만 확인되는 정도이다. 따라서 치매의 예방 및 치료제를 위한 천연약물의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

石菖蒲遠志散에 관한 실험적 연구로는 김<sup>8)</sup>은 CMS로 유발된 우울증 동물모델과 Morris 수중미로 실험에서 항우울 효과 및 학습과 기억향상 효과가

있음을, 이<sup>9)</sup>는 pCT105 과발현 신경세포암 세포에서 세포사를 억제하고 신경세포 보호 효과가 있음을, 강<sup>10)</sup>은 저산소 부하모델에서 뇌손상 보호기능이 있음을 보고하였으나, 아직 Neuro 2A 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자는 石菖蒲遠志散의 항치매 효과를 究明하기 위하여 알츠하이머병의 병인이 되는 베타 아밀로이드 펩타이드( $\beta$ -amyloid peptide)를 신경아종 세포인 Neuro 2A 세포주에 직접 처리하여 세포사멸의 기전을 조사하고, 石菖蒲遠志散을 전처리하여 세포생존율의 변화, 세포의 형태적 변화 및 표적 단백질 등의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 세포주

본 실험에 사용한 Rat에서 유래한 신경아종 Neuro 2A 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 10% Fetal bovine serum (FBS)가 포함된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 세포배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37℃ 세포배양기에서 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

#### 2) 약제

본 실험에 사용한 약제는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였으며, 한 첩 내용과 분량은 (Table 1)과 같다.

#### 3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항체, trypsin 및 우태아 혈청(fetal

Table 1. The Prescription of Seokchangpowonji-san

韓藥名	生藥名	重量(g)
石菖蒲	<i>Rhizoma Acori Graminei</i>	50
遠志	<i>Radix Polygalae</i>	50
Total amount		100

bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(24-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-X<sub>L</sub>s, ICAD/DFF45, HO-1 등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 試料의 調製

石菖蒲遠志散 100g을 물 1 l 와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 freeze dryer로 동결 건조시킨 후 21.2g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

### 2) Neuro 2A 세포주 배양

Rat에서 유래한 신경아종세포주인 Neuro 2A(ATCC, CRL1446)는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서(37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포사멸과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 3) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포( $1 \times 10^5$  cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정 시킨 후 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종부피의 1/10 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응시켰다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용

액 100  $\mu$ l/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 후 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 Neuro 2A 세포에 石菖蒲遠志散을 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름알데히드(3.7%)가 포함된 0.5% crystal violet 용액으로 실온에서 5분 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

### 5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성의 측정

Neuro 2A 세포는 50 $\mu$ M의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)와 30분 반응시킨 후 PBS로 세척하여 형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하여 붉은색 형광을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 측정하였다. DCF-DA는 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 deacetylation되어 dichlorofluorescein이 형광을 내는 물질로 전환되었다.

### 6) Western blot analysis

세포는 石菖蒲遠志散을 처리한 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)과 4℃에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200  $\mu$ g)은 2 $\times$ ample buffer와 혼합하여 100℃에서 5분 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 부하하여 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-X<sub>L</sub>s, ICAD/DFF45 및 HO-1에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시

간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase)와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

7) 미토콘드리아의 막전위 측정

세포내 소기관인 하나인 미토콘드리아의 막전위(membrane potential) 변화를 조사하기 위하여 JC-1 및 Rhodamine 123 염색을 시행하였다. 石菖蒲遠志散으로 처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. JC-1 (10µg/ml) 및 Rhodamine 123(5 µg/ml)은 DMEM 배지에 희석하여 20분 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

8) 통계 처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과로 통계처리는 student's t-test로 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05(p<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

結 果

1. β-amyloid에 의한 Neuro 2A 세포독성에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성 변화

β-amyloid에 의한 Neuro 2A 신경아종 세포의 세포사멸이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸임을 확인하기 위하여 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색으로 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 형광현미경을 통하여 관찰하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 DCF-DA의 형광 변화를 알아보기 위하여 150 µM 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 처리 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비하여 현저한 형광의 변화가 관찰되었으며(Fig. 1A와 B), 1 µM β-amyloid에 의해서도 처리 4시간 이후부터 DCF-DA의 형광 변화가 관찰되기 시작하여 처리 6시간 이후에 최대의 형광변화를 보였다(Fig. 1C).

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 생존율 변화

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 신경아종 세포의 세포독성은 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각 12시간 처리한 후 세

포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성에 의한 세포의 생존율은 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서 대조군의 71%, 400 µM 농도에서는 23% 미만으로 현저히 감소되어(Fig. 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 생존률은 농도 의존적으로 감소되는 것을 알 수 있었다.

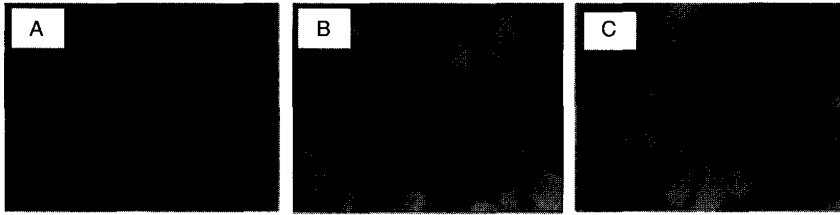
3. 石菖蒲遠志散이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 생존율에 미치는 영향

앞에서 β-amyloid 처리가 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성에 의한 세포사멸임을 확인하였으므로, 이때 Neuro 2A 세포 손상에 대한 石菖蒲遠志散의 방어효과를 알아보기 위하여 石菖蒲遠志散을 다양한 농도로 30분 전처리한 후 300 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 12시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포생존율은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서 대조군의 49%를 보였으나 石菖蒲遠志散 전처리 실험군은 75 µg/ml의 농도에서는 58%, 150 µg/ml의 농도에서는 63%, 300 µg/ml의 농도에서는 68%, 600 µg/ml에서는 75%, 그리고 1200 µg/ml에서는 87%의 세포 생존율을 나타내어 농도의존적인 방어효과를 보였다(Fig. 3).

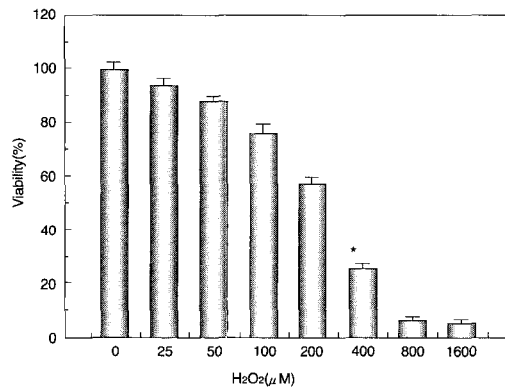
4. 石菖蒲遠志散이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 형태적 변화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 형태적 변화를 알아보기 위하여 crystal violet 염색을 통해 위상차 현미경으로 세포의 형태 변화를 관찰하였다. Neuro 2A 세포는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(300 µM) 6시간 단독 처리시 세포수의 현저한 감소와 세포막의 수포화 등의 변화가 관찰되었으나(Fig. 4B와 b), 石菖蒲遠志散(1200 µg/ml)을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 세포수와 형태가 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 4D와 d). 또한, 石菖蒲遠志散 단독처리군의 세포수 및 형태는 대조군(Fig. 4A와 a)과 유사하여 石菖蒲遠志散 자체의 세포 독성은 확인할 수 없었다(Fig. 4C와 c).

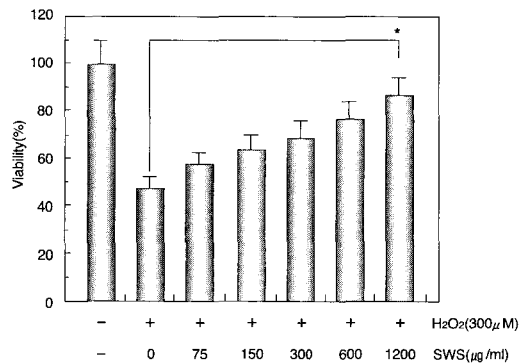
5. 石菖蒲遠志散이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 DNA 분절에 미치는 영향



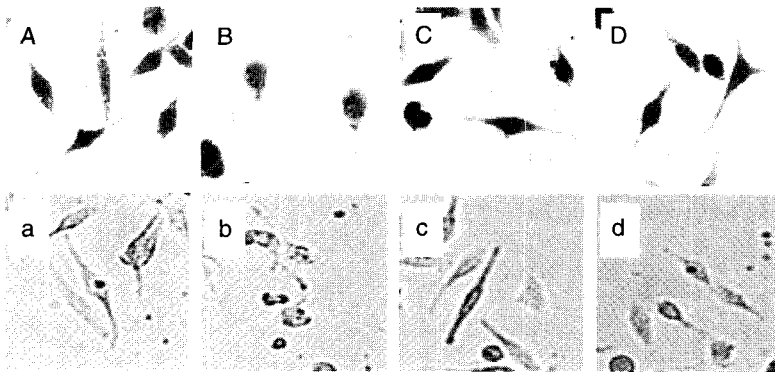
**Fig. 1.** Reduction of intracellular peroxide by  $\beta$ -amyloid-treated Neuro 2A cells. Cells were treated with  $\beta$ -amyloid in Neuro 2A cells for 6 hr. Then, cells were incubated with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 50  $\mu$ M) and fluorescence intensity of cells was visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments. (A) control, (B)  $H_2O_2$ -treated, (C)  $\beta$ -amyloid treated cells.



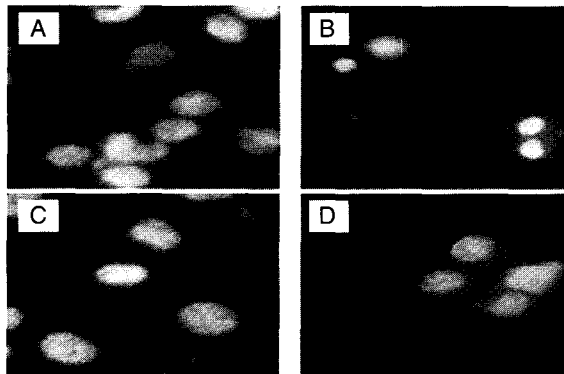
**Fig. 2.** Effects of  $H_2O_2$  on viability of Neuro 2A cells in a dose dependent manner. Cells were treated with various concentrations of  $H_2O_2$  for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates. \*  $p < 0.001$  by student's  $t$ -test, compared with control group.



**Fig. 3.** *Seokchangpowonji-san* (SWS) prevented the cytotoxicity by  $H_2O_2$  in Neuro 2A cells in a dose-dependent manner. Cells were pretreated with various concentrations of SWS for 30 min and followed by the addition of 300  $\mu$ M  $H_2O_2$  for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates. \*  $p < 0.01$  by student's  $t$ -test.



**Fig. 4.** Pretreatment of Neuro 2A cells with SWS prevented the cytotoxicity and morphological change by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) alone, SWS (1200 μg/ml) alone and SWS with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hr. Then, cells stained with crystal violet and observed under phase contrast microscopy. (A, a), control cells. (B, b), cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C, c), cells treated with SWS and (D, d), cells pretreated with SWS before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

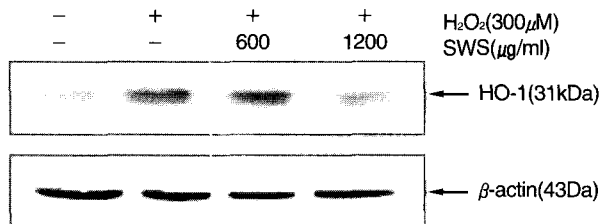


**Fig. 5.** Pretreatment of Neuro 2A cells with SWS prevented the morphological change by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) alone, SWS (1200 μg/ml) alone and SWS with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hr. Then, cells stained with Hoechst and observed under fluorescence microscopy. (A), control cells. (B), cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C), cells treated with quercetin and (D), cells pretreated with quercetin before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

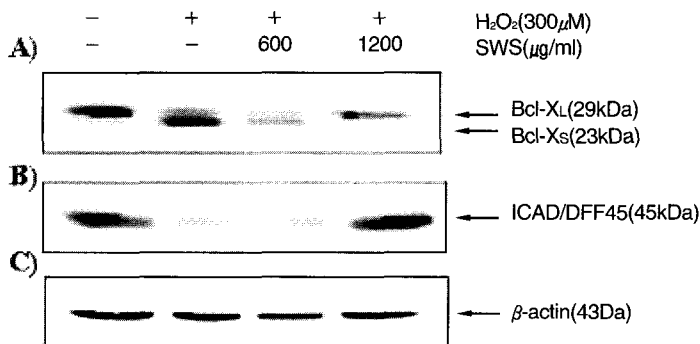
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포사멸의 특성을 알아보기 위하여 DNA 분절 현상을 Hoechst 염색을 통해 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리시 Neuro 2A 세포에서는 분절된 핵이 관찰되었으나(Fig. 5B), 石菖蒲遠志散 전처리에 의하여 대조군과 유사한 핵의 형태적 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 5D). 또한 石菖蒲遠志散 단독에 의한 세포핵의 형태적 변화는 관찰되지 않았으며(Fig. 5C), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포사멸이 핵의 분절을 동반하는 전형적인 세포고사임을 알 수 있었다.

#### 6. 石菖蒲遠志散이 Neuro 2A 세포에서 HO-1 단백질 발현에 미치는 영향

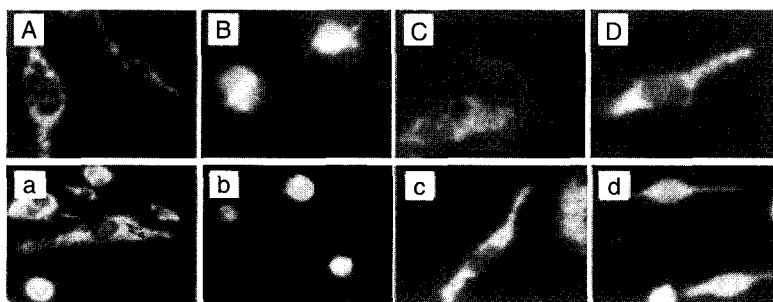
산화적 손상에 의해 세포내 발현이 증가되는 HO-1 단백질에 대한 石菖蒲遠志散의 효과를 Western blot 분석으로 조사하였다. Neuro 2A 세포의 HO-1 단백질 발현은 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 6시간 이후에 최대로 증가하였다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 6시간 이후에 발현이 증가 하였던 HO-1 단백질은 石菖蒲遠志散 600 및 1200 μg/ml를 30분 전처리한 실험군에서 石菖蒲遠志散의



**Fig. 6.** SWS suppressed the HO-1 expression induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Neuro 2A cells. Cells were treated with 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence and presence of SWS for 6 hr. Cell lysates were used to measure the HO-1 and  $\beta$ -actin expression by Western blot analysis with anti-HO-1 and  $\beta$ -actin antibodies.



**Fig. 7.** SWS inhibited the decrease in Bcl-X<sub>L</sub> expression as well as increase in Bcl-X<sub>s</sub> expression and SWS inhibited the degradation ICAD/DFF45 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated Neuro 2A cells. Cells were treated with 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence and presence of SWS for 8 hr. Cell lysates were used to measure the expression of their patterns by Western blotting with anti-Bcl-X<sub>L/s</sub>(A), ICAD(B) and  $\beta$ -actin (C) antibodies.



**Fig. 8.** SWS inhibited the disruption of mitochondrial membrane potential transition in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated Neuro 2A cells. Cells were treated with 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence and presence of 1200  $\mu$ g/ml SWS for 8 hr. Cells were stained with 10  $\mu$ g/ml of JC-1 (A, B, C and D,  $\times$ 50), 5  $\mu$ g/ml of Rhodamine 123 (a, b, c and d,  $\times$ 50) and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments. Control cells (A, a), 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B, b), 1200  $\mu$ g/ml SWS only (C, c) and 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with 1200  $\mu$ g/ml SWS treated Neuro 2A cells.

농도에 의존적으로 뚜렷하게 감소하였다. 이때 단백질은  $\beta$ -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 6)

7. 石菖蒲遠志散이 Neuro 2A 세포에서 Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>s</sub> 및 ICAD/DFF45 단백질 발현에 미치는 영향

세포고사 신호전달계에서 caspase-3의 활성화에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bcl-X<sub>L</sub>와 Bcl-X<sub>s</sub>의 발현을 조사하였다. Neuro 2A 세포에 600, 1200  $\mu$ g/ml 石菖蒲遠志散을 30분 전 처리한 후 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 세포 부유액으로부터 이들 단백질의 발현을 Western blot 분석으로 조사하였다. Neuro 2A 세포의 anti-apoptotic Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현은 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 6시간 처리시 대조군과 비교하여 현저히 감소하였으나 石菖蒲遠志散을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 7A). 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 pro-apoptotic Bcl-X<sub>s</sub> 단백질의 발현을 현저히 증가시켰으나 石菖蒲遠志散 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 7A). 또한 세포고사 신호전달계의 잘 알려진 effector 분자로서 caspase-3의 세포내 표적 분자인 ICAD/DFF45의 발현을 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(300  $\mu$ M)을 8시간 단독 처리시 ICAD/DFF45는 분해되어 이들 밴드가 사라진 형태로 나타났다. 그러나 600 및 1200  $\mu$ g/ml 石菖蒲遠志散을 전 처리한 실험군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 이들 효소의 분해가 억제되어 대조군 수준으로 ICAD/DFF45의 발현을 나타내었다(Fig. 7B) 이상의 결과는 石菖蒲遠志散이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포의 caspase-3 활성을 억제하는 효과가 있음을 시사한다. 이때  $\beta$ -actin 단백질 발현을 통해 동량임을 확인하였다(Fig. 7C).

8. 石菖蒲遠志散이 Neuro 2A 세포에서 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 Neuro 2A의 세포사멸은 caspase-3의 활성을 시사하고, 또한 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화는 미토콘드리아의 기능 변화 가능성을 간접적으로 시사하였다. 이에 미토콘드리아의 막

전위 변화(membrane potential transition; MPT)를 확인하기 위하여 JC-1 및 Rhodamine 123 형광염색을 시행하였다. 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 형태적인 변화와 함께 정상 대조군의 오렌지 형광이 녹색 형광으로 변화하였으나(Fig. 8B), 1200  $\mu$ g/ml 石菖蒲遠志散 전처리 실험군에서는 대조군 수준(Fig. 8A)의 오렌지 형광으로 회복되었다(Fig. 8D). 또한 Rhodamine 123 형광염색에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 형태적인 변화와 함께 정상 대조군의 녹색 형광이 diffused-pattern으로 변화되면서 세포질 전체에 균질하게 분포함을 확인하였으나, 1200  $\mu$ g/ml 石菖蒲遠志散을 전 처리한 실험군에서는 미토콘드리아가 세포질에 국한되어 염색되면서 대조군과 동일한 punctuated-pattern으로 회복되었으며, 1200  $\mu$ g/ml의 石菖蒲遠志散 단독 처리시에는 대조군과 유사한 조건을 보였다(Fig. 8).

考 察

痴呆는 의식이 淸明한 상태에서 전반적인 인지 기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성, 또는 진행성 뇌질환에 의해 발생되며, 記憶, 思考, 指南力, 理解, 計算, 學習, 言語, 判斷 등 다수의 고위대뇌기능에 장애가 나타나는 중후군이다<sup>12)</sup>. 痴呆는 뇌의 퇴행성 변화에 의한 알츠하이머형 치매와 뇌경색 등으로 유발된 뇌혈관성 치매, 그리고 양자가 혼합된 혼합형 치매가 많은 비율을 차지하고 있으며<sup>9)</sup>, 그 중에서도 알츠하이머형 치매의 비율이 높다. 전 세계적으로는 1700만에서 2500만명이 알츠하이머병 환자이고<sup>13)</sup>, 65세 이상의 치매환자에 있어서 가장 많은 원인이 알츠하이머병이며, 실제로 85세 이상의 인구 중 약 50%가 알츠하이머병인 것으로 알려져 있고, Evans 등의 연구에 의하면 65세 이상 인구의 유병률은 10.3%라고 한다<sup>14)</sup>.

알츠하이머병을 유발하는 원인으로서는  $\beta$ -amyloid, estroge, apolipoprotein E(Apo E), presenilin, oxidants (hydrogen, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질의 부족, 신경영양인자의 결핍 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져



있으며<sup>15)</sup>, 이 중  $\beta$ -amyloid의 침적으로 생기는 축색반(neuritic plaques)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축제(neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 발생하는 것이 대표적이므로 neuritic plaques와 NFTs는 알츠하이머병의 지표로 인식되고 있다<sup>16)</sup>.

Neuritic plaques는 노인반(senile plaque) 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며, 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가  $\beta$ -amyloid를 둘러싼 모양을 하고 있고, 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다. Neuritic plaques의 수는 질병의 심한 정도와 비례하므로 이 plaques에 대한 연구가 알츠하이머병 연구의 초점이 되고 있다<sup>17)</sup>.

뇌의 amyloid plaque 침적이 알츠하이머병의 주요 특징이지만 이것이 신경파괴의 원인인지 아니면 알츠하이머병에 의한 부산물인지는 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. Amyloid 침적은 약 40개의 아미노산으로 구성된  $\beta$ -amyloid가 응집한 결과물이며,  $\beta$ -amyloid는  $\beta$ -estrogen이나  $\gamma$ -secretase에 의해 큰 분자량의 amyloid precursor protein (APP) 일부가 잘라져서 생성되는데 이 단백질은 疏水性 殘期가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다. 따라서  $\beta$ -amyloid를 변화시키거나 APP가 잘라지는 부분을 변화시키고자 하는 치료법이 amyloid plaque 침적과 질병의 진행을 억제할 수 있을 것이다<sup>18)</sup>.

알츠하이머병은 유전자의 결합과도 관련 지어 생각해 볼 수 있다. 첫째, 다운 증후군 환자들의 뇌에도 amyloid 침전물이 있고, 실재로 St. George-Hyslop<sup>19)</sup> 등은 21번 염색체에 APP를 생산하는 유전자가 있는 것을 발견하였는데, 이것은 화학적으로  $\beta$ -amyloid로 변형된다. 둘째, Presenilin은 가족형 알츠하이머병을 일으키는 것으로 알려져 있는데, presenilin 1과 presenilin 2는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하며, 이 유전자의 돌연변이가 부發性 가족성 알츠하이머병의 70% 이상의 원인이 되는 것으로 보고되어 있다<sup>20)</sup>. 셋째, apolipoprotein E4가 65세 이후의 알츠하이머

병에 유전적으로 영향을 미친다고 하는데, Apo E 생성에 관계되는 유전자는 19번 염색체에 있으며, Apo E4가 많을수록 알츠하이머병의 발병 가능성이 높아지는 반면 Apo E2는 알츠하이머병의 발병을 억제하는 효과가 있다<sup>17)</sup>.

APP는 정상적으로 두개의 서로 다른 pathway에 의해 진행되는데<sup>21)</sup>, 즉  $\alpha$ -secretase에 의해  $\beta$ -amyloid domain 안쪽이 잘려지며, amino terminal이 세포밖으로 분비된다. 이렇게 잘려져 분비된 sAPP (secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고되었다<sup>22)</sup>. 한편, alternative processing pathway에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은  $\beta$ -secretase 등에 의해  $\beta$ -amyloid의 N terminal 주위가 잘라지며,  $\beta$ -amyloid sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 anchor되어 남는다<sup>23)</sup>. 이 C단 단백질 중 일부는  $\beta$ -amyloid 전체 sequence를 가지고 있으며,  $\gamma$ -secretase에 의해 잘려져  $\beta$ -amyloid를 형성하는 것으로 생각되며, 최근 C단 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한의학적으로 痴呆는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에 포함되며, 이들 병증에서 痴呆의 원인, 증상, 치법을 찾아볼 수 있다<sup>24)</sup>. 痴呆에 대한 최초의 한의학적 기록은 明代 張<sup>25)</sup>의 『景岳全書』 중 癡狂痴呆에 “痴呆症, …… 言辭顛倒, 舉動不經, 或汗多, 或善愁, 其症即天寄萬怪, 無所不止, 脈泌或弦或數, 或大或小, 變易不常 ……”이며, 清代의 陳<sup>26)</sup>은 서양의학의 痴呆의 개념과 유사한 개념으로 呆病에 대해 상세히 서술하고 있다. 또한 『黃帝內經』을 비롯하여 많은 역대의서에서도 痴呆나 呆病의 명칭은 없으나 健忘 등의 언급에서 유사한 증상을 제시하고 있다<sup>27)</sup>. 치매의 주요원인을 陳<sup>26)</sup>과 張<sup>28)</sup>은 痰으로 보았고, 治痰하는 약물을 사용하여 痴呆를 치료하였다. 鄭<sup>27)</sup> 등은 역대문헌적 고찰에서 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭<sup>28)</sup> 등은 年老氣衰, 久病, 或은 內風卒中, 外傷頭腦, 或은 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 응결되면 善忘, 痴呆 등의 증상을 일으킨다고 하였다. 이와 같이 뇌의 퇴행성 변화와 관련되어

있는 痴呆의 병인병기는 臟腑的으로는 肝腎不足이 중요하게 작용하고, 痰濁, 瘀血 등과 같은 병리적 산물들이 뇌에 정체됨으로 인해 각종 증상이 나타나는 것임을 알 수 있다<sup>30)</sup>. 痴呆의 변증은 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 髓海不足, 肝腎精虧, 脾腎陽虛로, 實證은 痰濁阻竅, 瘀血內阻, 心肝火盛으로 분류되며, 痴呆의 치법으로는 本虛를 치료하는 益髓填精, 補肝腎陰, 補脾腎陽과 標實을 치료하는 豁痰開竅, 活血化瘀, 清熱安神的 치법이 활용되고 있으며, 필요에 따라 두뇌를 활성화시켜 益智健腦시키는 遠志, 石菖蒲 등을 加味한다<sup>31)</sup>.

石菖蒲遠志散을 구성하는 약물의 효능과 약리작용을 살펴보면, 石菖蒲는 開竅시키는 약물로서 開竅醒神시키는 주요한 효능을 갖고 있어 熱로 인한 의식장애 및 뇌질환을 치료하는데 사용되는 대표적인 약물이다. 그 기원은 天南星科이며, 藥性은 微溫하고 味는 辛苦하다. 歸經은 心, 胃經이며, 化濕開胃, 開竅豁痰 및 醒神益智의 효능으로 濕阻痞滿, 噤口痢, 神昏, 癲狂, 健忘, 耳鳴, 耳聾 등의 병증에 응용한다<sup>2)</sup>. 石菖蒲의 약리작용은 중추신경억제작용으로는 鎮靜, 催眠, 抗痙攣, 鎮痛, 學習記憶促進, 體溫下降의 작용이 있고, 심장에 대한 작용으로는 심장 수축과 박동억제, 抗不整脈, 血壓降下, 血液循環改善의 작용이 있고, 호흡기계에 대한 작용으로는 止咳, 祛痰, 平喘의 작용이 있는 약물이며, 그 밖에 消化促進, 抗癌, 子宮收縮의 작용도 있는 것으로 보고되고 있다<sup>32)</sup>.

遠志는 遠志科에 속한 多年生 草本의 뿌리를 건조한 것으로서 그 歸經은 心, 腎經이며, 性味는 苦辛溫 등으로 분류되어 있고, 약효에 대해서는 『神農本草經·上品』에 “…… 補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”로 기재된 이후로 安神益智, 祛痰利竅 등의 효능으로 心神不安, 驚悸, 失眠, 心腎不交, 遺精滑精, 健忘 등의 병증에 응용한다<sup>2)</sup>. 遠志의 약리작용은 거담, 진정, 항경련, 자궁수축, 혈압강하, 용혈, 항균 등의 작용이 보고되고 있다<sup>33)</sup>.

이와 같이 石菖蒲遠志散은 遠志와 石菖蒲로 구성되어 있으며, 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 鬱結을 散하게 하여 뇌의 작용을 활발하게 하고 의식혼탁을 제거할 목적으로 널리 활용되고 있다<sup>2)</sup>.

따라서 본 연구에서는 石菖蒲遠志散의 항치매 효과를 究明하기 위하여 신경세포의 노화 과정에서 형성된 베타 아밀로이드가 세포내에 축적되어 일어나는 세포사멸 현상을 조사하고자 신경아종 세포 Neuro 2A에 베타 아밀로이드 펩타이드를 처리하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 여부를 관찰하였고, 이렇게 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸 기전과 세포독성을 방어할 수 있는 石菖蒲遠志散의 가능성을 조사하고자 하였다. 먼저 베타 아밀로이드 펩타이드는 신경아종 세포주 Neuro 2A 세포에 농도 의존적인 세포 독성을 보였으며, 이때 베타 아밀로이드에 의한 세포 독성은 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 의한 것임을 확인하였다. 이렇게 유발된 Neuro 2A 세포사멸에 대한 石菖蒲遠志散의 방어효과는 처리 농도에 의존적으로 세포독성을 억제하였다. 또한 石菖蒲遠志散은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(300 μM) 처리시 나타나는 특징적인 세포고사 현상의 세포막 수포화 현상을 억제하였다.

신체의 각 장기는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나, 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 장기는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체 방어작용이 일어난다. 대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 heme 단백질의 보결분자체인 heme을 담즙색소(biliverdin, bilirubin)와 일산화탄소와 환원철(Fe<sup>2+</sup>)로 분해하는 Heme Oxygenase(HO)를 들 수 있다<sup>34)</sup>. Heme Oxygenase는 최소 두가지의 isozyme(HO-1과 HO-2)이 보고되고 있다. HO-2는 구형형 효소이고, HO-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다. 본 연구에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리는 Neuro 2A 세포의 HO-1 단백질 발현을 증가시켰으나 石菖蒲遠志散 전처리는 베타 아밀로이드에 의한 HO-1 발현을 억제하였다.

세포고사를 조절하는 Bcl-2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크

계 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다<sup>35,36</sup>). 이중 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸만을 억제한다. 한편, Bcl-X<sub>S</sub> 단백질은 Bcl-X<sub>L</sub>과는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다<sup>37</sup>). 특히 Bcl-2 family 단백질은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있다. 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-X<sub>L</sub>을 과발현시켰을 경우 미토콘드리아 막전위 (MPT)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다<sup>38</sup>). 반대로 Bax나 Bcl-X<sub>S</sub> 단백질을 과발현 시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하고, 미토콘드리아 막탈전극을 유도한다<sup>39</sup>). 본 실험에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포사멸에서는 Bcl-X<sub>S</sub>의 발현을 증가시키고 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현을 감소시켰다. 또한 이러한 apoptogenic Bcl-X<sub>S</sub>의 발현 증가와 비교된 antiapoptotic Bcl-X<sub>L</sub>의 발현 감소가 초래되어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 세포사멸을 촉진하였을 것으로 생각된다. 石菖蒲遠志散은 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현 증가와 세포사멸촉진 단백질인 Bcl-X<sub>S</sub>의 발현 감소를 유도하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 세포독성을 방어하였다. 미토콘드리아의 intermembrane space에 존재하여 respiratory chain에서의 전자전달자의 역할을 수행하는<sup>40</sup>) cytochrome c는 세포고사 자극에 의하여 세포질로 방출되어 Apaf-1, dATP, procaspase-9과 복합체를 형성하여 caspase-9을 활성화 한다. 이러한 cytochrome c에 대하여 아직 명확히 밝혀져 있지 않았으나 Bcl-2 및 Bcl-X<sub>L</sub>은 방출을 억제하지만 Bax의 방출은 촉진한다고 알려져 있다<sup>38</sup>). 활성화된 caspase-9은 다음 단계의 caspase-3를 활성화 한다. 본 연구 결과에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 caspase-3의 세포내 표적 단백질인 ICAD/DFF45의 분해를 초래하였으며, 미토콘드리아 막 전위차 감소가 발생하여 기능 장애를 유도하였다. 이는 Bcl-2 단백질군의 발현 변화에 따른 미토콘드리아 기능장애에 의해 caspase가 활성화 되어 세포고사가 촉진된 것으로 생각된다. 이는 1960년대부터 보고되었던 알츠하이머형 치매에서 미토콘드리아의 구조 혹은 기능의 이상과 일치하였다. 石菖蒲遠志

散의 Neuro 2A 세포사멸 방어 효과는 미토콘드리아 막전위차 감소를 억제하는 현상과 유관함을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과를 종합하면 베타 아밀로이드에 의해 유도된 Neuro 2A 신경아종 세포의 사멸은 세포 내에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 형태적 변화를 동반한 세포막 수포화 현상, caspase-3의 활성화에 따른 ICAD/DFF45의 분해, Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현 감소, Bcl-X<sub>S</sub> 단백질의 발현 증가 및 미토콘드리아 막전위 감소를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 그러나 石菖蒲遠志散은 이러한 산화적 손상으로부터 세포막 수포화 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통해 Neuro 2A 세포를 방어하였다. 앞으로 2-D 전기영동 및 DNA microarray 등을 통해 새로운 표적인자들을 발굴하고 분석하여 산화적 손상에 의한 퇴행성 신경질환에서의 역할과 石菖蒲遠志散의 작용 표적인자 등에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 結 論

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 신경아종 세포의 산화적 손상에 대한 石菖蒲遠志散의 방어 효과를 究明하기 위하여 세포생존을 변화, 세포의 형태적 변화, HO-1, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub> 단백질의 발현, 미토콘드리아 막전위 변화 및 관련 단백질의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 石菖蒲遠志散은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Neuro 2A 신경아종 세포의 세포사멸을 농도 의존적으로 감소시켰다.
2. 石菖蒲遠志散은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포막 수포화 현상을 감소시켰다.
3. 石菖蒲遠志散은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HO-1 단백질의 발현 증가를 억제하였다.
4. 石菖蒲遠志散은 proapoptotic Bcl-X<sub>S</sub>의 발현 감소, antiapoptotic Bcl-X<sub>L</sub>의 발현을 증가시켰으며, 미토콘드리아 막전위 감소를 억제하였다.
5. 石菖蒲遠志散은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ICAD/DFF45의 분

해를 억제하였다.

이상의 결과로 보아 石菖蒲遠志散은 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상으로부터 Neuro 2A 신경아중 세포를 방어하는 효과를 나타냈으므로 알츠하이머병 등의 퇴행성 신경질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 參 考 文 獻

1. 元德必 編著. 國譯韓醫學大系(13·東醫四象新編), 서울:海東醫學社. 1999:208.
2. 신민교 編著. 臨床本草學. 서울:永林社. 1997:604-606, 646-647.
3. 이부영 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:일조각. 1994:63-66.
4. 서순규. 성인병. 노인의학. 서울:고려의학. 1992:225-228.
5. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:199-210.
6. 金知赫, 黃義完. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:26-21, 327-330.
7. 대한신경정신의학회 편. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1997:211-220.
8. 최혁. pCT105로 유도된 치매모델에서 石菖蒲 水抽出液이 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2002.
9. 김광호. 원지석창포산이 Chronic Mild Stress 처치 흰쥐의 우울과 학습장애에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2001.
10. 이성률. 원지와 석창포 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 원광대학교 대학원. 2002.
11. 강영록. 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1997.
12. 배영철 외. 노인의학. 서울:고려의학. 1996:193-209.
13. Lucilla Pametti, Umberto Senin, Patrizia Mecocci. Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. Drug. 1997;53(5):752-768.
14. 최용덕 외. 치매의 병리에 대한 동서의학적 고찰, 대

한동의병리학회지. 1999;13(1):36-46.

15. Mattson MP, Chan SL, Camandola S. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune system. Bioessays. 2001;23(8):733-44.
16. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat. Genet.. 1995;11(2):219-222.
17. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease in Pharmacotherapy ; a pathophysiologic approach. Dipro J. T . et al Ed, New York, Elsevier Science Publishing Co. Inc. 1996; 1325-1344.
18. Soriano S, Lu DC, Chandra S, Pietrzik CU, Koo EH. The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases. Biol. Chem.. 2001; 276(31):29045-50.
19. St. George-Hyslop, Tanzi RE, Polinsky RJ et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. Science. 1987;235:885-890.
20. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci.. 1991;88:7247-7251.
21. Checler. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. J. Neurochem.. 1995;65(4):1431-1444.
22. 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):2087-2096.
23. Shoji M, Glode TE, Ghiso J et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. Science. 1992;258(5079):126-129.
24. 陳琿 外. 實用中醫腦病學, 北京:學苑出版社. 1993: 242-21, 784-791.
25. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰林社. 1978:610-611.

26. 홍원식 譯. 國譯石室秘錄. 서울:서원당. 1984:102.
27. 정인철 외. 치매에 대한 문헌적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):77-94.
28. 張覺人. 呆從痰治. 上海中醫藥雜誌. 1995;3:20-21.
29. 郭宇鵬 外. 謝海洲治療腦萎縮經驗. 中醫雜誌. 1997;38(10):586-587.
30. 김이화 外. 치매치료의 최근 연구동향에 관한 고찰. 대한침구학회지. 1997;14(2):115-126.
31. 전국한의과대학 심계내과학교실 편. 심계내과학. 서울:서원당. 1999:481-485.
32. 鄭虎占 外. 中藥現代研究與應用(第2卷). 北京:學苑出版社. 1997:1356-1370.
33. 鄭虎占 外. 中藥現代研究與應用(第3卷). 北京:學苑出版社. 1997:2121-2131.
34. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, Van Den Engel S, Mol WM, Weimar W, Baan CC. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14(12):3278-87.
35. Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-1911.
36. Vander Heiden MG, and Thompson CB. Bcl-2 proteins inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* 1999;1:E209-E216.
37. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med.* 1998;6:614-620.
38. Trauth BC, Klas C, Peters A. MJ, Matzuku S, Moller P, Falk W, Debatin KM and Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989;245:301-305.
39. Heibein JA, Barry M, Motyka B, Bleackley RC. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and cytochrome c release are caspase independent. *J. Immunology.* 1999;163(9):4683-4693.
40. Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89:783-789.