

동의신경정신과 학회지

J. of Oriental Neuropsychiatry

Vol. 13. No. 2, 2002

pCT105로 유도된 치매모델에서 石菖蒲 水抽出液이 미치는 영향

최 혁, 김상호, 이대용*, 안대중**, 강형원, 류영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실 원광대학교 한의과대학 한방내과학교실, 중화한방병원**

The effects of Rhizoma Acori Graminei water extract in Alzheimer's Disease Model induced by pCT105

Hyuk Choi, Sang Ho Kim, Dae yong Lee*, Dae Joong Ahn**, Won Hyung Kang, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University*

Joonghwa Hospital of oriental medicine**

ABSTRACT

Alzheimer's disease(AD) is a geriatric dementia that is widespread in old age. In the future AD will be the largest problem in public health service. From old times, Much medicines have been used for treatment of dementia, but there is no medicine having obvious effect.

AD is one of brain retrogression disease. So We studied on herbal medicine that have a relation of brain retrogression. From old times, In Oriental Medicine, Rhizoma Acori Graminei has been used for disease in relation to brain retrogression.

We studied on the effects of anti-Alzheimer in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by Rhizoma Acori Graminei extract

As the result of this study, In 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 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 : Rhizoma Acori Graminei, Alzheimer's disease. beta-amyloid precursor protein, carboxyl-terminal 105(CT105), senile plaqu

I. 緒 論

痴呆는 보통 腦의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 腦 증후군(syndrome)이며, 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 대뇌질환으로, 腦 안에 신경반(neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되어지며 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되지는 병리학적 특징을 가진다²⁻⁴⁾.

AD의 대표적인 원인설로는 현재까지 amyloid β protein (이하 A β)이 중요한 원인적 인자로 알려져 있는데⁵⁻⁷⁾, A β 는 큰 분자량의 amyloid precursor protein (APP) 일부가 잘라져서 생성된 것으로^{3, 8, 9)}, APP가 어떤 효소에 의해서, 어떤 대사과정에 의해서 잘라져서 A β 를 만들어 내는지는 아직 명백하지는 않지만, APP의 대뇌침착은 AD시 가장 처음 나타나는 특징적인 병리학적 소견으로 알려져 있었다¹⁰⁻¹³⁾.

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, 이하 CT105)이 PC12 cells¹⁴⁾, primary cortical neurons¹⁵⁾, Xenopus oocytes^{16, 17)}, Purkinje cells¹⁸⁾ 등의 신경세포와, 형질환 동물모델^{19, 20)}에서 신경독성을 발휘하며, 또한 APP transfection하여 과발현시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것이 보고되었다²¹⁾. 또한 CT105는 Calcium homeostasis를 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다^{22, 23)} 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

이어서 최 등²⁴⁾은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH(Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등²⁵⁾은 C단 단백질

이 신경교세포의 활성화로 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하는 등 CT105와 AD와의 관련성뿐만 아니라 치료제 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다^{12, 22)}.

石菖蒲는 《神農本草經》²⁶⁾에 처음 수록된 약물로서, 開竅醒神시키는 주요한 효능을 갖는 開竅藥物로, 熱로 인한 의식장애 및 뇌질환에 활용하는 대표적인 약물이다²⁷⁾.

최근 韓醫學에서도 치매에 대한 연구가 문헌적^{28, 29)}, 임상적³⁰⁻³³⁾ 외에 관련 원인설에 기초를 둔 실험적 연구가 다양하게 진행되고 있다. 단일약물³⁴⁾ 및 복합처방³⁵⁾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³⁶⁾, 그리고 중추신경계의 항염증작용에 관한 연구¹⁰⁾를 보고한 적이 있으며, 최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다발현에 대한 연구^{37, 38)}와 β APP 과발현에서의 신경세포사 억제작용에 관한 연구³⁹⁾에까지 이르렀으나, 아직 한약 추출물로 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고 되지 않았다.

이에 著者は 뇌질환에 효과가 있을 것으로 사료되는 石菖蒲 水추출액을 이용하여 항치매 효과를 규명하기 위하여 APP의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 石菖蒲의 水추출액을 반응시켜 봄으로써 항치매 억제 및 신경재생효과에 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 試藥

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovin 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 調製

石菖蒲 水추출물 조제 : 본 實驗에 使用한 石菖蒲 1.5kg을 원광대 군포한방병원에서 엄선하여 세말한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 조제한 石菖蒲 水추출물(이하 RAG)을 동결 건조한 250g을 사용전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 實驗方法

1) pCT 105 플라스미드의 제작

본 실험에 사용된 pCT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital의 Center for Neurologic Diseases 소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양 받은 치매 유발 유전자 APP695로부터 Fig. 1에서 처럼 포유동물세포주인 SK-N-SH 내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여, 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질전환시켜 이 플라스미드를 추출하여

BamHI/HindIII의 제한효소를 처리하여 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamHI/HindIII에 삽입하여 cloning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 pCT105 플라스미드를 분리하여 본 실험에 사용하였다.

2) pCT 105 형질조합 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양 받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask 내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105의 플라스미드를 본 실험에 사용할 세포주를 구축하기 위해 미리 103 세포를 6-well plate에 분주하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 반응액 A으로 pCT105 2μg와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100μl을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10μl와 SFM 100μl을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한다음 6시간정도 37℃, 5% CO2 incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450μg/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

3) 세포 형태학적 관찰

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

4) DNA fragmentation 억제효과 측정

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 RAG 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하여 DNA fragmentation를 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μl 를 첨가한 후 30min간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가하고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합후 상기와 같이 15,000rpm에서 15분간 원심분리한다. 상등액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase(50 $\mu\text{g/ml}$)가 함유한 dH₂O 35 μl 를 첨가하여 녹인 후 이 용액을 1.5% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사한다.

5) CT105 세포주의 NO 생성도 측정

CT 105 세포주내의 NO (nitric oxide)의 생성도를 측정하기 위해 103세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 RAG군에 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 5시간 처리한 후 상등액 100 μl 을 따서 96-well에 옮기고 Greiss reagent용액 50 μl 를 첨가하고 실온에서 반응을 시킨 다음 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150 μM sodium nitrite를 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

6) neurite outgrowth의 길이 측정

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50ng/ml이 되게 하여 첨가하고 5시간동안 자극을 가한 다음 약물군의 무혈청 내지 RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth length를 현미경하에서 관찰하여 정상군과 상호 비교하여 neurite length score를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 통계 처리하였다.

7) 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 RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 가한 다음 5시간후에 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNazol 용액을 200 μl 를 첨가한 다음 chloroform 50 μl 를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 μl 을 넣고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 μl 에 10 mM dNTP 5 μl , 25mM MgCl₂ 6 μl , 10x RNA PCR buffer 5 μl , RNase inhibitor 1 μl , AMV-Optimized Taq 1 μl , AMV reverse Transcriptase XL 1 μl , 20 pM specific primer (sense/ antisense) 1 μl , RNase free dH₂O 26 μl 을 첨가하여 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 역전사 반응을 실시하고, 92 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하였는데 반응조건은 92 $^{\circ}\text{C}$ 2min, 92 $^{\circ}\text{C}$ 60sec, 54 $^{\circ}\text{C}$ 60sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60sec에서 35 cycles를 진행시켜 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 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'- agtgatgaccatccttttc -3'	56	30	320
	reverse 5'- ctaatacctgtcacacg -3'			
APP	uper 5'- aggtctagaatgctgccgg -3'	55	35	280
	reverse 5'- ataggcccctagtctgcat -3'			
cdc42	uper 5'- gatacgtgtgacgtccaga -3'	57	35	300
	reverse 5'- aatatgtaccgactgttt -3'			
iNOS	uper 5'- gataggcttctgtttgtt -3'	54	30	340
	reverse 5'- gaggggtgaattccaga -3'			
calpain	uper 5'- taaactataaccactagc -3'	55	35	289
	reverse 5'- tctatatggaacacggga -3'			
kinesin	uper 5'- taaactataaccactagc -3'	54	35	250
	reverse 5'- tctatatggaacacggga -3'			
β-actin	uper 5'- ccaaggccaaccgccgc -3'	54	35	450
	reverse 5'- aggggtacatggtgccgcc -3'			

8) 형광현미경 분석

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 slide glass위에 laminin coated 된 slide round cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 RAG 5, 10, 15, 25 μg/ml농도가 되도록 가한 다음 5시간 후에 세포사를 유도하는지 조사하기 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) 5μl를 떨어뜨려서 37°C에서 1시간 유지하고 증류수로 3회 세척

한 다음 blocking 용액인 0.5% BSA를 50μl정도 첨가하여 실온에서 10분간 정치하여 놓는 다음 avidine-FITC용액 50μl첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척한 다음 slide glass 위에 mounting 용액을 약간 떨어뜨리고 덮어놓고 형광현미경하에서 관찰한다. acridine orange 시약 1μg/ml로 세포사가 유도시 핵용축이 일어날 경우에 염색을 하면 응축성 염색질에 오렌지색 내지 적색으로 염색유무를 판정하여 세포사를 확인하였다.

9) 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, 2mM dithiothreitol, 10mM MgCl₂)로 처리하여 그 추출액 30 μ g을 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, GSK3 β , 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.

10) 통계처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 成績

1. CT105 과발현 세포주에 의한 시간별 CT105 발현 변화

치매는 신경세포가 어떤 원인으로 세포사가 발생하기 때문에 일어나는 신경계의 퇴행화의 일부 분으로 보통 신경세포의 세포사는 운동신경 및 감각신경의 장애를 초래하는데, 치매에 의한 신경세포의 세포사는 곧 언어장애와 운동장애로 심각한 생활에 장애를 초래한다. 따라서 신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 CT105의 발현을 FITC형광체로 확인한 결과 12시간부터 발현이 진행되어 48시간 시점에 가장 발현정도가 강하였다(Fig. 1).

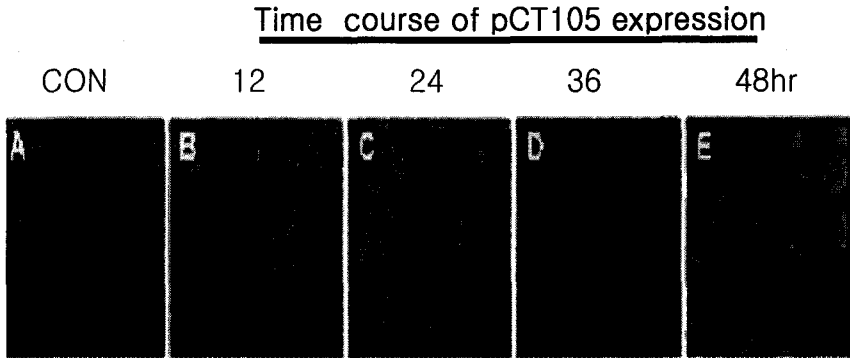


Fig. 1. Photomicrographs of apoptosis after CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Fresh cells resuspended in RPMI medium were incubated with prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by fluorescence microscopy.

2. CT105 발현에 의해 신경세포의 형태학적 변화

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰한 결과 Fig. 2에서처럼 RAG 농도 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리시 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면(Fig. 2A), CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실된 양상으로 나타내었으며(Fig. 2B), 이에 반해 RAG 처

리군은 신경세포가 잘 성장하는 것과 신경돌기가 보호받은 것으로 사료되어지며(Fig. 2C), 한편 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105가 발현됨을 의미하고 (Fig. 2E), RAG 처리 경우 세포 수가 증가하면서 신경돌기도 잘 분지되는 것을 보아 CT105의 발현량이 억제된 결과로 사료된다(Fig. 2F). 이 결과로 볼 때 RAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하여 신경세포의 세포사의 보호를 유도하리라 사료되어진다 (Fig. 2).

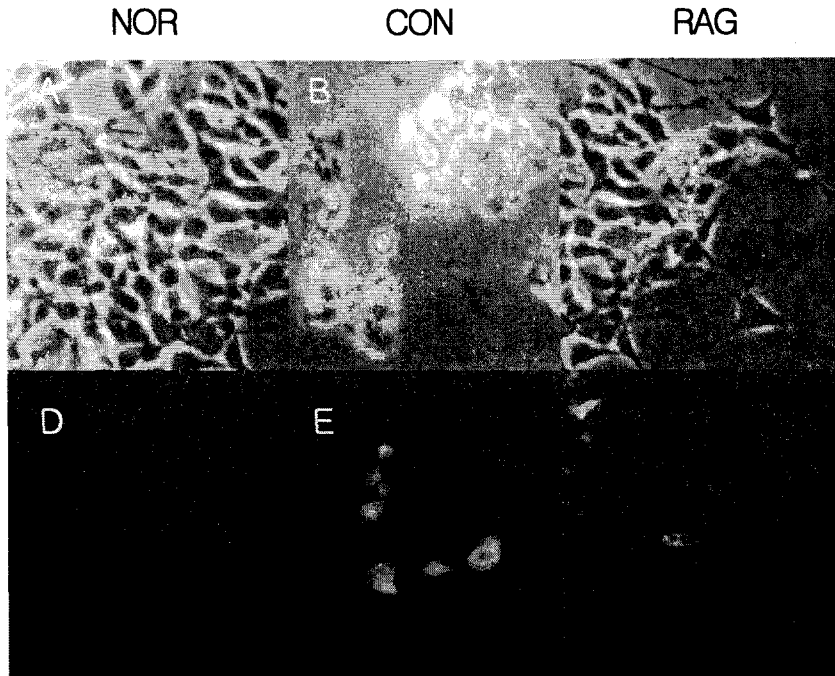


Fig. 2. Phase-contrast microphotographs of CT 105 expressing cells by RAG. Cells were incubated in 5% FBS with RPMI medium. Cells were observed after treat with RAG. Morphological characteristic of apoptosis induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Apoptotic cells were indicated by the arrows. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy.

3. RAG가 CT105 발현에 의한 신경세포에 미치는 영향

β APP의 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사는 형태학적 변화뿐만 아니라 CT105가 caspase-3과의 관계를 규명하기 위해 세포사의 표식자인 caspase-3 발현 유무를 확인하므로 입증 가능한 방법인 TUNEL assay로 조사한 결과, Fig. 3에서처럼 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 아무런 변화가 없는 상태인 반면(Fig. 3A), 대조군 경우에는 CT105의 발현으로 인한 강한 적색 내지 노랑색의 형광체를 나타내고 있다(Fig. 3B). RAG처리 경우 형광신호가 거의 감소한 상태로 나타냄으로 CT105의 발현이 억제됨을 시사해 주고 있다(Fig. 3C). 마찬가지로 caspase-3의 발현은 정상군에서는 아무런 반응이 없는 반면(Fig. 3D), 대조군에서는 CT105에 의해 caspase-3 단백질 발현으로 강한 형광신호를 나타내었으며(Fig. 3E), RAG 처리군에서는 거의 소멸된 상태를 나타내거나 녹색형광의 반응을 나타내고 있다(Fig. 3F). 한편 살아 있는 세포에서만 녹색 내지 무색

으로 염색되고 세포사가 일어난 세포 경우에는 적색 내지 오렌지색으로 염색되는 acridine orange 염색시약 (1 μ g/ml)으로 염색시 Fig. 4에서처럼 살아있는 세포에서는 녹색 내지 무색으로 (Fig. 4A), CT105로 인한 세포사가 유도된 세포에는 적색으로 염색되었으며(Fig. 4B), CT105로 발현된 세포에 RAG로 처리한 상태에서 염색시 녹색으로 보이는 세포가 존재한다는 것은 RAG로 세포사가 억제되고 정상적인 신경세포가 증가된다는 것을 시사해 주고 있다고 사료된다(Fig. 4C).

Fig. 5에서처럼 상대적으로 CT105가 발현된 신경세포에서의 세포사를 현미경하에서 관찰하여 세포사의 비율을 조사해 본 결과, CT105만이 발현된 세포인 대조군은 약 90 \pm 0.5%였으며 RAG 25 μ g/ml농도에서는 약 5 \pm 1.5%였는데, 본 연구에는 상기 결과와 관련해서 CT105의 세포사를 유도하는 것을 억제시키는 농도로 약 RAG 10 μ g/ml하여 사용하였다. 따라서 본 RAG가 β APP의 CT105로 인한 신경세포의 세포사를 억제하고 보호할 가능성을 시사해 주고 있다.

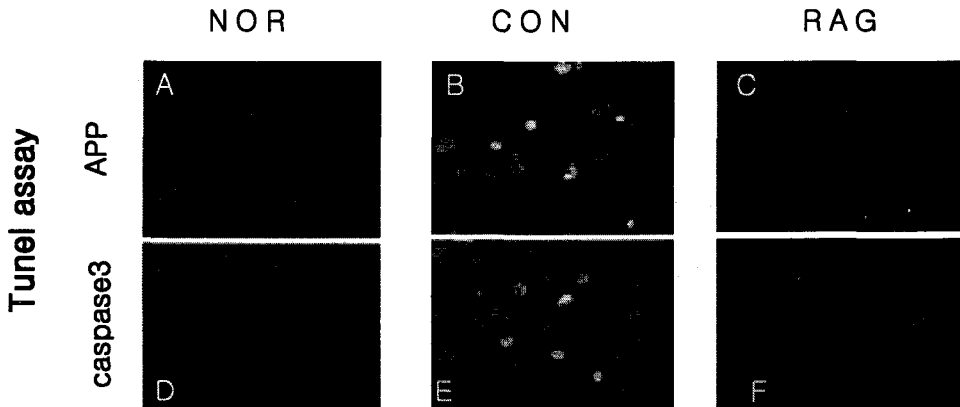


Fig. 3. Fluorescence Micrograph of FITC-avidine staining of TUNEL assay. Fresh cells resuspended in RPMI medium were incubated with, prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by fluorescence microscopy. The Texas-Red-avidine fluorescence was observed in regions adjacent to the nucleus and Fluorescence images and simultaneously obtained transmission images of the cells labeled with Red.

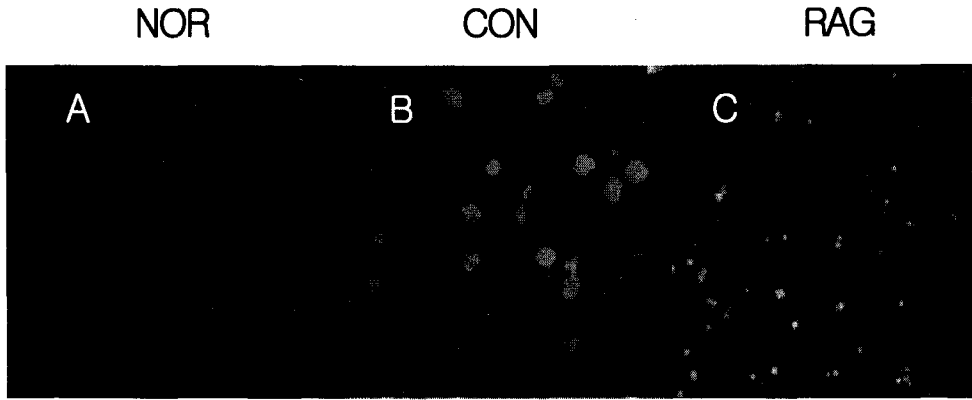


Fig. 4. Labeling of CT105 expressing cells with acridine orange. Overlay images of the red-orange fluorescence in nucleus. Green represent a transmission image corresponding to the cell survival. The orange image represent an overlay image of the acridine orange fluorescence in a early apoptotic cells.

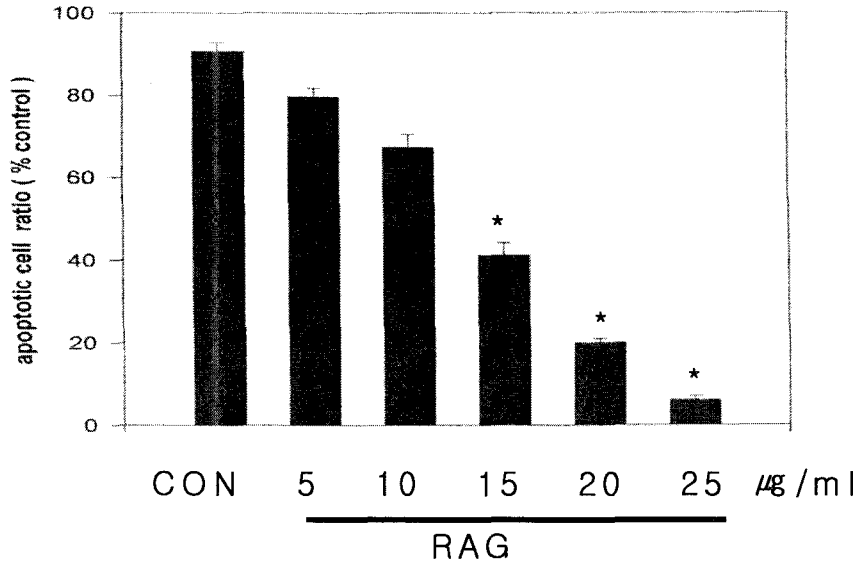


Fig. 5. Apoptotic effects of RAG. The apoptotic cell ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by Morphological characteristic of apoptotic cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy.

4. RAG가 CT105에 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 RAG를 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 해서 6 well에 105 cell수로 분주하여 하룻밤 배

양한 βAPP 의 CT105발현 세포에 첨가하여 세포사를 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과 Fig. 6에서처럼 대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 RAG 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상처리에서부터 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보임으로 해서 RAG가 βAPP 의 CT105발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료되어진다.

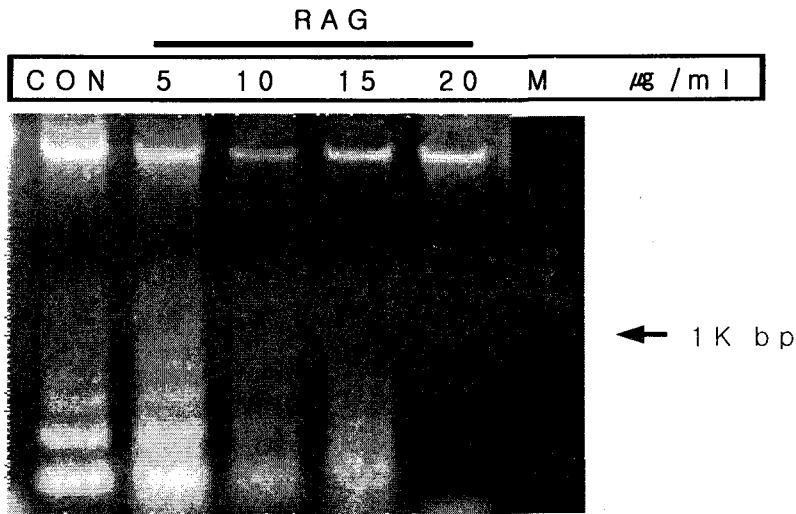


Fig. 6. Effects of RAG on DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. M, DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 5, 10 and 25 $\mu\text{g/ml}$ RAG for 12 h. Cells were incubated for 12hrs necessary to initiate DNA fragmentation. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

5. RAG가 CT105 발현으로 인한 NO생성도에 미치는 영향

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 RAG가 CT105세포주의 NO생성을 억제하는지 조사하였는데, Table. 2에서처럼 정상군에서는

3.0±0.82 μM이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 90.2±3.9 μM인데 반해 RAG 5, 10, 15, 25 μg/ml농도로 처리시, 각각 약 53.3±1.8, 35.3±3.4, 25.6±2.4, 16.3±2.9 μM정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 RAG가 관여하리라 사료된다(Table. 2).

Table 2. NO formation in pCT105 cell lines

samples	NO formation ratio (μM/well)
NOR	3.0 ± 0.82
CON	90.2 ± 3.9 *
ACO GU 5	53.3 ± 1.8
10	35.3 ± 3.4 **
15	25.6 ± 2.4
25	16.3 ± 2.9

Values represents the means ± S.D of performed experiments in triplicants wells ver control.

* : p<0.05, **: p<0.005

6. RAG가 neurite outgrowth 성장에 미치는 영향

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 주기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 Fig. 7에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나(Fig. 7A), CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 성장이 억제되는 상태로 나타내고 있으며(Fig. 7B), RAG 5, 25 μg/ml로 처리시 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여 주고 있다(Fig. 7C, D). 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과, Fig.

8에서처럼 대조군을 0.85±0.5로 환산시 정상군은 4.85±1.5이고 RAG의 농도를 5, 10, 15, 25 μg/ml로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.25±0.5, 2.55±4.5, 2.95±2.5, 4.25±0.5의 수치를 보였는데, RAG의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 길이를 감소시켜서 신경기능을 상실하게 되는데 아마도 RAG가 이런 현상을 억제시키는 신경기능의 유효 성분을 함유할 것으로 사료된다.

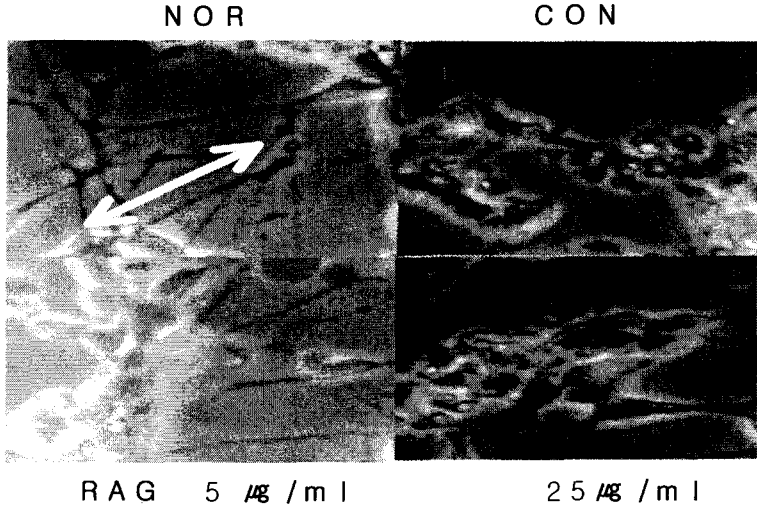


Fig. 7. RAG induces neurite outgrowth. CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RAG. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope.

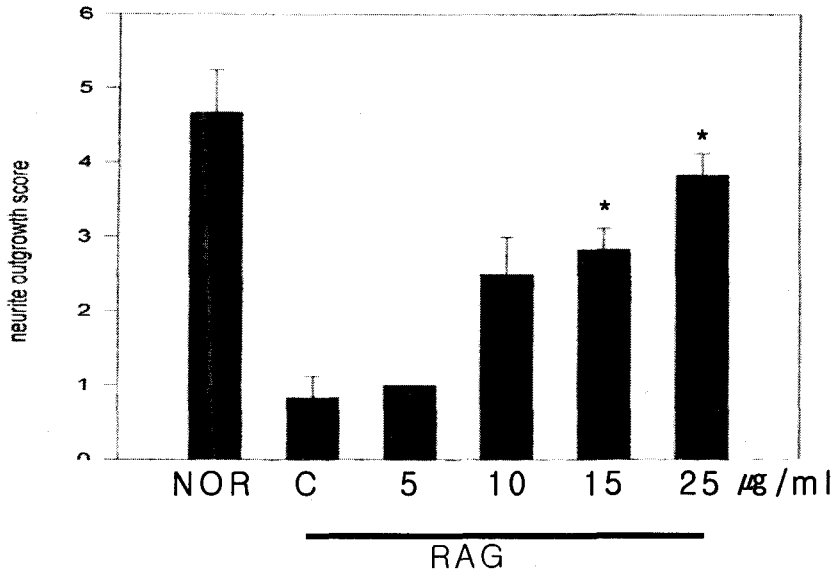


Fig. 8. RAG induces neurite outgrowth length. CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RAG. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means±S.D from 200 determination cells. Those values significantly different from control are indicated ($p < 0.05$, students two-tailed t test)

7. RAG가 CT105로 인한 mRNA발현에 미치는 영향

RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 β APP의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 RAG 5, 10, 15, 25 μ g/ml 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 9에서처럼 신경돌기의 신장에 중요한 인자인 BDNF mRNA 발현 경우 10 μ g/ml에서 발현이 유도되고 세포사에서 발현되는 caspase-3 mRNA의 발현은 15 μ g

/ml이상에서 발현이 억제됨을 알 수 있었다.

한편 Fig. 10에서처럼 iNOS mRNA발현은 10 μ g/ml이상에서 감소되는데, 이는 Table. 2와 유사한 결과이었으며 신경세포의 세포사에 관여하는 APP의 CT105 mRNA발현은 5 μ g/ml이상에서부터 발현이 억제되었고 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 보호기능을 조절하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다.

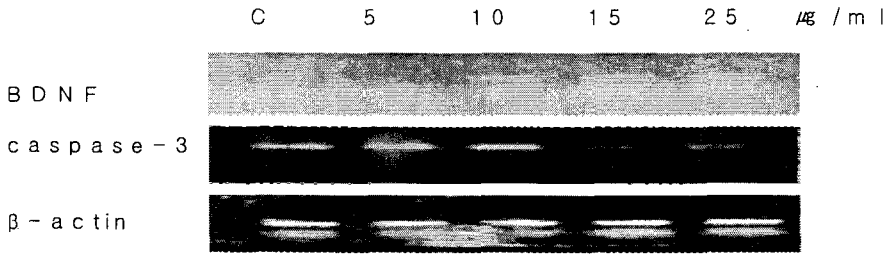


Fig 9. RT-PCR analysis of total RNA from in the CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by RAG. Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovin serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific primer. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without RAG treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

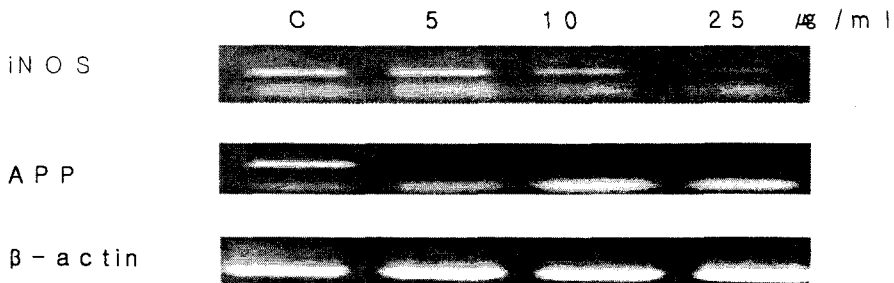


Fig. 10. RT-PCR analysis of total RNA from in the CT105 overexpressed SK-N-SH cell lines neuroblastoma by RAG. Subconfluent cells were cultured in RPMI medium fetal bovin serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific primer. Total RNA extracted from neuroblastoma cells were used as without RAG treatment controls. β -actin mRNA for standard transcript was used as control.

8. RAG가 CT105 발현에 의한 단백질 발현에 미치는 영향

βAPP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAG 5, 10, 15, 25 μg/ml 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 11에서처럼 APP의 발현은 10μg/ml농도이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen syntase kinase(GSK3β)는 10μg/ml이상에서 유도되고, caspase-3의 발현은 5μg/ml이상에서부터 감소하는 경향을 보였다. 한편 Fig. 12에서처럼 iNOS 단백질 발현은 15μg/ml이상에서 감소되는데, 이는 Table. 2와 유사한 결과

이었으며 신경세포의 생존에 관여하는 p42/44 단백질의 발현은 10μg/ml에서부터 발현이 강하게 증가되었고 마찬가지로 MAPK단백질 역시 5μg/ml이상에서부터 발현이 증가되었다. 신경세포의 단백질 발현에서처럼 본 약물은 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다(Fig. 12). 따라서 RAG처리군은 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 RAG에 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 βAPP의 CT105에 의한 신경세포의 세포사를 유의성 있게 억제하므로 치매치료에 적용될 수 있으리라 사료되어진다.

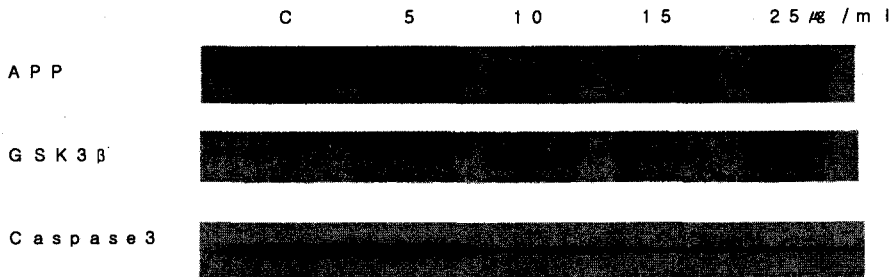


Fig. 11. Influence of RAG extract on APP and caspase-3 expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for APP, GSK3β and casapase 3 and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

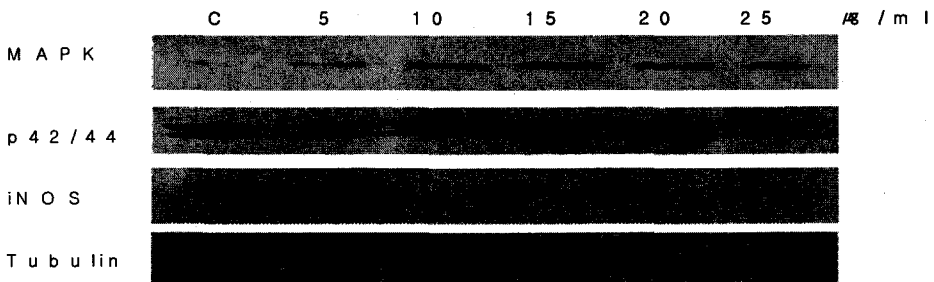


Fig. 12. Influence of RAG extract on APP and caspase-3 expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for iNOS, p42/44 and MAPK and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

IV. 考 察

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 노화로 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⁾

AD를 유발하는 원인으로는 A β , estrogen, apolipoprotein E(Apo E), presenilin, Oxidants (hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며⁴⁰⁻⁴⁴⁾, 이 중 A β 의 침적으로 생기는 축색반 (neuritic plaques)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우 (Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체 (neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경 퇴행이 생기는 것이 대표적이므로^{3, 4, 45)} NFTs와 neuritic plaques는 AD의 지표로 인식되고 있다. Neuritic plaques는 노인반(senile plaque) 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 A β 를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포 (glial cell)와 얽히게 된다. Neuritic plaques의 수는 질병의 심한 정도와 비례하므로 이 plaques에 대한 연구가 AD연구의 초점이 되고 있다⁴⁶⁾.

Amyloid 침적은 약 40개의 아미노산으로 구성된 A β 이 응집한 결과물이며 A β 는 β -secretase나 γ -secretase에 의해 큰 分子量의 amyloid precursor protein (APP) 일부가 잘라져서 생성되는데, 이 단백질은 疏水性 殘期가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 構成되어 있어 스스로 凝集하는 性質을 가지고 있다. 따라서 A β 을 변화시키거나 APP가 잘라지는 부분을 변화시키고자 하는 치료법이 amyloid palque 침적과 질병의 진행을 抑制할 수 있을 것이다¹¹⁾.

APP는 21번 chromosome 의 single gene에 encord되어 있으며⁴⁷⁾ 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자도 조기치매 현상을 나타내며 30대

와 40대에 이르러 알츠하이머병 환자의 腦에서 발견되는 똑같은 신경섬유다발과 신경반이 생긴다. 이러한 병변은 유전자 수가 증가한 효과에 의한 APP의 과도생성 때문에 일어난다고 추측되고 있다^{48, 49)}.

또한 Presenilin은 465개의 A.A를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형 AD를 일으키는 것으로 알려져 있다⁵⁰⁾. presenilin 1(PS1)과 presenilin 2(PS2)는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하며, 이 유전자의 다양한 돌연변이가 早發性, 가족성 알츠하이머병의 70%이상의 원인이 되는 것으로 보고되어⁵¹⁾ presenilin 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 presenilin 대사물이 APP의 형성을 촉진하여 A β 의 양을 증가시키는 것으로 생각하고 있다⁵²⁾.

또한 최근의 연구 결과에 따르면 apolipoprotein E4가 65세 이후의 AD에 유전적으로 영향을 미친다고 한다^{40, 46)}. Apo E생성에 관계되는 유전자는 19번 염색체에 있으며 Apo E2, Apo E3, Apo E4의 세 가지 주요 아형(subtype)이 존재한다. 이 중 Apo E3가 가장 흔하며 E2와 E4는 많지 않다. Apo E4가 많을수록 AD발병 가능성이 높아지는 반면 Apo E2는 AD발병을 抑制하는 효과가 있다⁴⁶⁾.

이상에서 보듯이 21번, 14번, 1번, 19번 염색체에 유전자 결합이 발견되어 AD의 유전적 특징은 여러 가지 원인의 영향을 받는 것으로 나타났는데⁵³⁾, 아마도 APP 유전자에 결합이 있으면 A β 가 과잉 생산되어 AD와 관련된 腦손상을 일으키는 것 같다^{11, 13, 42)}.

그 외도 염증매개물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는데 이는 amyloid plaque가 생성된 주변에 IL-1, IL-6, complement 등 염증매개물질들이 증가되어 있는 것으로부터 알 수 있다^{46, 49)}.

이와 같이 痴呆의 원인은 여러 가설이 있으나 AD시 나타나는 특징적인 병리학적 소견으로는, APP가 대뇌에 침착되는 것이 가장 먼저 나타난다고 알려져 있다⁵⁴⁾. 결국은 A β 원인설에서 시작하여 현재까지 대두되고 있는 어떤 인자와 결부되어 진행되는나가 중요시되고 있으며 무엇보다

도 α , β , γ -secretase에 의해 최종적인 산물이 결국은 신경세포의 細胞死를 誘導하기 때문에 간이나 腦조직에서 ApoE4의 돌연변이로 인한 산물이 β APP의 원시물질에서 β APP의 과발현시키는 단계로 진행되고 동시에 α , β , γ -secretase에 의해 최종산물이 생성되어 신경독성을 야기하여 細胞死를 誘導하는 데¹¹⁻¹³, 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 cells¹⁴, primary cortical neurons¹⁵, Xenopus oocytes^{16, 17}, Purkinje cells¹⁸ 등의 진핵세포와, 형질환 동물모델^{19, 20}에서 신경독성을 발휘하며, 또한 APP transfection하여 과발현시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것이 보고 되었다²¹. 또한 CT105는 Calcium homeostasis를 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다고 하여^{22, 23} 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

최근 C단 단백질에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons^{14, 15}에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, Xenopus oocytes^{16, 17}과 Purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고 하였다⁵⁵. 또한 CT105는 Calcium homeostasis에도 악영향을 미치는데, Rat brain microsome에서는 Mg²⁺-Ca²⁺ ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는 Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로써 calcium homeostasis를 손상시키지만, A β 는 그렇지 않다고 하여^{22, 23} 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

또한 가장 최근에 최 등²⁴은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등²⁵은 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로

caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 더욱 증명해주고 있다^{12, 22}.

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 관련 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있다. 李⁵⁶는 침구자극이 치매와 연관된 melatonin 분비와 Super Oxide Dismutase(SOD) 합성에 미치는 영향에 대한 보고에서 침구자극이 melatonin 분비와 SOD 합성에 영향을 주어 AD 치료에 도움이 되는 치료방법임을 확인한바 있고, 백 등³⁴이 녹차 등의 단일약물을, 복합처방에 대한 연구는 정³⁵이 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, 황³⁶은 麝香蘇合元을 가지고 白鼠의 記憶과 行動에 미치는 영향을 研究하였으며, 염증매개물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 역할을 하는 것에 근거를 둔 실험에서는 星香正氣散加蒲公英⁴⁵이 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³⁷, 導痰益氣活血湯³⁸, 補益清腦湯⁵⁷이 PC12 cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과발현 억제능력과 항콜린작용을 보이는 것으로, 鈞鈎藤³⁹이 β APP 과발현에서 신경세포사 억제작용이 있는 것으로 보고한 연구에까지 이르렀으나, 아직까지 한약 水추출물로 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에서의 항치매효과에 대한 보고가 없기에, 腦질환에 대표적으로 사용되는 石菖蒲의 水추출물을 이용하여 다음과 같이 항치매 효과에 대해 조사하였다.

石菖蒲는 開竅약류에 속하는 약물로서 開竅醒神시키는 주요한 효능을 갖고 있어 熱로 인한 의식장애 및 腦질환을 치료하는데 사용하는 대표적인 약물이며, 그 기원은 천남성과이며, 약성은 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 脛痞不飢, 禁口下痢, 神昏癲癇, 健忘 및 고혈압성의

耳聾 증상에 응용한다고 알려져 있다^{58, 59}.

먼저, 신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C 말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 Fig. 1에서 CT105의 발현을 FITC형광체로 확인한 결과 12시간부터 발현이 진행되어 48시간 시점에 가장 발현 정도가 강한 것으로 나타났다.

한편, CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰한 결과 Fig. 2에서처럼 RAG 20 μ g/ml을 처리시 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면 (Fig. 2A), CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실된 양상으로 나타났으며(Fig. 2B), 이에 반해 RAG 처리군은 신경세포가 잘 성장하는 것과 신경돌기가 보호받은 것으로 사료되어지며(Fig. 2C), 한편 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105가 발현됨을 의미하고(Fig. 2E), RAG 처리경우 세포수가 증가하면서 신경돌기도 잘 분지되는 것을 보아 CT105의 발현량이 억제된 결과로 사료된다 (Fig. 2F). 이런 결과로 볼 때 RAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하여 신경세포의 세포사의 보호를 유도하리라 사료되어진다(Fig. 2).

RAG가 CT105 발현에 의한 신경세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 TUNEL assay로 조사한 결과, Fig. 3에서처럼 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 아무런 변화가 없는 상태인 반면(Fig. 3A), 대조군 경우에는 CT105 발현으로 인한 강한 적색 내지 노랑색의 형광체를 나타내고 있다(Fig. 3B). RAG 처리 경우 형광신호가 거의 감소한 상태로 나타냄으로 CT105의 발현이 억제됨을 시사해주고 있다(Fig. 3C). 마찬가지로 caspase-3의 발현은 정상군에서는 아무런 반응이 없는 반면 (Fig. 3D), 대조군에서는 CT105에 의해 capsase 3 단백질 발현으로 강한 형광신호를 나타내었으며(Fig. 3E), RAG 처리군에서는 거의 소멸된 상

태를 나타내거나 녹색형광의 반응을 나타내고 있다(Fig. 3F). 한편, 또 살아 있는 세포에서만 녹색 내지 무색으로 염색되고 세포사가 일어난 세포경우에는 적색 내지 오렌지색으로 염색되는 acridine orange 염색시약(1 μ g/ml)으로 염색시 Fig. 4에서처럼 살아있는 세포에서는 녹색 내지 무색으로(Fig. 4A), CT105로 인한 세포사가 유도된 세포에는 적색으로 염색되었으며(Fig. 4B), CT105로 발현된 세포에 RAG로 처리한 상태에서 염색시 녹색으로 보였는데, 이는 RAG로 세포사가 억제되고 정상적인 신경세포가 증가된다는 것을 시사해 주고 있다고 사료된다(Fig. 4C). Fig. 5에서처럼 상대적으로 CT105가 발현된 신경세포에서의 세포사를 현미경하에서 관찰하여 세포사의 비율을 조사해 본 결과, CT105만이 발현된 세포인 대조군은 약 90 \pm 0.5%였으며 RAG 25 μ g/ml농도에서는 약 5 \pm 1.5%였는데, 본 연구에는 상기 결과와 관련해서 CT105의 세포사를 유도하는 것을 억제시키는 농도로 약 RAG 10 μ g/ml로 처리하여 사용하였다. 따라서 본 RAG가 β APP의 CT105로 인한 신경세포의 세포사를 억제하고 보호할 가능성을 시사해주고 있는 것이다.

RAG가 CT105에 의한 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향에 대해서도 살펴보기 위해 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과, Fig. 6에서처럼 대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 RAG 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 10 μ g/ml 이상처리에서부터 ladder가 강하게 감소하는 경향을 보임으로 해서 RAG가 β APP의 CT105발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료된다.

또 RAG가 CT105 발현으로 인한 NO 생성도에 미치는 영향에 대해서도 살펴보면, Table. 2에서처럼 정상군에서는 3.0 \pm 0.82 μ M이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 90.2 \pm 3.9 μ M인데 반해 RAG 5, 10, 15, 25 μ g/ml농도에서 각각 약 53.3 \pm 1.8, 35.3 \pm 3.4, 25.6 \pm 2.4, 16.3 \pm 2.9 μ M 정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 RAG가 관여하리라 사료된다.

RAG가 neurite outgrowth 성장에 미치는 영향에 대해서도 살펴보면, Fig. 7에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나 (Fig. 7A), CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우 성장이 억제되는 상태로 나타나고 있으며 (Fig. 7B), RAG 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리시 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다 (Fig. 7C, D). 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과, Fig. 8에서처럼 대조군을 0.85 ± 0.5 로 환산시 정상군은 4.85 ± 1.5 이고 RAG의 농도를 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.25 ± 0.5 2.55 ± 4.5 2.95 ± 2.5 4.25 ± 0.5 의 수치를 보였는데, RAG의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 길이를 감소시켜서 신경기능을 상실하게 되는데 아마도 RAG가 이런 현상을 억제시키는 신경기능의 유효 성분을 함유할 것으로 사료된다.

RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 문제 내지 전사 수준에서 조절하는지 βAPP 의 CT105 cell lines에서 알아보기 위해 RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 9에서처럼 신경돌기의 신장에 중요한 인자인 BDNF mRNA 발현 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 발현이 유도되고 세포사에서 발현되는 caspase-3 mRNA의 발현은 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 발현이 억제됨을 알 수 있었다. (Fig. 9)

한편 Fig. 10에서처럼 iNOS mRNA 발현은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 감소되는데, 이는 Table. 2와 유사한 결과이었으며 신경세포의 세포사에 관여하는 APP의 CT105 mRNA 발현은 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 발현이 억제되었고 세포의 전사수준에서 단백질 발현에 표준의 지표인 β -actin mRNA 발현 경우 모든 군에서 일정하게 발현된 것으로 나타났다. RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하여 신경세포의 보호기능을 조절하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다.

또 βAPP 의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAG 5, 10, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 11에서처럼 APP의 발현은 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도이상에서 감소하고, 세포 생존에 관여하는 glycogen syntase kinase (GSK3 β)는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유도되고 caspase-3의 발현은 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 감소하는 경향을 보였다. 한편 Fig. 12에서처럼 iNOS 단백질 발현은 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 감소되는데, 이는 Table. 2와 유사한 결과이었으며 신경세포의 생존에 관여하는 p42/44 단백질의 발현은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 발현이 강하게 증가되었고 마찬가지로 MAPK 단백질 역시 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서부터 발현이 증가되었다. 신경세포의 단백질 발현에서처럼 RAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분을 함유하는 것으로 사료된다 (Fig. 12). 따라서 RAG 처리군은 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 RAG에 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 βAPP 의 CT105에 의한 신경 세포의 세포사를 유의성있게 억제하므로 치매치료에 적용될 수 있으리라 사료되어진다.

이상과 같이 石菖蒲(RAG)의 단독투여가 pCT105 과발현 신경아세포암 세포주에서 細胞死 誘導에 대한 뚜렷한 抑制效果를 보여 $\text{A}\beta$ 침착에 따른 腦의 퇴행성 변화를 지연지시킬 수 있을 것으로 추정되며, 향후 石菖蒲를 이용하여 痴呆 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 思料된다.

V. 結 論

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 세포주를 이용한 石菖蒲의 水추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 세포사를 유도에 대한 抑制와 신경세포 保護效果를 규명하기 위하여 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 石菖蒲의 水추출물은 β APP의 CT105발현에 의한 세포사 유도를 농도 의존적으로 抑制하였다.

2. CT105로 인한 신경세포의 NO 생성도는 石菖蒲의 水추출물의 25 μ g/ml에서 가장 강하게 억제하였다.

3. CT105로 인한 신경세포로부터 DNA fragmentation의 유도 억제는 石菖蒲의 水추출물의 농도 의존적으로 감소하였다.

4. 石菖蒲의 水추출물은 neurite outgrowth length의 길이신장을 유도하고 axonal collapses cone을 억제하였다.

5. 石菖蒲의 水추출물 농도 증가에 의해 신경세포에 중요한 영양인자인 BDNF와 뉴우린의 신경전달인자의 수송에 관여하는 kinesin mRNA 발현은 증가하였으며, iNOS, calpain, APP의 CT105의 발현량은 점차적으로 감소하였다.

6. 石菖蒲의 水추출물 농도 증가에 의해 APP, Caspase-3 그리고 iNOS단백질의 발현은 감소하였고, GSK3 β , p42/44 그리고 MAPK단백질의 발현은 증가되었다.

以上과 같은 結論은 石菖蒲의 水추출물은 β APP의 CT105발현 신경아세포암 세포주의 세포사를 效果的으로 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 적용 可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣. 1994:63-66.
2. 김지혁·황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256-271, 327- 330, 663-664.
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. 1998;12(1):55-65.
4. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 (SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 1995;11(2):219-222.
5. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richey P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res. 1992;593(2):299-303.
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). 1992;84(6):596-605.
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. 2000;95(1):1-4.
8. Baddeley AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H. The decline of

- working memory in Alzheimer's disease, A longitudinal study. *Brain*. 1991;114(Pt 6):2521-2542.
9. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996;16(14):4491-4500.
 10. 황시영 · 강형원 · 유영수. 遠志에 의한 腦星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究. 서울:東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):95-108.
 11. 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 Aug 3;276(31):29045-50.
 12. 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*. 2000 Aug;14(11):1508-17.
 13. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 2000 Jun;113(Pt 11):1857-70.
 14. Kim SH, and Suh YH. Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem* 1996;67:1172-1182.
 15. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH and Suh YH. Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein(β APP) in PC12 cells by nicotine. *Molecular Pharmacology*. 1997;52:430-436.
 16. 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* 1996;66:2034-2040.
 17. 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* 1996;786:169-183.
 18. 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* 2000;74(3):1112-1121.
 19. 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* 1997;225:1055-1062.
 20. 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*. 1997;387(6632):500-505.
 21. 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*. 2000;6(4):397-404.
 22. 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 Dec 1;9(17):3875-9.
 23. Kim HS, Lee JH, and Suh YH. C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SK cell. *Neuroreport*. 1999; 10:113-116.

24. 최세훈. 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구. 서울대대학원. 학위논문(석사). 2001.
25. 라종철. 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화와 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대대학원. 학위논문(석사). 2002.
26. 吳普. 신농본초경. 서울:翰林社. 1976:9-11, 19-20.
27. 이금주, 정현우, 강성용. 석창포가 백서의 뇌연막동맥의 직경에 미치는 기전연구. 대한본초학회지. 2000;15(2):4.
28. 강형원 외. 치매의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 서울:동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.
29. 정인철, 이상용. 치매에 대한 문헌적 고찰. 서울:동의신경정신과학회지. 1996;7(1): 77-94.
30. 裴旻星. 노인성 치매에 관한 체질의학적 연구. 서울:대한한의학회지. 1992;13(2):101-106.
31. 나창수 외. 치매에 관한 최근의 연구 동향. 서울:대한한방내과학회지. 1998;19(1):291-317.
32. 현경철, 김중우, 황의완. Vascular Dementia에 관한 한의학적 임상연구. 서울:동의신경정신과학회지. 1999;10(1):147-158.
33. 황의완 외. 치매에 대한 한의학적 임상연구. 서울:동의신경정신과학회지. 1996;7(1):1-13.
34. 백봉숙 외. 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구. 釜山: 釜山大學校 藥學研究誌. 1995;29(2):49-56.
35. 鄭智天. 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去작용과 抗酸化 酸素系의 活性 增加 효과에 대한 研究. 서울:大韓韓醫學會誌. 1996;17(1):21-36.
36. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향. 서울:동의신경정신과학회지. 1999;10(1):1-16.
37. 최병만·이상룡. 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향. 서울:동의신경정신과학회지. 2000; 11(2):23-42.
38. 정인철. 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향. 대전대학교 대학원(박사). 2001.
39. 김상호, 강형원, 류영수. 鈞鈎藤이 β APP 과 발현 인간세경아세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(5): 960-966.
40. Mann DM, Takeuchi A, Sato S, Cairns NJ, Lantos PL, Rossor MN, Haltia M, Kalimo H, Iwatsubo T. Cases of Alzheimer's disease due to deletion of exon 9 of the presenilin-1 gene show an unusual but characteristic beta-amyloid pathology known as 'cotton wool' plaques. Neuropathol Appl Neurobiol. 2001 Jun;27(3):189-96.
41. Olson JM, Goddard KA, Dudek DM. The Amyloid Precursor Protein Locus and Very-Late-Onset Alzheimer Disease. Am J Hum Genet. Aug 7, 2001.
42. Mattson MP, Chan SL, Camandola S. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. Bioessays. 2001 Aug; 23(8):733-44.
43. Kametani F, Tanaka K, Usami M, Maruyama K, Mori H. Human wild presenilin-1 mimics the effect of the mutant presenilin-1 on the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein in PC12D cells. J Neurol Sci. 2001 Jul 15;188(1-2):27-31.
44. Hung AY, Haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdan JH, Selkoe DJ. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein, J Biol Chem. 1993;268(31):22959-22962.
45. 박진성, 강형원, 유영수. 생체의 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 서울:동의신경정신과학회지. 2001;12(2):157-172.

46. 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. 1996:1325-1344.
47. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguche H, Ruiz A, Maritnez A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. the E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A β 42 deposition and severe cerebellar pathology. Nat Med 1996;2:1146-1150.
48. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β -42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron 1996;17:1005-1013.
49. St. George-Hyslop, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Bruni A, Foncin J-F, Salmon D, Frommelt P, Amaducci L, Sorbi S, Piacentini S, Stewart GD, Hobbs WJ, Conneally PM and Gusella JF. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. Science. 1987;235, 885-890.
50. 徐敏華. 聰明湯이 노화백서 뇌조직의 생화학적 변화와 신경세포의 손상에 미치는 영향. 원광대학교대학원. 1996.
51. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl Acad. Sci USA 1991;88: 7247-7251.
52. Echoers MRW, Riorcon JF. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. Biochemistry. 1991;30:10065-10074.
53. Tanzi R, Gaston S, Bush A, Romano D, Pettingell W, Peppercorn J, Paradis M, gurubhagavatula S, Jenkins B and Wasco W. Genetic- heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer-disease. Genetica. 1993;91:255-263.
54. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. Neuron. 1993;10:243-254.
55. 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. 1997;8:3213-3217.
56. 이건목. 침구자극이 치매와 연관된 melatonin 분비와 SOD 합성에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(1):403-426.
57. 고태준, 이상용. 補益清腦湯이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):151-167.
58. 全國韓醫科大學 本草學教材共編著. 本草學. 서울:永林社. 1991:496-497, 523-524.
59. 신민교. 임상본초학. 서울:남산당. 1984:374-375.