

山査肉이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향

정인철* · 이상룡

대전대학교 한의화대학 신경정신과학교실

The Effects of Crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR Extract on the Alzheimer's Disease Model

In Chul Jung*, Sang Ryong Lee

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

This research investigates the effect of the Crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR(CPVM) on Alzheimer's disease. The CPVM extract suppressed the expression of IL-1 β , IL-6, APP, AChE mRNA in PC-12 cells treated with CT105. The CPVM extract suppressed the AChE activity, and the production of APP significantly in PC-12 cells treated with CT105. The CPVM extract group showed a significant inhibitory effect on the memory deficit for the mice with Alzheimer's disease induced by CT105 in the Morris water maze experiment. The CPVM extract suppressed the over-expression of IL-1 β , TNF- α and ROS in the mice with Alzheimer's disease induced by CT105. This study suggests that CPVM may be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words : Crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR, Dementia, Alzheimer's disease, CT105, amyloid precursor proteins, cytokine, acetylcholinesterase.

서 론

Alzheimer's disease(AD)는痴呆를 일으키는 대표적인 원인 질환으로^{1,2)}, 腦의 全般的 萎縮, 特有的 組織學的 所見과 함께^{1,3)}, 주위에 대한 無關心, 記憶力 低下, 指南力 減退, 情緒不安, 憂鬱, 大小便失禁 등의 症狀을 보인다^{1,2,4)}. 다양한 AD의 유발 기전 중, 대표적인 것으로 amyloid precursor proteins(APP)의 과다로 인한 amyloid β protein(A β)의 과량 침적으로 생기는 老人癩(senile plaques)이 神經細胞를 破壞한다는 가설과^{5,6)}, 물리적인 腦損傷, 感染 등에 의해 활성화된 microglial cell과 astrocyte들이 등의 proinflammatory cytokine을 과다하게 발현하여 中樞神經系의 炎症反應을 일으키고 이것이 細胞毒性을 일으킨다는 가설 등이 있다^{7,8)}. 한편, AD의 主症狀인 記憶力 감퇴는 choline성 神經系와 밀접한 관계가 있는데 특히 acetylcholine의 감소와 acetylcholine의 分解酵素인 acetylcholinesterase(AChE)의 증가 때문으로 생각되고 있다^{9,10)}. 韓醫學으로 痴呆의 原因은 痰飲, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등^{11-13,15,16)}인데, 특히 現代 中醫學에서는 氣滯血瘀, 痰飲停滯를 痴呆의 重要한 原因 중 하나로 보고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 山査肉은 薔薇科에 속한 落

葉喬木인 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로, 性味는 微溫 無毒, 酸甘하고 健脾行氣, 化痰化瘀, 消食積, 瘀血로 因한 痛症 治療에 效能이 있어^{18,19)}, 氣滯血瘀, 痰飲停滯 등의 原因으로 惹起되는 痴呆에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다. 최근 들어 韓醫學界에는 痴呆, 記憶障礙 등과 關聯된 多數의 研究²⁰⁻²⁹⁾가 報告되었고 山査肉에 대해서도 韓 등^{30,31)}의 研究가 發表되었으나 아직 山査肉이 AD의 機轉과 關聯된 各種 生化學的 變化 및 行動 樣態에 미치는 影響에 대한 研究는 接하지 못하였다. 이에 저자는 山査肉이 AD에 미치는 影響을 규명하고자 山査肉을 試料로 하여 PC-12 cell에 대한 細胞毒性을 측정 한 후 carboxyl terminal fragment(CT105)를 處理한 PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6, APP, AChE mRNA 발현과 PC-12 cell에서의 AChE의 활성, APP의 발현을 관찰하였고, CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 行動變化를 측정하였으며, 역시 CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델의 proinflammatory cytokine의 발현, reactive oxygen species(ROS)의 생성을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약재

180~300g Sprague Dawley(SD)계 雌性白鼠를 對한실험동

* 교신저자 : 정인철, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대청주한방병원 E-mail : npjeong@dju.ac.kr Tel : 043-229-3727

· 접수: 2002/01/30 · 수정: 2002/03/13 · 채택: 2002/03/25

물센터에서 공급받아 사용하였고, 6주령의 International Cancer Research(ICR)계 생쥐와 20g, 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였다. 動物은 실험실 환경에 2주일 간 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 사료는 고품사료(삼양사 Co., Korea)를, 식수는 정제수를 자유로이 섭취케 하였다. 실험에 사용된 藥材는 山査肉(Crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR ; CPVM)으로, 大田大學校韓方病院에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 검액의 조제

山査肉 200g을 깨끗이 씻어 round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 첨가하였다. 3시간 가열 추출하고 침전물을 3회 분리한 후, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -84℃ deep freezer(Sanyo Co., Japan)에서 4시간 동안 방치하고 24시간 동안 freeze dryer(Eyela Co., Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

3. 시약 및 기기

시약 중 AChE diagnostic kits, leupetin, Nonidet P-40, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), DL-dithiothreitol(DTT), isopropanol, ethidium bromide(EtBr), polyacrylamide, Hank's balance salt solution(HBSS), triphenyltetrazolium chloride는 Sigma사(U.S.A.) 製品을, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 Takaras사(Japan) 製品을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(U.S.A.) 製品을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A.) 製品을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(U.S.A.) 製品을, 그리고 agarose는 FMC사(U.S.A.) 製品을 사용하였고, rIL-1β(Pharmingen, U.S.A.), anti-human APP N-terminal antibody(Boehringer Mannheim, Canada), anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(Amersham, U.S.A.)와 그 외 試藥들은 특급 및 일급을 사용하였다. 器機는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan), Minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), autoclave(Hirayama Co., Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.), Windows 1D main program(AAB, U.S.A.), VIDEOTRACK(Viewpoint, France), histidin affinity column(Invitrogen, U.S.A.), Primus 96 Legal PCR system(MWG, Germany), 自動生化學分析機(Ciba-Corning Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

4. PC-12 cell에 대한 細胞毒性 측정

1) mLFC와 PC-12 cell의 배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 작은 조각으로 절단하여 conical tube에 넣어 1400rpm으로 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 배양기에서 2시간 동안 배양하

였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm으로 원심 분리한 후 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 1주일 동안 다시 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 wells plate에 나누었다. PC-12 cell(ATCC, CRL1721)은 白鼠의 pheochromocytoma로부터 유래된 cell로, DMEM에 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin 그리고 gentamycin이 함유된 배양액을 넣어 배양하였다.

2) Recombinant carboxyl-terminal fragment(CT105) 複製

CT105를 E. coli에서 발현 정제하기 위해 APP 105 amino acid를 coding하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고 Bam HI site를 넣어주었다. PC-12 cell을 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하고 mRNA를 추출하여 reverse transcription- polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 증폭하였다(Fig. 1). 얻어진 발현 벡터를 E.coli BL21 strain에서 형질 전환하였고, 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 원하는 E. coli를 획득하였다. 이 E. coli는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터뜨린 후 DNase와 RNase를 처리하고 3000rpm에서 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질에서 histidin affinity column을 사용하여 고유한 APP의 CT105를 얻었다.

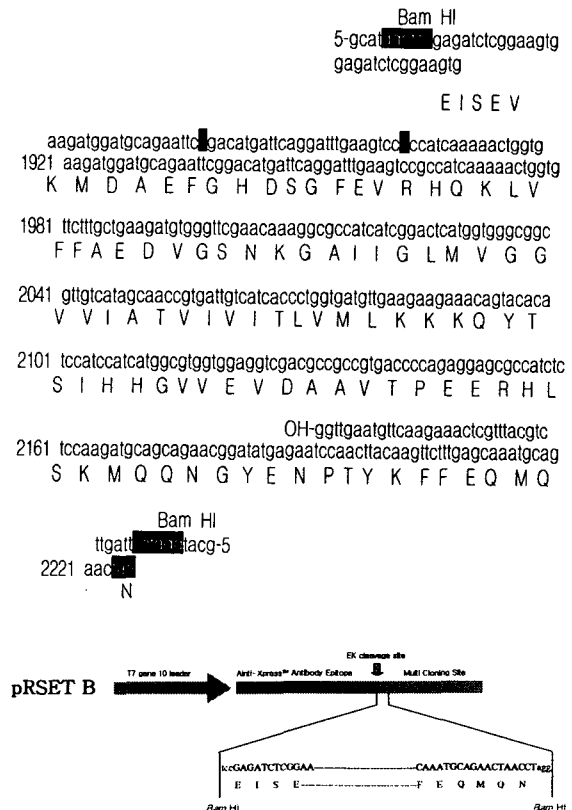


Fig. 1. Construction of pRSET-CT105.

3) 細胞毒性(cytotoxicity) 측정

細胞毒性 측정 방법은 SRB assay를 약간 변형하여 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell을 96 wells plate에 나누고 배양기에서 배양한 후 山査肉 추출물(최종농도 400 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)과 CT105(최종농도 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M)를 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid 50 μ l를 가하고 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치하였다. 그 후 증류수로 세척한 다음, well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4% SRB/1% acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 acetic acid 용액으로 약 세척한 다음, 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5speed로 shaking하고 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. PC-12 cell의 proinflammatory cytokine 및 APP, AChE mRNA 발현 측정

1) mRNA 추출

PC-12 cell을 24 wells plate에 분주하고, 山査肉 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)과 CT105(20 μ M)와 rIL-1 β (100ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 배양하고 2000rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. RNAzolB를 이용하여 PC-12 cell 세포막을 터뜨려 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 mRNA는 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

2) cDNA 제조

Reverse transcription 반응은 준비된 total mRNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 변성시키고, 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC가 처리된 증류수를 이용하여 최종부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 원심 침강하여 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

3) cDNA PCR

이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1 β , IL-6, APP, AChE 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer와 antisense primer를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer, 그리고 0.18 μ l Taq. polymerase를 첨가한 다음, 최종부피가 30 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation, denaturation, annealing, elongation을 25회 시행한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 전기영동을 통하여 분석하였다. PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height : Ht)으로 측정하였다.

6. PC-12 cell에서의 AChE activity와 APP 발현 측정

1) 蛋白質 추출

PC-12 cell에 山査肉 추출물(100 μ g/ml)과 CT105, rIL-1 β 를 24시간 동안 동시 배양한 후 세포 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 山査肉 추출물(100 μ g/ml)과 CT105, rIL-1 β 를 동시 배양한 후 세포 lysate를 얻어 Western blot 실험에 사용하였다. 세포 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 완충용액을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심 분리하여 세포 lysate를 얻어 Bradford법으로 50 μ g로 조정하였다.

2) AChE activity 측정

細胞 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution과 혼합하였다. 각 tube에 3.0ml water, nitrophenol solution 2ml, acetylcholine chloride solution 0.2ml을 첨가하였다. 다시 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 25 $^{\circ}$ C 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Western blot을 통한 APP 분석

세포 lysate를 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동 분리한 후 PDVF membrane에 전이시켰다. anti-human APP N-terminal antibody를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab와 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

7. AD 病態 생쥐모델에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과 측정

1) 생쥐 腦內 CT105 투여

AD 病態 생쥐 모델을 만들기 위하여 재조합 CT105를 Hippocampus에 주입하는데, 그 위치는 bregma에서 caudal로 1.2mm, midline에서 right로 0.7mm, 그리고 표면에서 깊이 1.1mm로, microinjector의 injection speed 0.1 μ l/min와 total volume 0.5 μ l의 조건으로 수행하였다. CT105 투여가 끝난 생쥐 모델은 피부부를 봉합하고 2주일 후, tacrine 投與群(10mg/kg)과 山査肉 投與群(500mg/kg)으로 구분하여 30일 동안 1일 1회 경구투여를 실시하였다.

2) AD 病態 생쥐모델의 記憶力 측정

AD 病態 생쥐모델을 4주일간 山査肉을 경구투여하면서 Morris water maze에서 1일 1회 반복학습 훈련을 실시하였다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 생쥐를 10마리를 한 群으로 하여 對照群, tacrine 投與群(10mg/kg), 山査肉 投與群(500mg/kg)으로 분류하고 계속 30일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복 훈련을 실시하였다. 訓練과 藥物 투여가 종료되고 2주와 4주 후 AD 病態 생쥐모델 한 마리씩을 Morris water maze에 넣고 VIDEOTRACK(animal and human being behaviour analysis system)으로 행동을 관찰하였고 그 결과를 videotrack software로 분석하였다.

8. AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS, NO 분석

1) Anti-CD14 單一抗體를 이용한 생쥐 腦內 microglial cell 분리

30일간의 山査肉(500mg/kg) 투여가 종료된 생쥐 모델의 두 개골을 열고 뇌를 적출한 다음 작은 조각으로 절단한 후 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI 1640 배지를 넣고 배양기에서 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 세척한 후 anti-CD14 단일항체를 넣고 얼음에서 배양하였다. 다시 CELlection™ Pan Mouse IgG Dynabeads로 CD14⁺ cell을 분리하고 cell release buffer로 microglial cell만 포집하였다.

2) Microglial cell내 inflammatory cytokine의 염색과 측정

포집한 microglial cell을 FACS 완충용액 250 μ l와 동량의 인산 완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 고정하였다. 고정 후 permeabilization 완충용액으로 방치한 후 FITC-anti-IL-1 β 와 FITC-anti-TNF- α 와 함께 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 cell을 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 microglial cell내 발현된 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

3) ROS 분석

Microglial cell에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 50 μ M을 처리한 후 5분간 배양한 후 flow cytometer로 cell 내 형광 ROS를 측정하였다.

9. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 student's t-test³²⁾를 이용하여 統計處理하였고, p<0.05 수준에서 有意性을 檢定하였다.

성적

1. PC-12 cell에 대한 細胞毒姓

1) mLFC과 PC-12 cell에 대한 山査肉의 細胞毒姓

mLFC의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 이하의 山査肉 投與群은 變化가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 85 \pm 3.9(%), 88 \pm 2.8(%로 감소되었으며, PC-12 cell의 生存率에 있어서는 對照群에 비해 100 μ g/ml 이하의 山査肉 投與群은 변화가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 81 \pm 3.4(%), 85 \pm 5.2(%로 감소되었다(Fig. 2).

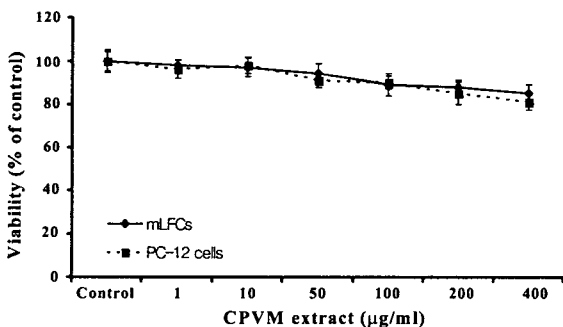


Fig. 2. Cytotoxicity of CPVM extract on mLFC and PC-12 cell. Control : Non-treatment group. CPVM : Group treated with various concentration(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml) CPVM extract for 72 hours. * : Statistically significant value compared with control data by T test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

2) PC-12 cell에 대한 CT105의 細胞毒姓

PC-12 cell에 CT105를 처리한 후의 生存率을 관찰한 결과, 對照群에 비해 5 μ M, 1 μ M의 CT105 投與群은 變化가 없었고, 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M 投與群은 각각 40.0 \pm 1.4(%), 79.5 \pm 3.7(%), 83.1 \pm 2.7(%), 92.4 \pm 3.4(%로 감소되어 濃度依存的으로 細胞毒姓을 나타냈다(Fig. 3).

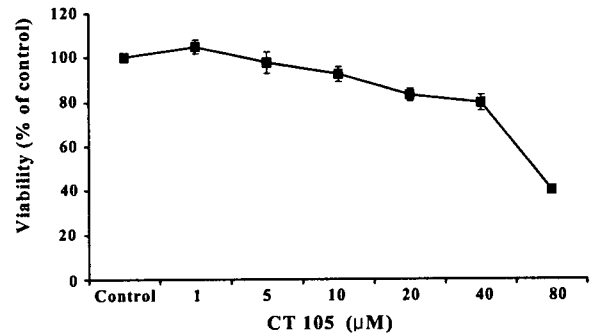


Fig. 3. Cytotoxicity of CT105 in PC-12 cell. Control : Non-treatment group. CT105 : Group treated with various concentration(1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) CT105 for 72 hours.

2. PC-12 cell의 proinflammatory cytokine과 APP, AChE mRNA에 대한 효과

1) PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현 억제 효과

PC-12 cell의 IL-1 β mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 발현이 억제되었고, IL-6 mRNA 발현 역시 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 投與한 實驗群에서 발현이 억제되었다(Fig. 4, 5).

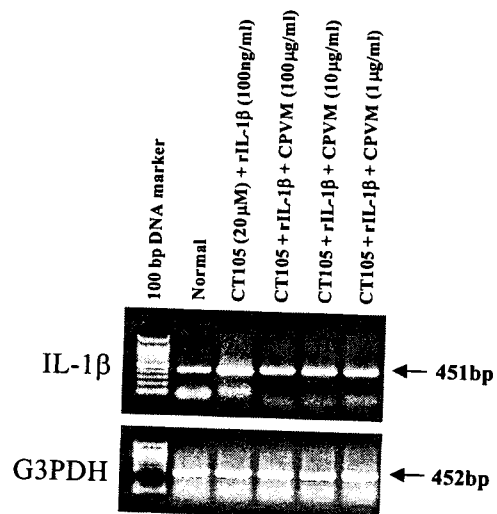


Fig. 4. Inhibitory effects of CPVM extract on IL-1 β mRNA expression in PC-12 cell. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours. CPVM : Group treated with 20 μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1 β for 24 hours and various concentration(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) CPVM extract for 1 hour.

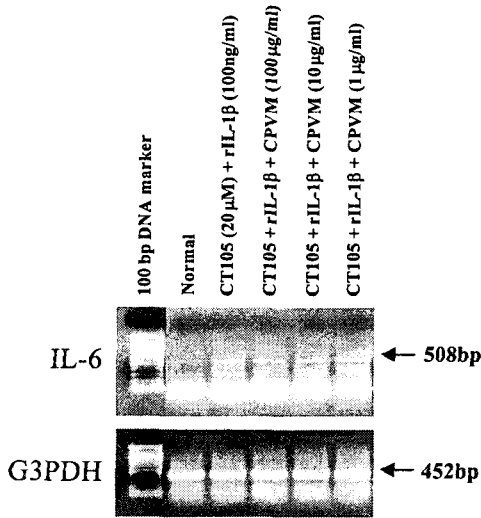


Fig. 5. Inhibitory effects of CPVM extract on IL-6 mRNA expression in PC-12 cell. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours. CPVM : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours and various concentration(100μg/ml, 10 μg/ml, 1μg/ml) CPVM extract for 1 hour.

2) PC-12 cell의 APP, AChE mRNA 발현 억제 효과

PC-12 cell의 APP mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μM의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1β만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1β와 100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 발현이 억제되었고(Fig. 6), AChE mRNA 발현 역시 對照群에 비해, CT105, rIL-1β와 100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 그 발현이 억제되었다(Fig. 7).

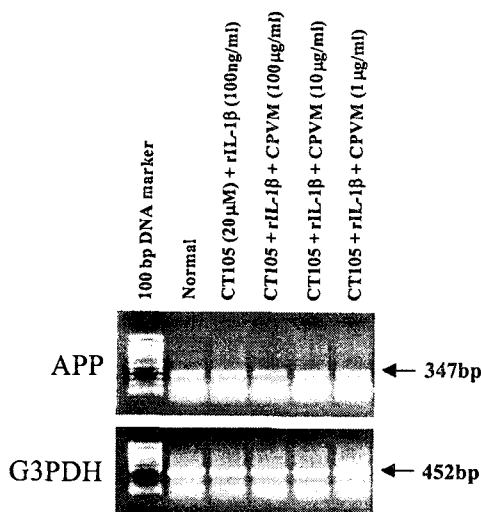


Fig. 6. Inhibitory effects of CPVM extract on APP mRNA expression in PC-12 cell. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours. CPVM : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours and various concentration(100μg/ml, 10 μg/ml, 1μg/ml) CPVM extract for 1 hour.

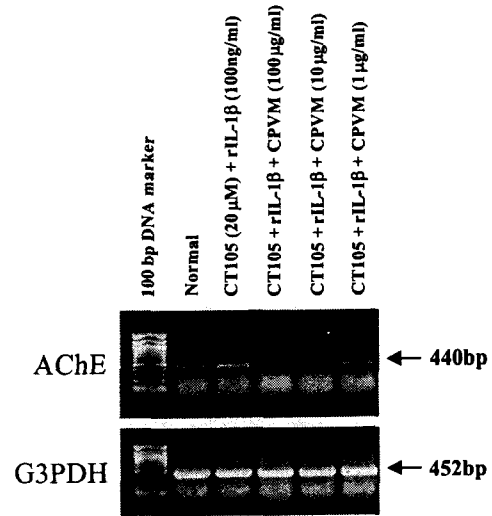


Fig. 7. Inhibitory effects of CPVM extract on AChE mRNA expression in PC-12 cell. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours. CPVM : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours and various concentration(100μg/ml, 10 μg/ml, 1μg/ml) CPVM extract for 1 hour.

3. PC-12 cell에서의 AChE activity와 APP 발현 억제 효과

1) PC-12 cell에서의 AChE activity 억제 효과

PC-12 cell에서의 AChE activity를 측정한 결과, 對照群에 비해 100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml의 山査肉 投與群은 각각 34±3.1(%), 47±4.6(%), 68±3.8(%)로 나타나 有意性 있는 억제 효과를 보였다(Fig. 8).

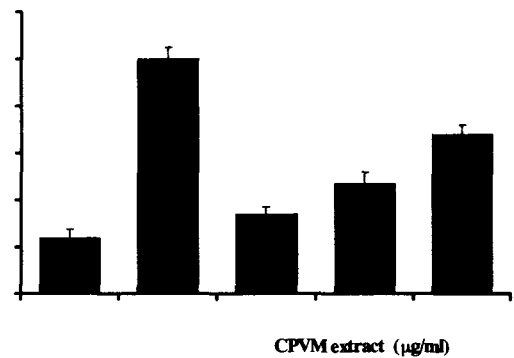


Fig. 8. Inhibitory effects of CPVM extract on the AChE activity in PC-12 cell. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β for 24 hours. CPVM : Group treated with 20μ M CT105 plus 100ng/ml rIL-1β and various concentration(100μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml) CPVM extract for 24 hours.

2) PC-12 cell에서의 APP 발현 억제 효과

PC-12 cell에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 正常群에 비해 對照群은 현저하게 발현되었으나, 山査肉 投與群에서는 발현이 감소되었다(Fig. 9).

4. AD 病態 생쥐모델에 대한 記憶力 감퇴 억제 효과

1) Stop-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과

藥物 投與 2주 후와 4주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 山査肉 投與群은 각각 20.4±4.1(sec), 13.6±3.0(sec)으로 모두 對照群에 비해 有意性 있는 시간의 단축을 보였다(Fig. 10).

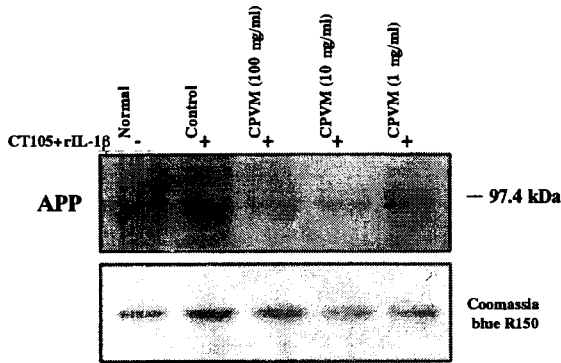


Fig. 9. Suppression effects of CPVM on APP in PC-12 cell. Lane 1 : non-treatment. Lane 2 : CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml). Lane 3 : CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml)+CPVM(100 μ g/ml). Lane 4 : CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml)+CPVM(10 μ g/ml). Lane 5 : CT105(20 μ M) plus rIL-1 β (100ng/ml)+CPVM(1 μ g/ml)

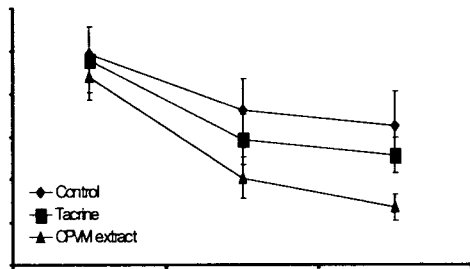


Fig. 10. Effects of CPVM on the Alzheimer's disease mice induced by CT105 in the stop-through type Morris water maze test. Control : Group treated with CT105(10 μ M). Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o). CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o). Stop-through latency : Each time the animal moves from entry to platform.

2) Distance movement-through latency 측정에서 나타난 記憶力 감퇴 억제 효과

藥物 투여 2주 후 distance movement-through latency를 관찰한 결과, 山査肉 投與群은 477±69(cm)로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단축을 보였고, 4주 후 distance movement-through latency에서 tacrine 投與群과 山査肉 投與群은 각각 544±56(cm), 328±46(cm)으로 對照群에 비해 有意性 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 11).

5. AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS, NO 발현 억제 효과

1) IL-1 β 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 IL-1 β 발현을 관찰한 결과, 正常群은

14.5±4.4(%), CT105만을 투여한 對照群은 76.3±9.3(%)이었고, 陽性對照群인 tacrine 投與群은 40.3±10.5(%)이었고, 山査肉 投與群은 38.3±5.4(%)로 對照群에 비하여 IL-1 β 의 발현이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 12).

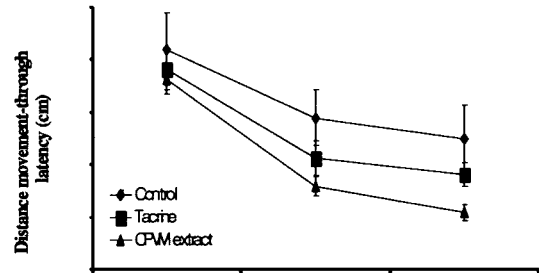


Fig. 11. Effects of CPVM on the Alzheimer's disease mice induced by CT105 in the distance movement-through type Morris water maze test. Control : Group treated with CT105(10 μ M). Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o). CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o). Lardist : The total distance covered by the animal in large movement. Smldist : The total distance covered by the animal in small movement.

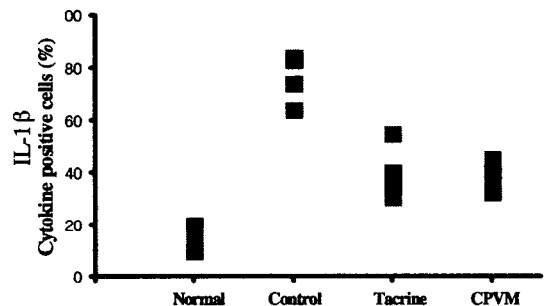


Fig. 12. Effects of CPVM on IL-1 β activity in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with CT105(10 μ M). Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o). CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

2) TNF- α 발현 억제 효과

Microglial cell에서의 TNF- α 발현을 관찰한 결과, 正常群은 44.8±9.8(%), CT105만을 투여한 對照群은 77.8±5.6(%)이었고, 陽性對照群인 tacrine 投與群은 65.3±7.8(%)이었고, 山査肉 投與群은 47.3±8.7(%)로 對照群에 비하여 TNF- α 의 발현이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 13).

3) ROS 발현 억제 효과

Microglial cell내의 ROS 발현을 관찰한 결과, 正常群에 비해 CT105를 투여한 對照群에서 ROS의 발현이 증가하였고 山査肉 投與群에서는 ROS의 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 14).

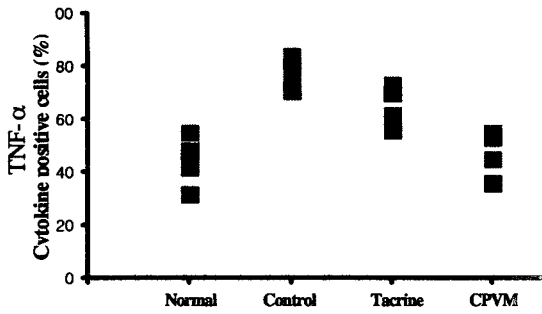


Fig. 13. Effects of CPVM on TNF- α activity in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with CT105(10 μ M). Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o). CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

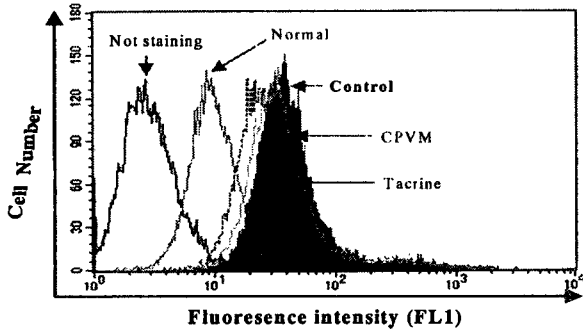


Fig. 14. Inhibitory effect of CPVM on the ROS production in the microglial cells of Alzheimer's disease mice induced by CT105. Normal : Non-treatment group. Control : Group treated with CT105(10 μ M). Tacrine : Group treated with CT105(10 μ M) and tacrine(10mg/kg p.o). CPVM : Group treated with CT105(10 μ M) and CPVM extract(500mg/kg p.o).

고찰

AD는 腦의 全般的 萎縮과 특유의 組織學的 所見, 즉 老人癡 (senile plaque), 神經纖維다발(neurofibrillary tangles) 및 神經細胞의 顆粒空胞變成 등을 특징으로 하며, 症狀으로는 記憶力의 損失, 抽象的 思考障礙, 判斷 및 衝動自制障礙 또는 人格의 變化가 나타난다. 發病은 서서히, 經過는 漸進的인 것이 특징이다^{1,3}. AD 유발에는 A β , apolipoprotein E, free radicals, 神經傳達物質의 不均衡 등의 많은 因子가 關여하는 것으로 알려져 있는데, 이 중 A β 의 沈積으로 생기는 老人癡의 神經毒性으로 인해 神經細胞의 파괴가 일어난다는 것이 대표적인 AD 機轉에 대한 가설이다⁶. Amyloid cascade hypothesis에 따르면 amyloid의 축적이 점차 커지면서 A β 가 神經細胞를 손상시켜 結局 痴呆의 症狀이 나타나게 된다고 하는데, A β 그 자체의 神經毒性 뿐만 아니라 이차적으로 NO를 생성하거나, amino toxicity를 유발하여 神經細胞를 손상시키는 것으로 생각되고 있다^{33,34}. 또한 최근에는 A β 를 포함하는 APP의 c말단 부위인 c단 蛋白質(carboxyl-terminal fragment protein)이 A β 보다 더 毒性이 있다고 알려지고 있다

^{35,36}. A β 의 과잉이 뇌 안에서 抗酸化作用을 억제하고 ROS의 생산을 증가시킴으로써 老人癡를 形成하고 神經毒性을 나타내는 것으로 판단되고 있다^{37,38}. APP는 21번 染色體의 single gene에 존재하는 蛋白質³⁹, AD에서 발견되는 老人癡과 神經纖維다발 형성은 이 APP의 과도생성 때문으로 추측되고 있으며³⁵, AD 患者의 基底 前腦와 海馬 부위에서 APP의 遺傳子 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 痴呆形成 과정에 직접적인 關連을 가지고 있을 것으로 추론할 수 있다⁴⁰. AD 機轉과 關連된 다른 중요한 이론으로 물리적인 腦損傷, 感染 및 炎症反應 등의 자극에 의해 손상된 腦血管障壁을 통하여 免疫系 細胞들이 中樞神經系로 침입하면 astrocyte와 microglial cell 등의 神經膠細胞에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하게 되고 腦에서의 cytokine 恒常性이 破壞됨으로써 中樞神經系의 炎症反應을 일으킨다는 가설이 최근 많은 연구 결과들에 의하여 입증되고 있다^{7,8}. 中樞神經系의 炎症反應은 일련의 단계로 진행되는데, microglial cell에서 유도발현된 IL-1 및 TNF- α 는 astrocyte를 활성화시켜 IL-6, IL-8 등을 발현시키고 活性酸素의 일종인 peroxynitrite 등을 유도함으로써 神經細胞의 사멸을 야기하게 된다⁴¹. A β 가 침적된 老人癡 주변에서는 활성화된 astrocyte와 microglial cell이 많이 관찰되는데, 이들 神經膠細胞들은 A β 에 의해 과잉 생산된 ROS 등이 매개되어 활성화되고 proinflammatory cytokine을 과다 발현함으로써 AD의 病理機轉에 기여하는 것으로 알려져 있어 A β 와 proinflammatory cytokine의 상관성이 주목되고 있다^{34,42}. 한편, acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 神經傳達物質은 노화에 따라 감소하는데, AD의 主症狀인 記憶力 障礙가 choline성 神經系와 밀접한 關係가 있다는 증거들이 다양하게 제시되고 있다. 특히 AD 환자에게서 나타나는 記憶力 감퇴는 acetylcholine을 만들어내는 神經細胞의 退化 때문이며 이 現象은 acetylcholine을 분해하는 酵素인 AChE의 증가로 인해 더욱 심화된다^{9,10}. 韓醫學적으로 痴呆는 '痴呆¹¹', '呆病^{12,13}', '健忘¹⁴' 등의 範疇에 속하며 症狀은 善忘善恐, 言辭顛倒, 舉動不經, 默默不言, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭 등이고, 治法으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등이 주로 언급되고 있다^{11-13,15,16}. 原因에 대해서는 歷代 文獻에서 痰飲, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 提示되고 있는데^{11-13,15,16}, 특히 現代 中醫學에서는 氣滯痰血, 痰飲停滯를 痴呆의 重要한 原因 중 하나로 다루고 있으며 이에 대한 多方面의 研究가 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁷. 山査肉은 薔薇科에 속한 落葉喬木인 山里紅, 山楂 또는 野山楂의 成熟한 果實로 性味는 微溫 無毒, 酸甘하고 脾, 胃, 肝經에 歸하며 健脾行氣, 化痰化瘀, 消食積의 效能이 있어 肉積, 痞滿, 吞酸, 瀉利 등의 疾患에 사용되는데^{18,19}, 그 效能으로 미루어 氣滯血瘀, 痰飲停滯 등의 原因으로 야기되는 痴呆에도 응용될 수 있다고 판단된다.

PC-12 cell을 이용한 실험에서는 먼저 적당한 處理物質과 實驗藥物的 농도를 정하기 위해 細胞毒性을 측정하였는데, 對照群에 비해 100 μ g/ml 以下の 山査肉 投與群은 변화가 없었고, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml의 山査肉 投與群은 각각 81 \pm 3.4(%), 85 \pm 5.2(%로 減少되었다(Fig. 2). 100 μ g/ml의 以下の 농도로 山査肉을 PC-12

cell에 처리하였을 때는 PC-12 cell의 생존률에 有意性 있는 변화가 없었으므로 이후의 以後의 PC-12 cell을 재료로 한 실험에서는 주로 100 μ g/ml 以下の 山査肉을 사용하기로 하였다. CT105는 A β 를 포함하는 APP의 carboxyl terminal portion으로, 實驗적으로 PC-12 cell과 cortical neuron에 毒性을 나타내고, 생쥐에 대해 記憶力을 감퇴시키고 神經變成을 招來하며 배양된 microglial cell에서 IL-1, IL-6 mRNA를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있어^{43,44}, 본 실험에는 CT105를 처리하여 인위적인 AD의 모델을 만들기 위해 CT105를 RT-PCR로 재조합하여 사용하였다. CT105를 PC-12 cell에 처리한 후의 생존률을 관찰한 결과, 對照群에 비해 投CT105 投與群은 濃度依存的으로 細胞毒性을 나타냈는데(Fig. 3), 이후 PC-12 cell을 재료로 한 실험에서는 약 80% 以上の 生存率을 나타낸 20 μ M의 농도로 CT105를 사용하기로 하고, 보다 효과적으로 AD 모델을 만들기 위해 rIL-1 β 를 함께 처리하였다. PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 관찰한 결과, 200 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 모두 발현이 억제되었다(Fig. 4, 5). PC-12 cell의 APP, AChE mRNA 발현을 관찰한 결과, 200 μ M의 CT105와 100ng/ml의 rIL-1 β 만을 처리한 對照群에 비해, CT105, rIL-1 β 와 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml의 山査肉을 함께 투여한 實驗群에서 모두 발현이 억제되었다(Fig. 6, 7). 이것으로 山査肉이 CT105로 인해 PC-12 cell에 과도하게 발현된 IL-1 β 와 IL-6을 감소시켰고 老人癡 形成에 關여하는 APP와 記憶力障礙에 중요한 역할을 하는 AChE를 억제함으로써 AD의 예방과 記憶力 감퇴 등의 症狀 治療에 기여할 수 있다고 판단된다. PC-12 cell에서의 AChE activity를 측정된 결과, 對照群에 비해 山査肉 投與群은 有意性 있는 AChE activity 억제 효과를 보였는데(Fig. 8), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 山査肉의 투여가 AChE를 억제함으로써 acetylcholine을 증가시켜 記憶力의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다. PC-12 cell에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 對照群에 비해 山査肉 投與群에서는 발현이 감소되었는데(Fig. 9), 이를 APP mRNA 발현 억제 결과와 함께 보면 山査肉이 A β 의 생성에 關여하는 APP의 발현을 억제함으로써, 임상적으로 AD의 예방에 山査肉을 사용해 볼 수 있음을 보여 준 것이라 할 수 있다. Morris water maze 과제는 동물의 空間學習과 記憶를 검사하기 위해 사용되는데, 동물이 주변에 있는 단서들을 사용하여 記憶하는 能力, 즉 空間準據記憶을 측정하는 것이다⁴⁵. Morris water maze를 이용하여 CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델에 대한 山査肉의 記憶力 감퇴 억제효과를 측정하였다. 먼저 山査肉 투여 2주 후와 4주 후 stop-through latency를 관찰한 결과, 山査肉 投與群은 對照群에 비해 모두 有意性 있는 시간의 단축을 보였고(Fig. 10), distance movement-through latency를 관찰한 결과, 對照群에 비해 山査肉 投與群은 2주 후와 4주 후 모두에서 有意性 있는 거리의 단축을 나타냈다(Fig. 11). stop-through latency, distance movement-through latency에서 山査肉 投與群이 有意性 있는 시간과 거리의 단축을 나타낸 결과로부터 AD에서 나타나는 記憶力 감퇴에 대한 治療

劑로써 山査肉을 사용해 볼 수 있다는 판단을 할 수 있다. CT105로 유도된 AD 病態 생쥐모델 microglial cell에서의 proinflammatory cytokine 및 ROS 발현을 관찰하였는데, 먼저 microglial cell에서의 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현을 관찰한 결과, 對照群에 비해 山査肉 投與群에서는 모두 발현이 현저히 감소했음을 볼 수 있는데(Fig. 12, 13), 이는 山査肉이 AD의 原因 중 하나로 알려진 細胞內에서의 proinflammatory cytokine의 활성화를 효과적으로 억제한 것으로, 山査肉의 투여를 통해 과잉 생산된 proinflammatory cytokine으로 초래되는 神經細胞 死滅을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. Microglial cell내에서의 ROS 발현을 관찰한 결과, 對照群에 비해 山査肉 投與群에서 ROS의 생산이 현저히 억제되었음을 알 수 있는데(Fig. 14), 이것으로 山査肉이 ROS로 매개되는 microglial cell의 활성화를 억제하고 細胞內의 過酸化 過程을 減少시켜 AD에 대해 예방적 효과가 있으리라 예측된다.

以上的 결과를 종합해 보면 山査肉은 APP의 과다 생성, proinflammatory cytokine의 과잉 발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료 및 AChE의 活性化로 야기되는 記憶力 감퇴에 대한 治療劑로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 정확한 기전에 대한 연구와 AD에 대한 山査肉의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

山査肉이 CT105로 誘導된 AD 病態 모델에 미치는 影響을 觀察한 結果, 山査肉은 PC-12 cell의 IL-1 β , IL-6, APP, AChE mRNA의 발현을 억제하였고, AChE의 활성화와 APP의 발현을 억제하였으며, Morris water maze를 통한 stop-through latency, distance movement-through latency 측정에서 有意性 있는 기억력 개선 효과를 나타냈다. 또, microglial cell에서의 IL-1 β , TNF- α 의 발현과 ROS의 생산을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 山査肉은 AD의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 AD 치료에 있어서 山査肉의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 金知赫·黃義完 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256~271, 327~330, 1992.
2. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.87~88, 465~467, 514~518, p.600, 1995.
3. 이근후 외 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216~228, 1988.
4. 이광우·정희원 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.199~210, 1997.
5. Selkoe DJ : The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell

- Biol, 8(11):447~453, 1998.
6. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK : Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 95(1):1~4, 2000.
 7. Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I : Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*, 274(49):34584~34589, 1999.
 8. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC : Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28(2):114~127, 1999.
 9. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR : In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(4):691~699, 1999.
 10. Almeida OP : Treatment of Alzheimer's disease ; critical evaluation of the use of anticholinesterase. *Arq Neuropsiquiatr*, 56(3B):688~696, 1998.
 11. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610~611, 1978.
 12. 陳士禛 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
 13. 錢鏡湖 : 辨證奇問全書,台北, 甘地出版社, pp.222~225, 233~235, 1990.
 14. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129~135, p.534, 545, 550, 1982.
 15. 陳輝 외 : 實用中醫腦病學,北京, 學苑出版社, pp.242~251, 784~791, 1993.
 16. 黃大東 외 : 實用中醫內科學,上海, 上海科學技術出版社, pp.378~381, 1989.
 17. 徐浩·馬芾云 : 從痰瘀論治老年期痴呆研究進展,浙江中醫雜誌, 31(10):474~475, 1996.
 18. 全國韓醫科大學本草學教授 共著: 本草學, 서울, 永林社, pp.369~370, 1991.
 19. 김창민 외 역 : 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, pp.2658~2663, 1998.
 20. 鄭仁哲·李相龍 : 痴呆에 對한 文獻의 考察, 동의신경정신과학회지, 7(1):77~94, 1996.
 21. 이승기 외 : 치매에 대한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 7(1):1~14, 1996.
 22. 金保岡 외 : Alzheimer型 痴呆患者 2例에 對한 臨床의 考察, 동의신경정신과학회지, 8(2):97~106, 1997.
 23. 김보균 외 : Dementia of Alzheimer Type에 관한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과학회지, 9(1):25~44, 1998.
 24. 현경철·김종우·황의완 : Vascular Dementia에 關한 韓醫學의 臨床研究, 동의신경정신과학회지 10(1):147~158, 1999.
 25. 조윤숙 외 : 형방지황탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 9(1):1~24, 1998.
 26. 박순권 외 : 한약물의 치매 치료에 관한 실험적 연구, 동의신경정신과학회지, 9(2):19~35, 1998.
 27. 姜현근·김종우·황의완 : 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 10(1):39~52, 1999.
 28. 鄭仁哲·李相龍 : 導痰益氣活血湯이 알츠하이머질환 病態 모델의 生化學的 變化 및 行動에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(2):260~276, 2001.
 29. 金保岡 : 安神清腦湯이 Alzheimer's disease 病態 모델의 生化學的 變化 및 記憶에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 2001.
 30. 高光宰 : 山査 抽出液이 白鼠의 肥滿模型에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 1998.
 31. 辛東勳 : 위점막 보호효과에 대한 山査의 항산화작용과 SH기 의 영향, 동국대학교대학원, 1999.
 32. 金字哲 외 : 統計學概論, 서울, 英志文化社, pp.177~179, 1990.
 33. Forsell C, Froelich S, Axelman K, Vestling M, Cowburn RF, Lilius L, Johnston JA, Engvall B, Johansson K, Dahlkild A, Ingelsson M, St. George-Hyslop PH, Lannfelt L : A novel pathogenic mutation(Leu262Phe) found in the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 234(1):3~6, 1997.
 34. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ : Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes ; morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, 785(2):195~206, 1998.
 35. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB : Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na⁺/Ca²⁺ gradients. *Neuroreport*, 11(15):3357~3360, 2000.
 36. 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*, 14(11):1508~1517, 2000.
 37. Kontush A : Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1120~1131, 2001.
 38. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB : Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity ; role of oxidative stress. *J Neurochem*, 78(2):249~253, 2001.
 39. Racchi M, Johnston JA, Flood FM, Cowburn RF, Govoni S : Amyloid precursor protein metabolism in fibroblasts from individuals with one, two or three copies of the amyloid precursor protein (APP) gene. *Biochem J*, 338:777~782, 1999.
 40. Breakefield XO, Geller AI : Gene transfer into the nervous system. *Mol Neurobiol*, 1(4):339~371, 1987.
 41. Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine

- CS, Norton WT, Brosnan CF : Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem*, 57(3):823~830, 1991.
42. Kang J, Park EJ, Jou I, Kim JH, Joe EH : Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *Neuroreport*, 12(7):1449~1452, 2001.
43. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee SW, Kim YM, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *J FASEB*, 14:1508~1517, 2000.
44. Chong YH : Effect of a carboxy-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sciences*, 61(23):2323~2333, 1997.
45. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I : FR121196, a potential antedementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1):256~263, 1995.