

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 14. No. 2, 2003

遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합추출액이 CT105 로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향

한원주, 김형수*, 김상태**, 김태현, 강형원, 류영수
원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
*원광대학교군포병원 진단방사선과
**지젠바이오/주암생명공학연구소

Comparative effects of Radix Polygalae and Rhizoma Acori Graminei on CT105-induced neuroblastoma cell lines

Won Ju Han,, Hyung Soo Kim, Sang Tae Kim,
Tae Heon Kim, Hyung Won Kang, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
*Department of Diagnostic Radiology, Wonkwang University Gunpo Hospital
**JuAm of Research Institute Bioscience & Biotechnolo

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, Radix Polygalae and Rhizoma Acori Graminei have been used for disease in relation to brain retrogression.

We studied of anti-Alzheimer effect on CT105-induced neuroblastoma cell lines by Radix Polygalae(RP) and Rhizoma Acori Graminei(RAG) water extract. As the result of this study, In RP and RAG group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of Neuroblastoma cells by CT105 expression is induced. These results indicate that In RP and RAG, RAG possess the strongest in inhibitory effect of apoptosis in the nervous system and repair effect against the degeneration of Neuroblastoma cells by CT105 expression.

Key words : Radix Polygalae(遠志), Rhizoma Acori Graminei(石菖蒲), apoptosis, CT105(C-terminal 105)

I. 結 論

Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로^{1, 2)}, 그 정확한 병리학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 신경반구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein (APP)으로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein (A β)이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁻⁶⁾. 그러나 A β 의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔다^{6, 7)}.

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 신경독성이 강할 뿐만 아니라⁸⁻¹⁴⁾ Calcium homeostasis를 손상시키지만 A β 는 그렇지 않다고 하여 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인 물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다^{15, 16)}.

본 연구에 사용된 遠志와 石菖蒲는 두 종류의 효능이 서로 비슷한 약물을 함께 사용하여 상호작용을 증강하는 相須의 대표적인 혼합배합으로¹⁷⁾, 遠志의 疏散氣滯 및 祛痰作用과 石菖蒲의 開竅醒神作用이 배합되어 心竅를 通利하고 心氣의 鬱滯를 散하게 하여 腦의 작용을 활발하게 하고 의식장애를 제거할 목적으로 다양한 腦질환에 널리 활용되고 약제들이 다¹⁸⁾.

遠志와 石菖蒲의 각각의 약물에 대한 實驗的 연구로는 遠志가 利尿效果와 中樞神經抑制 効果¹⁹⁾, 腦 성상 세포에서 TNF- α 생성 및 TNF- α mRNA의 발현을 억제하는 効果²⁰⁾가 있다고 보고한 바 있고, 石菖蒲가 국소 腦혈류량을 농도 의존적으로 증가시킨다는 보고²¹⁾하였으며, 특히 康¹⁹⁾은 遠志와 石菖蒲를 단독, 및 혼합투여하고 N $_2$ 및 CO $_2$ 가스로 무산소 부하상태를 만들었을 때, 이들 약물이 乳酸의 생성을 억제하고 뇌세포의 sodium-potassium pump가 정지하는 것을 지연시켜 세포손상을 막아 생존시간을 연장하여 뇌손상 보호

기능을 가진다는 유의성 있는 결과를 얻은 바 있지만, SK-N-SH cell line인 neuroblastoma 세포주에서 CT105를 과발현시켜서 항치매효과를 비교한 실험적 보고는 없다.

이에 저자는 원지와 석창포의 단독투여 및 혼합투여 하여 효과를 비교하기 위하여 치매실험모델인 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에서 그 효능을 비교하여 유의성있는 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 bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG 및 ECL kit는 Amersham pharmacia에서, 그 외 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기는 CO $_2$ incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (Olympus), immunofluorescence microscope (Olympus) 등을 사용하였다.

2) 試料의 調製

石菖蒲 및 遠志 수추출액 조제: 본 實驗에 사용된 약물은 石菖蒲 1.5kg, 遠志 1.5kg, 그리고 石菖蒲와 遠志를 각각 750g씩 배합한 혼합물 1.5kg을 원광대 군포병원에서 엄선하여 세말한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85 $^{\circ}$ C에서 12시간 열탕을 가한 다음 식힌 후 조제한 石菖蒲 수추출액(이하 RAG)과 遠志 수추출액(이하 RP) 그리고 石菖蒲와 遠志의 혼합 수추출액(이하 RPAG)을 동결 건조한 300g을 사용 전 -80 $^{\circ}$ C에 보관하여 3차 증류수를 이용해서 적당량 농도로 희석한 후에 실험에 사용하였다.

2. 實驗方法

1) CT105 형질조합 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 pCT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital의 Center for Neurologic Diseases 소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양받은 치매 유발 유전자 APP695로부터 포유동물세포주인 SK-N-SH 내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리한다. 이를 TA vector인 pT7 vector에 cloning하여 대장균인 JM109에 형질전환시켜 이 플라스미드를 추출하여 BamHI/HindIII의 제한효소를 처리하고, 이를 포유동물발현 벡터인 pTRA vector의 BamHI/HindIII에 삽입하여 cloning한 다음 대장균인 JM109에 형질전환시켜 pCT105 플라스미드를 분리하여 본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양 받아서 계대 배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask 내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105의 플라스미드를 본 실험에 사용세포주를 구축하기 위해 미리 103 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 반응액 A로 pCT105 2 μ g와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100 μ l을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10 μ l와 SFM 100 μ l을 혼합하여 45분간 반응시킨 다음 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간정도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지하고 5% RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 μ g/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 세포사멸에 미치는 영향

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 slide glass 위에 laminin coated 된 slide round cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음, RP, RAG, RPAG 약물군을 15 μ g/ml농도로 처리하여 가한 다음 5시간 후에 세포사를 유도하는지 Tunel assay 방법으로 조사하였다. 103세포수를 분주하고 하룻밤 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포를 4% p-formaldehyde로 12시간 동안 4°C에

서 고정시키고 0.5% Tween 20, 0.2% BSA (bovine serum albumin)을 첨가하여 실온에서 15분간 침투 과정을 실시하고 PBS로 3회 세척을 실시하고 세포 내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)용액(TdT완충액, biotin-dUTP, TdT=18:1:1) 5 μ l를 떨어 뜨려서 37°C에서 1시간 유지하고 증류수로 3회 세척한 다음 blocking 용액인 0.5% BSA를 50 μ l정도 첨가하여 실온에서 10분간 정치하여 놓는 다음 avidine-FITC용액 50 μ l첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척한 다음 slide glass 위에 mounding 용액을 약간 떨어뜨리고 덮어놓고 형광현미경하에서 관찰한다.

3) 세포 형태학적 관찰

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

4) CT105 발현세포주의 NO 생성도 측정

CT105 발현 세포주내의 NO (nitric oxide)의 생성도를 측정하기 위해 103세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 RP, RAG, RPAG 약물군에 15 μ g/ml의 농도로 12시간 처리한 후 상등액 100 μ l을 따서 96-well에 옮기고 Greiss reagent 용액 50 μ l을 첨가하고 실온에서 반응을 시킨 다음 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570 /A630nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 표준용액인 0, 1, 10, 20, 50, 100, 150 μ M sodium nitrite를 발색반응에 적용하여 비교 분석하였다.

5) neurite outgrowth의 길이 측정

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10³세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50 ng/ml이 되게

하여 첨가하고 5시간동안 자극을 가한 다음 무혈청배지 내지 각 약물군 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth length를 현미경하에서 관찰하여 정상군과 상호 비교하여 neurite length score를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 통계처리하였다.

6) Western Blot

CT105 유도발현 SK-N-SH cell lines를 10^3 세포수로 6-well에 분주하고 상기와 같은 방법으로 실시하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂)로 처리하여 그 추출액 30 μg 을 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, 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 30초에서 20분간 X-ray film에 노출시켜 발색정도를 확인하였다.

7) 통계처리

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

III. 成 績

1. CT105 발현 세포주에 의한 세포형태학적 영향

CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP, RAG, RPAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰한 결과 Fig. 1에서처럼 RP, RAG, RPAG 농도

15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리시, 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면, CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났으며, 이에 반해 RP 단독 처리군에서는 신경돌기가, RAG 단독 처리군에서는 세포증식이 잘 이루어지는 것을 볼 수 있는데, RPAG 혼합 처리군에서는 신경세포가 잘 성장하는 것과 동시에 신경돌기가 잘 발달되어 단독투여때보다 신경재생이 더 잘 유도된 것으로 나타났다.

한편 세포사가 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105에 의해 세포사가 일어남을 의미하고, RPAG, RP, RAG로 처리 한 경우 세포증식이 크게 증가하면서 신경돌기도 재생되어지는 것은 CT105의 발현이 감소된 결과로 보여진다(Fig. 2). 이 결과로 볼 때 RP, RAG, RPAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하며 특히 RPAG가 신경세포의 재생을 강하게 유도한다고 보여진다(Fig 1).

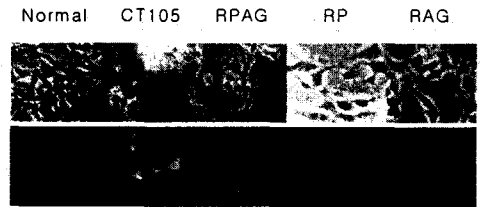


Fig. 1. Phase-contrast microphotographs of CT105 expressing cells by RPAG, RP, RAG. Cells were incubated in 5% FBS with RPMI medium. Cells were observed after treat with RP, RAG, RPAG. Morphological characteristic of apoptosis induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Apoptotic cells were indicated by the arrows. Cell morphology was determined by phase contrast microscopy.

2. RP, RAG, RPAG가 CT105 발현에 의해 신경세포에 미치는 영향

일반적으로 세포사의 유도시 염색체내의 nuclease에 의한 염색체의 상해로 유도되므로 CT105와

의 관계를 규명하기 위해 세포사의 표식자인 caspase-3 발현 유무를 확인하는 입증 가능한 방법인 TUNEL assay로 조사한 결과, 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 전무한 상태인 반면(Fig. 2), 대조군 경우에는 CT105 발현이 강하여 적색 내지 노랑색의 형광체를 띠므로써 CT105가 신경세포내에서 강한 신호를 나타냄을 나타내고 있으나(Fig. 1), RPAG, RP, RAG 처리 모두에서 형광 신호가 감소한 상태로 나타내며 Caspase-3의 경우도 상기 설명과 유사한 결과를 나타내는데 두 가지 결과로 볼 때 CT105에 의한 신경세포의 사멸현상은 원지, 석창포 단독 및 혼합 추출물 모두에서 억제되었다고 볼 수 있다(Fig. 2).

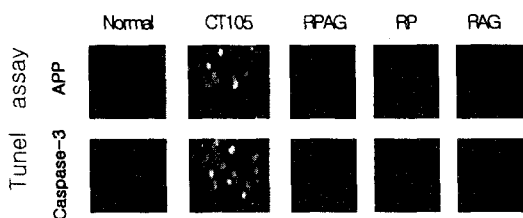


Fig. 2. Fluorescence Micrograph of FITC-avidine staining of TUNEL assay. Fresh cells re-suspended in RPMI medium were incubated with prepared as described under 'Experimental Procedures'. Aliquots were removed, coverslipped, and examined by fluorescence microscopy. The Texas-Red-avidine fluorescence was observed in regions adjacent to the nucleus and Fluorescence images and simultaneously obtained transmission images of the cells labeled with Red.

3. CT105 발현으로 인한 NO생성도에 미치는 영향

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되어 세포사를 유도하는 경우도 있는데 RP, RAG, RPAG의 투여가 CT105 발현 세포주의 NO생성을 억제하는지 조사한 결과, Table 1에서처럼 정상군에서는 $3.0 \pm 0.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 $89.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 인데 반해 RPAG, RP, RAG $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 6.3 ± 2.9 , 39.3 ± 1.8 , 15.6 ± 2.4

μM 정도였다. 이런 결과로 볼 때 CT105에 의한 iNOS에 의한 NO생성에서 RP와 RAG의 단독투여 때보다 RPAG의 혼합투여가 더 강하게 NO생성을 억제한다고 볼 수 있다.

Table 1. NO formation in pCT105 cell lines

samples	NO formation ratio($\mu\text{M}/\text{well}$)
NOR	3.0 ± 0.82
CT105	89.2 ± 3.9
RPAG	$6.3 \pm 2.9^{**}$
RP	$39.3 \pm 1.8^*$
RAG	$15.6 \pm 2.4^*$

Values represents the means \pm S.D of performed experiments in replicants wells ver control. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.005$

4. neurite outgrowth 성장에 미치는 영향

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 받기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 Fig. 2에서처럼 성장이 안되는 상태로 나타내고 있으나, RP, RAG 그리고 RPAG $15 \mu\text{g/ml}$ 으로 처리시에는 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다. 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 3에서처럼 대조군을 기준으로 0.85 ± 0.5 으로 환산시 정상군은 4.85 ± 1.5 이고 RPAG, RP, RAG의 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 3.9 ± 0.5 , 1.95 ± 0.5 , 2.75 ± 1.5 의 수치를 보여주어 RPAG가 가장 neurite outgrowth length를 증가시키고 다음으로 RAG가, 마지막으로 RP 순서로 강하게 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 CT105에 의해 신경돌기의 신장이 억제된 것을 RPAG의 $15 \mu\text{g/ml}$ 에서는 신경돌기의 재생으로 변화시키는 것은 아마도 신경돌기에 관여하는 유전자발현을 유도하여 신경돌기의 신장을 촉진시킨다고 볼 수 있다.

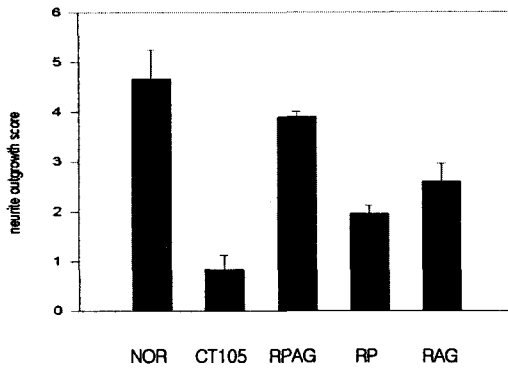


Fig. 3. RPAG, RP, RAG induces neurite outgrowth length. CT105 expressing SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and RPAG, RP, RAG. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means±S.D from 200 determination cells. Those values significantly different from control are indicated ($p < 0.05$, students two-tailed t test)

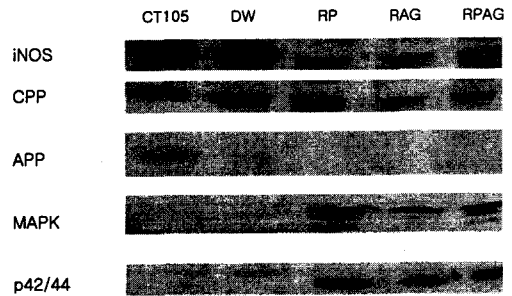


Fig 4. Influence of RP, RAG and RPAG extracts on iNOS, CPP, APP, MAPK and p42/44 expression in neuroblastoma cells. All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for iNOS, CPP, APP, MAPK and p42/44 and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane (Amersham). For detection of the protein were stained with ECL into Horseradish Peroxidase conjugates(HRP).

5. CT105 발현에 의한 단백질 발현에 미치는 영향

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RP, RAG 그리고 RPAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 15 μ g/ml 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 4에서처럼 APP의 발현은 RP, RAG 및 RPAG 모두에서 강하게 감소하였고, iNOS 단백질 발현과 caspase-3(CPP)의 발현에서도 모두 감소하는 경향을 보였다. 한편 신경세포의 생존에 관여하는 MAPK단백질과 p42/44 단백질은 강하게 발현되었는데, 이는 RP, RAG 및 RPAG 모두가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분을 함유하는 것으로 볼 수 있다(Fig. 4). 따라서 RP, RAG 그리고 RPAG 처리군 모두는 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 CT105에 의한 신경 세포의 세포사를 유의성 있게 억제한다고 볼 수 있다.

IV. 考 察

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 老化로 인한 腦 증후군으로¹⁾ 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 치매(AD)와 腦梗塞 등으로 誘發된 腦血管性 痴呆 그리고 兩者가 混在된 混合型 痴呆가 있는데, 이 중 전 세계적으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 AD이다.^{1, 22)}

AD의 원인에 대한 여러 가설들이 있으나, A β 가 AD의 발병원인으로 작용할 것이라는 베타아밀로이드 가설은 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여져 왔다.²³⁾

그러나 최근에는 A β 의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데²⁴⁻²⁶⁾, 특히 in vivo 실험에서는 A β 의 독성에 대해 상반되는 결과가 팽팽히 맞서고 있어, 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을 할 것인지 불확실한 실정이다. 따라서 실제 pathogenesis에는 다른 인자들, 그 중에서도 APP의 다른 중간대사

산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 A β 의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내²⁷⁾와 배양액¹³⁾에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 뇌 부위에서도 발견되었다²⁸⁻³⁰⁾. 또한 이 단백질은 in vitro에서 또는 세포에 transfection 시켰을 때 amyloid와 유사한 aggregate를 형성할 수 있다^{31, 32)}. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 transfection 시킬 경우 세포독성을 일으키는데³³⁻³⁵⁾, 특히 이러한 C단 단백질의 transfection시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다³³⁾. 미국의 Neve 박사 group에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데³⁶⁾, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고³⁷⁾ 인지기능의 결손이 동반됨이 보고 되어 C단 단백질이 과도하게 발현되면 신경세포에 유해한 영향을 끼쳐 인지기능을 손상시킬 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다.

최근 C단 단백질에 대한 연구로 CT105 자체가 PC12 cells와 primary cortical neurons^{8, 9)}에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, Xenopus oocytes^{10, 11)}과 Purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고하였다³⁸⁾. 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^{15, 16)} 기존의 A β 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

또한 가장 최근에 최 등³⁹⁾은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등⁴⁰⁾은 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 caspase-12 등의 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와

AD의 관련성을 더욱 증명해주고 있다^{15, 41-43)}.

축발인자를 무시하더라도 痴呆의 진행단계에 CT105의 과발현을 유도하게 되면 신경세포의 파괴를 유도할 수 있어 이를 이용한 한약재의 치매 예방 및 치료제 개발에 대한 연구가 진행되고 있다.

CT105로 유도된 치매모델에서 항치매 효과에 대한 한약재의 수추출물의 실험적 보고는 석창포⁴⁴⁾와 원지와 석창포의 혼합 수추출물⁴⁵⁾의 유의한 보고는 있지만, 원지와 석창포의 단독 투여 및 혼합투여의 비교 연구는 아직 없는 실정이다.

遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 乾燥한 것으로서¹⁸⁾ 그 歸經⁴⁶⁾은 心·腎이고 性味는 苦辛溫 등^{18, 46)}으로 分類되어 있고, 藥效에 대해서는 神農本草經 上品⁴⁷⁾에 “……補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”로 기재된 이후로 寧心安神, 祛痰利癆劑로 사용되어 오고 있다.

石菖蒲는 開竅藥類에 속하는 약물로서 開竅醒神시키는 주요한 효능을 갖고 있어 熱로 인한 의식장애 및 뇌질환을 치료하는데 사용하는 대표적인 약물이다. 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, 神昏癲癩, 健忘 및 고혈압성의 이릉 증상에 응용한다^{18, 48)}.

이러한 石菖蒲의 開竅醒神작용과 遠志의 疏散氣滯 및 祛痰作用이 배합되어 心竅를 通利하고 心氣의 鬱滯를 散하게 하여 腦의 작용을 활발하게 하고 의식장애를 제거할 목적으로 널리 활용되고 있는데¹⁹⁾ 이러한 遠志와 石菖蒲의 배합은 相須라 하여, 비슷한 효능을 가지고 있으며 두 약물이 같이 배합됨으로써 원래 가지고 있는 치료효능을 현저하게 증강시킬 수 있는 경우이다⁴⁶⁾.

석창포와 원지의 단독 투여 및 혼합투여의 항치매 효과에 대한 비교연구의 실험한 결과는 다음과 같다. CT105 발현이 확인된 신경세포에서 RP, RAG, RPAG가 CT105로 인한 신경세포의 세포사의 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태학적인 변화를 관찰한 결과 Fig. 1에서처럼 RP, RAG, RPAG 농도 15 μ g/ml를 처리시, 정상군에서는 세포형태학적으로 정상이고 신경돌기가 잘 뻗어 자라고 있는 반면, CT105가 발현된 세포인 경우 대조군은 세포사가 유

도된 상태뿐만 아니라 신경돌기가 소실되는 양상으로 나타났으며, 이에 반해 RP 단독 처리군에서는 신경돌기가, RAG 단독 처리군에서는 세포증식이 잘 이루어지는 것을 볼 수 있는데, RPAG 혼합 처리군에서는 신경세포가 잘 성장하는 것과 동시에 신경돌기가 잘 발달되어 단독 투여때보다 신경재생이 더 잘 유도된 것으로 나타났다.

한편 세포사가 CT105 발현과 관련하여 대조군에서 녹색의 형광이 강하게 보이는 것으로 CT105에 의해 세포사가 일어남을 의미하고, RPAG, RP, RAG로 처리 한 경우 세포증식이 크게 증가하면서 신경돌기도 재생되어지는 것은 CT105의 발현이 감소된 결과로 보여진다(Fig. 2). 이 결과로 볼 때 RP, RAG, RPAG가 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하며 특히 RPAG가 신경세포의 재생을 강하게 유도한다고 보여진다(Fig. 1).

일반적으로 세포사의 유도시 염색체내의 nucle-ase에 의한 염색체의 상해로 유도되므로 CT105와의 관계를 규명하기 위해 세포사의 표식자인 cas-pase-3 발현 유무를 확인하는 입증 가능한 방법인 TUNEL assay로 조사한 결과, 정상군은 APP에 의한 CT105 발현이 없는 상태이므로 Texas-Red 형광체가 전무한 상태인 반면(Fig. 2), 대조군 경우에는 CT105 발현이 강하여 적색 내지 노랑색의 형광체를 띠므로써 CT105가 신경세포내에서 강한 신호를 나타냄을 나타내고 있으나(Fig. 1), RPAG, RP, RAG 처리 모두에서 형광 신호가 감소한 상태로 나타내며 Caspase-3의 경우도 상기 설명과 유사한 결과를 나타내는데 두 가지 결과로 볼 때 CT105에 의한 신경세포의 사멸현상은 원지, 석창포 단독 및 혼합 추출물 모두에서 억제되었다고 볼 수 있다(Fig. 2).

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되어 세포사를 유도하는 경우도 있는데 RP, RAG, RPAG의 투여가 CT105 발현 세포주의 NO생성을 억제하는지 조사한 결과, Table 1에서처럼 정상군에서는 $3.0 \pm 0.82 \mu\text{M}$ 이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 $89.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 인데 반해 RPAG, RP, RAG $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 6.3 ± 2.9 , 39.3 ± 1.8 , $15.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$ 정도였다. 이런 결과로 볼 때 CT105에 의한 iNOS에 의한 NO생성에서 RP와 RAG의 단독 투여때보다 RPAG의 혼합투여가 더 강하게 NO생성을 억제한다고 볼 수 있다.

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 받기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 Fig. 2에서처럼 성장이 안되는 상태로 나타내고 있으나, RP, RAG 그리고 RPAG $15 \mu\text{g/ml}$ 으로 처리시에는 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다. 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 3에서처럼 대조군을 기준으로 0.85 ± 0.5 으로 환산시 정상군은 4.85 ± 1.5 이고 RPAG, RP, RAG의 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 약 3.9 ± 0.5 , 1.95 ± 0.5 , 2.75 ± 1.5 의 수치를 보여주어 RPAG가 가장 neurite out-growth length를 증가시키고 다음으로 RAG가, 마지막으로 RP 순서로 강하게 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 CT105에 의해 신경돌기의 신장이 억제된 것을 RPAG의 $15 \mu\text{g/ml}$ 에서는 신경돌기의 재생으로 변화시키는 것은 아마도 신경돌기에 관여하는 유전자발현을 유도하여 신경돌기의 신장을 촉진시킨다고 볼 수 있다.

β APP의 CT105 발현 신경아세포암 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 RP, RAG 그리고 RPAG가 세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 $15 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과, Fig. 4에서처럼 APP의 발현은 RP, RAG 및 RPAG 모두에서 강하게 감소하였고, iNOS 단백질 발현과 caspase-3(CPP)의 발현에서도 모두 감소하는 경향을 보였다. 한편 신경세포의 생존에 관여하는 MAPK 단백질과 p42/44 단백질은 강하게 발현되었는데, 이는 RP, RAG 및 RPAG 모두가 CT105로 인한 신경세포의 세포사가 유도되는 양상을 억제하고 신경세포의 생존을 유도하는 유효성분을 함유하는 것으로 볼 수 있다(Fig. 4). 따라서 RP, RAG 그리고 RPAG 처리군 모두는 세포사를 유도하는 단백질의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제함으로써 신경세포의 파괴를 보호하고 방어작용을 유도하는 성분이 있음이 시사되어지며 CT105에 의한 신경 세포의 세포사를 유의성 있게 억제한다고 볼 수 있다.

이상의 실험결과와 같이 RP, RAG 그리고 RPAG가 CT105 발현 신경세포암 세포주 세포주에서 신경세포의 세포사 유도에 대한 抑制효과가 규명되었고, 특히 단독으로 투여했을 때보다 혼합투여가 더 우수한 효과를 나타내 문헌과 임상에서의 결과를 뒷받침

하는 의미있는 결과로 사료된다.

에서도 痴呆 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用이 뒤따라야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

參考文獻

βAPP의 CT105발현 신경아세포암 세포주를 이용한 석창포와 원지 혼합물(RPAG), 원지(RP) 및 석창포(RAG)의 수추출물로부터 치매와 동일한 신경세포의 세포사를 유도에 대한 억제와 신경세포 보호효과를 규명하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 원지(RP), 석창포(RAG)의 단독 및 혼합 추출액(RPAG) 모두는 신경세포 증식과 신경돌기의 형태학적인 변화를 유도하며 특히 단독 투여때보다 혼합 수추출액(RPAG)이 더 신경세포의 재생을 강하게 유도하였다.

2. 원지(RP), 석창포(RAG)의 단독 및 혼합 추출액(RPAG)은 모두 CT105에 의한 신경세포의 사멸 현상을 저해하였다.

3. CT105에 의한 iNOS에 의한 NO생성에서 원지(RP)와 석창포(RAG)의 수추출물의 단독 투여때보다 혼합 수추출액(RPAG)의 투여가 더 강하게 NO생성을 억제하였다.

4. 혼합물의 수추출액(RPAG)이 neurite out-growth length의 길이신장을 가장 증가시키고 그 다음은 석창포,(RAG), 원지(RP) 순이다.

5. 원지(RP), 석창포(RAG)의 단독 및 혼합 수추출액(RPAG) 처리군 모두는 APP, Caspase-3 그리고 iNOS단백질의 발현은 감소하고, p42/44 그리고 MAPK단백질의 발현은 증가되는 것으로 보아 각각의 약물뿐만 아니라 혼합 수추출물이 신경세포의 증식을 유도하여 세포사의 진행을 억제하고 보호하는 역할을 수행한다고 볼 수 있다.

以上과 같은 結論으로 볼 때 석창포 수추출액(RAG)과 원지 수추출액(RP)보다는 혼합 수추출액(RPAG)이 βAPP의 CT105발현 신경세포암 세포주의 세포사를 더욱 강하게 效果的으로 抑制하고 신경세포를 보호한다는 것을 알 수 있다. 앞으로 좀 더 다양한 한약물의 항치매 연구가 시행되어 실제 임상

1. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
2. 대한신경정신의학회 편 : 신경정신과학, 서울 한나 의학사, pp.211-220, 1997.
3. 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, 593(2):299-303, 1992.
4. Dickson DW, Ksiazek-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH : Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein: identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site, Acta Neuropathol (Berl), 84(6):596-605, 1992.
5. 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.
6. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA : Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250: 279-282, 1990.
7. Fukuchi K, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Kamino K, Ogburn CE, Furlong CE, and Martin GM : Overexpression of a C-terminal portion of the beta-amyloid precursor protein in mouse brains by transplantation of transformed neuronal cells, Exp Neurol 127: 253-264, 1994.
8. Kim SH, and Suh YH : Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, J. Neurochem 67: 1172-1182, 1996.
9. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH

- and Suh YH : Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein(β APP) in PC12 cells by nicotine, *Molecular Pharmacology* 52: 430-436, 1997.
10. Fraser S, Suh YH, Chong YH, and Djamgoz MA : Membrane currents induced in *Xenopus* oocytes by the carboxyl terminal fragment of the amyloid precursor protein, *J. Neurochem* 66:2034-2040, 1996.
 11. Suh YH, Chong YH, Kim SH, Choi w, Kim KS, Jeong SJ et al. : Molecular physiology, biochemistry and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein(APP), *Annals of N Y Acad Sci* 786:169-183, 1996.
 12. Hartell NA, and Suh YH : Effects of fragments of β -amyloid precursor protein on parallel fiber-purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum, *J. Neurochemistry* 74(3):1112-1121, 2000.
 13. Matsmoto A and Matsumoto R : Familial Alzheimer's disease cells abnormal abnormally accumulate beta-amyloid harbouring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid, *Eur J Biochem* 225:1055-1062, 1997.
 14. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G et al. : Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein, *Nature* 387(6632):500-505, 1997.
 15. 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*, 9(17):3875-9, 1998.
 16. 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* 10:113-116, 1999.
 17. 전통의학연구소 편 : 동양의학대사전, 서울, 성보사, pp.1083, 1682- 1683, 2000.
 18. 全國韓醫科大學 本草學教材共編著 : 本草學, 서울, 永林社, pp.496-497, 523- 524, 1991.
 19. 康永祿 : 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, p.1, 1997.
 20. 朴大圭 : 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制作用에 關한 研究, 成均館大學校 大學院 博士學位論文, 1983.
 21. 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, 10(1):95-108, 1999.
 22. 김지혁·황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327- 330, 663-664, 1992.
 23. 정창환, 정민환, 목인희 : 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향, *한국뇌학회지*, 1(1):45-52. 2001.
 24. Games D, Khan KM, Soriano FG, Keim PS, Davis DL, Bryant K, Lieberburg I : Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injection in rat brain, *Neurobiol Aging*, 13(5):569-576, 1992.
 25. Podlisny MB, Stephenson DT, Frosch MP, Tolan DR, Lieberburg I, Clemens JA, Selkoe DJ : Microinjection of synthetic amyloid beta-protein in monkey cerebral cortex fails to produce acute neurotoxicity, *Am J Pathol*, 142(1):17-24, 1993.
 26. Clemens JA, Stephenson DT : Implants containing beta-amyloid protein are not neurotoxic to young and old rat brain, *Neurobiol Aging*, 13(5):581-586, 1992.
 27. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. : Amyloid beta-peptides is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature*, 24:359(6393):322-325, 1992.
 28. Tamaoka A, Kalaria RN, Lieberburg I, Selkoe DJ : Identification of a stable fragment of the Alzheimer amyloid precursor containing the beta-protein in brain microvessels, *Proc Natl Acad Sci USA*, 15:89(4):1345-1349, 1992.
 29. Iverfeldt K, Walaas SI, Greengard P : Altered processing of Alzheimer amyloid precursor protein in response to neuronal degeneration, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1:90(9):4146-4150, 1993.

30. Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee g, Fritz LC, Oltersdorf T : Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(19):7341-7345, 1988.
31. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K : Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease, *EMBO J*, 7(4):949-957, 1988.
32. Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K : Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid precursor, *Nature*, 11;347(6293):566-569, 1990.
33. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL : Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease, *Science*, 281245(4916):417-420, 1989.
34. Fukuchi K, Kamino K, Deeb SS, Smith AC, Dang T, Martin GM : Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity, *Biochem Biophys Res Commun*, 15;182(1):165-173, 1992.
35. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM : Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein, *Brain Res Mol Brain Res*, 26(1-2):207-217, 1994.
36. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C, Vaught JL, Neve RL : Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain, *Proc Natl Acad Sci USA*. 15;89(22):10857-10861, 1992.
37. Lacey-Casem ML, Oster-Granite ML : The neuropathology of the trisomy 16 mouse, *Crit Rev Neurobiol*, 8(4):293-322, 1994.
38. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, and Rowan MJ : Block of late-phase long-term potentiation in rat hippocampus in vivo by amyloid precursor protein fragments, *Neuroreport* 8:3213-3217, 1997.
39. 최세훈 : 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구, 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2001.
40. 라종철 : 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화와 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2002.
41. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH : Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity, *FASEB J*, Aug;14(11):1508-17, 2000.
42. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, Choi SH, Chang K, Rah J, Koo J, Kim E, Suh : Effects of nicotine on APP secretion and Abeta-or CT(105)-induced toxicity, *Biol Psychiatry*, 1;49(3):240. 2001.
43. Suh YH, Kim HS, Lee JP, Park CH, Jeong SJ, Kim SS, Rah JC, Seo JH, Kim S : Roles of A beta and carboxyl terminal peptide fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer disease, *J. Neural Transm Suppl* 58:65-82, 2000.
44. 최혁, 김상호, 이대용, 안대중, 강형원, 류영수 : pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 동의생리병리학회지, 17(4):1037-1049, 2002.
45. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수 : 원지와 석창포의 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 동의생리병리학회지. 17(4):1037~1049. 2002.
46. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.144, 370-371, 1995.
47. 劉文泰等纂 : 本草品彙精要, 北京, 人民衛生出版社 p.252, 1982.
48. 陳存仁 : 한방의약대사전(IV), 서울, 東都문화사 pp.72-75, 1984.