

pCT105로 원격 유도된 PC12 세포에서 조구등으로부터 분리한 corynoxine의 항치매 효과

강형원* · 김상태¹ · 류영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 1: 주암생명공학연구소

The Effects of Anti-Alzheimer on CT105-induced PC 12 Cells by Corynoxine Isolated from *Uncariae Ramulus et Uncus*

Hyung Won Kang*, Sang Tae Kim¹, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: JuAm of Research Institute Bioscience & Biotechnology

In this study, we investigated that the effects of corynoxine on the apoptosis by inducible CT105 in PC 12 cells and neuronpathogenic agent as CT105 confirmed with apoptosis, DNA fragmentation, neurite outgrowth and immunocytochemistry analysis This study examines whether corynoxine have an anti-alzheimer agent by inhibition of apoptosis by CT105 and induces neurite outgrowth. Cytotoxicity was assessed in PC12 cell cultures by DNA fragmentation and measuring lactate dehydrogenase (LDH) in the culture media. The treatment of corynoxine in exposure of cultures to CT105 and provided complete protection against cytotoxicity. CT105-induced cytotoxicity was blocked by apoptotsis, repaired by DNA fragmentation, neurite outgrowth and exposure to CT105 expression and regenerated with neurite outgrowth and immunocytochemistry by corynoxine. These results indicate that in neuronal cell cultures, damage of T105, repaired excitotoxicity by corynoxine and CT105-induced cytotoxicity is blocked primarily by the activation of anti-apoptosis.

Key words : corynoxine, *Uncariae ramulus et uncus*(釣鉤藤), cytotoxicity, apoptosis, CT105, APP, Alzheimer disease

서 론

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 고위대뇌피질 기능의 장애가 있는 것을 말한다¹⁾. 이 중 Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 腦위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로^{1,2)}, 腦 안에 신경반(neuritic plaque, NP)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)의 구조가 침착되어지며 신경반 주변에 활성화된 교세포들이 발견되어지는 병리학적 특징을 가진다^{2,4)}.

AD의 대표적인 원인설로 현재까지 정확한 병리학적 기전이

아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein (APP)으로부터 잘려 나온 Beta amyloid protein (Aβ)이 AD 환자의 신경퇴행에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 그러나 Aβ의 침착과 환자에게서 보이는 인지기능의 저하 현상과는 모순점이 많다는 연구결과들의 발표와 함께 APP의 또 다른 대사물이 치매증상의 발병과 관련이 되어 있을 가능성이 제기되어왔다^{8,9)}.

최근에는 APP의 다른 대사산물 특히 γ-secretase에 의하여 대사되어 Aβ가 되기 직전의 물질로 추정되는 C단 단백질(carboxy-terminal 105 amino acid fragment of APP, CT105)이 PC12 cells¹⁰⁾, primary cortical neurons¹¹⁾, *Xenopus oocytes*^{12,13)}, Purkinje cells¹⁴⁾ 등의 진핵세포와, 형질환 동물모델^{15,16)}에서 신경독성을 발휘하며, 또한 APP transfection하여 과발현시킨 경우에 C단 단백질이 많이 검출되는 것이 보고 되었다¹⁷⁾. 또한 CT105는 Calcium homeostasis를 손상시키지만 Aβ는 그렇지 않다고 하여

* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대 산본한방병원

· E-mail : antialz@empas.com · Tel : 031-390-2762

· 접수 : 2004/04/16 · 수정 : 2004/05/21 · 채택 : 2004/06/28

기존의 Aβ보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다^{18,19)}.

이어서 최²⁰⁾는 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH(Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 리²¹⁾는 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 염증반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하는 등 CT105와 AD와의 관련성뿐만 아니라 치료제 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다^{18,22-24)}.

최근 韓醫學에서도 癩癩에 대한 연구가 문헌적^{25,26)}, 임상적 연구^{27,28)}이외에 관련 원인설에 기초를 둔 실험적 연구가 다양하게 진행되어 왔다²⁹⁻³⁵⁾. 즉 단일약물²⁹⁾ 및 복합처방³⁰⁾을 이용하여 腦의 老化和 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³¹⁾와 腦성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1 및 Aβ의 생성의 억제에 관한 연구^{32,33)}가 보고되었으며, 최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현세포주에서 주로 한약처방에 대한 연구^{34,35)}와가 주를 이루었고, 단일약물이나 복합처방에서 유효성분을 분리하여 연구한 보고는 없다.

본 연구에 사용된 鈎鈎藤은 性味가 甘 · 苦 · 微寒 · 無毒하고 효능이 淸熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩 등의 諸症狀을 치료하고^{36,37)}, 주요 성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxindole계 alkaloid 類 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3-α-dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인 되었다³⁸⁾. 鈎鈎藤의 수추출물은 βAPP 과발현에서 신경세포사 억제작용이³⁹⁾, 백서에 경구 투여된 에틸아세테이드 분획은 항경련 작용에 도움이 된다는 사실⁴⁰⁾이 증명되었으나, 아직 조구등의 유효성분을 분리하여 pCT105로 유도된 PC12 세포에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고 된바 없다.

이에 저자는 임상에서 뇌신경계 질환에 다용되는 鈎鈎藤으로부터 분리한 corynoxine의 항치매 효과를 규명하기 위하여 APP의 pCT105로 유도된 PC12 세포에서 치매와 동일한 신경세포의 세포사 유도에 대한 억제 효과를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 시약 및 재료

1) 시약

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin (Gibco BRL), Ethanol (Merck, Germany), Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex kit(ABC: Vector Lab, USA)에서 3,3'-diaminobenzidine (DAB : Sigma)에서 구입하였으며 그 외 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) 등을 사용하였다.

2) 조구등의 corynoxine 조제

본 實驗에 使用한 鈎鈎藤(Uncariae Ramulus et Uncus) 5 kg을 원광대 산본한방병원에서 구입 엄선하여 잘게 분쇄한 후 75 % 메탄올(MeOH) 10 L을 넣고 4회이상 12시간동안 용매 추출하는 데, 이때 메탄올의 사용량은 조구등 부피대비 10배가 적당하였다.상기에서 분리된 메탄올추출액 1.5 kg을 50~60 mmHg 및 50 ~ 60℃의 조건하에서 증발 농축하여 추출액에 클로로포름:에테르 (50:50) 2L를 4회추출하여 메탄올 분획물(URM) 800 g을, 클로로포름 340 g을 에테르분획물(URE) 350g을 용매분획하였고 특히 칼럼크로마토그래피용 silica gel(6x100 cm)에 gel(70-230 mesh: ASTM Art.7734, Merck)를 충전하여 클로로포름/메탄올(CM)으로 약칭하여 20:1용매를 출발로 CM 10:1->5:1->3:1->2:1용매를 차례로 용출시켰다. 신경세포 사멸억제 및 LDH효소억제분석을 수행하여 fra1.에서는 하이드로카본화합물(0.5 mg)이 fra5에서 CM 10:1용출액에서 화합물 UREA(corynoxine:0.23 mg)가 CM 5:1에서는 UREB(rhynchophylline:0.18 mg)가 CM 3:1용출액에서는 UREC (isocorynoxine:0.25mg)가 CM 2:1의 용출액에서는 URED (isorhynchophylline:0.21 mg)분획물이 회수되었다

3) 실험동물

본 연구는 실험동물은 (주)중앙실험동물에서 분양받은 체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 대상으로 실험에 실시하였다. 실험 당일까지 고휘사료(항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 사육실 내를 실온 20±2℃, 습도 40~60 %로 유지하면서 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) CT 105 형질조합 시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 PC12는 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 pCT105의 플라스미드를 본 실험에 사용세포주를 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 B으로 lipofectin 10μl와 SFM 100μl을 혼합하여 45분간 반응시킨다음 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-418 450 μg/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) CT105에 의한 신경 세포사유도

배양한 상기 clone된 세포에 정상군, CT105군, 및 CT105과

corynoxine 처리군을 구분하여 corynoxine 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가하고 조사한 후 가장 강한 세포사 억제효과를 가지는 농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 24시간 처리하였다. CT105 유도발현 PC12 cell lines를 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물군의 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하여 상기 세포주의 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 5% FBS가 함유한 RPMI medium, penicilin / streptomycin이 함유한 배지를 37°C에서 24시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개정도 세포수를 촬영하여 조사하였으며 세포사의 유도양상을 보기 위해 세포사가 억제되는 농도를 선정하여 조사하였다.

3) LDH assay에 의한 신경세포생존율

corynoxine을 처리후 배양액 20 μl 를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1mg/ml)를 20 μl 씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약 (color reagent, Sigma 505-2)를 20 μl 씩 가한후 상온에서 20분간 혼합다음 0.4N NaOH를 100 μl 씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합후 ELISA reader로 흡광도(A570/A630)를 측정하였다.

4) DNA fragmentation 분석

CT105 유도발현 PC12 cell lines를 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 corynoxine의 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 DNA fragmentation를 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μl 를 첨가한 후 30 min간 얼음에 유지한 다음 proteinase K (100 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가하고 50°C에서 5시간동안 항온조에 유지한다음 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합후 상기와 같이 15,000 rpm에서 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) neurite outgrowth의 신장길이 측정

상기 방법에 의하여 정상군, CT105 유도군 그리고 corynoxine 처리군을 PC12 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 약물군의 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth 신장유무를 현미경하에서 관찰하였다.

6)면역조직화학분석법

흰쥐의 해마부위를 CT105에 의해 세포사가 일어난 세포잔사를 모아서 CT105의 세포사 능력을 분석하고 약물의 신경세포의 세포사 억제능력을 파악할 목적으로 흰쥐의 두개골을 절개하기 위해 동물을 ketamin으로 마취한 다음 절개한 후 해마부위에 세포잔사를 투여하고 신경세포의 양상을 조사하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. 2주간 약물을 경구투여를 실시한 후 흰쥐를 교살하여 해마부위를 formalin으로 고정한 후 5 μm 두께로 microtome으로 절단하고 연속절편을 4°C에서 2N HCl용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하고 0.1M

borate완충액을 처리하여 안정시킨 후 비특이적인 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K (DAKO, Denmark)가 포함된 0.5% bovine serum albumin을 1시간동안 반응시켰다. 다음 1차항체인 APP는 4°C 냉장실에서 12시간동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex (ABC: Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl완충액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후 광학현미경에서 관찰하였다.

7) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 세포의 대조군은 백분율로 (% Control)로 표시하였으며 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의한 P<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

성 적

1. CT 105과발현 세포주에 의한 세포형태학적 영향

치매는 신경세포가 세포사를 진행하기 때문에 일어나는 신경계의 퇴행화의 일부분으로 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 광학현미경하에서 관찰하였다. Fig. 1.에서 UREA는 CM 10:1용출액내에서 분리된 corynoxine 0.23 mg이고 UREC는 CM 3:1용출액에서 분리된 isocorynoxine 0.25 mg이다. Fig. 1.에서처럼 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 유도되었는데 세포사에 관련한 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였으나 corynoxine 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 신경돌기가 출현되는 것을 보아 신경세포의 세포사의 억제내지 재생이 가능하리라 사료되고 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 신경세포의 신경돌기가 정상적으로 유도되는 것을 보아 corynoxine이 신경세포의 생존이 확인됨과 동시에 신경돌기의 출현을 유도하였다. 따라서 CT105에 의한 신경세포사의 양상을 corynoxine에서 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보임을 사료된다(Fig. 1).

2. CT105발현으로 인한 신경세포의 세포사의 영향

상기 방법에 의한 신경세포의 세포사가 corynoxine에 의해 얼마나 억제시키는지 세포사의 ratio를 조사한 결과 Fig. 2.에서처럼 신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사는 정상군경우 5 \pm 2.5에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 약 92 \pm 2.0이고, CT105와 corynoxine(50 $\mu\text{g/ml}$)처리군에서는 약 16 \pm 2.5이었는데 이는 치매의 발병과정에 유도되는 CT105에서 corynoxine이 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보임을 사료된다(Fig. 2).

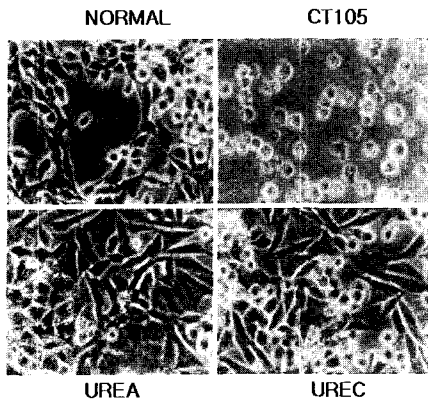


Fig. 1. Morphological pattern by corynoxeine extract treatment. Survival cell of CT105 expressing PC12 cells were observed by Morphological characteristic of survival cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by phase-microscopy.

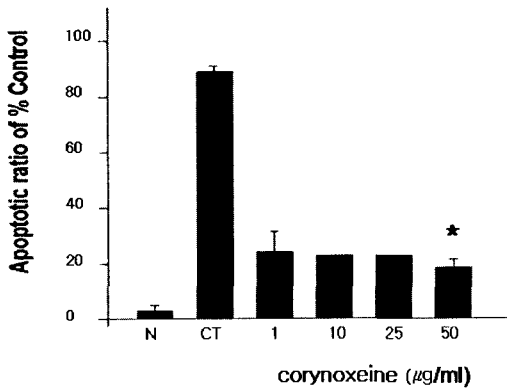


Fig. 2. Inhibitory effect of apoptotic ratio by corynoxeine extract treatment. Apoptotic ratio of CT105 expressing PC12 cells were observed by ELISA reader and phase-microscopy in medium, induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments.

3. CT 105과발현 세포주에 의한 LDH활성에 미치는 영향

치매는 신경세포의 세포사가 발생하기 때문에 일어나는 신경계의 퇴행화의 일부분으로 보통 신경세포의 세포사는 중추신경이나 척추신경의 운동신경 및 감각신경의 장애를 초래하는데 치매에 의한 신경세포의 세포사는 곧 언어장애와 운동장애로 심각한 생활에 장애를 초래한다. 따라서 신경세포의 최종적인 현상으로 βAPP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 Fig. 3에서처럼 정상군에 비해 βAPP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사는 정상군 경우에는 5±1.5에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 약 89±5.0이고, CT105과 corynoxeine처리군(50µg/ml)에서는 14±1.5이었는데 이는 치매의 발병과정에 유도되는 CT105발현에서 corynoxeine에서 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 유효성분이 함유함이 사료된다(Fig. 3).

4. CT 105과발현 세포주에 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 corynoxeine 50 µg/ml농도로 해서 6 well에 103 cell세포수의 하룻밤 배양한 βAPP의 CT105발현 세포를 분주하여 세포사를 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과 Fig. 4.에서처럼 대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 corynoxeine의 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 감소하고 50 µg/ml 이상처리에서부터 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸되는 경향을 보임으로 해서 corynoxeine이 βAPP의 CT105발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료되어진다(Fig 4).

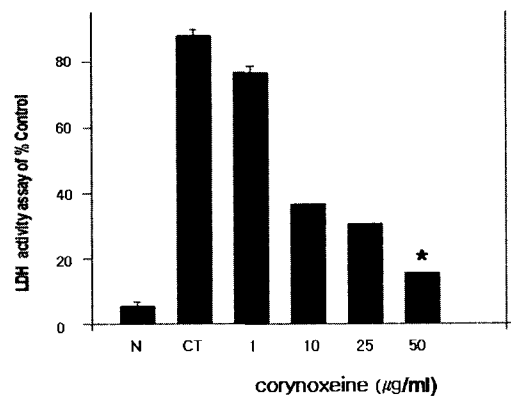


Fig. 3. Survival effects by corynoxeine extract treatment on LDH activity. Survival cell ratio of CT105 expressing PC12 cells were observed by Morphological characteristic of survival cells and induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detect on kit from ELISA reader.

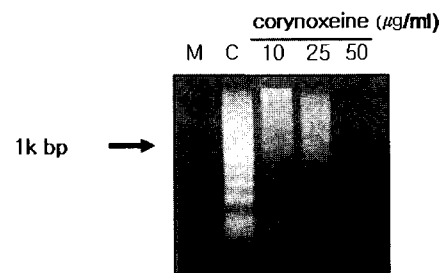


Fig. 4. Effects of corynoxeine extract treatment on DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. M, DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 10, 25 and 50 µg/ml of Sesim-tang for 12 h. Cells were incubated for 12hrs necessary to initiate DNA fragmentation. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

5. Neurite outgrowth 길이 변화에 미치는 영향

신경세포의 신경돌기 신장 상해는 세포사에 영향을 주기 때문에 CT105로 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 Fig. 5.에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나 (Fig. 5), CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우는 신경이 억제되는 상태로 나타내고 있으며 corynoxeine 25 µg/ml 이상으로 처리시 신경돌기가 잘 발달되어 자라게 되는 양상을

보여주고 있다. 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과, Fig. 6.에서처럼 대조군을 0.6 ± 0.5 로 환산시 정상군은 4.5 ± 4.5 이고 corynoxeine의 농도를 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.5 ± 0.25 2.8 ± 2.5 4.25 ± 1.5 의 수치를 보였는데, corynoxeine의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 길이를 감소시켜서 신경기능을 상실하게 되는데 아마도 corynoxeine은 이런 CT105에 의한 신경돌기의 신장을 억제시키는 현상을 저해시키거나 신장을 촉진하는 유효 성분이 함유할 것으로 사료된다.

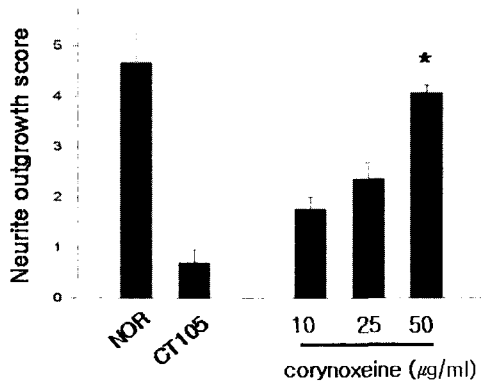


Fig. 5. Corynoxeine extract treatment induces neurite outgrowth. CT105 expressing PC12 cells were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and corynoxeine extract. neurite outgrowth was visualized by phase contrast microscope.

6. 면역조직화학 분석법에 의한 단백질발현에 미치는 영향

corynoxeine이 CT105에 의해 신경세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 DNA의 유전적인 분해 내지 전사 수준에서 조절하는지 βAPP 의 CT105를 해마부위에 투여한 후 일정시간 경과후 corynoxeine을 경구투여한 다음 해마를 면역조직화학분석법에 의해 알아본 결과 Fig. 6.에서 정상군경우는 해마 조직에서 APP발현이 약하게 유도되는 반면 CT105를 처리군에서는 강하게 갈색으로 염색된 것으로 보아 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 사료되고 corynoxeine을 50 mg/ml 농도로 경구 투여한 군에서는 신경세포의 세포사에 관여하는 APP의 발현이 감소되는 경향을 보였다. 조구등의 corynoxeine이 해마내 CT105에 의해 염색반응에 관여하는 양상을 억제시키므로 해서 신경세포의 파괴를 억제하여 신경보호 및 재생을 촉진하는 성분이 함유될 것으로 사료된다.

고 찰

痴呆는 전반적인 인지기능의 장애를 주증상으로 하며, 보통 만성 또는 진행성 腦 질환과 같은 병적인 老化로 인한 腦 증후군으로 1) 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.^{1,2)}

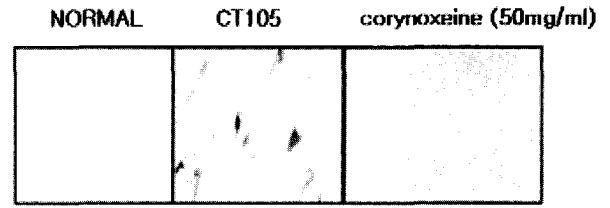


Fig. 6. The immunohistochemical stain for APP expression in hippocampus tissue from CT105-induced rat. The noticeable increase APP positive tissues (middle panel) in region of hippocampus brains were seen($\times 200$).

최근 alzheimer's disease(AD)는 가족성 AD (Familial Alzheimer's disease, FAD)와 산발성 AD (Spradic Alzheimer's disease, SAD)로 크게 분류되어지는데, 전체 AD 환자의 5-10% 정도를 차지하는 FAD의 경우 원인유전인자로 알려진 presenilin 1 (PS1), amyloid precursor protein (APP), 그리고 presenilin 2 (PS2)에 돌연변이가 일어났을 경우 100% AD로 진단되는 것으로 보고 되었다. AD 환자의 대부분을 차지하는 SAD의 경우는 현재까지는 특정 유전자의 돌연변이에 의해 발병하는 경우는 발견되지 않았으며 apolipoprotein E (ApoE), α -2-macroglobulin (A2M)과 같은 위험인자는 알려져 있으나 FAD에서 보이는 것과 같은 전체의 경우를 설명할 수 있는 유전학적 근거들은 보고된 바가 없다. AD의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되어지는 노인반(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실용치처럼 보이는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)을 들 수 있다⁵⁻⁸⁾. 노인반은 신경반(Neuritic plaques) 또는 아밀로이드 반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 $\text{A}\beta$ 를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교 세포(glial cell)와 얽히게 된다. 이러한 병리학적 특징은 FAD와 SAD의 모든 경우에 다 나타나며 그 결과 신경세포의 사멸에 의해 결국 인지기능의 손상을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다. APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 pathway에 의해 진행되는 데, 즉 α -secretase에 의해서 $\text{A}\beta$ domain 안쪽이 잘리며 amino terminal이 세포 밖으로 분비된다. 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고 되었다. 한편 alternative processing pathway에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β -secretase 등에 의해 $\text{A}\beta$ 의 N terminal 주위가 잘라지며 $\text{A}\beta$ sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 anchor되어 남는다. 이 C단 단백질 중 일부는 $\text{A}\beta$ 전체 sequence를 가지고 있으며 γ -secretase에 의해 잘려져 $\text{A}\beta$ 를 형성하는 것으로 생각한다. 하지만 이상과 같이 in vitro에서 $\text{A}\beta$ 의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, $\text{A}\beta$ 가 독성을 나타내기 위해서는 20 μM 이상의 고농도가 필요하고 일부 연구에서는 $\text{A}\beta$ 의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데, 특히 in vivo 실험에서는 $\text{A}\beta$ 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 중간대사산물이 관

여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 Aβ의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내와 배양액¹⁵⁾에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 뇌 부위에서도 발견되었다. 또한 이 단백질은 in vitro에서 또는 세포에 transfection시켰을 때 amyloid와 유사한 aggregate를 형성할 수 있다. 실제로 C단 단백질을 여러 종류의 세포주에 transfection시킬 경우 세포독성을 일으키는데, 특히 이러한 C단 단백질의 transfection시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다. 더구나 이렇게 C단 단백질에 transfect된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고 됨으로써 실제 in vivo에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다. 미국의 Neve 박사 group에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고인지기능의 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^{10,11)}에서 직접적인 신경독성을 야기한다고 하였고, Xenopus oocytes^{12,13)}과 Purkinje cells에서도 길고 비선택적인 내부전류를 유도한다 하였으며, 그리고 in vivo에서 해마(hippocampus)에 있는 long-term potentiation(LTP)를 차단한다고 보고하였다. 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 homeostasis을 손상시키지만, Aβ는 그렇지 않다고 하여^{18,19)} 기존의 Aβ보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다. 또한 가장 최근에 최 등²⁰⁾은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH(Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등²¹⁾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^{18, 22-24)}.

韓醫學에서 痴呆는 漢代《華佗神醫秘傳·治痴呆神方》에 처음으로 언급되었다는 기록이 있고 그 후 明代 張의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 “痴狀證，凡平素無痰而或以鬱結，或而不遂，或而思慮，或而疑貳 或而驚狂而漸致痴，言辭顛倒，舉動不經，…… 此其逆氣在心，或肝膽二經……” 이라 하여 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 痴呆의 病因·病機, 그리고 治法·豫後에 대해서 설명하였으며, 清代 陳에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였고, 歷代醫書에서 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 概念이다^{25,26)}. 痴呆의 主要 病因病機로는 鄭 등²⁶⁾이 痰瘀, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등은 年老氣衰, 久病, 或은 內風卒

中, 外傷頭腦, 或은 邪毒內竅 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀을 發한다고 하였다. 한편 陳은 呆病의 主要 原因을 痰으로 보았고, 최근 張도 呆從痰治으로 治痰하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였다. 이와 같이 腦의 退行性 病變과 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 臟腑의으로는 肝腎 不足이 重要하게 作用하고 痰·瘀血의 生成이 腦에 停滯됨으로 인해 各種 症狀이 나타나는 것임을 알 수 있다. 최근 姜²⁵⁾은 痴呆의 병리학적 연구에서 痴呆의 老化和 遺傳의 要因이 韓醫學의 臟腑의으로는 腎虛와 밀접한 關係를 맺고, Aβ와 tau 단백질과 같은 腦 속의 비정상적인 plaque는 痰濁과 瘀血 등의 韓方的 病理產物과 관련된다고 하였다.

최근 韓醫學에서도 痴呆에 대한 연구가 관련 원인설에 기초를 두고 다양하게 진행되고 있다. 백 등²⁹⁾이 녹차 등의 단일약물을, 복합처방에 대한 연구는 정³⁰⁾이 左歸飲, 右歸飲 등을 이용하여 腦의 老化和 연계하여 老化를 유발하는 항산화작용에 대한 연구를 활발하게 진행하여 왔고, 황³¹⁾은 nbM을 전기적으로 손상시켜 유발된 AD모델 白鼠의 학습과 기억에 대한 Morris water maze와 radical arm maze과제를 이용한 실험에서 麝香蘇合元이 白鼠의 학습과 작업기억의 결함을 개선시키는 유의성은 없으나 경향성은 있는 것으로 보고하였으며, 염증매개물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 역할을 하는 것에 근거를 둔 실험에서는 洗心湯³²⁾, 星香正氣散加蒲公英³³⁾이 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF-α, IL-1 및 Aβ의 생성을 억제하는 것으로 보고하였다.

최근에는 AD의 원인인 아밀로이드 전구단백질과 presenilin 유전자의 과다 발현에 대한 연구에서 益精地黃湯³⁴⁾, 導痰益氣活血湯³⁵⁾이 PC12 cell에서 PS-1, PS-2 및 APP 과잉발현 억제능력과 항콜린작용을 보이는 것으로, 鈞鈞藤³⁹⁾ 수추출물이 βAPP 과 발현에서 신경세포사 억제작용이 있는 것으로 보고한 연구는 있으나, 조구등의 유효성분을 분리하여 pCT105로 유도된 PC12 세포에서의 항치매 효과에 관한 연구는 보고 되지 않았다.

본 연구에 사용된 鈞鈞藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 鈞鈞 혹은 華鈞藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 찌서 건조한 약재로서 鈞藤, 鈞藤, 鈞鈞, 芎藭, 嫩鈞藤, 雙鈞藤, 鈞屯 등의 이명을 가지고 있다^{36,37)}. 그리고 性味가 甘·苦·微寒·無毒하고 효능이 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩 등의 諸症狀에 사용되어 왔다^{36,37)}. 주요 성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxyindole계 alkaloid 類, 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3-α-dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인 되었다³⁸⁾, 생리활성의 연구로는 alkaloid 성분의 혈압강하 혹은 혈관확장 작용에 관하여 보고되었다⁴¹⁾. 그 외 김⁴³⁾은 鈞鈞藤의 신경계통의 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣 作用, 李⁴⁴⁾는 鈞鈞藤의 phospholipase Cγ1 저해 성분과 그 항암 효과에 대해 보고한 바가 있으며, 강⁴⁵⁾은 鈞鈞藤 추출물이 H₂O₂의 산화적 손상으로부터 신경세포와 총단백질의 양적 증가와 lipid peroxidation과 LDH 활성을 유의하게 감소시킴으로서 척수감각신경절 세포 손상에 효과적으로 작용한다는

것을 보고한 바 있으며, 실제 임상에서도 鈎鈎藤은 고혈압 頭暈이나 目眩 및 神經性 頭痛 등의 치료에 頻用할 뿐만 아니라 척수 및 말초신경의 손상에 의한 마비와 뇌졸중 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다^{36,37}.

이에 著者는 조구등에서 분리한 corynoxine의 항치매 효과를 규명하기 위하여 pCT105 과발현 PC12세포주에서 세포사 유도의 억제효과에 대한 형태학적인 변화, 신경세포사, DNA fragmentation 억제효과, neurite outgrowth length 측정, 면역조직화학분석법을 이용한 단백질 발현 억제에 대한 현미경적 관찰 등으로 분석하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 광학현미경하에서 관찰한 결과 Fig. 1.에서처럼 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 유도되었는데 세포사에 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였으나 corynoxine 25 μ g/ml 농도에서 신경돌기가 출현되는 것을 보아 신경세포의 세포사의 억제내지 재생이 가능하리라 사료되고 50 μ g/ml 농도에서 신경세포의 신경돌기가 정상적으로 유도되는 것을 보아 corynoxine이 신경세포의 생존이 확인됨과 동시에 신경돌기의 출현을 유도하였다. CT105발현에 의한 신경세포의 세포사는 정상군 경우 5 \pm 2.5에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 정상군 경우 5 \pm 2.5에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 약 92 \pm 2.0이고, CT105와 corynoxine 50 μ g/ml 처리군에서는 약 16 \pm 2.5이었는데 이는 치매의 발병과정에 유도되는 CT105에서 corynoxine이 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보임을 사료된다. 따라서 신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 정상군 경우에는 5 \pm 1.5에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 약 89 \pm 5.0이고, CT105과 corynoxine 50 μ g/ml 처리군에서는 14 \pm 1.5이었는데 이는 치매의 발병과정에 유도되는 CT105발현에서 corynoxine에서 치매진행과정을 억제하거나 지연시키는 유효성분이 함유함을 나타낸다.

세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있기 때문에 corynoxine 50 μ g/ml 농도로 해서 6 well에 103 cell 세포수의 하룻밤 배양한 β APP의 CT105발현 세포를 분주하여 세포사를 억제되는 정도를 세포 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과 Fig. 4.에서처럼 대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 corynoxine의 농도가 증가할수록 각 lane에 보이는 band가 감소하고 50 μ g/ml 이상처리에서부터 ladder가 강하게 감소하여 거의 소멸되는 경향을 보임으로 해서 corynoxine이 β APP의 CT105발현에 의한 세포사를 억제한다고 사료되어진다. 한편 이런 결과를 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과, 대조군을 neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과, Fig. 6.에서처럼 대조군을 0.6 \pm 0.5로 환산시 정상군은 4.5 \pm 4.5이고 corynoxine의 농도를 10, 25, 50 μ g/ml로 증가하면 할수록 수치가 각각 약

1.5 \pm 0.25 2.8 \pm 2.5 4.25 \pm 1.5의 수치를 보였는데, corynoxine의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 CT105로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 길이를 감소시켜서 신경기능을 상실하게 되는데 아마도 corynoxine은 이런 CT105에 의한 신경돌기의 신00장을 억제시키는 현상을 저해시키거나 신장을 촉진하는 유효 성분이 함유할 것으로 사료된다. 조구등의 corynoxine이 CT105에 의해 신경세포사에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향이 해마조직에서 APP발현이 약하게 유도되는 반면 CT105를 처리군에서는 강하게 갈색으로 염색된 것으로 보아 신경세포의 파괴가 유도된 것으로 사료되고 조구등의 corynoxine을 50 μ g/ml 농도로 경구 투여한 군에서는 신경세포의 세포사에 관여하는 APP의 발현이 감소되는 경향을 보였다. 조구등의 corynoxine이 해마내 CT105에 의해 염증반응에 관여하는 양상을 억제시키므로 해서 신경세포의 파괴를 억제하여 신경보호 및 재생을 촉진하는 성분이 함유될 것으로 사료된다.

이상과 같이 조구등의 corynoxine이 pCT105 과발현 신경아세포주에서 細胞死 誘導에 대한 뚜렷한 抑制效果를 보여 $A\beta$ 침착에 따른 腦의 퇴행성 변화를 지연시킬 수 있을 것으로 추정되며, 향후 조구등의 corynoxine을 이용하여 痴呆 원인 인자를 연결한 지속적인 분자생물학적인 研究를 시행하여 AD 등의 다양한 腦疾患에 臨床應用으로 접목 可能할 것으로 思料된다.

결론

β APP의 CT105발현 PC12 세포주를 이용한 조구등의 corynoxine으로부터 동일한 신경세포의 細胞死 유도에 대한 억제 및 신경세포 보호 효과를 규명하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

조구등의 corynoxine은 β APP의 CT105발현에 의한 신경세포 세포사 유도를 형태학적으로 抑制시켰다. 조구등의 corynoxine은 β APP의 CT105발현에 의한 세포 생존율을 증가시켰다. 신경세포의 LDH의 활성도는 조구등의 corynoxine이 50 μ g/ml 농도에서 약 14 \pm 1.5%를 나타냄으로 생존유도 효과를 나타내었다. DNA fragmentation은 조구등의 corynoxine이 50 μ g/ml에서 완전히 억제하므로 세포생존을 촉진함을 나타내었다. 조구등의 corynoxine은 neurite outgrowth 신장을 촉진시켰다. 조구등의 corynoxine이 CT105에 의해 環취의 해마부위 APP 단백질발현은 50 mg/ml 농도이상에서 완전히 억제하여 신경세포 생존을 증가시키는 것으로 보아 본 약물이 신경세포의 생존도를 증가시켜서 세포사의 진행을 억제하여 신경세포의 보호기능을 나타낸 것으로 사료된다.

이상과 같은 결론으로 조구등에서 분리추출한 corynoxine이 β APP의 CT105발현 PC12 세포주의 세포사를 효과적으로 억제하고 신경세포를 보호하는 것을 알수있었으며, 좀 더 과학적으로 치매원인 인자를 연결한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각되며, 치매 등의 다양한 뇌질환에 임상응용 및 치료제로 접목 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음.(KRF-2003-003-E00276)

참고문헌

1. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
2. 김지혁 · 황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327- 330, 663-664, 1992.
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*, 12(1):55-65, 1998.
4. Alzheimer's disease collaborative group : The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families, *Nat Genet*, 11(2):219-222, 1995.
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*, 593(2):299-303, 1992.
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)*, 84(6):596-605, 1992.
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*, 95(1)1-4, 2000.
8. Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA : Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250: 279-282, 1990.
9. 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.
10. Kim SH, and Suh YH : Neurotoxicity of a carboxy terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein, *J. Neurochem* 67: 1172-1182, 1996.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Matsumoto A and Matsumoto R : Familial Alzheimer's disease cells abnormally accumulate beta-amyloid harbouring peptides preferentially in cytosol but not in extracellular fluid, *Eur J Biochem* 225:1055-1062, 1997.
16. 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.
17. 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* 6(4):397-404, 2000.
18. Kim HS, CH Park, and YH Suh : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg^{2+} - Ca^{2+} ATPase, *Neuroreport* 9(17):3875-3879, 1998.
19. 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.
20. 최세훈 : 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구, 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2001.
21. 라종철 : 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성화 과 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2002.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
 25. 강형원 외 : 癩鼠의 병리에 대한 동서의학적 고찰, *동의병리학회지*, 13(1):36-45, 1999.
 26. 정인철, 이상용 : 치매에 대한 문헌적 고찰, *동의신경정신과학회지*, 7권 1호, 77-94, 1996.
 27. 나창수 외 : 치매에 관한 최근의 연구 동향, *대한한방내과학회지*, 19(1):291-317, 1998.
 28. 현경철, 김종우, 황의완 : Vascular Dementia에 관한 한의학적 임상연구, 서울, *동의신경정신과학회지*, 10(1):147-158, 1999.
 29. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 기전에 관한 연구, *釜山, 釜山大學校 藥學研究誌*, 29(2):49-56, 1995.
 30. 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*, 17(1):21-36, 1996.
 31. 황의완 : 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, *동의신경정신과학회지*, 10(1):1-16, 1999.
 32. 김태현, 김준한, 강형원, 유영수 : 세심탕에 의한 뇌성상세포로부터 염증성세포활성물질의 분비 억제효과, *동의신경정신과학회지*, 12(1):137-150, 2001.
 33. 박진성, 강형원, 유영수 : 생체의 알츠하이머병 실험모델에서 星香正氣散加滿公英의 효과에 관한 연구, *동의신경정신과학회지*, 12(2):157-172, 2001.
 34. 최병만 · 이상룡 : 益精地黃湯이 치매병태모델에 미치는 영향, 서울, *동의신경정신과학회지*, 11(2):23-42, 2000.
 35. 정인철 : 導痰益氣活血湯이 Alzheimer's disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 행동에 미치는 영향, *대전대학교 대학원(박사)*, 2001.
 36. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.658-659, 1986.
 37. 李盛雨, 盧昇鉉 : 釣鉤藤에 관한 文獻的 研究, *大韓韓醫學會誌* 第8卷第1號 附錄 本草分科學會誌 2(1): 53-58, 1987.
 38. 김종문 : 조구등과 홍삼의 성분에 관한 연구, *서울대 대학원 학위논문(박사)*, 1995.
 39. 김상호, 강형원, 류영수 : 釣鉤藤이 β APP 과발현 인간세경 아세포암에서의 항치매효과에 대한 연구. *동의생리병리학회지*. 16(5):960-966. 2002.
 40. 김동영, 최종원, 박종철, 이정규 : 조구등 성분의 항경련효과 II. 메탄올추출물 및 에틸 아세테이트 분획의 뇌 신경전달 관련물질에 미치는 효과. *생약학회지*. 29(3):179-186. 1998.
 41. Chang P, Koh YK, Geh SL, Soepadmo E, Goh SH, Wong AK. Related Articles, Links : Cardiovascular effects in the rat of dihydrocorynantheine isolated from *Uncaria callophylla*, *J Ethnopharmacol*. Apr;25(2):213-5(1989)
 42. Mitsutoshi Yuzurihara, Yasushi Ikarashi, Kazuhiro Goto, Iwao Sakakibara Terumasa Hayakawa, Hiroshi Sasaki. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae Ramulus et Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. *European Journal of Pharmacology* 444:183~189, 2002.
 43. 김동영 : 조구등(釣鉤藤) 성분의 항경련 효과 I;에틸아세테이트 분획의 항경련 효과, *생약학회지*, 104:53-57, 1996.
 44. 이지숙 : 조구등의 phospholipase C γ 1 저해 성분과 그 항암 효과, *서울대 대학원 학위논문(박사)*, 1998.
 45. 강형원 : 조구등이 산소자유기에 의하여 손상된 배양척수감각신경절세포에 미치는 영향에 관한 연구. 1999. *원광대학교 제3의학과 대학원*.