

# 遠志 디클로로메탄분획이 CT105에 의한 신경세포 傷害에 미치는 영향

이상원 · 김상호 · 김태현 · 강형원\* · 류영수

원광대학교 한의과 대학 한방신경정신과 교실

## The Effects of Polygala Tenuifolia DM Fraction on CT105-injured Neuronal Cells

Sang Won Lee, Sang Ho Kim, Tae Heon Kim, Hyung Won Kang\*, Yeoung Su Lyu

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

Alzheimer's disease(AD) is a geriatric dementia that is widespread in old age. In the near future AD will be the common disease in public health service. Although a variety of oriental prescriptions in study POD(Polygala tenuifolia extracted from dichlorometan) have been traditionally utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and action mechanisms have not yet fully elucidated. It has been widely believed that A $\beta$  peptide derived from APP causes apoptotic neurotoxicity in AD brain. However, recent evidence suggests that CT105, carboxy terminal 105 aminoacids peptide fragment of APP, may be an important factor causing neurotoxicity in AD. SK-N-SH cells expressed with CT105 exhibited remarkable apoptotic cell damage. Based on morphological observations by phase contrast microscope and NO formation in the culture media, the CT105-induced cell death was significantly inhibited by POD. In addition, AD is one of brain degeneration disease. So We studied on herbal medicine that have a relation of brain degeneration. From old times, In Oriental Medicine, PO water extract has been used for disease in relation to brain degeneration. We were examined by ROS formation, neurite outgrowth assay and DPPH scavange assay. Additionally, we investigated the association between the CT105 and neurite degeneration caused by CT105-induced apoptotic response in neurone cells. We studied on the regenerative and inhibitory effects of anti-Alzheimer disease in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by POD. Findings from our experiments have shown that POD inhibits the synthesis or activities of CT105, which has neurotoxicities and apoptotic activities in cell line. In addition, treatment of POD(>50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 12 hours) partially prevented CT(105)-induced cytotoxicity in SK-N-SH cell lines, and were inhibited by the treatment with its. POD(>50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 12 hours) repaired CT105-induced neurite outgrowth when SK-N-SH cell lines was transfected with CT105. As the result of this study, In POD group, the apoptosis in the nervous system is inhibited, the repair against the degeneration of Neuroblastoma cells by CT105 expression is promoted. Decrease of memory induced by injection of scopolamin into rat was also attenuated by POD, based on passive avoidance test. Taken together, POD exhibited inhibition of CT105-induced apoptotic cell death. POD was found to reduce the activity of AchE and induced about the CA1 in rat hippocampus. Base on these findings, POD may be beneficial for the treatment of AD.

Key words : Alzheimer's disease, Polygala tenuifolia, CT105

### 서 론

\* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포한방병원  
· E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2762  
· 접수 : 2004/01/29 · 수정 : 2004/02/25 · 채택 : 2004/03/30

치매란 의식이 淸明한 상태에서 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해 발

생되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능에 장애가 나타나는 증후군이다<sup>1)</sup>.

한의학에서 痴呆는 明代 張<sup>2)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 처음으로 ‘痴狀’라고 기재되어 있으며, 清代 陳<sup>3)</sup>에 의해 서양의학에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였고, 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 개념으로 인식되어왔다<sup>4,7)</sup>. 이러한 痴呆는 腦의 退行性 變化에 의한 알츠하이머형 痴呆(Alzheimer’s disease, 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<sup>8,9)</sup>.

AD의 주요원인에 대해서는 Beta amyloid (Aβ)의 침적으로 생기는 축색반(neuritic plaques)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이므로<sup>9,11)</sup> NFTs와 neuritic plaques는 AD의 지표로 인식되어 왔지만<sup>12)</sup> 실제 AD의 발병에 이 단백질이 어떤 역할을 할 것인지 불확실한 실정이다<sup>13-15)</sup>.

따라서 실제 pathogenesis에는 다른 인자들, 그 중에서도 amyloid precursor protein (APP)의 다른 중간대사산물이 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 Aβ의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질(carboxy-terminal 105 amino acid fragment of APP, CT105)에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 최근에 최 등<sup>16)</sup>은 C단 단백질 투여에 의한 인지 기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등<sup>17)</sup>은 C단 단백질이 신경교세포의 활성으로 caspase-12 등의 염증 반응 물질을 다량으로 분비하여 결국 주변의 신경세포의 사멸을 유발하게 됨을 확인하여 CT105와 AD의 관련성을 더욱 증명해 주고 있다<sup>18-21)</sup>.

그리고 CT105와 AD의 관련성에 입각하여 이 등<sup>22)</sup>은 석창포와 원지의 혼합 수추출물을, 최 등<sup>23)</sup>은 석창포의 단일 수추출물을 이용하여 pCT105 과발현 SK-N-SH 세포주에서의 항치매 효과를 규명하였지만 아직 遠志의 디클로로메탄 분획으로 항치매 효과의 여부를 연구한 보고는 없었다.

본 실험에 사용된 遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 건조한 것으로서<sup>24)</sup> 神農本草經 上品<sup>25)</sup>에 “……補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”로 기재된 이후로 寧心安神, 祛痰利竅劑로 사용되어 오고 있다. 또한 이미 遠志의 실험적 연구로는 腦 성장세포에서 TNF-α 생성 및 TNF-α mRNA의 발현을 억제하는 효과<sup>26)</sup>가, 또한 遠志가 利尿效果와 中樞神經抑制 효과<sup>27)</sup>가 있다고 보고된 바 있다.

임상에서 뇌신경계 질환에 대응하는 遠志의 메탄올 추출물 중 디클로로메탄분획(이하 POD)의 항치매 효과를 규명하기 위하여 pCT105 과발현 SK-N-SH 세포주에서 세포사 유도 억제 효과에 대한 형태학적인 변화, 신경세포의 ROS 발생, NO 생성도, free radical 생성, 아세틸콜린에스테라제 활성저하 등을 분석하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 試藥

實驗에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin /streptomycin, trypsin, lipofectin, (Gibco BRL), MeOH (Merck, Germany), MeOH, dichlorometane, Acetylcholinesterase(AChE), MTT (3-[4,5- dimethiozol-2y-]2,5-diphenyltetrazolium bromide), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Scopolamine, Greiss reagent, sodium nitrite는 Sigma CO.사에서 구입하였고, N',N-dimethyl formamide는 amresco사(USA), D2DCFDA(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein는 Molecular Probes에서(USA), Fluorescan Ascent FL는 Thermo Labssystem사에서 (Finland)으로 부터 구입하였고 그 외 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), phase-contrast microscope (Olympus), GEMINI avoidance System (San Diego Instruments, San Diego, CA), evaporator(Elyla, Japon), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Bio-Red, USA) reader 등을 사용하였다.

#### 2) 試料의 調製

POD조제 : 본 實驗에 使用할 遠志 2 kg은 원광대 군포한방 병원에서 엄선하여 잘게 분쇄한 후 메탄올(MeOH) 수용액 5 L를 넣고 2 ~ 4회 용매 추출하고 분리된 알콜 추출액을 50 ~ 60 mmHg 및 30 ~ 40 °C의 조건하에서 감압농축기 evaporator로 증발 농축하여 추출액내의 알콜을 제거하고, 회수된 추출액에 대해서는 동결 건조하여 분말상태로 얻는다. 농축액 중에 함유된 불필요한 성분을 정제하기 위하여, 디클로로메탄과 물이 5 : 1 부피비로 혼합되어 있는 혼합액을 1:1 부피비로 투입하고 진탕하여 디클로로메탄층(이하 POD라 명명) 용매분획을 얻는 다음, 용매 분획에 대해서는 동결 건조시켜 분말상태로 하여 75 g을 회수하였다. 이와 같이 추출·정제 공정을 수행하여 회수된 디클로로메탄 분획을 사용 전에 미리 1000 mg/ml농도로 희석하여 CT105에 의한 신경세포 상해의 개선효과와 아세틸콜린에스테라제(AChE)의 활성을 저해시키는 효과 유무를 확인하기 위해 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) pCT 105 형질이입시킨 세포주의 배양

본 실험에 사용된 pCT105 플라스미드의 구축은 Harvard Medical School, Brigham and Women’s Hospital의 Center for Neurologic Diseases소속 Dennis J. Selkoe 박사로부터 분양받은 치매 유발 유전자 APP695로부터 포유동물세포주인 SK-N-SH cell내에서 발현이 되도록 PCR를 수행하여 APP695부분의 CT105 절편만을 분리하여, 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 사용하였다. 세포주인 SK-N-SH cell은 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 °C에서 하룻밤 배양하여 80 %정도 조밀차게 배양한 다음 반응액 A로 pCT105 2 µg와 serum free medium (이하 SFM이라 명명) 100 µl을 혼합하고, 반응액 B로 lipofectin 10 µl와 SFM 100 µl을 혼합하여 45 분간 반응시킨 다음, 상기 반응액 A와 B를 다시 혼합하여 15분간 반응시킨 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 SFM 배지 1.5 ml와 반응 혼합액을 분주한 다음 6시간 정도 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 유지하고 5 % RPMI배지를 첨가하여 하룻밤 배양한다. 이를 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 G-418 450 µg/ml로 selection을 2주간 실시하고 단일 clone을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2) 세포 증식도 측정

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 96-well plate에 분주하고 37 °C incubator에서 하룻밤 배양한 다음 CT105가 없는 vector만 형질이입시킨 정상군(NOR), CT105가 삽입시켜 형질 이입시킨 대조군(CON), 대조군에 10, 25, 50, 100 µg/ml농도로 POD를 처리한 약물군으로 구분하여 수행하였다. 배양한 세포는 약물을 처리한 후 6시간 후에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20 µl을 첨가하여 3 시간 동안 배양한 다음 DMSO 50 µl을 첨가하고 실온에서 30 분 이상 반응을 시켜서 실험색의 색상이 변화되는 정도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader의 A570/A630 nm에서 흡광도로 측정하였다.

3) 세포 형태학적 관찰

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 103세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 IC<sub>50</sub>농도인 POD 약물군의 65 µg/ml 농도로 처리하여 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 200개정도 세포수를 촬영하여 조사하였다.

4) 신경세포의 ROS(Reactive Oxygen Species) 측정

ROS 측정은 Zhang등<sup>28)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. CT105 과발현 SK-N-SH cells를 10<sup>3</sup> cells/ml로 96-well plate에 분주하고 37 °C incubator에서 하룻밤 배양하고 POD 약물군을 10, 25, 50, 100 µg/ml 농도로 배지에 처리한 후 12시간 배양하였다. 세포를 99.9 %의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20 °C에 stock solution으로 저장하였으며 실험시 10 µM DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 N,N-dimethyl formamide (amresco, USA)에 용해된 H2DCFDA (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein) (Molecular Probes, USA)를 최종 농도가 50 µM이 되도록 22 °C에서 20분간

배양한 후 사용전까지 암소에 보관한 후 실험시 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2', 7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로 발생된 형광은 Fluorescan Ascent FL (Thermo Labssystem, Finland)을 이용하여 excitation 485 nm/emission 530 nm에서 측정하였다.

5) 신경세포의 항산화력 측정

항산화력을 측정하기 위해 Takao (1994) 등의 방법<sup>29)</sup>을 약간 수정하여 실험을 실시하였다. 프리라디칼인 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액을 80 µg/ml in EtOH로 조제하고, 이 용액 1ml에 POD 10, 25, 50 그리고 100µg/ml의 농도가 되도록 에탄올에 용해시킨 후 DPPH의 color변화를 관찰하여 개략적인 항산화 활성 여부를 판정하였다.

6) CT105 세포주의 NO 생성도 측정

CT105 세포주내의 NO(nitric oxide)의 생성도를 측정하기 위해 103세포수로 96-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 약물 10, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 6시간 처리한 후 상등액 100 µl을 따서 96-well에 옮기고 Greiss reagent용액 50 µl을 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.

7) neurite outgrowth의 길이 측정

CT105 발현 SK-N-SH cell lines를 10<sup>3</sup>세포수로 laminin coated 6-well plate(BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50 ng/ml이 되게 하여 첨가하고 6시간동안 자극을 가한 다음 약물군의 무혈청 내지 10, 25, 50, 100 µg/ml농도별로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth length를 현미경하에서 관찰하여 정상군과 상호 비교하여 neurite length score는 대조군을 0.5로 임의의 수치를 설정하여 실험군의 결과치를 1, 2, 3, 4, 5로 지정하여 통계 처리하였다.

8) 아세틸콜린 에스터라제(Ach E)의 활성 저해도 측정

디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시킨 후 100 mM 인산염(pH 8.0, '완충액 I'이라 함)에 200 µg/ml 농도로 희석하였다(DMSO의 경우 최종농도 5 %로 희석). 10, 25, 50, 100 µg/ml 의 POD 1.5 ml, 100 mM 인산염(pH 7.0, '완충액 II'라 함) 1.5 ml, 75 mM 아세틸티오콜린요오드 용액 20 µl 및 완충염탄시약 [Buffered Ellman's reagent; 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산)10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 17.85 mM] 100 µl를 혼합하고 25°C에서 10 분간 반응시켰다. 그리고, AChE 효소(20 µl)를 넣고 흔들어 섞어준 다음 30초 간격으로 5 분동안 흡광도를 측정하므로써 선형반응(linear reaction)임을 확인하였다. 블랭크(blank)에는 효소 대신 식염수 (saline)를 넣어주었다. 또한, 아세틸티오콜린요오드 용액을 넣지 않고 흡광도를 측정하여 POD과 효소활성 측정시약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음도 확인하였다. 또한, POD를 넣지 않았을 때 대조군(control)으로 하고 이때의 AChE 활성도를 100 %로 하였을 때, POD농도에 대한 AChE 억제활성도를 '%억제'로

나타내었다. 효소활성도는 대조군에서 Lineweaver-Burk plot으로부터 Km 값 0.006이고 Vmax 값은 6.78으로 확인하여 실험군의 AChE의 활성을 측정하였다. AChE 활성실험은 5회 반복하여 결과의 유의성을 P<0.05의 범위 내에서 t-test로 검정하였다.

9) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±S.E로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

성 적

1. CT105 발현 세포주에 의한 세포형태학적 영향

신경세포의 최종적인 현상으로 βAPP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 광학현미경하에서 관찰한 결과, 정상군에 비해 CT105의 발현으로 인한 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. POD처리군은 25 μg/ml 이상농도에서 세포의 생존율과 세포사의 회복, 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었고, 100 μg/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

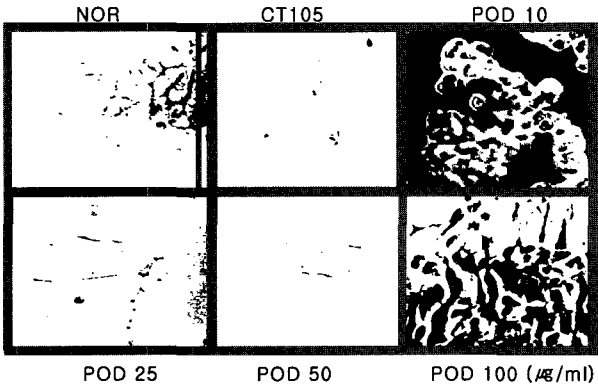


Fig. 1. Effect of POD on morphological changes. Representative photomicrographs of SK-N-SH cells(NOR), CT105-expressed cells(CT105), and CT105 cells treated with POD at the concentration of 10, 25, 50 and 100 μg/ml, respectively, are shown (200 ×). Survival cell was determined by phase-contrast microscopy. Similar results were found in at least three separate experiments.

2. 농도별 신경세포의 세포사 억제효과

신경세포의 세포사가 POD에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과, 신경세포의 최종적인 현상으로 정상군이 5.3±2.5 %인데 비해 CT105의 발현으로 인한 세포사의 비율은 약 92.1±2.0 %로 나타난 반면, CT105와 10, 25, 50, 100 μg/ml POD 처리군에서는 각각 약 81.1±2.5 %, 57.2±3.5 %, 51.25±2.5 %, 36.2±2.6 %로 나타내었고, 특히 IC50은 약 53 μg/ml 정도였다. 따라서 신경세포의 세포사가 POD에 의해 50 μg/ml 이상농도에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2).

3. 신경세포의 ROS발생 억제변화

신경세포에서 CT105에 의해 손상에 의한 POD의 ROS발생 억제효과를 관찰한 결과 Fig 3에서처럼, POD 처리군에서는 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였고 50 μg/ml 농도이상에서 강한 억제효과를 보였는데, 정상군의 14±2.4 %에 비해 CT105가 발현되는 대조군은 약 92±1.4 %, CT105와 10, 25, 50, 100 μg/ml POD 처리군에서는 각각 84±1.5 %, 61±1.5 %, 52±1.3 %, 38±1.8 %로 나타내었는데, 이는 50 μg/ml 이상 농도에서 ROS 발생 억제효과가 P<0.05의 범위 내에서 유의성 있게 나타났다(Fig. 3).

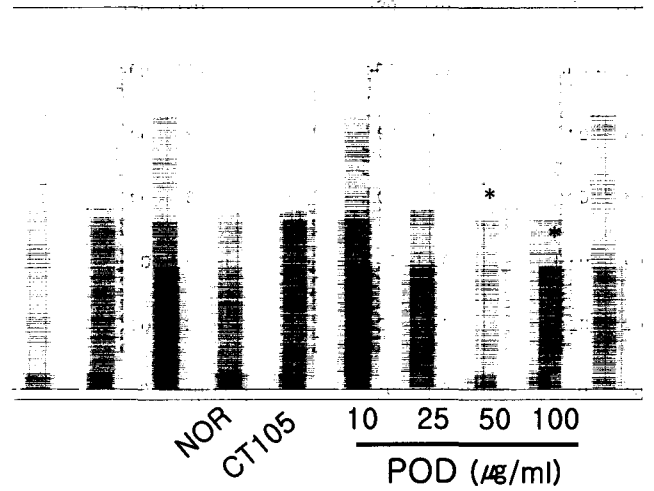


Fig. 2. Inhibitory effect of apoptotic ratio by POD. Apoptotic ratio of CT105 expressing SK-N-SH cells were observed by ELISA reader and phase-contrast microscopy in medium, induced by CT105 expression. Similar results were found in at least three separate experiments. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test(\*p<0.05).

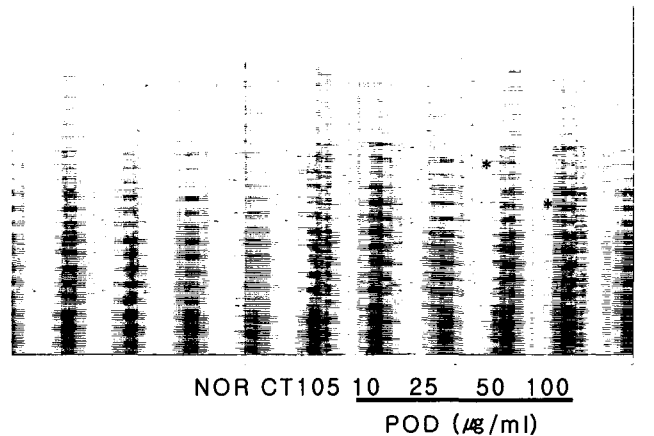


Fig. 3. ROS measurement of SK-N-SH cells in medium containing various concentration of POD after 12hr. incubation. Control was cultured in medium without POD. Cell viability was quantified by MTS assay and MTT assay. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\*p<0.05).

또한 신경세포의 POD의 항산화효과를 측정된 결과, Fig. 4에서처럼 POD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저

히 억제되는 경향을 보였는데 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이상에서 강한 억제 효과를 보였으며, 정상군의  $52 \pm 1.0$  unit에 비해 CT105이 발현되는 대조군은 약  $242 \pm 3$  unit, CT105와 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  POD 처리군에서는 각각  $191 \pm 2$ ,  $181 \pm 5$ ,  $135 \pm 2$ ,  $112 \pm 3$  unit로 나타내었다. 이는 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 농도에서 유의성 있게 ROS 발생 억제 효과를 나타내었다.

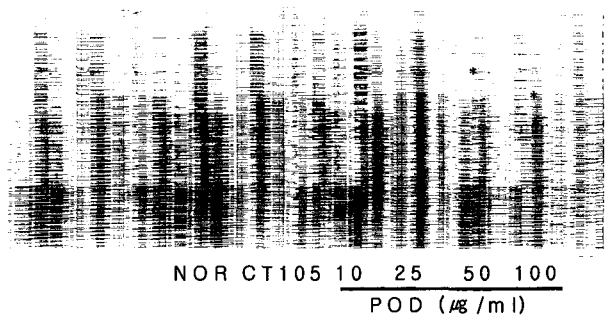


Fig. 4. Anti-oxidative effect of SK-N-SH cells in medium containing various concentration of POD after 12hr. incubation. Control was cultured in medium without POD. Cell viability was quantified by MTS assay. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

4. 신경세포의 NO생성도에 미치는 영향

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도된다. POD가 CT105발현 신경세포주에서의 NO생성을 억제하는지 조사하였는데, Fig. 5에서처럼 정상군에서는  $4.0 \pm 1.82$   $\mu\text{M}$ 이였으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약  $91.2 \pm 0.9$   $\mu\text{M}$ 인데 반해 POD처리시 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 약  $77.1 \pm 2.8$ ,  $58.3 \pm 1.4$ ,  $46.2 \pm 1.6$ ,  $33.3 \pm 2.5$   $\mu\text{M}$  정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 POD가 억제하고 특히 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 농도에서  $P < 0.05$ 의 범위 내에서 유의성 있게 NO 생성 억제 효과가 나타났다.

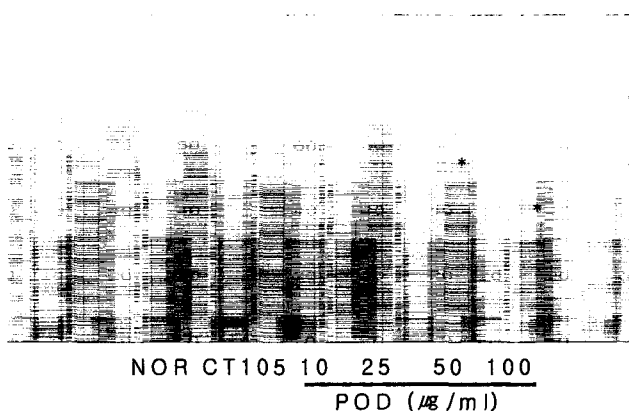


Fig. 5. Inhibitory effect of NO formation on SK-N-SH cells in medium containing various concentration of POD after 12hr. incubation. Control was cultured in medium without POD. NO formation was quantified by ELISA reader. Statistically significant value compared with CT105 control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

5. POD의 항산화효과

POD의 신경세포에서 CT105의 손상에 의한 free radical 발생 억제효과를 관찰하였다. Fig 6에서처럼, POD 농도 의존적으로 free radical 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데 농도가 증가할수록 억제되는 경향이 증가되었다. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이상에서 강한 억제효과를 보였으며 대조군은  $2.0 \pm 1.5\%$ 인데 반해 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  POD 처리군에서는 각각  $22 \pm 1.5\%$ ,  $35 \pm 2.5\%$ ,  $49 \pm 2.3\%$ ,  $72 \pm 2.4\%$ 로 나타내었는데, 이는 POD 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 농도에서는  $P < 0.05$  범위 내에서 유의성 있게 free radical 생성이 억제되었다(Fig. 6).

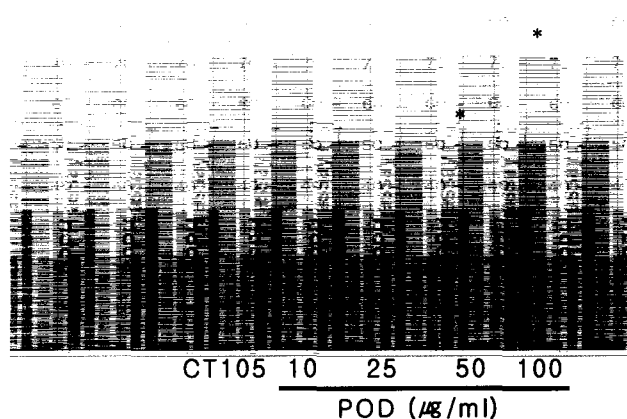


Fig. 6. Inhibitory effect of free radical by various concentration of POD. Control was cultured in medium without POD. free radical formation was quantified by ELISA READER. Statistically significant value compared with control group data by t-test (\* $p < 0.05$ ).

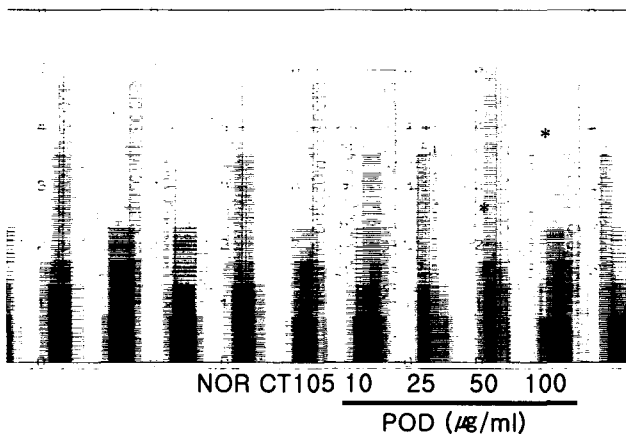
6. Neurite outgrowth 증가에 미치는 영향

Fig. 1에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나 (Fig. 1), CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우 성장이 안 되는 상태로 나타내고 있으며, POD 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 증가시켜 처리시 신경돌기가 잘 신장되어 자라는데 이런 결과에서 neurite outgrowth length를 임의의 값으로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 7에서처럼 대조군을 기준으로  $0.71 \pm 0.5$ 로 환산시 정상군은  $4.95 \pm 0.5$ 이고 POD의 농도 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 증가하면 할수록 각각 약  $1.43 \pm 2.5$ ,  $1.61 \pm 1.5$ ,  $2.25 \pm 1.5$ ,  $3.45 \pm 2.5$ 의 수치를 보였는데, 특히 POD 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 농도에서는  $P < 0.05$  범위내에서 유의성 있게 신경돌기의 생성이 증가되었다(Fig. 7).

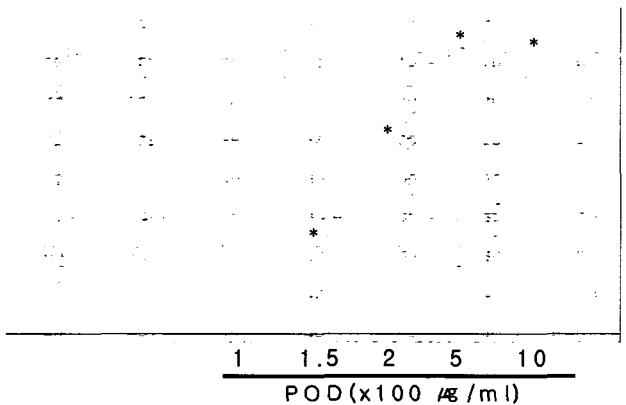
7. Acetylcholinesterase(ACh E) 활성저해도에 미치는 영향

Fig. 8에서처럼 ACh E의 활성저해도를 측정하여 POD의 효과를 확인한 결과 POD (1, 1.5, 2, 5, 10)  $\times 100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 효소를 반응시켰더니 AChE 효소와 POD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음을 확인하였다. 효소활성도는 대조군에서 Lineweaver-Burk plot으로부터 Km 값 0.006이고 Vmax 값은 6.78로 확인하여 실험군인 POD의 AChE의 활성 저해도를 측정하였는데 각각  $44 \pm 1.5\%$ ,  $51 \pm 2.5\%$ ,  $64.5 \pm 0.5\%$ ,  $76 \pm 2.5\%$ ,  $75.5 \pm 0.5\%$ 의 값을 얻었다. 이는 AChE 활성실험을 5회 반복하여

1.5 × 100 μg/ml의 농도이상에서 효소활성 저해도에 대한 P<0.05 범위 내에서 유의성이 있었다.



**Fig 7. POD induces neurite outgrowth.** CT105 expressed SK-N-SH cells were cultured for 5 hours in the presence of the NGF (50ng) and POD. 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 8. Inhibition of human Acetylcholinesterase activity by POD.** Concentration of POD to inhibit human AchE activity by 50%. All results are the Means±S.D from five experimental values. Those values significantly different from control are indicated (p<0.05, students two-tailed t test)

## 고찰

치매란 의식이 淸明한 상태에서 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해 발생되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능에 장애가 나타나는 증후군으로<sup>1)</sup> 韓醫學에서 痴呆는 明代 張<sup>2)</sup>의 《景岳全書·雜證謨》癡狂篇에서 처음으로 ‘痴狀’라고記載되어 있으며, 淸代 陳<sup>3)</sup>에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였고, 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등이 이와 유사한 概念이다<sup>4,7)</sup>. 이러한 치매는 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<sup>8-9)</sup>.

AD를 유발하는 원인으로는 Aβ, estrogen, apolipoprotein

E(Apo E), presenilin, Oxidants (hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>30-34)</sup>, 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 축색반(neuritic plaques)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이므로<sup>9-11)</sup> NFTs와 neuritic plaques는 AD의 지표로 인식되어 왔다<sup>12)</sup>. NFTs와 neuritic plaques는 정상 뇌에도 존재하며 나이가 많아짐에 따라 그 수가 증가하나 AD의 경우 뇌의 기억과 인지를 담당하는 부위에 상당히 많이 증가하여 신경전달을 방해하게되고 부교감신경과 뇌의 다른 신경전달경로를 파괴하는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 이에 따라 acetylcholine, serotonin, noradrenaline, dopamine, glutamate, substance P 등의 많은 신경전달물질이 크게 감소하게 되고, 이 중 acetylcholine의 결핍은 가장 중요한 현상이며 이것을 회복시키는 것이 현재까지의 주 치료목표의 하나가 되어 왔다<sup>35)</sup>. Neuritic plaques는 노인반(senile plaque) 또는 아밀로이드반(amyloid plaque)이라고도 하며 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 Aβ를 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다. Neuritic plaques의 수는 질병의 심한 정도와 비례하므로 이 plaques에 대한 연구가 AD연구의 초점이 되어 왔다<sup>12)</sup>.

최근에는 일부가 잘라져서 Aβ가 되는 APP는 정상적으로 두 개의 서로 다른 pathway에 의해 진행되는데<sup>36)</sup>, 즉 α-secretase에 의해서 Aβ domain 안쪽이 잘려지며 amino terminal이 세포 밖으로 분비된다. 이렇게 잘려져서 분비된 sAPP(secreted form of APP)는 세포내 cyclic GMP level을 증가시켜 신경세포에 보호작용이 있음이 보고되었다<sup>37)</sup>. 한편 alternative processing pathway에서는 역시 아직까지 알려져 있지 않은 β-secretase 등에 의해 Aβ의 N terminal 주위가 잘라지며 Aβ sequence 전체를 포함하는 다양한 크기의(14-22KD) C단 단백질이 세포막에 anchor되어 남는다<sup>38-39)</sup>. 이 C단 단백질 중 일부는 Aβ 전체 sequence를 가지고 있으며 γ-secretase에 의해 잘려져 Aβ를 형성하는 것으로 생각된다.

하지만 이상과 같이 in vitro에서 Aβ의 독성을 증명하는 많은 보고들이 있음에도 불구하고, Aβ가 독성을 나타내기 위해서는 20μM이상의 고농도가 필요하고 일부 연구에서는 Aβ의 신경독성을 입증하는데 실패하고 있는데<sup>13-15)</sup>, 특히 in vivo 실험에서는 Aβ의 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 관여할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그런 인자 중에서도 특히 Aβ의 직전 대사물질로 생각되고 있는 C단 단백질에 대하여 관심이 모아지고 있는데, 우선 이 단백질은 배양세포내<sup>40)</sup>와 배양액<sup>41)</sup>에서 발견될 뿐만 아니라, in vivo에서도 FAD나 다운증후군 환자의 신경반이나 신경섬유다발은 물론 그러한 병변이 없는 腦 부위에서도 발견되었다<sup>39, 42-43)</sup>. 또한 이 단백질은 in vitro에서 또는 세포에 transfection시켰을 때 amyloid와 유사한 aggregate를 형성할 수 있다<sup>44-45)</sup>. 실제로 C단

단백질을 여러 종류의 세포주에 transfection 시킬 경우 세포독성을 일으키는데<sup>46-48</sup>, 특히 이러한 C단 단백질의 transfection시 일어나는 세포독성은 신경세포에 특이하게 일어난다는 보고가 있어 흥미를 끌고 있다<sup>46</sup>. 더구나 이렇게 C단 단백질에 transfect된 세포를 실험용 흰쥐의 뇌에 이식하였을 때 자발적 퇴행이 일어난다고 보고 됨으로써<sup>48-49</sup> 실제 in vivo에서도 C단 단백질이 신경독성을 일으킬 가능성이 높음을 입증하였다. 미국의 Neve 박사 group에서는 transgenic mouse를 만들어 C단 단백질을 brain에 과도하게 발현시켰는데<sup>49</sup>, 해마 부위에 신경세포 퇴행이 일어나고<sup>50</sup> 인지기능의 결손이 동반됨이 보고 되어 C단 단백질이 과도하게 발현되면 신경세포에 유해한 영향을 끼쳐 인지기능을 손상시킬 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다.

또한 CT105는 Calcium homeostasis에도 악영향을 미치는데, Rat brain microsome에서는  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  ATPase에 의해, SK-N-SH cell에서는  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger activity에 의해 calcium uptake를 억제함으로써 calcium homeostasis를 손상시키지만, A $\beta$ 는 그렇지 않다고 하여<sup>51</sup> 기존의 A $\beta$ 보다 더 강력한 독성을 갖는 아밀로이드 C단 단백질이 AD의 병인물질로서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 제시하였다.

또한 가장 최근에 최 등<sup>16</sup>은 C단 단백질 투여에 의한 인지기능의 손실은 PDH (Pyruvate dehydrogenase)의 활성저하와 이로 인한 아세틸콜린의 합성저하로 기인한 것이라 하였고, 라 등<sup>17</sup>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<sup>18-21</sup>. 그리고 CT105와 AD의 관련성에 입각하여 이 등<sup>22</sup>은 석창포와 원지의 혼합 수추출물을, 최 등<sup>23</sup>은 석창포의 단일 수추출물을 이용하여 pCT105 과발현 SK-N-SH 세포주에서의 항치매 효과를 규명하였다. 이에 이번 실험에서는 원지의 디글로로메탄분획을 가지고 항치매 효과를 고찰해보았다.

遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 건조한 것으로서<sup>24</sup> 그 歸經<sup>52</sup>은 心·腎이고 性味는 苦辛溫 등<sup>24-25, 52</sup>으로 分類되어 있고, 藥效에 대해서는 神農本草經 上品<sup>25</sup>에 “……補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”로記載된 以後로 寧心安神, 祛痰利竅劑로 사용되어 오고 있다.

遠志의 實驗的 연구로는 뇌 성상세포에서 遠志가 TNF- $\alpha$  생성 및 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 억제하는 효과<sup>26</sup>가, 遠志 Saponin이 이노효과와 중추신경억제효과<sup>27</sup>, 그리고 遠志의 安神作用에 對한 藥理解析 研究에서 祛痰說이 가장 可能的 說明으로 認定될 수 있다고<sup>53</sup> 보고한 바 있다.

임상에서 腦神經계 질환에 대응하는 遠志의 디글로로메탄분획(이하 POD)의 항치매 효과를 규명하기 위하여 pCT105 과발현 SK-N-SH 세포주에서 세포사 유도 억제효과에 대한 형태학적인 변화, 신경세포의 ROS 발생, NO 생성도, free radical 생성, 아세틸콜린에스테라제 활성저하 등을 분석한 결과는 다음과 같다.

신경세포의 최종적인 현상으로  $\beta$ APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 광학현미경하에서 관찰한 결과, CT105의 발현으로 인한 신경세포

세포사는 정상군에 비해 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사와 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 하지만 POD 처리군은 25  $\mu$ g/ml 이상농도에서 세포의 생존율과 세포사의 회복, 신경돌기의 신장이 미약하게 관찰되었고, 100  $\mu$ g/ml 농도에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도되었다(Fig. 1).

신경세포의 세포사가 POD에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과, 신경세포의 최종적인 현상으로  $\beta$ APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105 발현에 의한 신경세포의 세포사 비율은 정상군의 5.3 $\pm$ 2.5 %에 비해 약 92.1 $\pm$ 2.0 %로 높게 나타난 반면, CT105와 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml POD 처리군에서는 각각 약 81.1 $\pm$ 2.5 %, 57.2 $\pm$ 3.5 %, 51.25 $\pm$ 2.5 %, 36.2 $\pm$ 2.6 %로 나타났고, 특히 IC50은 약 53  $\mu$ g/ml 정도였다. 따라서 신경세포의 세포사가 POD에 의해 50  $\mu$ g/ml 이상 농도에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2). 신경세포에서 POD의 ROS 발생 억제효과를 관찰한 결과 Fig 3에서처럼, POD 처리군에서는 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였고 50  $\mu$ g/ml 농도 이상에서 강한 억제효과를 보였는데, 정상군의 14 $\pm$ 2.4 %에 비해 CT105가 발현되는 대조군은 약 92 $\pm$ 1.4 %, CT105와 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml POD 처리군에서는 각각 84 $\pm$ 1.5 %, 61 $\pm$ 1.5 %, 52 $\pm$ 1.3 %, 38 $\pm$ 1.8 %로 나타났다. 이는 50  $\mu$ g/ml 이상 농도에서 ROS 발생 억제효과가 P<0.05의 범위 내에서 유의성이 있었다(Fig. 3). 또한 신경세포의 POD의 항산화효과를 측정된 결과, Fig. 4에서처럼 POD 처리군에서 농도 의존적으로 ROS의 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데 50  $\mu$ g/ml 농도 이상에서 강한 억제효과를 보였으며, 정상군의 52 $\pm$ 1.0 unit에 비해 CT105가 발현되는 대조군은 약 242 $\pm$ 3 unit, CT105와 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml POD 처리군에서는 각각 191 $\pm$ 2, 181 $\pm$ 5, 135 $\pm$ 2, 112 $\pm$ 3 unit로 나타났다. 이는 50  $\mu$ g/ml 이상 농도에서 유의성 있게 ROS 발생 억제효과가 나타났다.

일반적으로 NO생성은 iNOS에 의해 유도되는데 POD가 CT105발현 신경세포주에서의 NO생성을 억제하는지에 대해 조사하였는데, Fig. 5에서처럼 정상군에서는 4.0 $\pm$ 1.82  $\mu$ M이었으며 CT105를 발현하는 대조군에서는 약 91.2 $\pm$ 0.9  $\mu$ M인데 반해, POD 처리시 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도에서 각각 약 77.1 $\pm$ 2.8, 58.3 $\pm$ 1.4, 46.2 $\pm$ 1.6, 33.3 $\pm$ 2.5  $\mu$ M 정도였다. 이런 결과로 볼 때 NO의 생성을 유도하는 iNOS의 발현에도 POD가 억제하고 특히 50  $\mu$ g/ml 이상 농도에서 P<0.05 범위 내에서 유의성 있게 NO 생성 억제효과가 나타났다고 할 수 있다.

CT105의 손상에 의한 free radical 발생의 POD의 억제효과를 관찰하였는데, Fig 6에서처럼, POD 농도 의존적으로 free radical 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였는데 농도가 증가할수록 억제되는 경향이 증가되었다. 50  $\mu$ g/ml 농도 이상에서 강한 억제효과를 보였으며 대조군의 경우 2.0 $\pm$ 1.5 %에 비해 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml POD 처리군에서는 각각 22 $\pm$ 1.5 %, 35 $\pm$ 2.5 %, 49 $\pm$ 2.3 %, 72 $\pm$ 2.4 %로 나타내었는데 이는 POD 50  $\mu$ g/ml 이상 농도에서는 P<0.05 범위 내에서 유의성 있게 free radical 생성을 억제한 것으로 볼 수 있다(Fig. 6).

Fig. 1에서처럼 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지

되어 있으나, CT105의 발현에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우 성장이 안 되는 상태로 나타나고 있으며(Fig. 7), POD 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 증가시켜 처리시 신경돌기가 잘 신장되어 자라는데 이런 결과에서 neurite outgrowth length를 임의의 값으로 환산하여 조사한 결과는 Fig. 7에서처럼 대조군을 기준으로  $0.71 \pm 0.5$ 으로 환산시 정상군은  $4.95 \pm 0.5$ 이고 POD의 농도 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 으로 증가하면 할수록 각각 약  $1.43 \pm 2.5$   $1.61 \pm 1.5$   $2.25 \pm 1.5$   $3.45 \pm 2.5$ 의 수치를 보였는데, 특히 POD 50  $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서는  $P < 0.05$  범위 내에서 유의성 있게 신경돌기의 생성을 증가되었다(Fig. 7). Fig. 8에서처럼 아세틸콜린에스트라제의 활성저해도를 측정하여 POD의 효과를 확인하기 위하여 POD (1, 1.5, 2, 5, 10)  $\times 100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 효소를 반응시켰더니 AChE 효소와 POD는 약간의 비특이적 반응이 나타나지 않음을 확인하였다. 효소활성도는 대조군에서 Lineweaver-Burk plot으로부터 Km 값 0.006이고 Vmax 값은 6.78로 확인하여 실험군인 POD의 AChE의 활성 저해도를 측정하였는데 각각  $44 \pm 1.5\%$ ,  $51 \pm 2.5\%$ ,  $64.5 \pm 0.5\%$ ,  $76 \pm 2.5\%$ ,  $75.5 \pm 0.5\%$ 의 값을 얻었는데 이는 AChE 활성실험을 5회 반복하여  $1.5 \times 100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도이상에서 효소활성 저해도에 대한  $P < 0.05$  범위 내에서 유의성이 있었다.

이상의 실험결과와 같이 POD가 CT105 발현 신경아세포종 세포주에서 신경세포의 세포사 유도에 대한 탁월한 억제효과를 보여 향후 遠志 매탄을 추출물 중 유효한 성분 추출로 AD 뿐만 아니라 다양한 뇌질환에 임상 응용 및 신약화에 기여할 것으로 사료된다.

## 결 론

CT105 발현 신경아세포종 세포주를 이용한 遠志의 디클로로메탄분획의 치매와 동일한 신경세포의 세포사 유도에 대한 억제효과를 규명하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. POD에 의해 神經細胞로부터 CT105발현에 의한 세포사 유도는 유의성 있게 감소하였다.( $P < 0.05$ ) POD는 CT105발현에 의한 ROS발생 유도를 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다. POD 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 CT105로 인한 신경세포의 NO 생성도는 유의성 있게 저해되었다.( $P < 0.05$ ) POD로부터 DPPH의 자유기 소거효과가 유의성 있게 증가하였다.( $P < 0.05$ ) POD는 neurite outgrowth의 길이 증가를 유의성 있게 유도하였다.( $P < 0.05$ ) POD  $1.5 \times 100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도이상에서 AChE의 활성저해도는 유의성있게 증가하였다.( $P < 0.05$ )

이상과 같은 결론으로 볼 때, POD가  $\beta\text{APP}$ 의 CT105발현 신경아세포종의 세포사를 효과적으로 억제하는 것으로 보아 치매 원인에 대한 병인, 병리학적 분석으로 지속적인 연구가 이뤄지고, 癡呆 등의 다양한 뇌질환에 임상응용으로 접목 가능할 것으로 사료되어진다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

## 참고문헌

1. 이동원 외 : 치매에 관한 동서의학적 비교 고찰. 서울. 대한한방내과 학회지. 16권 1호. pp.2-5, 11, 14. 1995.
2. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, pp.573-578, 1985.
3. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
4. 金賢兒 : 老人性 癡呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 大韓韓方內科學會誌, 13(2): 57-68, 1992.
5. 鄭仁哲, 李相龍 : 癡呆에 對한 文獻的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):77-94, 1996.
6. 鄭仁哲 外 : 癡呆에 對한 文獻的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1): 77-94, 1996.
7. 강형원 외 : 癡呆의 병리에 대한 동·서의학적 고찰, 서울, 동의병리학회지, 13(1):36-45, 1999.
8. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
9. 김지혁, 황의완 : 동의정신의학, 서울, 현대의학서적사, pp.256-271, 327-330, 663-664, 1992.
10. Reznik-Wolf H., Machado J., Haroutuian V., DeMacro L., Walter G. F., Goldman B., Davidson M., Johnston J. A., Lannfelt L., Dani S. U., 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.
11. 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.
12. 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. 1325-1344, 1996.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 최세훈 : 아밀로이드 C단 단백질 투여에 의한 생쥐의 인지 기능과 대뇌피질 및 해마의 아세틸콜린의 변화에 대한 연구, 서울대 대학원, 학위논문(석사), 2001.
17. 라종철 : 아밀로이드 C단 단백질에 의한 신경교세포의 활성



- 과 염증반응에 관한 신경독성연구 서울대 대학원, 학위논문 (석사), 2002.
18. Kim HS, Park CH, Suh YH : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup> ATPase, *Neuroreport*, 1;9(17):3875-9, 1998.
  19. 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.
  20. 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 Aβ- or CT(105)-induced toxicity, *Biol Psychiatry*, 1;49(3):240, 2001.
  21. 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.
  22. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수 : 원지와 석창포의 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. *동의생리병리학회지*, 17(4):1037-1049, 2002.
  23. 최혁, 김상호, 이대용, 안대중, 강형원, 류영수. pCT105로 유도된 치매모델에서 석창포 수추출액이 미치는 영향. *동의신경정신과학회지*, 13(2):173~194, 2002.
  24. 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.
  25. 劉文泰等纂 : 本草品彙精要, 北京, 人民衛生出版社, p.252, 1982.
  26. 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.
  27. 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.
  28. Zhang HY, Tang XC, Huperzine B : A novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells, *Neuroscience Letters*, 292:41-44, 2000
  29. Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi and K. Sakata, 1994, A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 10:1780-1783.
  30. 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*. Jun;27(3):189-96, 2001.
  31. Olson JM, Goddard KA, Dudek DM. : The Amyloid Precursor Protein Locus and Very-Late-Onset Alzheimer Disease. *Am J Hum Genet*. Aug 7, 2001.
  32. Mattson MP, Chan SL, Camandola S : Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. *Bioessays*. Aug;23(8):733-44, 2001.
  33. 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*. Jul 15;188(1-2):27-31, 2001.
  34. Hung A. Y., Haass C., Nitsch R. M., Qiu W. Q., Citron M., Wurtman R. J., Growdan J. H., Selkoe D. J. : Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein, *J Biol Chem*, 268(31):22959-22962, 1993.
  35. Gomez-Isla T., Price J. L., McKeel D. W., Jr, Growdon J. H., Hyman B. T. : Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease, *J Neurosci*, 16(14):4491-4500, 1996.
  36. Checler F : Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease, *J. Neurochem* 65(4):1431-1444, 1995.
  37. Barger SW, Fiscus RR, Ruth P, Hofmann F, Mattson MP : Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of beta-amyloid precursor, *J. Neurochem*, 64(5):2087-2096, 1995.
  38. Shoji M, Glode TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. : Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 2;258(5079):126-129, 1992.
  39. 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.
  40. 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.
  41. Matsumoto 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.
  42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Lacey-Casem ML, Oster-Granite ML : The neuropathology of the trisomy 16 mouse, *Crit Rev Neurobiol*, 8(4):293-322, 1994.
51. Kim HS, CH Park, and YH Suh : C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup> ATPase, *Neuroreport* 9(17):3875-3879, 1998.
52. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.370-371, 1995.
53. 李棣熙 : 遠志의 安神作用에 對한 藥理的 解析의 研究, 서울, 大韓本草學會誌, 12(1): 1-6, 1997.