동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 15. No. 2, 2004

拱辰丹이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 病態모델에 미치는 영향

황선미, 정대규
대구한의대학교 한의과대학 신경정신과 교실

The Effects of KongJin-Dan(KJD) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105

Seon-Mi Hwang, Dae-Kyoo Chung

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Kyoungbuk, Korea

Abstract

Objective :

This experiment was designed to investigate the effect of KongJin-dan(KJD) on the Alzheimer's disease.

Method :

The effects of KJD on IL-1β, IL-6, TNF-α, amyloid precursor proteins(APP), acetylcholinesterase(AChE), glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA of PC-12 and THP-1 cell treated by CT105 and AChE activity, APP production of PC-12 cell lysate treated by CT105 were investigated, respectively.

Results :

1. KJD suppressed IL-1β, IL-6, TNF-α, APP, AChE, GFAP mRNA in THP-1 and PC-12 cell treated by CT105.

2. KJD suppressed AChE activity and production of APP significantly in cell lysate of PC-12 cell treated by CT105.

Conclusions :

This study shows that KJD might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key Words : KongJin-dan(KJD), Alzheimer's disease, CT105.

교신저자 : 황선미 : 부산광역시 금정구 부곡동 224-1 102/1602
Tel. 051-582-9830, E-mail : haettra@hanmail.net
◆ 접수: 11/6 수정: 11/10 채택: 11/13

Ⅰ. 緖 論

Alzheimer's disease(AD)는 뇌의 전반적 위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 지남력 저하, 판단력, 추리력, 사고력, 계산력 등이 쇠퇴하여 점차적으로 방향상실, 일상생활능력저하 및 대소변 실금 등의 인격의 본질적인 면까지 상실되는 질병이다[1-3].

AD는 많은 원인에 의해서 유발되지만 β-amyloid protein(Aβ)의 과량침적으로 생기는 노인반(senile plaque)의 신경독성으로 신경세포사가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체(Neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이다[4]. 또한 acetylcholine과 같은 신경전달 물질의 감소는 기억력을 감소시키며, 인지결함은 acetylcholine을 만들어내는 신경세포의 퇴화와 함께 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 더욱 심화됨도 제시되고 있다[5]. 이 외에도 물리적인 뇌손상, 감염 및 기타 염증반응에 의해 활성화된 뇌의 신경교세포인 microglial cell과 astrocyte 등이 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등의 proinflammatory cytokine을 과다하게 발현하여 중추신경계의 염증반응을 일으키고 이것이 세포독성을 일으킨다고 알려져 있다[6].

韓醫學에서 痴呆는 〈景岳全書[7]〉에 痴獃란 病名으로 처음 언급되었으며 이후 呆病[8], 健忘[9] 등의 범주에서 다루어졌는데, 일반적인 증상은 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭 등이며, 원인은 稟賦不足, 肝腎陰虛, 濕痰閉阻, 氣滯血瘀 등으로 虛證은 陰虛와 腦髓不足에 의한 것이 많아 培補眞陰해야 한다고 보았다[10].

拱辰丹은 元末에 危[11]가 撰한 〈世醫得效方〉에 최초로 수록된 처방으로 先天稟賦虛弱으로 眞氣가 猶怯한데 사용하며 그 효능은 天元一氣를 固密하게 하여 水昇火降을 도모하면 五臟이 自和하므로 百病이 不生한다고 하여 임상에 널리 활용되고 있다[12].

최근 韓醫學界에서는 痴呆에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있는데, 실험적 연구로 각종 韓藥材가 痴呆실험동물에 있어 記憶과 行動에 미치는 影響에 대한 연구[13-15], 행동 및 생화학적 변화에 대한 연구[16-19] 그리고 염증성 뇌세포 활성물질에 대한 연구 등[20-23]이 있으나, 先天稟賦不足, 腦髓不足에 多用하는 拱辰丹을 이용한 효과에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 拱眞丹이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 拱辰丹을 시료로 하여 CT105를 처리한 PC-12와 THP-1 cell의 IL-1β, IL-6, TNF-α, amyloid precursor proteins(APP), AChE, glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA 발현과 PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE의 활성, APP의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

본 실험을 위하여 20g, 4週齡의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 사용하였으며, 암컷 C57BL/6 생쥐는 한국생명과학연구원에서 공급받아 실험에 사용하였다. 飼料는 固形飼料(粗蛋白質 22.1% 이상, 粗脂肪 8.0% 이하, 粗纖維 5.0% 이하, 粗灰分 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사)를, 食水는 精製水를 자유로이 섭취하게 하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 拱辰丹의 처방구성은 대구한의대학교 부속한방병원 處方集에 準하였으며, 사용한 藥材는 대구한의대학교 부속한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였고, 처방 1丸의 내용과 분량은 다음과 같다.

Composition of KongJin-Dan (KJD)

韓 藥 名	生 藥 名	用量(g)
鹿 茸	Cervi Pantiorichum	0.542
當 歸	Angelicae Radix	0.542
山 茱 萸	Corni Fructus	0.542
麝 香	Moschus	0.068
紅 蔘	Ginseng Radix Rubra	0.542
熟 地 黃	Rehmanniae Radix Preparat	0.542
蜂 蜜	Mel	2.222
Total amount		5.000

3) 檢液의 調製

拱辰丹의 무게를 측정하고, 세말로 분쇄한 후 최종농도 10 ㎎/㎖가 되게 생리식염수를 첨가하여 현탁원액을 제조하고, 1시간 동안 rotary shaker에서 전탕하여 현탁액을 제조하였다. 세포 배양액에 첨가하기 위하여, 10 ㎖의 현탁액을 0.22 ㎛ filter(Millipore, U.S.A.)로 여과하여 사용하였다.

2. 方法

1) 세포독성(cytotoxicity) 측정

(1) 세포 배양

Mouse lung fibroblast cells(mLFCs)는 BALB/c 생쥐의 정상 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15 ㎖)에 넣어 1400rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 DMEM{containing collagenase A(5 ㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15 ㎎/㎖, Sigma), antibiotics (penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS를 넣어 약 2회 1500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양였다.

1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105cells/㎖ 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

PC-12(rat adrenal pheochromocytoma, ATCC, CRL1721)는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% horse serum과 5% FBS으로 배양하였다

THP-1(ATCC, TIB-202; American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)는 DMEM에 10% FBS, penicillin (100 U/㎖), streptomycin (100 ㎍/㎖) 그리고 10 ㎍/㎖의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO2인 37℃ 배양기에서 배양하였다.

(2) Recombinant carboxyl-terminal fragment(CT105) 복제

CT105를 E. coli에서 발현 정제하기 위해 APP 105 amino acid를 coding 하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 Bam HI site를 넣어주었다. PC-12 cell를 lipopolysaccaride(LPS)로 자극하고 mRNA를 추출하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 415 base pair를 증폭하였다. 증폭된 절편을 Bam HI으로 절단하여 insert를 취해 6×his·tag을 갖는 pRSET B vector의 Bam HI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 E. coli BL21 strain에 再形質 전환하였고 이를 再造合 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 유도는 1 mM IPTG로 3시간 동안 시행하여 E. coli를 획득하였다.

이 E. coli는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터뜨린 후 DNase와 RNAse를 처리하고 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidin affinity column(Invitrogen. U.S.A.)을 사용하여 native한 APP의 CT105을 얻었다(Fig.1).

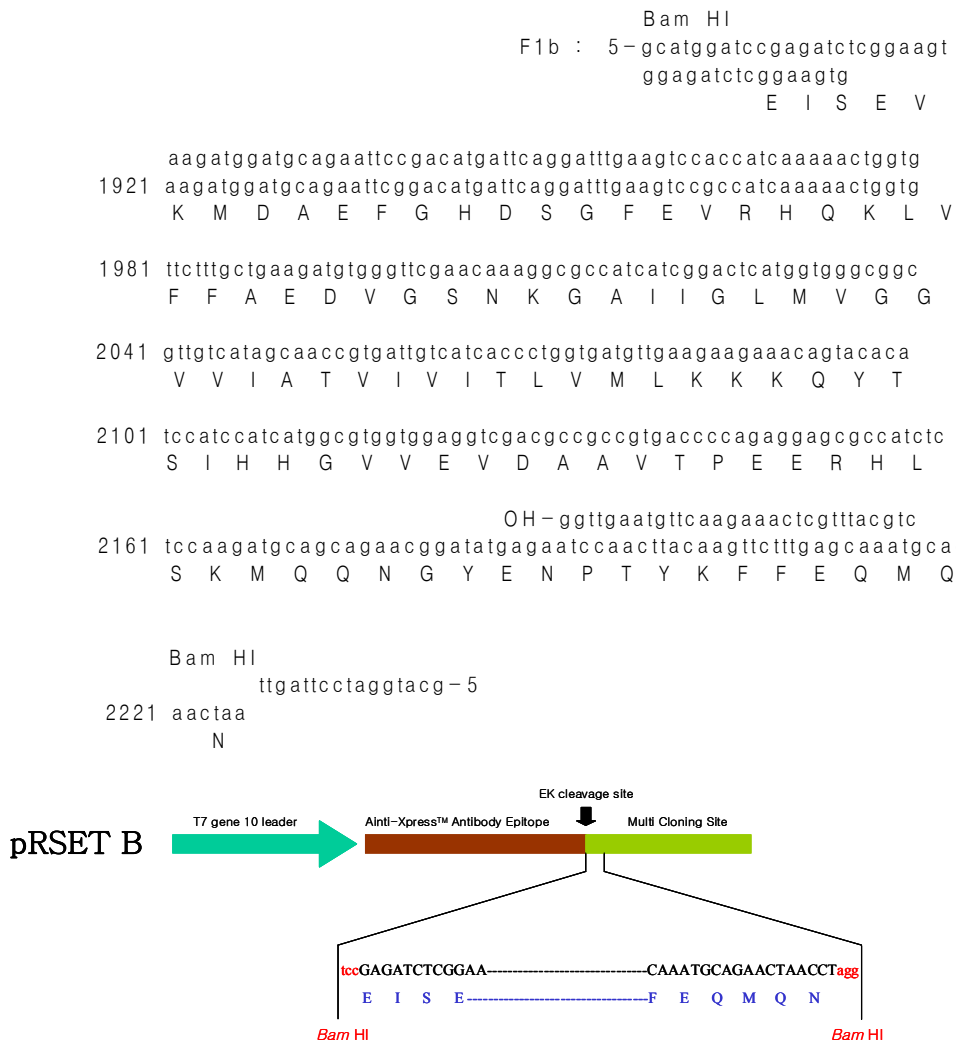


Fig.1. Construction of pRSET-CT105.

(4) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법24)을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC와 PC-12 cell은 37℃, 5% CO2 incubator에서 자란 것을 trypsin-EDTA용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0×104개의 세포로 96 wells plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO2)에서 2시간 배양한 후 拱辰丹(최종농도 400 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖)과 CT105(최종농도 80 ㎛M, 40 ㎛M, 20 ㎛M, 10 ㎛M, 5 ㎛M, 1 ㎛M)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50 ㎕를 가하고 1 시간 동안 4 ℃에 방치하였다. 그 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid)용액을 100 ㎕/well로 가한고 실온(room

temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 ㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER(molecular devices, U.S.A.)에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Alzheimer's disease 관련 유전자발현 분석

(1) PC-12 cell에서 Alzheimer's disease 관련 유전자발현 분석

PC-12 cell을 24 wells plate에 2.0×106세포로 각각 분주한 후 12시간 이상 FBS 결핍 DMEM배지에서 배양한 후 拱辰丹(100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖과 1 ㎍/㎖)의 농도로 첨가하고 1시간 후 CT105(20 ㎛M)를 처리하고 5시간 동안 동시 배양하였다.

(2) THP-1 cell에서 proinflammatory cytokine 유전자발현 분석

THP-1 cell에 LPS (2 ㎍/㎖)을 동시 처리하여 proinflammatory cytokine을 유발시켰다. 拱辰丹은 처리 1시간 전에 Hank's balance salt solution(HBSS)으로 세척한 후에 FBS 결핍 DMEM배지에 100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖의 농도로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

(3) RNA 추출

PC-12 cell과 THP-1 cell은 拱辰丹(100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖과 1 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT105(20 ㎛M), rIL-1㎁(100 ng/㎖)와 LPS(2 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 5시간 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 ㎕를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroformm(CHCl3) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 혼합(voltex)하였다. 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다가 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 세척하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(4) RT-PCR

역전사반응(reverse transcription reaction)은 준비된 total mRNA 3 ㎍을 75℃에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor (20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer (150 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl2)를 가한 후, 1 ㎕의 M-MLV RT (200 U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(5) cDNA PCR

PCR은 항온 수조 방식의 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 ㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-1㎁, IL-6, APP, AChE, gilal fibrillary acidic protein(GFAP) 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmole/㎕)와 antisense primer(20 pmole/㎕)를 혼합하여 1 ㎕를 가하고, 다시 3 ㎕ 2.5 mM dNTPs, 3 ㎕ 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl2), 그리고 0.18 ㎕ Taq. polymerase(5 U/㎕)를 첨가한 다음, 최종 부피가 30 ㎕ 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation(72℃, 1분)을 25 cycles한 뒤

post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 ㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

3) PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE 활성도 측정 및 APP 발현 측정

(1) 세포성 단백질 추출

PC-12 cell에 拱辰丹(100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖, and 0.1 ㎍/㎖)을 처리하고 1시간 후 CT105(20 ㎛M)를 24시간 동시 배양한 후 세포성 lysate를 얻어 AChE 활성도를 측정하였고, 세포성 lysate를 얻기 위하여 50 ㎕의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200 mM; pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10㎍/㎖ leupetin}을 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고 5분간 원심분리하여 세포성 lysate를 얻어 Bradford 염색법25)으로 단백질을 정량하여 50 ㎍으로 조정하였다.

(2) AChE 활성도 측정

세포성 lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2 ㎖와 혼합하였다. 각 tube에 3.0 ㎖ water, nitrophenol solution 2 ㎖, acetylcholine chloride solution 0.2 ㎖을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25℃ 수조에서 30분간 배양시킨 후 ELISA LEADER (Molecular Devices, U.S.A.)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) APP의 immunoblotting 분석

세포 lysate(50㎍)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 전이시켰다. 2% BSA로 2시간 blocking 한 후 anti-human APP N-terminal antibody을 처리하여 4℃에서 overnight시켰다. 그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, Arlington Heights, IL)과 반응시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 분석하였다.

7) 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test26) 분석 방법을 이용하여 P<0.05수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 成 績

1. PC-12 cell에 대한 세포독성

1) mLFC과 PC-12 cell에 대한 拱辰丹의 세포독성

拱辰丹의 세포독성을 관찰한 결과, mLFC의 생존률에 있어서 대조군에 비해 200 ㎍/㎖ 이하의 拱辰丹 투여군은 변화가 없었고, 400 ㎍/㎖의 拱辰丹 투여군은 85±3.7(%)로 감소되었다. PC-12 cell의 생존률에 있어서는 대조군에 비해 200 ㎍/㎖ 이하의 拱辰丹 투여군은 변화가 없었고, 400 ㎍/㎖의 拱辰丹 투여군은 88±3.9(%)로 감소되었다(Table Ⅰ)

Table Ⅰ. Cytotoxicity Effects of KJD on mLFC and PC-12 cell

Group	Concentration (㎍/㎖)	Percent of control data(%)	
		mLFC	PC-12
Control	0	100 ± 4.9	100 ± 5.3
KJD	1	98 ± 3.2	100 ± 2.5
	10	97 ± 2.6	101 ± 3.4
	50	97 ± 3.1	98 ± 3.0
	100	94 ± 2.8	96 ± 4.6
	200	90 ± 3.8	93 ± 5.5
	400	85 ± 3.7*	88 ± 3.9*

Mouse lung fibroblast cells(mLFCs) and rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration KongJin-Dan(KJD). The results are expressed the mean±S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test(*p<0.05, **p<0.01, ***<0.001)

2) PC-12 cell에 대한 再造合 CT105의 세포독성

PC-12 cell에서 CT105를 처리한 후의 생존률을 관찰한 결과, 대조군에 비해 5 μM 이하의 CT105 투여군은 변화가 없었고, 80μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%), 83.1±2.7(%), 92.4±3.4(%)로 감소되어 농도의존적으로 세포독성을 나타내었다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ.
Cytotoxicity of recombinant CT105 in PC-12 Cell

Group	Concentration (μM)	Percent of control data(%)
		PC-12
Control	0	100 ± 1.3
CT105	1	105 ± 3.1
	5	97.8 ± 4.9
	10	92.4 ± 3.4*
	20	83.1 ± 2.7***
	40	79.5 ± 3.7***
	80	40.0 ± 1.4***

Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with 1 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM and 80 μM of CT105 for 72hr. The results are expressed the mean±S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test(*p<0.05, **p<0.01, ***<0.001)

2. THP-1 cell에서 proinflammatory cytokine mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

THP-1 cell의 IL-1β mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μM의 CT105와 100 ng/mℓ의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, 100 μg/mℓ, 10 μg/mℓ, 1 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서 농도의존적으로 발현이 억제되었고(Table Ⅲ, Fig. 2), IL-6 mRNA와 TNF-α mRNA 발현 역시 대조군에 비해 100 μg/mℓ, 10 μg/mℓ, 1 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서 억제되었다(Table Ⅲ, Fig. 3, 4).

Table Ⅲ.
Effects of KJD on Proinflammatory Cytokines Gene mRNA Expression in THP-1 Cell

Group		CT105 + IL-1β	Cytokine mRNA expression(Ht)		
			IL-1β	IL-6	TNF-α
Media		-	42	14	112
Control		+	163	186	162
KJD (μg/mℓ)	100	+	13	23	39
	10	+	47	89	124
	1	+	137	165	158

THP-1 cell were pretreated with various concentration KJD(100, 10, 1 μg/mℓ) in the presence CT105(20 μM) plus rIL-1β(100 ng/mℓ) for 6h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The gene expression were observed IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA expression, and internal control(β-actin) in THP-1 cell.

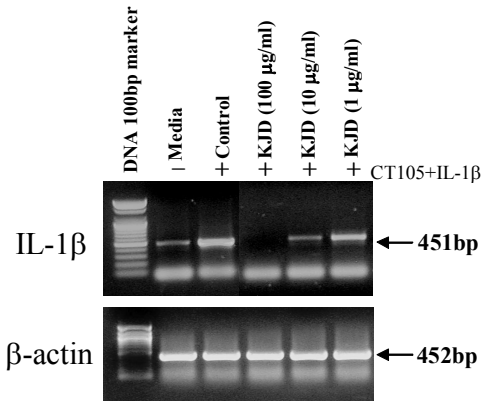


Fig. 2. Inhibitory effects of KJD on proinflammatory IL-1β gene mRNA expression in THP-1 cell.

THP-1 cell were pretreated with various concentration KJD (100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105(20 μM) plus recombinent rIL-1β(100 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed IL-1β mRNA expression, and internal control (β-actin) in THP-1 cell.

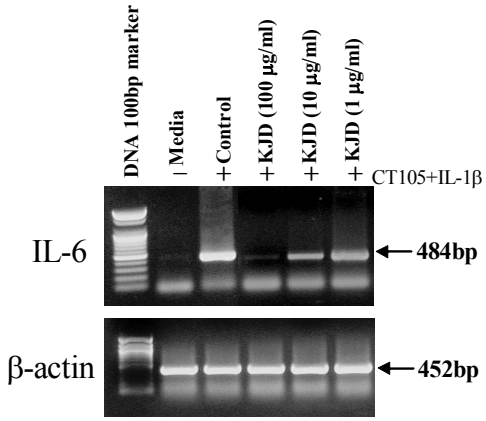


Fig. 3. Inhibitory effects of KJD on proinflammatory IL-6 gene mRNA expression in THP-1 cell.

THP-1 cell were pretreated with various concentration KJD (100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105(20 μM) plus rIL-1β (110 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed IL-6 mRNA expression, and internal control (β-actin) in THP-1 cell.

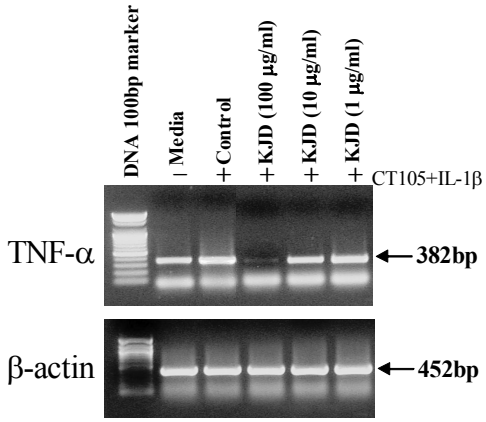


Fig. 4. Inhibitory effects of KJD on proinflammatory TNF-α gene mRNA expression in THP-1 cell.

THP-1 cell were pretreated with various concentration KJD (100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105(20 μM) plus rIL-1β (100 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed TNF-α mRNA expression, and internal control (β-actin) in THP-1 cell.

3. PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

PC-12 cell의 APP mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μM의 CT105와 100 ng/mℓ의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, CT105, rIL-1β와 100 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서만 발현이 억제되었고(Table Ⅳ, Fig. 5), AChE와 GFAP mRNA 발현은 대조군에 비해 CT105, rIL-1β와 100 μg/mℓ, 10 μg/mℓ, 1 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군 모두에서 억제되었다(Table Ⅳ, Fig. 6, 7).

Table Ⅳ.
Inhibitory Effects of KJD on Alzheimer's Disease Related Gene mRNA Expression in PC-12 cell

Group		CT105 + rIL-1β	mRNA expression(Ht)		
			APP	AChE	GFAP
Media		-	33	66	43
Control		+	70	121	203
KJD (μg/mℓ)	100	+	21	64	59
	10	+	76	62	110
	1	+	72	107	172

Rat pheochromocytoma cell line(PC-12) were pretreated with various concentration KJD(100, 10, 1 μg/mℓ) in the presence CT105(20 μM) plus recombinent rIL-1β(100 ng/mℓ) for 6h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The gene expression were observed APP, AChE, glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA expression, and internal control(G3PDH) in PC-12 cell.

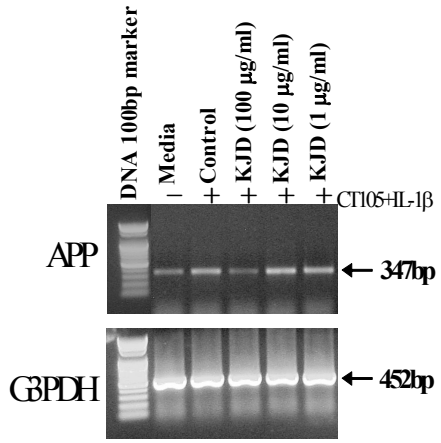


Fig. 5. Inhibitory effects of KJD on amyloid precursor protein (APP) mRNA expression in PC-12 cell.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration KJD(100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105(20 μM) plus recombinent IL-1β (100 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed APP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell.

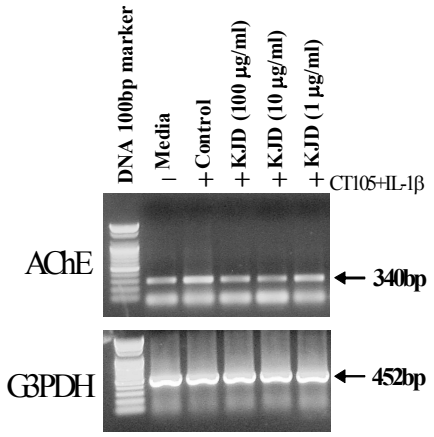


Fig.6. Inhibitory effects of KJD on acetyl-cholinesterase (AChE) mRNA expression in PC-12 cell.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration KJD(100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105 (20 μM) plus recombinent IL-1β (100 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed AChE mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell.

4. PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE 활성도와 APP 발현에 미치는 영향

1) PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE 활성도에 미치는 영향

PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE 활성도를 측정한 결과, 20 μM의 CT105와 100 ng/mℓ의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, CT105, rIL-1β와 100 μg/mℓ, 10 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서 각각 52.7±8.7(%), 76.5±7.4(%)로 나타나 유의성 있는 억제 효과를 보였다(Fig. 8).

2) PC-12 cell 세포성 단백질에서의 APP 발현에 미치는 영향

PC-12 cell 세포성 단백질에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군은 현저하게 발현되었으나 拱辰丹 투여군에서는 발현이 감소되었다(Fig.9).

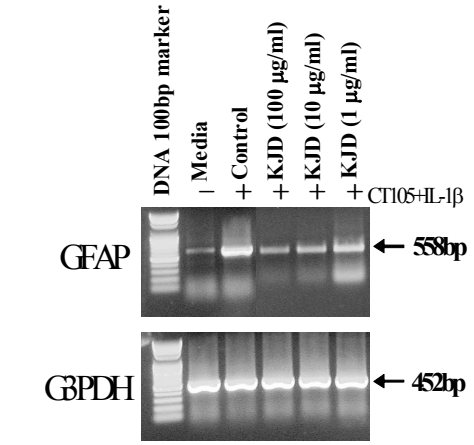


Fig.7. Inhibitory effects of KJD on glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA expression in PC-12 cell.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration KJD(100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105 (20 μM) plus recombinent IL-1β (100 ng/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed GFAP mRNA expression, and internal control (G3PDH) in PC12 cell.

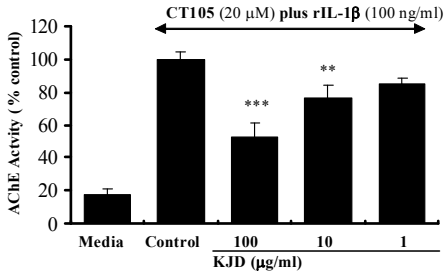


Fig.8. Inhibitory effect of KJD on the AChE activity in CT105 plus rIL-1β stimulated PC-12 cell.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration KJD (100, 10, 1 μg/ml) in the presence CT105(20 μM) plus rIL-1β (100 ng/ml) for 24 h.The lysate (100 μl,mg/ml) were measured using AChE diagnostic kits (Sigma). The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Media was not treated, CT105 plus rIL-1β was control, CT105 plus rIL-1β + KJD (100 μg/ml), CT105 plus rIL-1β + KJD (10 μg/ml), and CT105 plus rIL-1β + KJD (1 μg/ml). Statistically significant value compared with CT105 control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

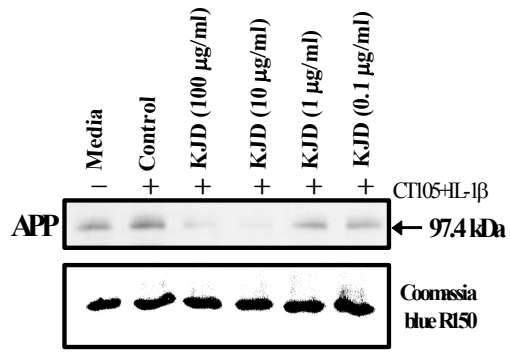


Fig. 9. Suppression effect of KJD on the amyloid precursor protein (APP) in PC-12 stimulated CT105 plus rIL-1β by Western blot analysis.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with various concentration KJD in the presence CT105 (20 μM) plus rIL-1β (100 ng/ml) for 24 h. APP expression was measured by immune Western blot assay. Cell lysate (50 μg/lane) were separated by SDS-polyacryamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes. Lane 1, RPMI-1640 media control was not treated; Lane 2, CT105 plus rIL-1β; lane 3, CT105 plus rIL-1β (100 μg/ml); lane 4, CT105 plus rIL-1β+KJD (10 μg/ml); lane 5, CT105 plus rIL-1β+KJD (1 μg/ml); lane 6, CT105 plus rIL-1β+KJD (0.1 μg/ml).

Ⅳ. 考 察

AD는 진행성 痴呆로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로, 그 원인에 대해서는 다양한 가설들이 있다3).

AD를 유발하는 원인으로는 Aβ, estrogen, apolipoprotein E, PS(presenilin), oxidants(hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며27-28), 이 중 Aβ의 침적으로 생기는 노인반(Senile plaque)의 신경독성으로 신경세포의 파괴가 일어나는 것과 과인산화 타우(Tau) 단백질의 침적에 의한 신경원섬유농축체(Neurofibrillary tangles, NFTs)의 작용으로 신경퇴행이 생기는 것이 대표적이다29).

NTFs와 노인반은 정상 뇌에도 존재하며 나이가 많아짐에 따라 그 수가 증가하나 AD의 경우 뇌의 기억과 인지를 담당하는 부위에 상당히 많이 증가하여 신경전달을 방해하게 되고 부교감신경과 뇌의 다른 신경전달경로를 파괴하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 acetylcholine, serotonin, noradrenalin, dopamine, glutamate, substance P 등의 많은 신경전달물질이 크게 감소하게 되고, 이중 acetylcholine의 결핍은 가장 중요한 현상이며 이것을 회복시키는 것이 현재까지의 주 치료목표의 하나가 되고 있다30).

노인반은 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 Aβ(β-amyloid protein)을 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다. 신경교세포는 염증매개물질 분비작용과 식세포작용을 하기 때문에 이것은 AD의 염증성 기전을 설명하는데 중요하다31).

뇌의 amyloid 침적은 Aβ이 응집한 결과물이며 Aβ은 β-secretase나 γ-secretase에 의해 큰 분자량의 APP(amyloid precursor proteins) 일부가 잘려서 생성되는데 이 단백질은 소수성 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다. Amyloid cascade hypothesis에 따르면 Aβ의 축적은 AD 유발의 결정적 인자로 amyloid의 축적이 점차 커지면서 Aβ가 신경세포를 손상시켜 결국 痴呆의 증상이 나타나게 된다27-28,32). Aβ는 그 자체가 신경독성이 있

는 것이 아니라 2차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있다. 또한 최근에는 APP의 C말단 부위인 C말단 단백질(carboxyl-terminal fragment protein)이 Aβ보다 더 독성이 있다고 알려지고 있다. Aβ와 C말단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 활발한 연구가 진행되고 있는데 특히 활성효소의 형성과 세포내 칼슘 항상성의 저해가 중요한 역할을 할 것으로 알려지고 있다27-28,33-35).

APP(amyloid precursor proteins)는 21번 염색체의 single gene에 존재하며 이 21번 염색체가 3개인 다운증후군 환자는 早期痴呆 현상을 나타내고 30~40대에 이르러서는 AD에서 발견되는 노인반과 신경원섬유농축체가 형성되는데, 이러한 병변은 유전자 수의 증가로 말미암은 APP의 과도생성 때문으로 추측된다. 또한 AD 환자의 기저 전뇌와 해마 부위에서 APP의 유전자 발현이 증가되어 있고 노화된 섬유아세포에서 APP 유전자 발현이 증가되어 있다는 보고를 볼 때 APP가 痴呆형성과정에 직접적인 관련을 가지고 있을 것으로 추론할 수 있다27-28,33-36).

이 외에도 염증매개물질과 다른 면역체계가 AD의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는데 이는 노인반이 생성된 주변에 IL-1, IL-6, complement 등 염증매개물질들이 증가되어 있는 것으로부터 알 수 있다31).

특히, 노인반은 reactive microglial cell을 함유하고 있는데 이것은 식작용 교세포로서 특수한 형태의 백혈구와 비슷한 기능을 하는 것으로 이 microglial cell에서 Aβ의 침전물이 생성하는 것으로 생각하고 있다37). 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 microglial cell은 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서 cytokine을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만 일단 물리적인 뇌손상, 감염 및 염증 반응 등의 자극에 의해 손상된 뇌혈관 장벽을 통하여 면역계 세포들이 중추신경계로 침입하면 활성화된 astrocyte 및 microglial cell들이 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 proinflammatory cytokine들을 과다하게 생성하여 뇌에서 cytokine 항상성이 파괴됨으로써 중추신경계 염증반응을 일으킨다는 가설이 최근 많은 연구결과들에 의해 입증되고 있다6,38-39). 뇌손상에서 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 microglial cell로, astrocyte의 주요자극인자인 IL-1과 TNF-α를 과잉유도하여 중추신경계의 염증반응을 개시하는 중요한 역할을 갖고 있다고 생각된다. 중추신경계의 염증반응은 일련의 단계로 진행되는데, microglial cell에서 유도발현된 IL-1 및 TNF-α는 astrocyte를 활성화시켜 IL-6, IL-8 등을 발현시키고 활성효소인 일종의 peroxynitrite 등을 유도함으로써 신경세포의 사멸을 야기하게 된다40-41).

또한 AD, Parkinson's disease 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine 발현을 보이는 astrocyte와 microglial cell의 활성화가 관찰됨으로써 이들 질병과 proinflammatory cytokine이 밀접한 관계가 있으리라는 가설이 설득력을 얻고 있다41).

韓醫學的으로 痴呆는 음식과 攝生의 부적절로 인한 濕痰阻竅, 情緖의 抑鬱이나 정신적 쇼크 또는 타박손상으로 인한 氣滯血瘀, 大病 久病 후와 高齡時 衰弱으로 인한 肝腎陰虛, 先天不足의 虛弱과 유전적 결함으로 인한 腦髓不足 등으로 인해 발생되며, 濕痰阻竅에는 割痰開竅하고 氣滯血瘀에는 理氣和血하며 肝腎陰虛에는 滋補肝腎에 熄風을 補助하고 腦髓不足에는 塡精補髓하는 治法을 쓴다10).

拱辰丹은 元末에 危11)가 撰한 世醫得效方에 최초로 수록된 처방으로 그 이후 醫家들에 의해 임상에서 많이 활용되어 왔다. 본 방은 峻補下元之品으로 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥之品인 當歸, 固精强陰·助陽收澁之品인 山茱萸, 開關利竅之品인 麝香의 4가지 약물로 구성되어 전체적으로 溫無毒, 甘苦辛鹹하여 心·腎·肝經에 入하여 鹿茸, 當歸, 山茱萸는 補肝腎兼補心하고 麝香은 이들의 藥性을 十二經으로 通行케 한다. 여기에 大補元氣하는 紅蔘과 養血滋陰하는 熟地黃을 加하여 先天稟賦虛弱으로 眞氣가 猶怯한데 사용하며, 그 효능은 天元一氣를 固密하고 水昇火降을 순조롭게 하여 心腎을 補益함으로서 臟腑의 虛損에 대한 豫防 및 治療를 하는 補益强壯劑라 할 수 있다11-12,41).

拱辰丹에 대한 실험적 연구로는 張43)의 强精補氣作用에 미치는 영향, 金44)의 免疫反應, 抗疲勞 및 內分泌에 미치는 影響 및 朱45)의 拱辰丹 藥鍼刺戟이 血液 및 免疫組織에 미치는 影響 등에 관한 연구가 있으며, 한편 痴呆에 대한 실험적 연구로는 각종 韓藥材가 痴呆실험동물에 있어 記憶과 行動에 미치는 影響에 대한 연구 13-15), 행동 및 생화학적 변화에 대한 연구 16-19) 그리고 염증성 뇌세포 활성물질에 대한 연구20-23)가 있으나, 先天稟賦不足, 腦髓不足에 多用하는 拱辰丹을 이용한 효과에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 拱辰丹이 AD에 대한 예방 및 치료제로서의 가치를 평가하고자, mLFC와 PC-12 cell에 대한 拱辰丹과 CT105의 세포독성을 측정하고 拱辰丹과 LPS를 처리한 후 THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현을 분석하였으며, 拱辰丹과 CT105를 처리한 후 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA 발현과 PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE의 활성 및 APP의 발현을 관찰하였다.

PC-12 cell를 이용한 실험에서는 먼저 적당한 처리물질과 실험약물의 농도를 정하기 위하여 세포독성을 측정하였는데, mLFC, PC-12 cell에 대한 拱辰丹의 세포독성을 관찰한 결과, mLFC의 생존률에 있어서는 대조군에 비해 200 ㎍/㎖ 이하의 拱辰丹 투여군은 변화가 없었고, 400 ㎍/㎖의 拱辰丹 투여군은 85±3.7(%)로 감소되었다. PC-12 cell의 생존률에 있어서는 대조군에 비해 200 ㎍/㎖ 이하의 拱辰丹 투여군은 변화가 없었고, 400 ㎍/㎖의 拱辰丹 투여군은 88±3.9(%)로 감소되었다(Table Ⅰ). 200 ㎍/㎖ 이하의 농도로 拱辰丹을 PC-12 cell에 처리하였을 때는 mLFC와 PC-12 cell의 생존률에 유의한 변화가 없었으므로 이후의 PC-12 cell를 재료로한 실험에서는 주로 100 ㎍/㎖ 이하의 拱辰丹을 사용하기로 하였다.

CT105는 Aβ를 포함하는 APP의 carboxyl-terminal protein으로, 실험적으로 PC-12 cell과 cortical neuron에 독성을 나타내고, 생쥐에 대해 기억력을 감퇴시키고 신경변성을 초래하며 세포내 칼슘 항상성을 파괴하는 작용을 하며, 배양된 microglial cell에서 IL-1β, IL-6 mRNA를 강력히 발현시키는 것으로 알려져 있어46) 본 실험에는 인위적인 AD의 모델을 만들기로 하고 CT105를 RT-PCR로 再造合하여 사용하였다.

CT105를 PC-12 cell에 처리한 후의 생존률을 관찰한 결과, 대조군에 비해 5 μM 이하의 CT105 투여군은 변화가 없었고, 80μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM 투여군은 각각 40.0±1.4(%), 79.5±3.7(%), 83.1±2.7(%), 92.4±3.4(%)로 감소되어 농도의존적으로 세포독성을 나타냈는데(Table Ⅱ), 이후 PC-12 cell를 재료로 한 실험에서는 약 80%이상의 생존률을 나타낸 20 μM 이하의 농도로 CT105를 사용하기로 하고, 보다 효과적으로 AD 모델을 만들기 위해 rIL-1β 함께 처리하였다.

THP-1 cell의 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현을 관찰한 결과, 20 μM의 CT105와 100 ng/㎖의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, 100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서 농도의존적으로 발현이 억제되었다(Table Ⅲ, Fig. 2, 3, 4).

GFAP는 뇌손상, 중추신경계감염, AD 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로서, AD 환자에서는 GFAP가 현저하게 증가하는 경향을 보이는데, 이는 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 노인반형성과 신경변성 과정을 촉진하게 된다. 이러한 AD에서의 GFAP의 증가는 TNF-α의 과다발현과 연관이 많은 것으로 알려져 있다47-48).

PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA 발현을 관찰한 결과, APP mRNA 발현에 있어서는 20 μM의 CT105와 100 ng/㎖의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, CT105, rIL-1β와 100 ㎍/㎖의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서만 발현이 억제되었고(Table Ⅳ, Fig. 5), AChE와 GFAP mRNA 발현은 대조군에 비해 CT105, rIL-1β와 100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군 모두에서 억제되었다(Table Ⅳ, Fig. 6, 7). 이것은 拱辰丹이 CT105와 rIL-1β로 인해 과도하게 발현된 proinflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6,

TNF-α를 감소시켰고, 노인반 형성에 관여하는 APP와 기억력 장애에 중요한 역할을 하는 AChE를 억제함으로써 AD의 예방과 기억력 감퇴 등의 증상 치료에 기여할 수 있으리라 기대된다.

PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE 활성도를 측정한 결과, 20 μM의 CT105와 100 ng/mℓ의 rIL-1β만을 처리한 대조군에 비해, CT105, rIL-1β와 100 μg/mℓ, 10 μg/mℓ의 拱辰丹을 함께 투여한 실험군에서 각각 52.7±8.7(%), 76.5±7.4(%)로 나타나 유의성 있는 억제 효과를 보였는데(Fig. 8), 이를 AChE mRNA 발현 결과와 함께 보면 拱辰丹의 투여로 PC-12 cell의 유전자 수준과 세포성 단백질 수준에서 모두 AChE가 억제되는데, 이는 拱辰丹 투여가 기억력 개선에 도움을 줄 것으로 생각된다.

PC-12 cell 세포성 단백질에서의 APP를 Western blot을 통해 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군은 현저하게 발현되었으나 拱辰丹 투여군에서는 발현이 감소되었는데(Fig. 9), 이를 유전자 수준의 APP mRNA 발현 억제 효과와 함께 보면 拱辰丹이 Aβ의 생성에 관여하는 APP의 발현을 억제함으로써 임상적으로 AD의 예방에 효과가 있을 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해보면 拱辰丹은 THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현을 억제하였으며, CT105를 처리한 후 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA 발현을 억제하였고, PC-12 cell 세포성 단백질에서의 AChE의 활성과 APP의 발현을 억제하였다.

따라서 拱辰丹은 APP의 과다생성, proinflammatory cytokine의 과잉발현 등으로 인해 야기될 수 있는 AD에 대한 예방과 치료 및 AChE의 활성화로 야기되는 기억력 감퇴에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 더 과학적으로 痴呆원인인자를 연결한 韓醫學的인 병인, 병리학적 분석과 AD에 대한 拱辰丹의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 結 論

拱辰丹의 AD에 대한 효과를 규명하고자 CT105를 처리한 PC-12와 THP-1 cell에서 proinflammatory cytokines, APP, AChE, GFAP mRNA 유전자 발현 및 AChE 활성도, APP의 발현을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 拱辰丹은 THP-1 cell에서 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 억제하였다.
2. 拱辰丹은 PC-12 cell에서 APP, AChE, GFAP mRNA의 발현을 억제하였다.
3. 拱辰丹은 PC-12 세포성 단백질에서 AChE의 활성과 APP의 발현을 억제하였다.

본 연구에서 저자는 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 실험모델에서 拱辰丹의 유의성 있는 효과를 관찰하였으며, 拱辰丹이 AD의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 생각된다.

參 考 文 獻

1. 이부영. ICD-10 정신 및 행동장애. 서울:일조각. 1998:58-61.
2. 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256-71, 327-30, 663-4.
3. 서순규. 노인병·노인의학. 서울:고려의학. 1992:225-8, 230-2.
4. Baddeley AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H. The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. Brain. 1991;114(Pt6):2521-42.
5. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaro EP, Foster NL. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and

Alzheimer's disease. Neurology 1999;52(4):691-9.
6. Pyo H, Joe E, Jung S. Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. J Biol Chem. 1999;274(49):34584-89.
7. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102, 316-7.
8. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
9. 張介賓. 景岳全書. 서울:大成文化社. 1988:692.
10. 이봉교. 症狀鑑別治療. 서울:成輔社. 1991:122-6.
11. 危亦林. 世醫得效方. 北京:人民衛生出版社. 1990:271.
12. 金定濟. 診療要覽(下). 서울:東洋醫學研究院. 1974:438.
13. 황의완. 麝香蘇合元이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):1-16.
14. 홍대성, 김종우, 황의완. 麝香蘇合元이 情緖反應性과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):17-38.
15. 강현근, 김종우, 황의완. 香附子八物湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1999;10(1):39-52.
16. 정인철, 이상룡. 導痰益氣活血湯이 알츠하이머질환 病態모델의 生化學的 變化 및 行動에 미치는 影響. 東醫生理病理學會誌. 2001;15(20):260-76.
17. 김보경. 安神淸腦湯이 Alzheimer's disease 病態모델의 生化學的變化 및 行動에 미치는 影響. 東醫生理病理學會誌 2001;15(5):708-22.
18. 蔡鐘杰. 山査肉이 CT105로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 大田: 大田大學校大學院; 2002.
19. 정인철, 이상룡. 山査肉이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 東醫生理病理學會誌 2002;16(2):279-88.
20. 고재왕, 김태헌, 김준한, 류영수. 中樞神經系에서 蒲公英의 抗炎症作用에 關한 硏究. 東醫神經精神科學會誌. 2000;11(2):11-21.
21. 김태헌, 김준한, 강형원, 류영수. 洗心湯에 의한 腦星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(1):137-49.
22. 박진성, 강형원, 류영수. 生體外 알츠하이머병 實驗모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 關한 硏究. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(2):157-71.
23. 전창환, 민상준, 이성률, 강형원, 류영수. 中樞神經系에서 七福飮의 抗炎症作用에 관한 硏究. 東醫神經精神科學會誌. 2001;12(2):173-83.
24. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107-12.
25. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity; theoretical and experimental studies. Anal Biochem. 1996;236(2):302-8.
26. 金宇哲. 統計學槪論. 서울:英志文化社. 1990:177-9.
27. 김진수. Alzheimer's disease의 神經化學的 變化에 관한 考察. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):10-5.
28. Engidawork E, Baiic N, Fountoulakis M, Dierssen M, Greber-Platzer S, Lubec G. Beta-amyloid precursor protein, ETS-2 and collagen alpha 1 (VI) chain precursor, encoded on chromosome 21, are not overexpressed in fetal Down syndrome : further evidence against gene dosage effect. J Neural Transm Suppl. 2001;(61):335-46.
29. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T.

Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abetal-42/1-40 ratio in vitro and vivo. Neuron. 1996;17(5):1005-13.
30. Lucilla Parnetti, Umberto Senin, Patrizia Mecocci. Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease Drugs. May. 1997;53(5):752-68.
31. Jeffery L. Cummings, MD., Harry V. Vinters, MD., Gregory M. Cole, PhD., Zaven S. Khachaturian, PhD.. Alzheimer's Disease Etiologies, pathophysiogy, cognitive reserve and treatment opportunities. Neurology. 1998;51(Suppl 1):S1-S17.
32. Huse JT, Doms RW. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2000;22(1-3):81-98.
33. Russo C, Salis S, Dolcini V, Venezia V, Song XH, Teller JK. Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. Neurobiol Dis. 2001;8(1):173-80.
34. SP Fraser, YH Suh, YH Chong and M.B.A. Djamgoz. Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the C-terminal fragment of the β-amyloid precursor protein. J. Neurochemistry. 1996;66:2034-40.
35. SP Fraser. YH Suh, and M.B.A. Djamgoz. Ionic effects of the Alzheimer's disease β-amyloid precursor protein and metabolic fragment. Trends Neurosci. 1997;20:67-72.
36. Solans A, Estivill X, de La Luna S. A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. Cytogenet Cell Genet. 2000;89(3-4):177-84.
37. Mcgeer PL, Rosers J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. Neurology. 1992;42:447-9.
38. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral disease. Eur J Immunol. 1989;19(4):689-94.
39. Aloisi F, Car e A, Borsellono G, Gallo P, Rosa S, Bassani A. Production of hemolymphopoietic cytokines(IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor alpha. J Immunol. 1992;149(7):2358-66.
40. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnam CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes; Differential induction by lipopolysaccharide and IL-beta. J Immunol. 1993;150(7):2659-67.
41. Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. J Neurochem. 1991;57(3):823-30.
42. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981:66-7, 101-3, 115-6, 417.
43. 張鎔勳. 拱辰丹이 强精補氣作用에 미치는 影響. 大邱韓醫科大學 大學院. 1989.
44. 金璋顯. 拱辰丹이 免疫反應, 抗疲勞 및 內分泌 機能에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1990.
45. 朱貞柱, 金容奭, 李栽東, 崔道永, 高炯均, 安秉哲. 拱辰丹 藥鍼刺戟이 血液 및 각 免疫組織의 淋巴球와 CD4+ T細胞에 미치는 影響.

大韓鍼灸學會誌. 1999;16(3):179-202.
46. Chong YH. Effects of a Carboxy-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. Life Science. 1997;61(23):2323-33.
47. Monzon-Mayor M, Alvarez M, Arbelo-Galvan J, Romero-Aleman M, Yanes C, Plaza ML. Long-term evolution of local, proximal and remote astrocyte responses after diverse nucleus basalis lesioning(an experimental Alzheimer model); GFAP immunocytochemical study. Brain Res. 2000;865(2):245-258.
48. Zhao W, Bing-sheng L, Alkon DL, Barker JL, Chang YH, Wu M. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. Neuroreport. 2000;11(2):409-12.