동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 3, 2008

H2O2와 Aβ로 유도된 pc12 cell에서 生酸棗仁 수추출물의 항산화 및 항치매 효과

이상원, 김대현, 윤종현, 김진우, 정은영, 이성근*, 이기상*, 김태헌, 류영수, 강형원**
원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실
원광대학교 한의과대학 한방내과학교실*
원광대학교 산본한방병원 신경정신과 & 인암뇌신경센타**

The Effects of Antioxidant and Anti-Alzheimer on Hydrogen peroxide and β-amyloid peptid-induced PC 12 cells by Semen Ziziphi Spinosae water extract

Sang-Won Lee, Dae-Hyun Kim, Jong-Hyun Yun, Jin-Woo Kim, Ejun-Young Jung, Seoung-Geun Lee*, Key-Sang Lee*, Tae-Heon Kim, Yeoung-Su Lyu, Hyung-Won Kang**

Dept. of neuropsychiatry, college of Oriental Medicine, WonKwang University
Dept. of internal medicine, college of Oriental Medicine, WonKwang University*
Department of Neuropsychiatry and Inam Neuroscience Research Center, WonKwang University, Sanbon Oriental Medical Center**

Abstract

Objective : The antioxidant and anti-Alzheimer effects of Semen Ziziphi Spinosae (SZS) water extract against the amyloid beta peptide (1-42) or H2O2-induced oxidative damage and cell death were investigated in rat pheochromocytoma line PC 12.

Methods : The cells were incubated with SZS water extract and oxidative damage-inducing materials, amyloid beta peptide (1-42) or H2O2 for 24 h. The cellular viability was assessed by WST-1 assay, cytotoxic damage by LDH activity assay, oxidative damages of cells by fluorescence spectrophotometric method, and apoptosis by TUNEL staining assay.

Results and Conclusions :

1. Preincubation of the cells with SZS water extract prior to amyloid beta peptide (1-42) (2 uM) or H2O2 (30 uM) exposure elevated the cell survival close to the control and decreased the level of LDH activity and the fluorescence from the cell homogenates and TUNEL staining of the cells, compared to only amyloid beta peptide (1-42) (2 uM) or H2O2 (30 uM) treated conditions .

투고일 : 6/5 수정일 : 9/10 채택일 : 10/10
* 교신저자 : 강형원 주소 : 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
Tel : 031-390-2762 E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr

2. Our study suggests that Semen Ziziphi Spinosae (SZS) water extract has protective effects against amyloid beta peptide (1-42) or H2O2-induced cell toxicity through the antioxidation mechanism, which might be beneficial for the treatment of Alzheimer's disease.

Key Words : Semen Ziziphi Spinosae(SZS), pc 12, Antioxidant, Anti-Alzheimer, MTT assay, LDH assay

Ⅰ. 緖 論

痴呆는 정상적으로 성숙한 뇌가 외상이 아닌 질병 등 요인에 의해서 기질적으로 손상내지는 파괴되어 발생하며, 전반적으로 知能·學習·言語 등의 인지기능과 고도 정신기능이 감퇴되는 복합적인 임상증후군이다[1].

원인 질환에 따라 노인성 痴呆(Alzheimer's dementia), 혈관성 痴呆(Vascular dementia), Lewy소체 치매, 이마관자엽 치매 등으로 분류할 수 있는데, 미국의 경우 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, 이하 AD)이 전체 치매환자의 50-60%에 이르며, 혈관성 치매가 15-20%로 추정되어 AD의 예방과 치료법의 연구는 매우 중요한 문제로 대두되고 있다[1].

AD의 주요원인에 아직 명확한 원인은 밝혀지지 않고 있지만 다양한 원인적 가설이 주창되고 있다[3]. 여러 연구들 특히 신경병리학적 연구들에서 AD의 신경세포 산화[4,5]에 대해 강조하고 있는데, senile plaques의 주성분이 Aβ라고 알려지고[7,8], Aβ에 신경 독성이 있다는 것이 밝혀져 AD에 대한 연구는 Aβ의 독성을 제거하거나, 산화적 스트레스에서 신경세포를 보호하기 위해 연구가 진행 중이다[9].

산화적 손상으로 인한 신경세포의 상해는 활성산소가 신경세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산의 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포자사 또는 괴사를 유도한다[4,5].

이러한 산화적 스트레스는 APP(Amyloid precursor protein)에 의해 H_2O_2를 매개로 하여 신경세포의 세포사를 야기하고, 특히 Aβ도 신경세포의 세포사를 일으킨다고 보고되고 있다[6].

한의학에서는 痴呆에 대하여 張景岳의 ≪景岳全書·雜證謨≫[14] <癲狂篇>에서 '痴獃'라고 처음 기재되어 있으며, 淸代 陳士澤[15]에 의해 서양의학에서 말하는 痴呆의 槪念과 유사한 개념으로 기술되었다. 이후 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞등의 범주에서 다루었으며, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭 등의 일반적인 증상이 나타나며, 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등으로 辨證하고, 각각 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰開竅, 活血通竅, 淸熱解毒, 健腦益智 등의 치법에 따라 還少丹, 腎氣丸, 洗心湯, 通竅活血湯, 黃連解毒湯, 八物湯 등 여러 처방을 사용한다[2].

痴呆에 대한 연구에서 최근 최[16]등은 23가지 單味가 연구되었고, 48가지 복합처방이 연구되었다고 보고하였다.

酸棗仁(*Semen Ziziphi Spinosae*)은 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속한 낙엽관목인 묏대추나무(*Ziziphi Spinosa HU.*)의 성숙한 種仁으로 그 성질은 甘, 平, 無毒하고 心 · 脾 · 肝 · 膽으로 歸經하며, 補肝膽 · 寧心安神 · 斂汗등의 효능이 있어 血虛心煩不眠, 驚悸多夢, 體虛多汗, 盜汗 등의 병증을 치료하는데 사용되었다

[18]. 최[16]등이 보고한 것에 따르면 단미제로서 酸棗仁을 연구한 내용은 없으며, 복합처방의 연구들 중에서 洗心湯, 壯元丸加減方, 天王補心丹, 壯元丹 등의 구성약물로서 처방에 포함되어 연구되었다[16]. 즉 酸棗仁이 포함된 처방의 치매에 대한 유효성만 보고되고 酸棗仁 단미제에 대한 보고는 없었다.

또한, 정[22]이 메탄올(MeOH)로 추출한 酸棗仁의 CT105 발현세포주에서의 신경세포의 상해에 대한 보고한 바 있으나 Aβ와 H_2O_2에 의한 치매모델에서 신경세포효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 AD의 중요한 發病原因으로 알려져 있는 Aβ와 H_2O_2 유발 산화독성에 의한 PC-12세포주에서 生酸棗仁의 항산화 효과를 통한 신경세포 보호효과를 연구하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 시약

PC12 세포 배양에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic, trypsin(Gibco, USA)이며 그 외에 amyloid beta1-42(Sigma, USA), peroxide(Junsei, Japan), LDH activity Assay 는 In Vitro Toxicology Assay Kit (Sigma,USA), QIAmp DNA Mini kit(QIAGEN,USA) TUNEL assay 는 Intergen(USA) 회사의 ApopTag in situ apoptosis detection kit 을 사용하였다.

본 實驗에 사용된 기기는 CO2 incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co.), light microscope (IX51, Olympus), spectrophotometer(Multiskan EX, Thermo electron corporation), UV spectrophotomer(UV-1650pc, Shimadzu), fluorescence spectrophotometer (LS55, PerkinElmer)등을 사용하였다.

2) 사용약제

본 실험에 사용된 生酸棗仁(*Semen Ziziphi Spinosae*)은 원광대학교에서 1Kg을 구입하여 정제수 2,000mL로 수욕상에서 5 시간 동안 약 50%의 수율인 1,000mL로 감압 농축한 다음 동결 건조하여 약 450g 을 회수하였다. 이 추출물로 일정한 농도의 증류수 현탁액을 만든 후 3분간 열탕 멸균하여 사용하였다.

2. 硏究方法

1) PC12 cell 배양

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 PC12 cell을 사용하였다. 세포 배양은 RPMI-1640 배지에 10% heat inactivated FBS와1% antibiotic-antimycotic을 첨가하여 95% O2, 5% CO2, 37℃ incubator에서 배양하였다. media는 2일에 한 번씩 갈아주었다.

2) 신경세포 생존율 측정 (WST-1 assay)

PC12 cell을 96well plate 한 well 당 $2x10^4$ 농도로 분주하여 95% O2, 5% CO2 37℃ incubator에서 배양하였다. 24시간 후에 生酸棗仁 水抽出物을 5ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml 농도로 투여하고 2 uM amyloid-beta또는 30 uM H_2O_2를 투여하였다. 약물 처리 후 24시간 뒤에 WST-1(Roche, Germany)을 처리하여 37℃ incubator에서 2시간 반응 시킨 후, ELISA reader로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 신경세포 독성 측정 (LDH activity Assay)

약물 처리 후 24시간 뒤에 배양액 30㎕를 96well plate 각 well에 옮기고 동량의 LDH Assay Substrate ,Cofactor, Dye Solutions (In Vitro Toxicology Assay Kit, Sigma,USA)을 섞은 용액을 각 well 당 60㎕씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합 후 실온에서 빛을 차단하여 30분간 반응시켰다. 1N HCl를 10㎕ 씩 가하고 상온에서 5분간 더 반응 시킨 후, ELISA reader로 490nm, 690nm에서의 흡광도를 측정하여490nm 흡광도 값에서 690nm 흡광도의 값을 빼주었다.

4) 지질과산화반응 측정(Fluorometry)

Culture dish 에서 세포를 긁어 떼어낸 후 PBS로 2번 세척한다. PBS를 버린 후 eppendorff tube에 옮긴 후 50 mM potassium phosphate 와100mM glycine, (p H 7.4) 혼합된 완충액을 가하고 현탁시킨 후, 이 eppendorff tube를 얼음에 넣어두어 차갑게 한 후, 초음파 균질기를 사용하여 30 amplitude에서 4초간 4번 초음파를 가해 세포를 균질화시킨다. 이 균질액을 4 ℃, 15,000×g에서 10 분간 원심분리하여 침전물을 MDA 유래 손상 단백질의 형광원으로 사용하였다.

침전물을 300 ul 로 현탁시킨 후 50 ul 을 취해 형광분광도 측정용 plate에 옮긴 후 형광의 세기를 측정하고, 균질액 일부를 가지고 bicinchoninic acid (BCA, Sigma, USA) 법을 사용하여 단백질 정량을 하였다.

형광분석 조건은 다음과 같다.

Excitation/emission wavelength= 360/460 nm, 각 filter bandwidth: 2.5 nm

5) 세포자사 관찰 (TUNEL assay)

Chamber slide에 PC12 세포를 부착시킨 후 2uM amyloid-beta와 30uM H_2O_2 및 酸棗仁 0.1 mg/ml 을 처치한 후 형태학적 관찰을 하기 위해 Intergen(USA) 회사의 ApopTag in situ apoptosis detection kit를 사용하여 제조회사의 실험방법대로 시행하였다. 먼저 배양액을 제거하고 phosphate- buffered saline(PBS)로 3회 세척 후 4% PFA로 실온에서 10분간 세포들을 고정하였다. PBS로 5분간 2회 세척 후 ethanol : acetic acid(2:1)로 -20℃에서 5분간 후고정 하고 PBS로 5분간 2회 세척을 한 후 proteinase K(20 ㎍/ml)를 점적하고 37℃에서 10분간 배양하였다.

멸균된 물로 2회 세척 후 1% H_2O_2 in PBS를 실온에서 5분간 반응시키고 PBS로 2회 세척 후 equilibration buffer 75 ㎕를 점적하고 10초 반응시킨 후 제거하였다. Working strength TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소를 55 ㎕/5 cm2 점적 후 37℃에서 습도를 유지하면서 1시간 동안 반응시키고, working strength stop/wash buffer를 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다.

PBS로 3회 세척후 anti-digoxigenin peroxidase 65 ㎕/5 cm2를 점적 후 습도를 유지하면서 실온에서 30분간 반응시키고, PBS로 4회 세척하였다. 발색제로는 0.02% 3,3 -diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)과 0.003% H_2O_2가 혼합된 용액을 사용하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 통계 처리

실험결과는 mean±SEM으로 표시하였고 ANOVA와Duncan's multiple range tests에 의해 유의성을 검정하여 $p<0.05$인 경우, 유의성이 있는 것으로 하였다.

Ⅲ. 結　果

1. Aβ 1-42 와 H2O2 로 유발된 독성에 대한 酸棗仁의 신경세포 PC 12의 생존율에 미치는 효과

Aβ 1-42 혹은 산화적 손상을 유발하는 H2O2에 의한 세포사멸을 관찰하기 위해서, Aβ 1-42 혹은 H2O2 을 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 酸棗仁을 농도별로 첨가하여 배양하였고 24시간 후에 酸棗仁의 세포사멸 억제효과를 WST-1 assay로 측정하였다.

PC12 세포에 Aβ 1-42 (2 uM)만을 처리하고 24시간 동안 배양했을 때 control 대비 63% 정도의 세포생존이 유지되었고, H2O2 (30 uM)을 처리하고 24시간 동안 배양했을 때 약 80% 정도의 세포생존이 유지됐다.

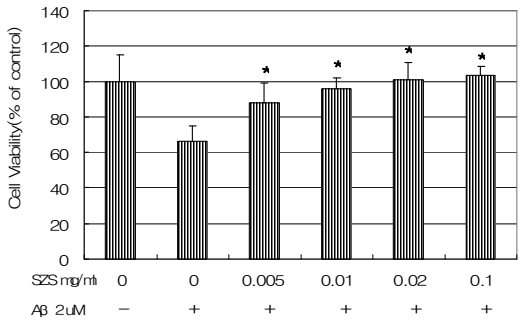
酸棗仁을 이용하여 Aβ 1-42와 H_2O_2 에 의해 유발된 신경세포독성을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여, 독성유발 성분을 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 生酸棗仁을 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2 mg/ml 최종농도로 전처리하였다. 이들 농도에서는 生酸棗仁 자체독성은 대부분 거의 나타나지 않았으며, Aβ 1-42 와 H_2O_2 에 대해서 0.1 mg/ml 농도가 生酸棗仁이 세포보호를 나타내는데 가장 효율적인 농도임을 확인하였다.

Fig. 1.A), B) 에서 보는 바와 같이 0.005에서 0.02 mg/ml 까지의 농도 범위에서는 첨가된 酸棗仁의 농도에 비례적으로 생존율이 증가하였으며, 그 값은 정상세포(control) 에 접근하였다.

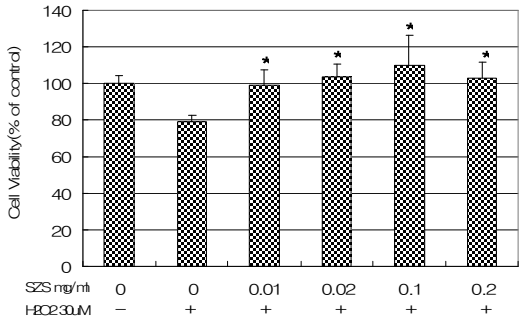
Fig. 2. 에서 보는 바와 같이 0.01에서 0.1 mg/ml 까지의 농도 범위에서는 첨가된 酸棗仁의 농도에 비례적으로 생존율이 증가하였으며, 그 값은 정상세포 (control) 에 유사하거나 더 높았다.

Fig. 1. Effect of SZS on Aβ and H2O2 -induced cell death in PC12 cells.

A)



B)



PC12 cells pre-incubated in several concentration of SZS for 2 h and then treated with 2 uM Aβ and H2O2 30 uM. Cell viabilities of PC12 cells were estimated using the WST-1 assay at 24h after treatment for A) Aβ and B) H2O2 . The result was analyzed using the Mann-Whitney test and when compared with A) the only Aβ treatde group and B) the only H2O2 treatde group, significant differences ($p < 0.05$) are indicated by *.

2. Aβ 1-42 와 H2O2 에 의해 유발된 세포손상에 대한 酸棗仁의 신경세포 PC12 보호효과

앞에서 언급한 1.의 실험조건에서, WST-1 직접처리에 의해 세포 생존율을 측정하는 과

정 직전에 소량의 배양액을 취하고 원심분리하여 침전물을 제거한 후 배양액 일정량으로 세포손상의 지표인 lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도를 정량하였다. 세포내부에서 배양액으로 유출되어 나온 LDH 는 세포손상에 의한 세포파괴를 의미한다. Aβ 와 H_2O_2를 처리하여 세포독성 유발 조건에서 酸棗仁의 처리농도 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2 mg/ml 에 각각 거의 역비례적으로 세포독성의 지표인 LDH 활성도가 감소하였다.

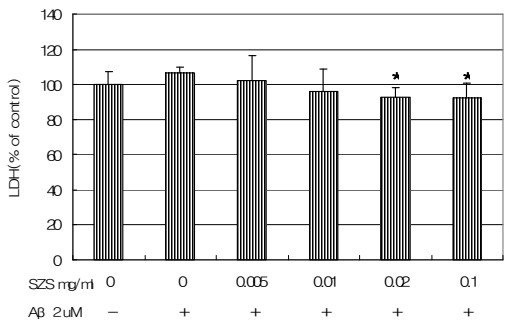
Aβ를 처리한 경우에서 이들 값들이 정상세포(control) 값 (100 %) 보다도 더욱 작아졌다. 즉, Aβ 1-42 유발에 의한 세포손상뿐만 아니라 정상적인 세포증식과정 생기는 세포손상도 막아줄 수 있음을 확인할 수 있었다 Fig. 1. A).

그러나 H_2O_2를 처리한 경우에 酸棗仁의 처리농도에 역비례적으로 감소하던 LDH 가 0.2 mg/ml에서 다시 증가하는 경향을 보였다.

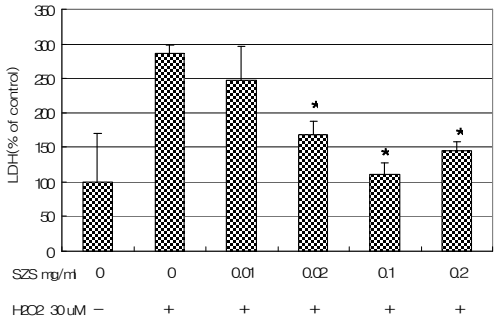
0.1 mg/ml의 농도에서 이들 LDH 값들이 정상세포(control) 값 (100 %) 에 가까워졌다 Fig. 1. B).

Fig. 2. Effects of SZS on Aβ and H2O2-induced cell cytotoxicity in PC12 cells determined by lactate dehydrogenase (LDH) activity assay.

A)



B)



PC12 cells pre-incubated in several concentration of SZS for 2 h and then treated with 2 uM Aβ and 30 uM H2O2. The result was analyzed using the Mann-Whitney test and when compared with A) the only Aβ treatde group and B) the only H2O2 treatde group, significant differences (p <0.05) are indicated by *.

3. Aβ 1-42 와 H2O2 유발 산화적 손상에 대한 酸棗仁의 신경세포 PC12 보호효과

앞에서 언급한 1.의 실험조건에서, 선정된 세포보호효과가 우수한 酸棗仁의 농도 0.1 mg/ml 를 처리했을 때 산화적 손상을 얼마나 효과적으로 차단할 수 있는지 항산화 능력을 조사하였다. Aβ 1-42 나 H_2O_2 가 세포 손상 및 사멸을 일으키는 주된 경로는 세포에 산화적 스트레스를 유발하여 생체분자들을 손상시킴으로써 세포사에 이르게 하는 것이다.

Aβ 1-42 가 유도한 산화적인 손상에 대해서는 정상세포 대비 90 % 정도 산화적인 손상이 증가했으나, 酸棗仁은 이 손상을 80 % 정도 감소시켜, 정상세포 대비 13 % 정도만 산화적 손상이 증가하는 항산화효과를 보였다.

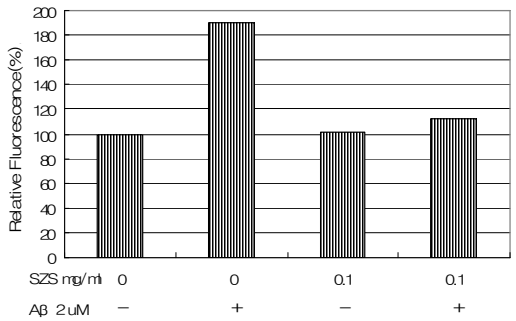
H_2O_2 가 유도한 산화적인 손상에 대해서는 정상세포 대비 74 % 정도 산화적인 손상이 증가했으나, 酸棗仁은 이 손상을 54 % 감소시켜, 정상세포 대비 20 % 정도만 산화적 손상이 증

가하는 항산화효과를 보였다.

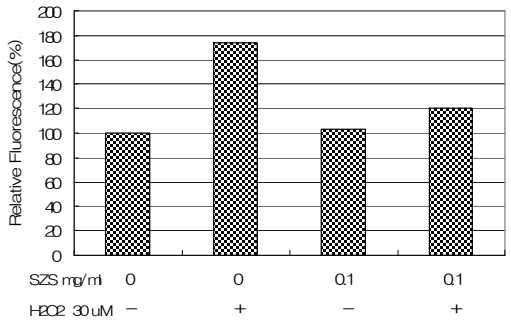
두 경우 모두에서 酸棗仁은 신경세포에서 산화적 손상에 대해 강한 항산화효과를 보여 세포내 손상들이 크게 감소하였음을 확인하였다.

Fig. 3. Effect of SZS on Aβ and H2O2-induced oxidative damages in PC12 cells.

A)



B)



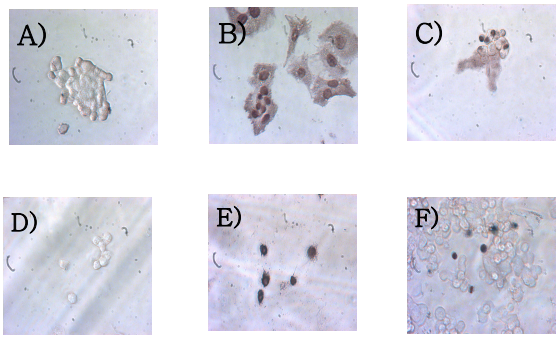
The fluorescence increases when biomolecules are oxidative-modified. These fluorescences were measured with the precipitates centrifugated from cell homogenates which were made of the treated cells at 24 h after the incubation.

4. Aβ 1-42 와 H2O2 유발 세포자사에 대한 酸棗仁의 신경세포 PC12 보호효과

PC12에 Aβ 나 H_2O_2 를 처리하였을 때 일부세포들에서 세포사가 유도되었음을 앞에서 언급한 1.에서 세포생존율로 확인하였으며, 이때 酸棗仁가 세포사를 억제하는 과정을 TUNEL assay 법으로 관찰하였다.

이 분석법의 원리를 간단히 살펴보면, 세포자사를 일으킨 세포에 특이적으로 존재하는 단편화된 DNA의 유리 3 -OH 말단을 terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 digoxigenin-dUTP로 표식한 후, peroxidase를 결합한 anti-digoxigenin 항체로 표식하고 발색기질로 DAB을 사용하였다. 따라서 세포자사를 일으켜 TUNEL 염색에 양성인 세포들은 흑갈색으로 염색되어 광학 현미경으로 관찰할 수 있었다.

Fig. 4. Representative photographs of PC12 cells stained with TUNEL assay.



Effects of SZS on Aβ and H2O2-induced cell death were estimated. A)-C): Aβ -induced cell death and D)-F): H2O2-induced cell death: A) normal cell (control), B) 2uM Aβ, C)2uM Aβ + 0.1 mg/ml SZS, B) Note cells with strong TUNEL-positive nuclei but C) Note cells with weak TUNEL-positive nuclei : D) normal cell (control), E) 30 uM H2O2, F) 30 uM H2O2 + 0.1 mg/ml SZS. E) Note cells with strong TUNEL-positive nuclei but F) Note cells with weak TUNEL-positive nuclei.

Aβ로 유도된 세포사 A)-C)를 분석하여 보면, 정상세포 (control)인 A) 에서는 TUNEL 염색이 거의 안되어 세포자사가 거의 일어나지 않았음을 확인할 수 있다. 그러나, 2uM A

β를 처리한 B)에서는 핵에서 강한 흑갈색 염색을 보임으로써 세포자사가 유도된 것을 확인할 수 있었다. 또한 일부 핵 염색질이 약간 나누어지려는 세포자사의 고유의 특징을 보여주고 있다. 그러나, 2uM Aβ 와 0.1 mg/ml 酸棗仁을 처리한 C)에서는 세포자사로 인한 흑갈색의 염색이 존재하지만 염색이 크게 약한 것을 확인할 수 있다. 즉, 酸棗仁 처리에 의하여 세포자사가 많이 감소되었음을 확인할 수 있었다.

H_2O_2로 유도된 세포사 D)-F)를 분석하여 보면, 정상세포 (control)인 D) 에서는 TUNEL 염색에 거의 음성인 것을 확인할 수 있다. 그러나, 30uM H_2O_2 를 처리한 E) 에서는 핵에서 강한 흑갈색 염색을 보임으로써 세포자사가 유도된 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 30 uM H_2O_2 와 0.1 mg/ml 酸棗仁을 처리한 F)에서는 세포자사로 인한 흑갈색의 염색이 일부 세포에서 약하게 일어난 것을 확인할 수 있다. 즉, 酸棗仁 처리에 의하여 세포자사가 많이 감소되었음을 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 考　察

우리나라의 치매노인에 대해서 보건사회연구원은 2007년 기준으로 약 40만명 정도로 추정하고 있고 향후 20년 동안에 70만명에 이를 것으로 전망하고 있다. 노인성치매는 현재 큰 관심거리로서 그에 따른 연구가 활발하게 이루어지고 있다[24].

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군을 말한다[1].

AD는 노인성 치매에 있어서 약 50% 以上의 비율을 차지하며, 女性이 男性에 비해서 2~3배 정도 더 많이 發病하는 것으로 알려져 있다[23].

AD의 원인과 발병기전은 분명하진 않지만 다양한 병인적 병리적 인자들이 관련되어 있어서[27] 다양한 내과적 질환, 외상, 신생물등 약 90여 가지의 다양한 위험인자(Risk Factor)가 추정되어진다[1]. AD의 발병기전에 대한 가설로는 APP의 비정상적인 분해경로로 인해 Aβ가 과생성되어 신경세포 밖에 불용성물질로 침착된다는 아밀로이드 증폭가설 (amyloid cascade hypothesis), 정상적으로는 미세관(microtubule)을 안정화시킨다는 Tau protein이 과인산화(hyperphosphorylation)되어 세포 내에 신경섬유농축체를 만들고 세포사를 유도한다는 타우농축체가설(tautangle hypothesis)과 신경염증가설, 혈관가설등이 있다[1].

이 중에 APP의 비정상적인 분해경로로 인한 Aβ의 침적으로 생기는 senile plaques의 신경독성으로 신경세포 사멸을 가져온다는 아밀로이드 증폭가설이 대표적이고 oxidative stress가 주된 기전으로 보고 있다[28].

Aβ의 과잉이 신경세포의 항산화작용을 억제하고 ROS의 생산을 증가시켜 세포 손상을 초래하는 신경독성을 나타내고 senile plaques를 형성한다고 보고되었다.

senile plaques는 파괴된 축색돌기와 수상돌기들이 얽힌 덩어리가 Aβ을 둘러싼 모양을 하고 있고 다시 신경교세포(glial cell)와 얽히게 된다. Aβ는 β-secretase나 ɣ-secretase에 의해 APP 일부가 잘라져서 생성되는 것으로[25], APP의 일부가 잘라져서 비정상적인 과정을 거쳐 만들어진 Aβ는 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있으며[26], 세포 밖에 침착하여 신경반으로 형성하는 데, 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되어 독성기전에 대해서 많은 연구가 진행

중에 있다.

한편 산화적 스트레스의 증가는 인체의 여러 조직이나 세포에 치명적인 손상을 유도하게 되는데, 특히 활성산소인 ROS(reactive oxygen species)와 hydrogen peroxide(H_2O_2)는 hyperoxide dismutase(SOD)같은 여러 항산화 효소들에 의해 기원하여 신경세포나 그 주변 세포에 과량이 축적되어 DNA에 상해를 입히는 원인이 된다[12]. 활성산소는 DNA에 상해를 입혀 미토콘드리아내의 효소를 변이시켜 항산화효소의 수준이 미달되게 하여 세포조직에 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포사 또는 괴사를 유도한다. 특히 이러한 산화적 스트레스는 APP 같은 것에 의해 H_2O_2를 매개로 신경의 세포사를 야기하며 치매, 뇌졸중 등의 뇌의 퇴행성 변화로 인한 중추신경계의 질환을 일으킬 수 있다[10-12].

한의학에서 痴呆는 先天稟賦不足, 老年精氣不足, 情志失調, 外傷 혹은 다른 병의 영향으로 神이 손상되는 등의 여러 원인에 의해 나타나는 질환으로 愚鈍함과 어리석음을 주로 표현하는 일종의 神志疾病이다. 가벼운 증상으로는 神淸淡漠, 少言寡語, 善忘, 遲鈍 등이며, 그 증상이 심한 경우에는 終日不語, 閉門獨居, 口中喃喃自語, 言辭倒錯, 擧動不輕, 哭笑無常, 不欲飮食, 數日不知飢餓 등의 증상이 나타난다. 痴呆에 대한 認識은 病理的으로만 이루어진 것이 아니라 노화과정이라는 生理的인 방향으로도 이루어졌다.

《黃帝內經·靈樞》[41] <天年篇> 에, "六十歲, 心氣始衰, 故憂悲. 八十歲, 魄離, 故言善誤."라 하여 노화에 따른 정신적인 변화를 설명하고 이를 노화와 함께 나타나는 生理的 증상으로 인식하였다.

또, 精神作用이 全身적 영향을 통해 나타난다는 生理的 관점은 다양한 치료방법이 가능한 토대를 마련해주고 있다.《黃帝內經·素問》[13] <上古天眞論>에서는 腎藏精氣의 성쇠에 의한 인체의 生長發育과 老化를 설명하고 있으며, <靈蘭秘傳論>에서 "心者 君主之官 神明出焉"이라고 한 것과 《黃帝內經·靈樞》[41] <經脈論>, <海論> 《黃帝內經·素問》[13]<脈要精微論> 등에서 사람이 생겨남에 먼저 精이 이루어지고 精이 쌓여서 腦髓가 생성된다고 하였고, 腦는 骨髓가 모이는 곳이며 精明之府로서 精神作用을 맡고 있다고 한 것으로 미루어 사람의 精神作用을 心, 腎의 盛衰와 연결시켜 인식한 것을 볼 수 있다.

이후 漢代의 華佗가 "痴呆"라는 명칭을 사용하였다는 기록이 있고, 이후 明代 張景岳은 그의 저서 《景岳全書》[14] <雜證謨>에서 病因·病機, 증후 및 치법, 예후 등에 대하여 비교적 자세하게 기록하였으나, 이때는 기억력 장애에 대한 내용은 없었고, 淸代에 와서 陳士澤의 《辨證錄》[15], 《石室秘錄》[42]과 錢鏡湖의 《辨證奇聞》[17]등에는 치매의 원인, 병리 및 임상적 경과에 따른 임상증후가 상세히 기록되었다. 현재 한의학에서는 임상적으로, 痴呆를 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞에 해당된다. 痴呆는 각각의 원인에 따라 豁痰開竅, 理氣和血, 滋補肝腎, 活血祛瘀, 淸熱瀉火 등의 치법이 응용되며 七福飮[14], 轉呆丹[29], 歸脾湯[30], 還少丹, 腎氣丸, 洗心湯, 通竅活血湯, 黃連解毒湯, 八物湯 등 여러 처방을 사용한다[2]. 이러한 다양한 원인과 원인에 따른 치법과 처방의 근거는 치매를 생리적 과정으로 인식하기 때문에 가능한 것이다. 또, 후대에 병리적, 임상적 경과에 따라 자세히 기술해 놓았기 때문에 가능하게 된 것이다.

酸棗仁(***Semen Ziziphi Spinosae***)은 갈매나무과(***Rhamnaceae***)에 속한 낙엽관목인 묏대추나무(***Zizyphus spinosa HU.***)의 서숙한 종자를 건조한 것으로 性味는 甘酸 平하며 心肝膽脾經으로 歸經하여, 補肝膽, 寧心, 斂汗, 生津하여서

不眠, 不安, 心悸, 怔忡 등의 여러 증상에 상용되었다[31]. 鎭靜, 催眠, 鎭痛, 抗痙攣, 降溫 작용 및 血壓 降下작용, 子宮興奮작용, 抗菌작용, 抗癌작용 등의 약리작용이 있으며, 지방유, 단백질, vitamin C를 다량함유하고 있고, 2종의 sterol, betulin, betulic acid 등의 triterpenoid, jujuboside로 구성되어 있다[32].

酸棗仁은 치매 및 건망의 치료에 다용되는 壯元丸加減方[19], 天王補心丹[20], 壯元丹[21] 등에서 복합처방의 구성약물로 사용되었다.

壯元丹[21]에서는 酸棗仁만을 따로 실험하지 않고 포함되어 있는 복합처방에 대한 실험을 진행하여 酸棗仁의 효과를 확인할 수 없고, 壯元丸加減方[19]는 산조인의 신경세포 보호효과에 대한 보고가 아니며, 天王補心丹[20] 炒用 酸棗仁을 사용하여 세포환원활성도와 LDH를 확인 보고한 것은 生酸棗仁에 대해서 한 연구가 아니고, 세포보호효과나 生酸棗仁의 抗치매효과로 평가할 수 없다.

정 [22]등은 酸棗仁의 CT 105에 의한 신경세포의 상해 및 백서의 기억에 미치는 영향에 대하여 보고하였는데, MeOH로 추출한 酸棗仁 extract를 사용하고 Aβ가 아닌 APP의 대사산물인 C단 단백질 중 독성이 강한 CT105를 발현시키는 세포사 모델을 연구하였으나 세포사 과정에 대한 산조인의 영향은 규명하여 보고하지 않았다.

실제로 AD 환자의 뇌에 있는 세포에서 산화적 손상입은 단백질들, 지질들, DNA 들을 측정하였을 때, 비정상적으로 높은 수치가 확인되고 있다. 이런 Free radical 매개성 분자의 손상들은 특히 노인반에서 두드러지게 나타나는데 이는 아밀로이드 매개성 신경세포 손상에 활성기 산소(ROS)가 관여함을 의미한다[33]. PC 12 세포를 이용한 연구에서도 Aβ 가 ROS의 생성을 유발한다는 보고가 있었다[34].

따라서, 본 연구에서는 PC 12 세포에 Aβ 1-42 를 처리하여 세포독성을 유도한 후 항산화제 성분을 포함하고 있는 酸棗仁 水抽出液이 세포독성으로부터 신경세포를 보호할 수 있는 지를 확인하고자 하였다.

본 연구는 PC 12 세포를 배양하는 시험관 조건에서 Aβ나 H_2O_2를 처리하여 산화적 손상에 의한 신경세포 사멸을 유도하고 酸棗仁이 세포사멸을 억제하는 과정을 여러 단계별로 규명하였다.

Aβ 1-42 유발 독성조건에서, 酸棗仁을 농도별로 처리시 2μM Aβ 1-42 만의 처리경우의 세포 생존율 약 67% 보다는 0.005 mg/ml에서부터 크게 증가하여 정상세포의 생존율에 접근함을 보였다. 처리농도 0.01 mg/ml 에서는 정상세포의 생존율에 거의 근접함을 확인하였다(Fig. 1. A)). 이것의 의미는 酸棗仁이 Aβ 1-42 유발 독성에 의해 초래되는 신경세포의 사멸을 효과적으로 차단한다는 것으로 알츠하이머병의 진행을 막는데 유용할 것으로 판단된다.

생체에서 흔히 발생하는 산화제성분인 H_2O_2를 이용하여 세포사멸을 유도하였을 때, 30 uM H_2O_2 만 처리했을 경우의 세포 생존율 약 80% 이였으며, 여기에 酸棗仁을 농도를 증가시키며 처리시 처리농도 0.01 mg/ml부터 생존율이 높게 유지되며, 여러 처리농도들의 경우에서 정상세포의 생존율 부근에 있음을 보였다(Fig. 1. B)). H_2O_2는 세포내에서 발생하기도 하는 강력한 산화제로 알려져 있으므로, 이 실험에서 酸棗仁은 강한 항산화제로서의 작용하여 신경세포 생존에 대한 강한 보호 기능이 확인 되었다.

세포손상의 정도를 알아보기 위해 세포손상시 유출되어 나오는 LDH 활성도값을 비교하였을 때, Aβ 1-42 와 H_2O_2 처리하여 독성을 유발한 환경에 酸棗仁을 처리하였을 경우 발생한 세포손상이 처리농도에 역비례하여 감소

하는 추세를 보였으며, 자연적인 세포증식과정에서 생기는 일부 세포손상(control) 값과 Aβ 1-42 처리경우에는 거의 비슷 혹은 그 이하로 억제되었으며, H_2O_2 처리시에는 酸棗仁 처리농도 0.1 mg/ml 에서는 가장 최소값으로서 정상세포의 값(control)에 근접함을 볼 수 있다 (Fig. 2.A), B)). Aβ 1-42 유발 독성의 경우에서는, 酸棗仁을 0.01 mg/ml 이상 처리조건의 LDH 활성도값이 정상세포(control) 의 값 보다 약 4% 정도 낮게 나왔고 그 이상의 농도에서 점차 감소하는 것을 볼 수 있다. H_2O_2 유발 독성의 경우에서는 酸棗仁이 대체적으로 높게 나오는 것 알 수 있다. 酸棗仁이 Aβ 1-42 와 H_2O_2 유발 독성환경 중에서 특히 Aβ 1-42 유발 독성환경에서 세포손상 및 세포파괴를 효과적으로 막아주는 것을 알 수 있다.

生酸棗仁의 항산화 기능을 보다 명확히 검증하기 위해 PC 12 신경세포에 대해 산화적 손상 정도를 분석하였다. 본 분석법은 세포가 산화적 손상을 받을 때 직접적으로 그리고 비례적으로 생성되는 알데히드류가 세포내의 생체분자들과 결합하여 발생하는 형광을 정량함으로써 정확히 세포손상 정도를 평가할 수 있는 방법이다.

2uM Aβ 1-42 와 30 uM H_2O_2 처리하여 독성을 유발한 조건들에서 0.1 mg/ml 酸棗仁을 처리하였을 경우에서 입은 산화적 손상값은 2uM Aβ 1-42 나 30 uM H_2O_2 만 처리하여 독성을 유발한 경우의 손상값 보다 의미있게 감소되었음을 확인할 수 있었다.(Fig. 3.A), B)).

특히, 2uM Aβ 1-42 만 처리한 세포(190%) 대비 酸棗仁은 80 % 정도의 산화적 손상을 억제하는 강력한 항산화효과를 보였다. Aβ 1-42 에 의한 주요 손상기전으로 언급되는 산화적 손상에 대해 酸棗仁이 우수한 효과를 보임으로서 강력한 신경세포 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다.

강력한 산화제인 H_2O_2 처리에 의한 산화적 손상에 대해 酸棗仁이 효과를 보면, 약 54 % 정도의 산화적 손상을 억제함을 보임으로써 H_2O_2 에 대해서도 강력한 신경세포 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다.

다음은 Aβ 1-42 와 H_2O_2 처리시 유발되는 세포자사에 대해 酸棗仁이 미치는 영향을 알아보았다. 일반적으로, 세포의 DNA 가 손상을 입어 세포가 사멸될 때는 크게 세포자사(apoptosis) 와 세포괴사(necrosis) 과정을 거치는데, 세포자사의 경우에는 다음과 같은 독특한 세포의 특성을 보인다. 세포크기가 축소하고 세포의 표면의 미세한 융털이 소실되며, 표면은 평평해진다. 또 핵의 크로마틴이 핵막 주변에 응축하여 단편화되고 세포도 단편화하여 '아포토시스 소체'라 불리는 기름 방울 모양의 작은 조작이 된다.

2uM Aβ 1-42 나 30 uM H_2O_2를 처리하여 독성을 유발한 조건들에서, 2uM Aβ 1-42 나 30 uM H_2O_2 만 처리하여 독성을 유발한 경우 TUNEL 염색이 핵염색질에서 진하게 염색되어 세포자사가 강하게 유발되나 이 조건에 0.1 mg/ml 酸棗仁을 처리하였을 경우에서는 그 염색 정도가 크게 감소하여 약하게 염색됨을 알 수 있다. 즉, 세포자사과정을 통한 세포사멸을 크게 감소시킴을 알 수 있었다 (Fig. 4.A)-F)).

Aβ1-42에 의한 세포사멸을 억제할 수 있는 酸棗仁 추출액의 항산화 성분들에 대한 연구는 거의 없는 관계로 zizypus 속에 속하는 Zizyphus jujuba var. inermis Rehder 의 항산화성분들[35]을 참조하였다. 이것의 추출물은 각종 폴리페놀류와 플라보노이드 등 항산화제 성분들이 다수 포함되어 있으므로, 같은 속에 속하는 酸棗仁의 추출물도 유사한 정도로 항산화성분들을 내포할 것으로 예상되므로, Aβ 1-42에 의한 ROS 유발과 이로 인한 신경세포

사멸을 효과적으로 차단할 수 있었을 것으로 판단된다.

이로서, 生酸棗仁 水抽出物은 Aβ protein에 의해 유도되는 ROS를 효과적으로 감소시켜 줌으로써, 세포안에서 과도하게 발생한 산화적 스트레스에 의한 신경세포사멸기전을 효과적으로 차단하여 높은 세포생존율을 유지시키고, 그 결과 신경세포의 손상을 효과적으로 방어한 것임을 알 수 있었다[36].

본 연구에서는 AD 모델에서의 生酸棗仁 水抽出物의 신경보호작용에 대해 알아보았다.

PC 12 세포 모델을 이용하였으며, 알츠하이머 모델로서는 뇌신경세포에 독성을 일으켜 학습과 기억력을 감퇴시키는 독성단백질로 주원인 단백질로 알려져 있는 Aβ 1-42에 의해 유도된 시스템을 이용하여, Aβ에 의한 신경세포사멸 기전을 규명하고, Aβ로 유발된 독성을 生酸棗仁 水抽出物이 억제하고 신경세포를 보호할 수 있는지를 세포사멸 과정을 통해 확인하였다. AD의 원인 물질로 알려져 있는 Aβ protein의 독성 작용 기전은 명확히 규명되고 않았으나, 최근까지 밝혀진 Aβ protein의 작용기전에 있어서 가장 강력히 제기되고 있는 주장은 ROS의 유발로 인한 신경세포의 손상이다. 따라서 ROS의 제거 여부 또한 Aβ에 대한 신경보호효과의 매우 중요한 지표가 될 수 있다.

치매의 치료에 있어서 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 콜린신경계통을 보충해주거나 개선해 주어 저하된 인지기능 및 기억력을 개선해 줄 수 있는 약물들을 개발하고자 하는 노력이 급증하고 있다. 현재까지 AD의 진행을 억제하거나 완치할 수 있는 치료법은 없다. AD의 인지장애와 관계깊은 신경전달물질은 아세틸콜린으로 알려져[1] 지금까지 개발된 AD 치료약물들에는 아세틸콜린 합성전구체 (acetylcholine precursor), 수용체 활성제 (receptor agonist), 아세틸콜린분해 억제제 (acetylcholine esterase inhibitor) 등이 있으나, 그러한 약물들의 효과가 일시적이고 미약하다. 국내·현재 사용되고 있는 기억력 개선 치료제들은 증상개선을 위한 항콜린약물, 대사를 비특이적으로 항진시키는 대사항진약물, 혈액순환을 좋게 해주는 혈액순환개선제 등이 있으나 이들 약물들의 효과 역시 매우 일시적이고 한정적이며 미약한 수준으로 이러한 약물은 부교감신경자극을 통해 오심, 구토, 기관지 수축 등의 부작용을 나타내고, 우울증, 불면증, 고혈압, 변비 등을 야기하기도 한다[1]. 결론적으로 이런 단점들을 보완한, 오랜 기간 지속적으로 부작용 없이 독성이 낮고 강력한 콜린신경계통 증진효과를 가지며 감퇴된 학습과 기억력을 개선시켜줄 수 있는 뇌보호 및 뇌기능 향상에 도움을 주는 소재를 개발하는 것은 매우 가치 있는 일이며, 시급한 연구과제이다.

生酸棗仁 水抽出物이 어떠한 작용 기전을 통해 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경세포사멸을 효과적으로 방어하는 지에 대해서는 세포의 스트레스 및 사멸기전에 관여하는 다양한 인자들의 방어기전을 작동시키는 역할을 생각해볼 수 있으며, 본 연구 결과들을 토대로 추정해 볼 때, 활성기산소의 축적을 억제해 줌으로서, 아밀로이드 베타 단백질에 의해 세포자멸사로 이어지는 신경세포사멸 기전을 차단하고, 궁극적으로 세포 보호 작용을 나타낼 수 있는 것으로 사료되어진다. 생체에서 발생하는 Free radical의 이차 생성물인 활성기 산소종은 세포내의 DNA, 단백질, 생체막 등을 공격하여 과산화지질이나 여러 가지 유해한 산화 분해물을 생성함과 더불어 생체조직을 손상시켜, 결국 여러질환 및 증상의 주요한 원인물질로 알려져 있는데[37,38], 이러한 산화적 스트레스는 생체의 에너지 대사과정 중 지속적으로 발생

하는데, 특히 우리의 두뇌는 산화적 스트레스에 의해 훨씬 민감하게 손상받는 것으로 알려져 있으며, 이는 정상인들의 두뇌활동에도 부정적인 역할을 할 것으로 생각되고 있다[39,40].

본 연구에서 生酸棗仁 水抽出物은 Aβ로 인해 외부에서 제공되는 산화적 스트레스를 매우 효과적으로 제거하였고, 그 결과 신경세포의 손상을 효과적으로 감소시켰다. 구체적으로 生酸棗仁 水抽出物이 정확히 산화적 스트레스의 어떤 경로를 차단하는지에 대한 항산화 작용기전은 본 실험의 대상이 아니어서 밝혀내진 못했지만, 자체의 화학적 성질을 이용하거나 간접적인 효능을 이용하여 산화적 스트레스를 제거하는 방어 기전작동의 가능성과 세포의 산화적 스트레스에 관련된 항산화효소의 레벨과 활성을 증강시키는 기전으로 나누어 생각해 볼 수 있다. 요약컨대, 生酸棗仁 水抽出物의 효과적인 ROS의 억제 효능은 매우 유효한 소재로서 주목할 만하며, 일상적으로 우리 뇌가 받는 산화적 스트레스의 효과적인 제거를 통해 우리 뇌의 보호 및 그 기능의 향상에도 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다. 추후 다양한 모델과 방법을 이용하여 심도 있는 연구를 통해서 生酸棗仁 水抽出物의 작용 기전은 꾸준히 밝혀져야 할 것으로 생각되며, 이러한 분자적 수준에서의 보호기전 연구는 두뇌보호와 기능 활성의 측면에서 큰 의학적 가치와 다양한 신경퇴행질환에 대한 예방 및 치료 전략에도 중요한 정보와 가치를 제공하는 연구가 될 것으로 판단된다.

V. 結　論

신경세포주 PC-12세포주에 Aβ와 H_2O_2 처리에 의한 신경세포 손상 및 사멸에 대해 生酸棗仁 水抽出物을 처리하였는 바, 酸棗仁의 신경세포 손상 및 사멸에 대한 보호기능은 항산화 효능을 통해 이루어짐을 규명하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 生酸棗仁 水抽出物은 Aβ 혹은 H_2O_2에 의한 세포독성에 대하여 세포생존율을 정상세포에 근접하게 회복시켰다.
2. 生酸棗仁 水抽出物은 Aβ 혹은 H_2O_2 유발 세포손상을 정상세포와 비슷할 정도로 효과적으로 억제시켰다.
3. 生酸棗仁 水抽出物의 항산화효과는 Aβ 혹은 H_2O_2 에 의한 산화적 세포 손상을 효과적으로 감소시켰다.
4. 生酸棗仁 水抽出物은 Aβ 혹은 H_2O_2에 의해 발생하는 세포자사 (애폽토시스)를 효과적으로 억제시켰다.

이와 같이 生酸棗仁 水抽出物이 Aβ 혹은 H_2O_2 유도에 의한 PC-12 신경세포주의 손상과 사멸를 효과적으로 억제하여, 신경세포 생존을 높이 유지시키는 보호효과가 있는 것을 규명하였다.

참 고 문 헌

1. 대한신경학회. 신경학. 서울:군자출판사. 2007:406, 416, 427-30.
2. 大韓韓方神經精神科學會. 韓方神經精神醫學. 파주:集文堂. 2005:311-320.
3. Cummings JL, Berson DF. Dementia. A Clinical Approach. 2nd ed. Boston. Butterworth-Heinemann. 1992.
4. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress. glutamete. and neurodegenerative disoders.

Science. 1993;262:689-695.
5. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 1997;23:134-147.
6. Schippling S, Kontush A, Arlt S, Buhmann C, Sturenbug HJ, Mann U, Muller-Thomsen T, Beisiegel U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 2000;28:351-360.
7. Selcoe DJ. Alzheimer's disease : a central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol. 1994;53(5):438-47.
8. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-tur J, Hutton M. Genetic. dissection of Alzheimer's disease and related dementias:amyloid and its relationship to tau. Nat Neurosci. 1998;1(5):355-8.
9. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, et al.. Effects of nicotine on APP secretion and A beta-or CT105-induced toxicity. Biol Psychiatry. 2001;49(3):240-7.
10. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. Toxicology and Applied Pharmacology. 1993;120:168-78.
11. Halliwell B and Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems:the superoxide theory of oxygen toxicty. in free radicals in biology and medicine 2nd Ed. Oxford. Clarendon Press. 1989:86-9.
12. Polidori MC, Mecocci P. Plasma. Susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. J Alzheimer Dis. 2002;4(6):517-22.
13. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:37, 124, 196, 229, 217-8.
14. 張介賓. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社. 1985:71-578.
15. 陳士澤. 辨證錄. 서울:醫聖堂. 1989:241-6.
16. 최성열, 김대현, 김상태, 김태헌, 강형원, 류영수. 痴呆에 대한 최신 실험적 연구 동향 (2000년 이후 한의학 학술지를 중심으로). 동의신경정신과학회지. 2008;19(1):125-146.
17. 錢鏡湖. 辨證奇門全書. 台北. 甘地出版社. 1990:222-5, 233-5.
18. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:영림사. 2000:643-4.
19. 강형원, 김상태, 이종화, 김태헌, 손형진, 한평림, 류영수. 壯元丸加減方 水抽出物이 아밀로이드 전구단백질로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 東醫神經精神科學會誌. 2007;18(2):13-24.
20. 김상호, 김종우, 강철훈, 황의완. 天王補心丹과 單味들이 Hypoxia-Reoxgenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 2006;17(2):15-36.
21. 김건진, 정대규. 壯元丹이 CT105와 Aβ로 誘導된 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌. 2006;17(2):91-122.
22. 정정욱, 박창국, 박치상, 이소연, 윤현덕, 신오철. 酸棗仁이 CT 105에 의한 신경세포 상해 및 백석의 기억에 미치는 영향. 大韓本草學會誌 2005;20(2):19-33.
23. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-28.
24. 李東垣 外. 痴呆에 關한 東西醫學的 比較考察. 大韓韓方內科學會誌. 1995;16(1):2-14.
25. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in

cytokine-activated primary human brain cell culture ; role of tumor necrosis factor-alpha. Glia. 1999;28(2):114-27.

26. 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. 1996;16(14):4491-4500.
27. Markesbery WR and Ehmann WD: Brain trace elements in Alzheimer's disease. In Alzheimer's Disease. neurotoxicology. 1986;7(1):195-206.
28. Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radical. new insights. Biochem Pharmachol. 2002;63:563-567.
29. 陳士澤. 增補百病辨証錄. 서울:書苑堂. 1981:172-5.
30. 嚴用和. 濟生方. 中國醫學大系11. 서울:여강출판사. 1984:256-66.
31. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1991:493-4.
32. 이경순, 안덕균, 신민교, 김창민 完譯. 中藥大辭典. 서울:정담. 1997:2008-92.
33. Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. Jun 2006;1762(6):575-86.
34. Jang JH, Surh YJ. Beta-Amyloid induces oxidative DNA damage and cell death through activation of c-Jun N terminal kinase. Ann N Y Acad Sci. 200;973:228-236..
35. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Physiological Activity/Nutrition : Components and Their Antioxidative Activities of Methanol Extracts from Sarcocarp and Seed of Zizyphus jujuba var. inermis Rehder Korean J. Food Sci Technol.. 2006;38(1):128-134.
36. 이 도연, 윤지영, 김장일, 김도희, 한인숙, 이원복. 아밀로이드 베타 단백질을 이용한 알츠하이머 모델에서 유도되는 신경세포 사멸에 대한 피브로인 BF-7의 뇌기능 보호 작용에 관한 연구. 대한해부학회지. The Korean J. Anat. 2007;40(1):57~67.
37. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative disease and oxidative stress. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2003;58: 39-46.
38. Chu CT, Levinthal DJ, kulich SM, Chalovich EM, CeFranco DB. Oxidative neuronal injury. Eur J Biochem. 2004;271:2060-2066.
39. Mattson MP, Daun W, Pedersen WA, Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain disease. Apoptosis. 2001;6:69-81.
40. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence?. Nature Neurosci. 2004:1:518-523.
41. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:79, 174, 241.
42. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.