

알츠하이머병과 혈관성치매에서 뇌척수액 신경스테로이드의 임상적 의의

곽용태 · Robert Morfin*

효자병원 신경과, Biotechnologie,
Conservatoire national des arts et
métiers*

Address for correspondence

Yong Tae Kwak, M.D.
Department of Neurology, Hyoja Geriatric
Hospital, Sanghari, 33, Kuseong-myeon,
Yongin 449-910, Korea
Tel: +82-31-288-0602
Fax: +82-31-288-0539
E-mail: ytkwak1@kornet.net

Clinical Significance of Cerebrospinal Fluid Neurosteroid Level in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia

Yong Tae Kwak, M.D., Robert Morfin, Ph.D*

Department of Neurology, Hyoja Geriatric Hospital; Biotechnologie, Conservatoire national des arts et métiers*

Background : The role of the neurosteroid DHEA in degenerative disease is unknown, although a neurodegenerative disorder such as Alzheimer's disease (AD) has higher dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in cerebrospinal fluid (CSF) than that of controls. Increased DHEA production in brain involves alternative pathways, induced by reactive oxygen species, and activated by the β -amyloid protein. Since human brain is known to metabolize DHEA into DHEA sulfate (DHEAS), 7α -hydroxy-DHEA, 7β -hydroxy-DHEA and 16α -hydroxy-DHEA, it is possible that DHEA accumulation in brain results from increased production of DHEA and decreased production of such metabolites. To investigate the clinical significance of neurosteroids and test such an hypothesis, we compared the concentrations of CSF neurosteroid levels between patients of dementia and controls. **Methods :** We compared the concentrations of CSF levels of pregnenolone (PREG), PREG sulfate (PREGS), DHEA, DHEAS, 7α -hydroxy-DHEA, 7β -hydroxy-DHEA and 16α -hydroxy-DHEA among 14 patients with AD, 8 patients with vascular dementia (VD) and 12 controls. After CSF sample was measured by high performance liquid chromatography, consequently, 7α -hydroxy-DHEA, 7β -hydroxy-DHEA was measured by RIA, and 16α -hydroxy-DHEA, PREGS was measured by ELISA. **Results :** DHEA CSF levels were significantly increased ($p=0.005$), and DHEAS level was significantly decreased in AD and VD ($p=0.004$) while other metabolite levels were not significantly changed. Steroid level ratios such as DHEA/(7α -hydroxy-DHEA+ 7β -hydroxy-DHEA), 16α -hydroxy-DHEA/DHEA, gave significant differences between diseased and control patients ($p<0.000$, $p=0.004$, respectively). **Conclusions:** These results indicate that DHEA found in CSF does not help protecting brain from patients of dementia and are neither better sulfated nor better hydroxylated at 7α , 7β and 16α -positions than in controls. These results indicate that, though some CSF neurosteroid levels are significantly different between demented patients and controls, clinical usefulness for differential diagnosis of AD and VD may have limited value.

Key Words : Dehydroepiandrosterone (DHEA), Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), Neurosteroid, Alzheimer's disease, Vascular dementia

서 론

말초 기관이 아닌 뇌 자체에서 형성되는 스테로이드를 신경스테로이드라고 한다[1]. 최근 신경스테로이드에 대한 관심이 높아지고 있는데 이것은 신경스테로이드가 고령화와 밀접한 관계를 가질 뿐 아니라 여러 임상질환과의 연관이 보고 되기 때문이다.

가장 잘 알려진 신경스테로이드인 dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)의 혈중 농도는 생후 초기에는 매우 적은 양이지만 성장함에 따라서 급

격하게 증가되어 사춘기를 지나게 되면 정점에 도달한 후에 서서히 감소하게 되어 노인이 되면 젊었을 때의 25-33% 정도만 유지하게 되며[2], 노화와 연관된 알츠하이머병과 연관성도 보고 되고 있다[3].

신경스테로이드가 뇌에서 어떻게 생성되는지는 정확하게 밝혀지지 않는지만[4], 신경세포에서만 존재하는 cytochrome P45017 α 에 의하여 pregnenolone (PREG)의 가지(side chain)를 산화분리(oxidative cleavage)하여 DHEA를 형성하거나[5], 대체경로(alternative pathway)로서 희소돌기아교세포(oligoden-

drocyte)에서 PREG 전자산화촉매(e^{++} -catalyzed oxidation)를 통해서 DHEA를 형성하게 된다[3, 6]. DHEA는 신경세포에서 cytochrome P450에 의하여 수산화(hydroxylation)되어 7α -hydroxy-DHEA, 7β -hydroxy-DHEA로 대사되는데[7, 8], DHEA의 7α -hydroxylation과 관련된 cytochrome P4507B1은 주로 해마에 있는 신경세포에 국한되어 존재 한다[9, 10].

DHEA는 알츠하이머병에서 흔히 관찰되는 β -amyloid 단백질이 있을 경우에 현저하게 증가하며[4, 5], 알츠하이머병 환자에서 다른 정상 대조군에 비하여 뇌척수액에서의 DHEA의 양이 40배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다[3]. 왜 DHEA가 알츠하이머병 환자에서 과량 생산되는지는 확실하지 않지만, 회소돌기아교세포를 통한 대체경로의 활성화와 DHEA 대사의 이상에 의한 것으로 생각된다.

본 연구는 알츠하이머병, 혈관성 치매, 대조군의 뇌척수액에서 PREG, PREG sulfate (PREGS), DHEA, DHEA sulfate (DHEAS), 7α -hydroxy-DHEA, 7β -hydroxy-DHEA and 16α -hydroxy-DHEA와 같은 신경스테로이드 양을 검사하여 이들의 임상적 의의 및 알츠하이머병, 혈관성 치매와 신경스테로이드의 병태생리적 관계에 대해서 고찰하고자 시행되었다.

대상과 방법

1. 연구 대상군과 임상척도

연구 대상군은 1997년 11월부터 2002년 5월까지 용인효자병원에 입원하여 뇌척수액 천자를 한 알츠하이머병 환자 15명과 혈관성 치매 8명, 이외에 다른 병원에서 치매와 관계없는 다른 대상 질환을 가진 환자 12명을 정상 대조군으로 하였다(Table 1). 알츠하이머병은 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) 기준[11]으로 진단하였으며, 혈관성 치매는 National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement Neurosciences (NINDS-AIREN) 기준[12]을 이용하여 진단하였다. 인지 기능 평가로서 Korean Mini-Mental State Examination (K-MMSE)[13]을 시행하였고 이들은 모두 뇌핵자기공명사진(MRI)이나 뇌전산단층촬영(CT) 중 적어도 1가지 이상의 검사를 시행하여 뇌종양이나 외상과 같은 다른 기질적 병변을 배제 하였다.

2. 연구 방법

1) 뇌척수액

뇌척수액은 영하 70도에서 동결 보관한 것으로서 실험시에는 1 mL의 증류수를 첨가하여 분석하였다.

2) 신경스테로이드 분석

DHEA, DHEAS, 16α -hydroxy-DHEA를 측정하기 위한 시약은 Steraloids (Newport, RI, USA), PREG, PREGS는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 7α -hydroxy-DHEA와 7β -hydroxy-DHEA는 Starka[14]가 제시한 방법을 사용하였다.

동결된 뇌척수액에 증류수 1 mL와 에테르(ether) 3 mL를 첨가하여 원심분리 후 non-polar phase는 제거하고 나머지를 시험관에 옮긴 후 고작위액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography: HPLC)를 위해 탈기(evaporation)하였다.

① HPLC 기기

305 master pump, manometric module 805, slave pump 306, dynamic mixer 811C, autoinjector 234를 포함한 Gilson (Villers Le France)의 HPLC 기기를 사용하였다.

② 가스크로마토그래피(gas chromatography: GC/MS system)

GC/MS system은 Shimadzu (Kyoto, Japan)에서 구입한 것을 사용하였다.

③ HPLC 분리

Methanol 70 μ L를 혼합한 후에 이를 HPLC에서 분석하였다. HPLC binary high pressure gradient 용출액은 Mobile phase A에서는 100 mg/L의 ammonium bicarbonate가 포함된 15% acetonitrile, Mobile phase B에서는 methanol을 이용하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min이며 20분간 시행하였다. DHEA, 7β -hydroxy-DHEA, 7α -hydroxy-DHEA, 16α -hydroxy-DHEA, PREG, PREGS가 포함된 표준 시약은 0.1 mg/mL이다. 표준 시약에서 시행한 표본에서 내부표준시약 계산방식에 의하여 retention time을 결정하고, 이에 따라 검사된 표본을 수거하여 진공상태에서 탈기하였다. 이렇게 건조된 표본에 다시 methanol 100 μ L에 용해 시킨 후 7β -hydroxy-DHEA, 7α -hydroxy-DHEA는 방사선면역측정법(RIA) 분석을 시행하고 16α -hydroxy-DHEA, PREGS는 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

④ 방사선면역측정법(RIA)

7α -hydroxy-DHEA 7β -hydroxy-DHEA는 Lapčik 등이 제시한 방법[14, 15], PREG, PREGS 등은 Hill 등이 제시한 방법[16]을 이용하여 분석하였고, DHEA, DHEA sulfate 등은 IMMUNOTECH (Marseille, France) kit를 이용하여 분석하였다.

⑤ GC/MS 분석

16α -hydroxy-DHEA, PREGS를 포함한 각 HPLC 분획을

O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride (PFBOX) 과 pyridine 2:98로 80°C에서 2시간, 이후 bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, trimethylchlorosilane (99:1, 10 μL)와 pyridine (30 μL)를 80°C에서 45분 가열하여 탈수시킨다. 탈수시킨 후에 acetonitrile (50 μL)과 iso-octane (200 μL)를 포함하여 1분간 혼합하였다. 이후 4 μL 를 추출하여 medium-polarity column (ZEBRON ZB-50, 15 m \times 0.25 mm, 0.15 μm film thickness, cat No 7EG-G004-05)을 가진 GS와 simple quadrupole electron-impact MS detector를 이용하여 분석하였다. 16 α -hydroxy-DHEA, PREGS의 표준 시약 1,000 pg/ μL , 100 pg/ μL , 10 pg/ μL 을 같은 방법으로 측정하여 내부표준(internal standard)으로 사용하였다.

⑥ 이와 같은 방법으로 DHEA와 이것과 연관된 대사 산물들을 측정하였고 또한 이들간의 관계를 확인하기 위하여 DHEA/(7 α -hydroxy-DHEA+7 β -hydroxy-DHEA), 16 α -hydroxy-DHEA/DHEA, DHEAS/DHEA 값도 구하여 분석하였다.

Table 1. Demographic data of study groups (mean \pm standard deviation)

	Controls	AD	VD	p-value*
Numbers of patients	12	15	8	
Sex				0.059
male	7	6	6	
Female	5	9	2	
Age (year)	55.3 \pm 15.0	77.1 \pm 7.9	79.6 \pm 5.8	<0.001
Symptom onset age (year)		72.4 \pm 8.0	78.5 \pm 5.3	0.104
Symptom duration (month)		57.5 \pm 34.5	12.7 \pm 15.0	0.019
K-MMSE		8.4 \pm 5.8	15.4 \pm 4.0	<0.001
CDR		2.7 \pm 0.6	1.9 \pm 1.1	0.045

*One way ANOVA test, independent T test, chi-square test. AD; Alzheimer's disease, VD; vascular dementia. K-MMSE; Korean Mini-Mental State Examination. CDR; Clinical Dementia Rating Scale.

Table 2. Difference of grouped mean neurosteroid levels among Alzheimer's disease (AD), Vascular dementia (VD) and normal controls

	controls (N=12)	AD (N=15)	VD (N=8)	p-value*
DHEA [†]	0.267 \pm 0.139	0.692 \pm 0.484	0.529 \pm 0.193	0.005
DHEAS [‡]	16.016 \pm 16.662	1.829 \pm 2.398	1.165 \pm 0.882	0.004
7 α -OH-DHEA	0.267 \pm 0.139	0.191 \pm 0.101	0.139 \pm 0.101	0.172
7 β -OH-DHEA	0.225 \pm 0.181	0.199 \pm 0.113	0.268 \pm 0.164	0.527
16 α -OH-DHEA	0.849 \pm 0.394	0.751 \pm 0.444	0.962 \pm 0.776	0.660
(DHEA)/(7 α +7 β) [†]	0.696 \pm 0.414	1.767 \pm 0.594	1.622 \pm 0.763	0.000
DHEAS/DHEA [‡]	88.2730 \pm 133.5694	4.5778 \pm 8.7055	2.4517 \pm 2.0143	0.022
16 α -OH-DHEA/DHEA	3.647 \pm 1.878	1.565 \pm 1.190	1.852 \pm 1.562	0.004
Preg	3.389 \pm 2.305	5.262 \pm 6.375	2.123 \pm 0.897	0.268
Pregs	2.327 \pm 2.827	1.018 \pm 0.783	0.580 \pm 0.646	0.068

*ANCOVA test was done (with age cofactor); [†]Statistical significance was found between controls and AD; [‡]Statistical significance was found between controls and dementia patient.

3. 통계 처리

SPSS 8.0 통계 프로그램의 Kolmogorov-Smirnov test를 이용하여 각 자료가 정상분포함을 확인하고 이후 나이를 보조인자(cofactor)로 한 ANCOVA를 이용하여 각 군간의 차이를 구하였다.

결 과

1. 성별 및 연령 분포

Table 1에서 보는 바와 같이 알츠하이머병 환자 15명, 혈관성 치매 8명, 대조군 12명 사이에 남녀간의 성별, 발병기간은 유의한 차이가 없었다. 입원 당시 알츠하이머병 환자의 평균 연령은 77.1세, 혈관성 치매 79.6세로 양군간의 유의한 차이가 없었으나, 대조군의 55.3세와 비교하여 치매환자 들의 나이가 유의하게 높았다. 알츠하이머병에서 K-MMSE 점수는 8.4, CDR은 2.7로서 혈관성 치매의 15.6, 1.9에 비하여 유의하게 낮았다(Table 1).

2. 각 군에서 뇌척수액에서 neurosteroid의 차이

DHEA, DHEAS, 7 α -hydroxy-DHEA, 7 β -hydroxy-DHEA, 16 α -hydroxy-DHEA, PREG, PREGS와 이를 이용한 DHEA/(7 α -hydroxy-DHEA+7 β -hydroxy-DHEA), 16 α -hydroxy-DHEA/DHEA 비는 Table 2와 같다. 대조군에서 DHEA가 알츠하이머병이나 혈관성 치매에 비하여 유의하게 감소하여 있었고 ($p=0.005$), DHEAS는 알츠하이머병이나 혈관성 치매에 비하여 유의하게 증가되어 있었다($p=0.004$). DHEA/(7 α -hydroxy-DHEA+7 β -hydroxy-DHEA) 비는 대조군에서 알츠하이머병이나 혈관성치매에 비하여 유의하게 낮았으며, 16 α -hydroxy-DHEA/DHEA는 대조군에서 다른 군에 비하여 유의하게 높았

다. PREGS는 혈관성 치매에서 가장 낮은 수치를 보였으나 다른 군에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이외에 PREG, 7 α -hydroxy-DHEA, 7 β -hydroxy-DHEA, 16 α -hydroxy-DHEA 농도는 알츠하이머병, 혈관성치매, 정상대조군에서 통계적인 차이가 발견되지 않았다.

나와 연관된 분석에서(Analysis with the co-variate) 나이가 DHEA/(7 α -hydroxy-DHEA+7 β -hydroxy-DHEA)와 유의하게 음의 상관관계를 보였다($p < 0.01$).

고 찰

신경스테로이드가 어디에서 형성되는지에는 두가지 가설이 있는데 생식기와 부신과 같은 말초에서 형성된 스테로이드가 blood-brain barrier를 넘어서 뇌에 존재한다는 가설과 뇌 자체에서 형성된다는 가설이 있다. 그러나 뇌의 DHEA 양이 말초의 양보다 많으며, 동물실험에서 말초 스테로이드 생성기관을 제거한 후에도 쥐의 뇌에서 신경스테로이드가 2주 이상 지속적으로 존재하고[17], 인간의 뇌척수액에서 스테로이드는 혈장과 다른 구성을 보이는 것으로 보아[18, 19] 뇌에서만 고유하게 형성되고 대사되는 신경스테로이드가 있음을 알 수 있다. 또한 뇌 면역검사 방법(immunocytochemical localization)을 이용한 연구에서 cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (P450scc) 이 쥐의 백질에서 관찰되었고 이후 회색질기아교세포가 뇌의 신경스테로이드의 생성원이며[20], 신경세포가 이들의 대사에 관계함이 알려졌다[5, 9, 10].

생성된 DHEA는 신경세포에서 cytochrome P7B1에 의해서 7 α -hydroxylation되어 7 α -hydroxy-DHEA로 대사된 후 다시 7 β -hydroxy-DHEA로 대사된다. 16 α -hydroxy-DHEA는 DHEA에서 cytochrome P3A7에 의해서 직접 형성되지만[9, 21, 22] 이것이 뇌의 어느 부위에서 형성되는지는 정확하지 않다. 7-hydroxylation이나 16 α -hydroxylation 되지 않는 DHEA는 특정한 sulfotransferase에 의하여 DHEAS로 대사된다[23-25]. 그러나 P450scc을 이용한 정상적인 경로 외에도 P450scc 없이 세포내 reactive oxygen species에 의해 DHEA가 형성되는 대체 경로(alternative pathway)가 있는데[6] 이것은 신경계퇴행에 있어서 관찰되는 oxidative stress에 의한 자유라디칼 산소(free radical oxygen)에 의하여 활성화 된다.

본 연구에서 기존 연구와 유사하게[26, 27] 대조군에 비하여 알츠하이머병에서 뇌척수액의 DHEA 양이 유의하게 증가하였고 알츠하이머병과 혈관성 치매의 뇌척수액에서 DHEAS 양이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 알츠하이머병에서 DHEA가 증가하는 이유는 병리소견인 amyloid plaques와 neurofibrillary tangles이 oxidative stress를 증가시키고 이로 인한 reactive oxygen species와 Fe⁺⁺이 대체경로를 활성화시키기 때문이다[26]. 신경스테로이드 중 뇌에서 DHEA가 대사되어 형성

된 것으로 생각되는 7 α -hydroxy-DHEA, 7 β -hydroxy-DHEA와 16 α -hydroxy-DHEA의 뇌척수액에서의 양은 본 연구에서 처음 보고하는데 이 3가지 스테로이드는 대조군, 알츠하이머병, 혈관성 치매 사이에 유의한 차이가 없었다. 그러나 치매 환자군에서 DHEA/(7 α -hydroxy-DHEA+7 β -hydroxy-DHEA)는 대조군에 비하여 증가 되어 있고, 16 α -hydroxy-DHEA/DHEA 양은 대조군에 비하여 감소되어 있다. 이것은 알츠하이머병이나 혈관성 치매에서 DHEA가 대조군에 비하여 더 많이 형성되지만 대조군에 비하여 7 α -hydroxylation 대사가 원활하게 이루어지지 않는 것을 시사한다. 특히 7 α -hydroxylation은 주로 해마에 있는 신경세포에서 이루어지므로[9], 이들의 대사 정도가 알츠하이머병의 특이한 표식인자가 될 것으로 기대되었으나 혈관성 치매와 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

이 결과들은 DHEA와 DHEA의 7-hydroxylation 대사물질이 신경보호 기능을 하고 있다는 기존의 연구와 달리[21, 28, 29] 뇌에서 형성되고 뇌척수액에서 검출된 DHEA가 퇴행성 신경질환을 방지하거나 진행하는데 도움을 주지 못하며 치매 환자의 병리 소견에 따른 부수현상(epiphenomenon)일 가능성이 높을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서도 알츠하이머병과 혈관성 치매의 뇌척수액에서 DHEAS 양이 감소되어 있고, DHEAS가 신경보호작용이 있다는 기존의 연구가 있으므로[30, 31] DHEAS가 신경보호기능이 있는지는 결론 내리기 어렵다.

비록 본 연구에서 알츠하이머병과 혈관성 치매가 치매의 진행 정도나 치매의 유병기간이 차이가 있지만 혈장을 이용한 이전의 연구와 비슷하게 신경스테로이드의 양이 유의한 차이가 없었다[32]. 이것은 두 병이 신경스테로이드의 생성과 대사에 관계되는 유사한 병리현상을 공유하거나 두 군의 환자들이 대부분 심하게 진행된 환자이기 때문에 혈관성 치매에서도 알츠하이머병이 병발되었을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 그러나 치매 환자군에 진행된 환자들이 많고 정상대조군과 같은 연령대가 아니며 증례수가 적기 때문에 이에 대해서는 좀더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

결론적으로 알츠하이머병과 혈관성 치매의 뇌척수액에서 대조군에 비하여 유의하게 DHEA가 증가되어 있고 DHEAS가 감소되어 있으며 이들의 7 α -, 7 β , 16 α -hydroxyl 대사물질은 유의한 차이가 없었다. 이는 알츠하이머병과 혈관성 치매를 일으키는 질환에서 PREG에서 DHEA로 비정상적으로 과도하게 형성됨에도 불구하고 이의 대사는 정상적으로 이루어지지 않는 것을 의미한다. 비록 뇌척수액의 신경스테로이드 검사가 치매환자의 진단에 도움이 되지만 각 치매환자의 감별진단에는 의의 있는 방법이 아니며 이는 그 질환이 비록 다른 병이지만 본 연구와 같이 진행된 환자는 공통의 병리소견을 가질 가능성이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Baulieu EE. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* 1991; 71: 3-10.
- Parker LN, Sack J, Fisher DA, Odell WD. The adrenarche: prolactin, gonadotropins, adrenal androgens and cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46: 396-401.
- Brown RC, Cascio C, Papadopoulos V. Neurosteroids: oxidative stress-mediated dehydroepiandrosterone formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 2000; 21: S238.
- Robel P, Young J, Corpechot C, Mayo W, Perche F, Haug M, et al. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rat and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 355-60.
- Brown RC, Liu Y, Papadopoulos V. DHEA: biosynthesis, regulation and function in the central nervous system. In: Morfin R. DHEA and the brain, Taylor and Francis, London. 2002; 129-46.
- Brown RC, Cascio C, Papadopoulos V. Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and β -amyloid peptide. *J Neurochem* 2000; 74: 847-59.
- Doostzadeh J, Morfin R. Studies of the enzyme complex responsible for pregnenolone and dehydroepiandrosterone 7 α -hydroxylation in mouse tissues. *Steroids* 1996; 61: 613-20.
- Doostzadeh J, Cotillon AC, Morfin R. Dehydroepiandrosterone 7 α - and 7 β -hydroxylation in mouse brain microsomes. Effects of cytochrome P450 inhibitors and structure-specific inhibition by steroid hormones. *J Neuroendocrinol* 1997; 9: 923-8.
- Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JY. Structure and functions of human oxysterol 7 α -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *J Lipid Res* 1999; 40: 2195-203.
- Trincal M, Loeper J, Pompon D, Haw JJ, Morfin R. DHEA metabolism in the brain: production and effects of the 7 α -hydroxylated derivative. In: Morfin R DHEA and the brain, Taylor and Francis, London. 2002; 117-28.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
- Amar K, Wilcock G. Vascular dementia. *Br Med J* 1996; 312: 227-31.
- Kang Y, Na DL, Hahn S. A validity study on the Korean Mini-Mental State Examination (K-MMSE) in dementia patients. *J Korean Neurol Assoc* 1997; 15: 300-8.
- Lapčik O, Hampl R, Hill M, Bičiková M, Starka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids. 1. Radioimmunoassay of 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 67: 439-45.
- Lapčik O, Hampl R, Hill M, Starka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids. 2. Radioimmunoassay of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 71: 231-7.
- Hill M, Lapčik O, Havliková H, Morfin R, Hampl R. 7-Hydroxy-dehydroepiandrosterone epimers in human serum and saliva. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and radioimmunoassay. *J Chromatogr A* 2001; 935: 297-307.
- Corpechot C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, et al. Neurosteroids: 3[α]-hydroxy-5[α]-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 1993; 133: 1003-9.
- Guazzo EP, Kirkpatrick PJ, Goodyer IM, Shiers HM, Herbert J. Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3851-960.
- Wolf OT, Kirschbaum C. Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and human. *Brain Res Rev* 1999; 30: 264-88.
- LeGoascogne C, Robel P, Guezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M. Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* 1987; 237: 1212-5.
- Steckelbroeck S, Watzka M, Lütjohann D, Makiola P, Nassen A, Hans VHJ, et al. Characterization of the dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism via oxysterol 7 α -hydroxylase and 17-ketosteroid reductase activity in the human brain. *J Neurochem* 2002; 83: 713-26.
- Yang HY, Lee QP, Rettie AE, Juchau MR. Functional cytochrome P4503A isoforms in human embryonic tissues: expression during organogenesis. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 922-8.
- Falany CN, Xie XW, Wang J, Ferrer J, Falany JL. Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem J* 2000; 346: 857-64.
- Luu-The V, Bernier F, Dufort I. Steroid sulfotransferases. *J Endocrinol* 1996; 150 Suppl: S87-97.
- Meloche CA, Falany CN. Expression and characterization of the human 3 β -hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 77: 261-9.
- Brown RC, Han J, Cascio C, Papadopoulos V. Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 57-65.
- Murialdo G, Nobili F, Rollero A, Gianelli MV, Copello F, Rodriguez G, et al. Hippocampal perfusion and pituitary-adrenal axis in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 2000; 42: 51-7.
- Lathe R. Steroid and sterol 7-hydroxylation: ancient pathways. *Steroids* 2002; 67: 967-77.
- Jellinck PH, Lee SJ, McEwen BS. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rat hippocampal cells in culture: possible role of aromatization and 7-hydroxylation in neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78: 313-7.

30. Lapchak PA, Chapman DF, Nunez SY, Zivin JA. *Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA (A) receptors.* *Stroke* 2000; 31: 1953-7.
31. Lapchak PA, Araujo DM. *Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases.* *Int Rev Neurobiol* 2001; 46: 379-97.
32. Yanase T, Fukahori M, Taniguchi S, Nishi Y, Sakai Y, Takayanagi R, et al. *Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia.* *Endocr J* 1996; 43(1): 119-23.