Effect of Reserpine on the Behavioral Defects, A β -42 Deposition and NGF Metabolism in Tg2576 Transgenic Mouse Model for Alzheimer's Disease

Jun Go, Sun Il Choi, Ji Eun Kim, Young Ju Lee, Moon Hwa Kwak, Eun Kyoung Koh, Sung Hwa Song, Ji Eun Sung and Dae Youn Hwang*

Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received March 25, 2013 / Revised June 4, 2013 / Accepted June 17, 2013

Reserpine, an anti-hypertensive drug, is able to positively modulate several phenotypes associated with A β toxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease (AD). We investigated into the therapeutic effects of reserpine on mammalian neurodegenerative disorders, and found that significant alteration of the key factors influencing AD was detected in Tg2576 mice after reserpine treatment for 30 days. The aggressive behavior of Tg2576 mice was significantly improved upon reserpine treatment, whereas their social contact was consistently maintained. Furthermore, the levels of A β -42 peptide in the hippocampus of the brain and blood serum were lower in the reserpine-treated group than in the vehicle-treated group. Among γ -secretase components, the expression levels of PS-2, Pen-2, and APH-1 were slightly lower in reserpine-treated Tg2576 mice, although a significant change in nicastrin (NCT) expression was not detected. Furthermore, the serum level of nerve growth factor (NGF) increased in reserpine-treated Tg2576 mice compared with vehicle-treated mice. Among down-stream effectors of the NGF receptor TrkA signaling pathway, reserpine treatment induced elevation of TrkA phosphorylation and reduction of ERK phosphorylation. In addition, in the NGF receptor p75^{NTR} signaling pathway, the expression levels of p75^{NTR} and Bcl-2 were enhanced in reserpine-treated Tg2576 mice compared with vehicle-treated mice, whereas the expression level of RhoA declined. Overall, these results suggest that reserpine can help relieve AD pathogenesis in Tg2576 mice through down-regulation of A β -42 deposition, alteration of γ -secretase components, and regulation of NGF metabolism.

Key words : A β -42, Alzheimer's disease, γ -secretase, nerve growth factor (NGF), reserpine, Tg2576 mice

서론

Alzheimer's Disease (AD)는 인지기능의 저하와 행동장애 등의 임상적 특징을 나타내는 신경퇴행성 질환이다[19]. AD 환자의 뇌에는 비정상 단백질의 축적이 발견되어, 주로 학습이나 기억 능력과 관계있는 해마 부위에서 노인성 반점(senile plaques)과 tau 단백질의 과인산화된 응집체(hyperphosphorylated aggregates) 형태로 존재한다[2, 5, 52, 55]. 이러한 질병의 원인이 되는 amyloid beta (A β) peptide는 amyloid precursor protein (APP)이 β -secretase와 γ -secretase의 연속적인 절단에 의해 A β -40와 A β -42로 생성된다[9]. 정상 뉴런에서는 APP가 α -secretase에 의해 절단되며,

생성된 A β 는 뉴런이 과도하게 전기적으로 흥분되었을 때, 억제적 되먹임(negative feedback)을 통하여 시냅스의 기능이 항상성을 유지하도록 작용하지만[27], AD가 진행되는 과정에서는 항상성이 유지되지 못하고, A β -42 peptide가 비정상적으로 과생산되어 반점(plaque)을 형성하여 조직에 축적된다[11]. A β peptide는 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 신경독성을 나타낸다. 특히 합성된 A β peptide (A β -40, A β -42)와 그 응집체는 *in vitro*에서 배양한 신경세포 뿐만 아니라, 마우스의 해마부위 신경세포 모두에서 독성을 나타낸다[4, 38, 40, 46, 50, 57]. 또한 합성된 A β -40와 AD 환자의 뇌에서 얻은 노인성 반점을 마우스의 대뇌에 주입한 결과, 신경세포의 사멸을 유발하였다[15, 32]. 현재까지 A β peptide에 의해 유도되는 신경세포 사멸과정에 관한 연구들이 많이 이루어졌지만, 이로 인한 신경세포의 손상을 효과적으로 저해하거나 A β peptide로부터 신경세포를 보호할 수 있는 치료 방법이 미미한 상태이다.

한편, reserpine은 인도사목의 뿌리에서 추출되는 식물 알칼로이드로서, 인도에서는 뱀에 물린 상처와 정신이상 치료용으로 사용되었고[36], 1940년대와 50년대에는 정신적 질병의

*Corresponding author

Tel: +82-55-350-5388, Fax: +82-55-350-5389

E-mail : dyhwang@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

치료제 또는 항고혈압제로 사용되었다[6, 54]. Reserpine의 작용은 vesicular monoamine transporter (VMAT)에 큰 친화력을 가지고 결합하여[19] 신경전달물질이 소포로 흡수되는 것을 막아, 최종적으로 저장소포로부터 카테콜아민을 고갈시킨다[22, 30, 31]. VMAT에 대한 reserpine의 작용 결과로 카테콜아민 분비 후 흡수가 되지 않기 때문에 분비 가능한 소포 카테콜아민이 감소하여 만성적으로 카테콜아민 분비가 제한된다[8, 47]. 이로 인해 중추신경계의 신경전달이 차단되면서 우울증과 파킨슨병 등의 증상이 나타난다. 그러나 Arya 등[3]은 reserpine이 뉴런퇴행성 질병, 특히 AD에 보호적 기능을 제공할 수 있음을 *C. Elegans* AD 모델을 통해 평가하였다[34]. 이 모델동물에서 reserpine은 A β -42 및 oligomer, monomer의 발현 정도에는 영향을 미치지 않았으나, A β toxicity로 인한 마비가 지연되는 것이 확인됨으로써, reserpine이 A β toxicity를 감소시킴을 보고하였다[44]. 그러나 reserpine이 포유동물 치매모델에서 치매질환의 병리적 증상에 미치는 영향에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 30일 동안 reserpine을 치매모델동물로서 잘 알려진 Tg2576 마우스에 투여한 후 행동학적 변화, A β -42 peptide의 변화, NGF의 변화, NGF receptor 신호전달의 변화 등을 관찰하였다. 이러한 결과는 비록 추가적인 많은 연구가 필요하지만 reserpine이 포유동물에서 치매치료제로서 가능성을 처음으로 제시하고 있다.

재료 및 방법

동물실험 설계

본 실험에 사용된 Tg2576 마우스와 Non-Tg 마우스(B6SJLF1/J, 11주령, 20 $\pm$ 5 g)는 샘타코바이오키리아(Osan, Korea)로부터 구매하였으며, 12시간의 조명주기(08:00~ 20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 $\pm$ 10%)에서 사육하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina Mills Inc., Seongnam, Korea)를 자유급식하도록 하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호:PNU-2011-000220)을 받아 수행되었다. 동물실험설계를 위해, 실험동물은 3개 그룹(Non-Tg 그룹, vehicle 투여 Tg2576 그룹, reserpine 투여 Tg2576 그룹)으로 분류하였고, Non-Tg 마우스는 그룹 당 5마리, Tg2576 마우스는 그룹 당 4마리씩 배정하였다. Vehicle 투여 Tg2576 그룹이 증류수(0.3 ml)를 투여하는 동안, reserpine 투여 Tg2576 그룹은 reserpine (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 2 mg/kg으로 30일 동안(1회/3일) 복강투여 하였고, Non-Tg 그룹은 어떠한 처치도 하지 않았다. 투여가 완료된 후 모든 마우스는 Zoletil (VirBac, Carros, France)을 이용해서 마취하고, 혈액과 뇌조직을 적출하여 분석에 사용하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 Tg2576 마우스의 확인

Tg2576 마우스와 Non-Tg 마우스를 확인하기 위해, PCR 증폭유전자산물인 마우스 꼬리로부터 얻은 genomic DNA를 주형으로 APP유전자 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 통해 얻은 뒤 전기영동하여 확인하였다. 먼저, 마우스 꼬리를 1 cm정도 절단한 뒤 tail mix 용액(100 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 0.5% SDS)과 proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C 항온수조에서 밤새 처리하였다. 배양액으로부터 8 M KAc 용액과 chloroform 용액을 이용하여 단백질을 제거한 후 genomic DNA를 분리하였다. PCR반응은 genomic DNA를 주형으로 95 $^{\circ}$ C (30 sec), 62 $^{\circ}$ C (30 sec), 72 $^{\circ}$ C (45 sec) 25 cycle로 APP 특이적인 primer (sense: 5'-CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGT T-3', anti-sense: 5'-GTG GAT AAC CCC TCC CCC AGC CTA GAC CA-3')를 이용하여 PCR 장치(Thermal Cycler T100, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA)에서 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% 아가로스겔에서 전기영동하고, UV-transilluminator에서 사이즈를 관찰하였다.

사회적 상호작용시험(Social interaction test)

Tg2576 마우스의 활동성과 공격행동을 측정하기 위해 수행된 사회적 상호작용시험은 이전에 보고된 방법에 따라 실시하였다[18]. 먼저, 2마리의 마우스를 자유롭게 돌아다닐 수 있는 52 $\times$ 52 $\times$ 25 cm 크기의 상자에 넣고, 30분간 적응시킨 후 마우스를 실험 상자의 양 끝에 두고 20분간 행동을 관찰하였다. 이때, 마우스가 보이는 행동 중 냄새맡기, 따라다니기, 기어다니기, 수동적 접촉 등은 사회적 상호작용으로 기록하고, 물기, 뛰기, 차기, 피하기/쫓기, 싸우기 등은 공격적 행동으로 기록하여 그 빈도를 합산하여 계산하였다.

면역조직화학염색(Immunohistochemical staining)

마우스 뇌에 대한 면역조직화학염색은 이전에 보고된 방법에 따라 수행하였다[25, 41]. 먼저, 마우스를 CO $_2$ 가스로 마취한 후 PBS와 헤파린 혼합 용액으로 심장을 통해 관류시켜 전체조직의 혈액을 제거하였다. 혈액이 제거된 마우스의 뇌는 두개골을 분리시켜 채취하고, 포름알데히드에 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌는 탈수과정을 거친 뒤 파라핀을 이용하여 포매한 후 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)를 이용하여 10 μ m의 두께로 박절하였다. 박절된 조직의 면역염색을 실시하기 위하여 xylene과 ethanol에서 탈수과정을 거친 뒤, 3% H $_2$ O $_2$ 에 10분간 배양하고 PBS로 세척한 후 10% BSA를 이용하여 blocking을 실시하였다. 여기에 anti-A β -42 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 1% BSA를 1:100 농도로 희석한 용액을 첨가하여 밤새 처리 한 후에 이차 항체(biotinylated goat anti-rab-

bit IgG)와 HRP streptavidin (Histostain-Plus Kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)를 순차적으로 결합시켰다. 최종적으로 A β -42 peptide의 양은 stable 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Invitrogen)을 이용하여 발색 반응을 유도한 후, BX50F-3 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

Dot Blot Analysis

Tg2576 마우스에 A β -42 peptide의 침적양을 조사하기 위하여, slot blot analysis를 실시하였다. 먼저, Tg2576 마우스와 Non-Tg 마우스의 뇌조직 100 mg을 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 5 μ g의 단백질을 slot blot에 사용하였다. 동일한 양의 단백질은 Slot Blot Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 단백질이 전이된 membrane은 1시간 동안 실온에서 5% skim milk로 blocking을 실시하였다. 여기에 일차 항체인 rabbit polyclonal anti-A β -42 antibody (Invitrogen)로 1시간 동안 처리하고 미결합된 항체는 washing buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, and 0.05% Tween-20)를 이용하여 제거하였다. 그리고 이차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (GenTest, Woburn, MA, USA)를 실온에서 1시간 처리한 후 ECL Kit (Amersham Life Science)를 이용하여 발현양을 측정하였다.

A β -42 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

마우스 뇌에서 A β -42의 농도는 Human A β -42 ELISA Kit (Invitrogen)를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, 마우스의 뇌조직 100 mg에 guanidine-tris buffer (5 M guanidine HCl/50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 ml)를 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries)를 이용하여 분쇄한 후, 실온에서 3시간 동안 균질 현탁액을 분해하였다. ELISA Kit의 각 well에 뇌조직 현탁액과 anti-A β -42 antibody를 첨가하여 12시간 이상 배양한 후 미부착단백질은 wash buffer (200 μ l)를 이용하여 세척하였다. 다시 각 well에 anti-rabbit IgG HRP working solution (100 μ l)를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양한 후 wash buffer로 세척하였다. 여기에 stabilized chromogen (100 μ l)을 첨가하여 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, stop solution (100 μ l)을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 색깔의 변화는 ELISA-reader (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를

이용하여 450 nm에서 측정하였다.

NGF ELISA

마우스 혈청에서 NGF의 농도는 ChemiKine Nerve Growth Factor, Sandwich ELISA Kit (Millipore, Bedford, MA, USA)를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, ELISA Kit의 각 well에 각 마우스에서 추출한 혈청과 표준용액을 첨가하여 12시간 이상 배양하였다. Plate의 각 well로부터 미부착단백질은 wash buffer (200 μ l)를 이용하여 세척하고, mouse anti-mouse NGF monoclonal antibody (100 μ l)를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 배양하고, HRP conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody (100 μ l)를 첨가하였다. 2시간 동안 배양한 후 stabilize-chromogen (100 μ l)를 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 반응정지용액 (100 μ l)을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 색깔의 변화는 ELISA-reader (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

Western Blot Analysis

Tg2576 마우스의 뇌조직혼합액은 뇌조직 100 mg을 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries)를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30-60 μ g의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 6-14% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동 한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 단백질이 전이된 막은 anti-beta actin antibody (Sigma-Aldrich), anti-presenilin-2 (PS-2) antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-anterior pharynx defective 1 (APH-1) antibody (Sigma-Aldrich), anti-nicastrin (NCT) antibody (Cell signaling Technology), anti-presenilin enhancer-2 (Pen-2) antibody (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) antibody (abcam, Cambridge, MA, USA), anti-Bcl-2-associated X (Bax) antibody (abcam), anti-tyrosine kinase receptor type 1 (TrkA) antibody (Cell Signaling Technology), anti-phospho-TrkA (pTrkA) antibody (Cell Signaling Technology), anti-RhoA antibody (Cell Signaling Technology), anti-p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) antibody (Cell Signaling Technology), anti-serine/threonine protein kinase (Akt) antibody (Cell Signaling Technology), anti-phospho-Akt (pAkt) antibody (Cell signaling Technology), anti-extracellular signal-regulated kinase (ERK) antibody

(Santacruz Biotechnology), anti-phospho ERK (pERK) antibody (Santacruz Biotechnology) 등의 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하고 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다.

통계분석

Non-Tg 그룹과 Tg2576 그룹간에 유의성은 One way ANOVA (SPSS for Windows, Release 10.10, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였고, vehicle 투여 Tg2576 그룹과 reserpine 투여 Tg2576 그룹의 유의성은 *post hoc* test (SPSS for Windows, Release 10.10, Standard Version)를 이용하여 분석하였다. 모든 결과에서, $p < 0.05$ 를 유의성이 있는 값으로 인정하였으며, 실험 결과는 $\text{means} \pm \text{SD}$ 로 제시하였고, 그래프의 값은 Non-Tg 그룹을 1로 설정하고 다른 그룹의 값을 상대적으로 비교하여 제시하였다.

결 과

Reserpine이 Tg2576 마우스의 행동에 미치는 영향

Tg2576 치매모델동물에서, reserpine이 행동학적 변화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 마우스를 대상으로 사회적 상호작용시험을 실시하였다. 그 결과, 사회적 상호작용은 Non-Tg 그룹에 비하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹과 reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 유의적으로 크게 감소하였으나, 두 그룹 간의 차이는 없었다(Fig. 1A). 한편, 공격적 행동은 Non-Tg 그룹에 비하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 유의적으로 2배 정도 증가하였으나, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서는 Non-Tg 그룹 수준으로 감소하였다(Fig. 1B). 이러한 결과는 reserpine이 Tg2576 마우스에서 비록 사회적 상호작용에는 영향을 미치지 못하지만, 공격적인 행동은 유의적으로 감소시킴을 제시하고 있다.

Reserpine이 A β -42의 생성에 미치는 영향

Reserpine이 뇌조직의 A β -42 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, A β -42 peptide의 양을 reserpine을 투여한 Tg2576 마우스의 뇌조직에서 면역조직화학염색, Dot Blot Analysis, ELISA를 이용하여 측정하였다. 먼저, 면역조직화학염색에서 A β -42 peptide는 Non-Tg 그룹에 비하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹의 해마부분(CA1-3, DG)에서 유의적으로 증가하였지만, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서는 다시 감소되었다(Fig. 2). 또한, Dot Blot Analysis와 ELISA에서도 유사한 결과가 관찰되었다. 비록 두 가지 분석법에서 변화의 비율은 차이가 있었지만, A β -42 peptide 양은 Non-Tg 그룹에 비하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 유의적으로 증가하였고, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서는 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 reserpine이 Tg2576 마우스의 뇌조직에서 A β -42 peptide의

Fig. 1. Effect of reserpine on the social contact (A) and aggressive behavior (B). The social contact and aggressive behavior of Tg2576 mice was measured using social interaction test for 20 min as described Materials and Methods. Each mouse was tried triplicate in social interaction test.

생성을 억제함을 제시하고 있다.

Reserpine이 γ -secretase 구성단백질 발현에 미치는 영향

Reserpine이 A β -42 peptide 형성을 촉진하는 γ -secretase 구성단백질(PS-2, Pen-2, APH-1, NCT)에 미치는 영향을 알아보기 위해, 4가지 단백질의 발현 변화를 Tg2576 마우스의 뇌조직에서 Western Blot Analysis를 이용하여 분석하였다. 그 결과, full length PS-2의 발현은 Non-Tg 그룹에 비하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 감소하였으며, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 더욱 감소하였다. 그러나 C-말단절편의 발현양은 reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 오히려 증가하였다. Pen-2와 APH-1의 발현은 매우 유사한 발현양상을 나타내었다. 이들 두 단백질의 발현양은 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 Non-Tg 그룹에 비교하여 증가하였으나 reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 유의적으로 감소하였다. 그러나 NCT의 발현은 모든 그룹에서 일정하게 유지되면서 큰 차이가 없었다(Fig. 4). 따라서, 이러한 결과는 reserpine이 γ -secretase의 구성단백질 발현량의 변화를 유도함으로써 A β -42 peptide의 생성에 영향을 미칠 수 있음을 제시하고 있다.

Tg2576

Fig. 2. Effect of reserpine on the deposition of A β -42 peptides in the mouse brain. Deposition of A β -42 peptides in brains of Tg2576 mice was detected by immunohistochemical staining. The low intensity was observed in the hippocampus (CA1-3) and DG of reserpine-treated Tg2576 mice, as compared with vehicle-treated mice, at 40x magnification (A-C), scale bar=200 μ m. Detailed histological features of several regions of the hippocampus are shown in three rectangles at 400x magnification (D-L), scale bar=20 μ m.

Reserpine이 NGF 농도와 NGF 신호전달과정에 미치는 영향
NGF 분비능과 신호전달과정에 미치는 reserpine의 영향을
평가하기 위하여, 마우스의 혈청에서 NGF 농도를 ELISA를
이용하여 측정하였고, 뇌조직에서 TrkA 신호전달과정과

p75^{NTR} 신호전달과정에 포함된 단백질의 변화를 Western Blot
Analysis로 확인하였다. 그 결과, 혈청 내 NGF 농도는 Non-Tg
마우스와 비교하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 감소하였
고, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 다시 증가하였다(Fig. 5B).

Fig. 3. Effect of reserpine on the concentration of Aβ-42 peptides in the mouse brain. The concentration of Aβ-42 peptides in brain homogenate were measured with Dot blot assay (B) and Aβ-42 ELISA assay (D). Also, Aβ-42 peptides bands were shown (A), and actual concentration of Aβ-42 peptides was calculated with standard curve (C).

또한, high affinity NGF receptor 신호전달과정에서, TrkA의 인산화는 Non-Tg 마우스와 비교하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 증가하였고, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 더욱 증가하였다(Fig. 5D). 그러나, ERK의 인산화는 vehicle-투여 Tg2576 그룹에서 큰 변화가 없었으나, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 5E). 하지만 Akt의 인산화는 비록 Tg2576 그룹에서 증가하였지만 vehicle 투여 Tg2576 그룹과 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 일정한 수준을 나타내었다(Fig. 5F).

한편, low affinity NGF receptor 신호전달과정에서, p75^{NTR}과 Bcl-2 발현양은 매우 유사한 변화양상을 나타낸다. 이들 단백질의 발현은 Non-Tg 마우스와 비교하여 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 증가하였고, reserpine 투여 Tg2576 그룹에

서 더욱 증가하였다. 그러나, RhoA의 발현양은 vehicle 투여 Tg2576 그룹에서 증가하였지만, reserpine 투여 Tg2576 그룹에서 다시 감소하였다. 그리고 Bax의 발현은 모든 그룹에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과는 reserpine은 Tg2576 마우스에서 NGF의 분비를 촉진시키고, 뇌 조직에서 NGF 신호전달에 영향을 미침을 제시하고 있다.

고 찰

Tg2576 마우스는 가장 잘 알려진 치매질환모델동물로서 APP유전자의 Swedish 돌연변이 형태(APP^{sw})를 미세주입기술을 이용하여 수정란에 주입함으로써 개발되었다. Tg2576 마우스에서 APP단백질은 Lys670과 Met671이 각각 Asn, Leu

Fig. 4. Effect of reserpine on the expression of γ -secretase components in brain of Tg2576 mice. The expression level of PS-2 (B, C), Pen-2 (D), APh-1 (E) and NCT (F) in the lysate mixture prepared from the brain tissue was detected using the specific primary antibody. The expression level of β -actin was used as endogenous control. Bands (A) were quantified using an Analyzer (Model GS-690, Bio-Rad) to obtain relative protein levels.

Fig. 5. Effect of reserpine on secretion of NGF and high affinity TrkA receptor signaling pathway. The concentration of NGF was measured in the serum of blood collected from abdominal vein of Tg2576 mice (B). Actual concentration of NGF was calculated with standard curve of NGF (A). The phosphorylation level of three components including TrkA (D), ERK (E) and Akt (F) in the lysate mixture prepared from the brain tissue was detected using the specific primary antibody. The expression level of β -actin was used as endogenous control. Bands (C) were quantified using an Analyzer (Model GS-690, Bio-Rad) to obtain relative protein levels.

Fig. 6. Effect of reserpine on low affinity p75^{NTR} receptor signaling pathway. The expression level of four components including p75^{NTR} (B), RhoA (C), Bax (D) and Bcl-2 (E) in the lysate mixture prepared from the brain tissue was detected using the specific primary antibody. The expression level of β -actin was used as endogenous control. Bands (A) were quantified using an Analyzer (Model GS-690, Bio-Rad) to obtain relative protein levels.

아미노산으로 변환됨으로써 γ -secretase 활성이 증가되어 과량의 A β -42 peptide를 생성하게 된다[20]. 이러한 마우스는 solu-

ble A β -40와 A β -42가 6-8개월령에서 급격히 증가하고, A β peptide가 침적된 신경반이 10-16개월령에 신피질과 해마에서

형성된다[16, 24, 42]. 본 연구에서는 비록 완전한 치매증상이 나타나는 6개월령 이상의 모델마우스를 사용하여 효능을 평가하진 못했지만 reserpine이 포유동물에서 효과적으로 작용 가능함을 제시하는 최초 연구로 의미가 매우 크다고 사료된다. 더불어 추가적인 연구에서는 6개월 이상의 모델동물을 이용함으로써 인간과 유사한 치매증상을 나타내는 모델동물에서 구체적인 효능과 기전에 대한 연구가 수행될 필요가 있다.

γ -secretase는 PS-1, 2, NCT, APH-1, Pen-2로 구성된 효소 단백질 복합체이며, 세포 내 Notch, E-cadherin, CD44 등 다양한 기질을 절단하여 대사반응을 조절한다[26, 33, 48, 56, 58]. 초기단계에서 PSs는 endoproteolytic cleavage를 통해 amino-terminal fragment (NTF)와 carboxyl-terminal fragment (CTF)를 포함하는 기능적 PS heterodimer를 형성한다[7]. PS1 NTF/CTF heterodimer는 transition-state analogue γ -secretase inhibitor에 결합할 수 있음을 증명함으로써 이들이 γ -secretase의 결정적인 구성성분이라는 것을 제시하였다[28, 35]. 한편, NCT는 PS의 보조인자로, APP와 Notch에 결합하고 γ -secretase receptor로서 작용한다[37]. APH-1은 NCT와 상호작용하여 γ -secretase 복합체의 초기 조립 단계에서 안정된 중간체를 형성하고[28], Pen-2는 PS endoproteolysis를 촉매한다[1, 37]. 따라서, 본 연구에서는 reserpine이 γ -secretase 복합체 구성단백질에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Tg2576 마우스의 뇌조직을 이용하여 western blot을 실시하였다. 결과에서 보여주는 것처럼, reserpine은 Tg2576 마우스에서 증가된 Pen-2와 APH-1 단백질의 발현을 회복시켜주는 효과가 있었다. 이러한 결과는 비록 reserpine은 다른 γ -secretase 구성 단백질의 발현에도 영향을 주지만, 특히 Pen-2의 발현조절을 통해 γ -secretase의 활성을 조절할 가능성이 있음을 시사하고 있다.

한편, NGF는 neurotrophin family에 속하는 단백질로서 교감신경계와 감각신경계의 유지와 발달을 위해 매우 중요한 역할을 수행한다[13]. 알츠하이머의 신경퇴행성과정은 NGF 수용체와 밀접한 관계를 갖고 있다. NGF 수용체의 하나인 TrkA는 APP C-terminal의 인산화를 조절하며, 이러한 조절은 Ras/MAPK 신호전달과정과 PI3K/PKB 신호전달과정을 통해 생존과 증식을 조절한다[43, 51]. 또한, NGF receptor의 다른 종류인 p75^{NTR}은 APP의 절단에 의해 생성되는 A β peptide와 결합할 수 있지만 아직도 구체적인 신호전달과정과 AD에 미치는 영향은 명확히 밝혀져 있지 않다[39, 49]. 알츠하이머의 증상인 인지능력 감소는 기저전뇌의 콜린작동성 뉴런(basal forebrain cholinergic neurons, BFCNs)의 노화에 따른 퇴화로 인해 발생한다. BFCNs의 기능과 형태는 대뇌 피질과 해마로부터 공급되는 NGF에 의존하는데 BFCNs 세포체에 NGF 공급이 줄어들면 축삭, 수상돌기와 같은 신경세포 표지물(neuronal marker)이 감소하게 되어 뇌수축이 유도된다[45]. 따라서 이러한 치매와 NGF의 상관관계에 기반하여 본 연구에

서는 reserpine이 뇌조직에 미치는 영향을 NGF의 분비와 신호전달과정의 측면에서 관찰하였다. 이전에 보고된 일부 실험은 본 실험결과와 매우 유사하다. Fabrazzo [14]는 랫드에 reserpine을 투여한 결과 9시간 후에 cerebral cortex에서 NGF mRNA의 발현이 약 340% 증가하였으며, NGF 단백질은 18시간 후 약 150% 증가함을 보고하였다. 하지만 NGF mRNA와 NGF 단백질은 각각 24시간, 36시간 후에 정상 수준으로 돌아왔다. 본 실험에서는 30일 동안 지속적으로 Tg2576 마우스에 reserpine을 투여하였고, 그 결과 NGF 단백질의 양이 Non-Tg 수준으로 회복되었다.

체내로 분비된 NGF는 세포막에 분포하는 두 종류의 수용체(high와 low affinity receptor)에 결합하여 세포 내로 신호를 전달한다. 두 종류의 수용체 중에서, 높은 친화력을 갖는 high affinity receptor는 TrkA로서 세포질 쪽에 위치한 tyrosin-kinase domain을 통하여 Akt 혹은 ERK를 거쳐 신경돌기돌출(neuritic outgrowth)을 유도할 수 있다[53]. 특히, TrkA의 intracellular domain은 APP C-terminal과 상호작용을 통해 세포 내 신호전달과정을 조절한다[21]. 본 연구에서 TrkA는 reserpine 투여 후 정상 대조군에 비해 약 2배 증가하였으며, 이러한 신호는 Akt로 전달되어 세포생존을 증가시켰다.

한편, 낮은 친화력을 갖는 low affinity receptor는 p75^{NTR}로서 G-protein receptor 그룹에 속하며, 세포질부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있으며, RhoA를 거쳐 Bcl-2/Bax의 발현을 조절한다[12, 17]. 또한, p75^{NTR}은 γ -secretase와 β -secretase에 의해 절단되어 세포질에 RhoA의 증가를 유도한다[21]. 본 연구에서 reserpine 투여로 인해 p75^{NTR} 발현이 증가하였으며, 이러한 신호는 Bcl-2로 전달되어 최종적으로 anti-apoptosis 효과를 나타내었다.

Arya [3]의 논문에서 *C. elegans*에 reserpine을 투여한 결과, 비록 A β 독성에 의해 유도되는 마비를 완화시키는 특성을 나타내었으나 A β 의 축적은 변화 없었고, A β oligomer와 monomer의 변화도 관찰되지 않았다[44]. 앞선 결과와는 다르게 본 실험에서는 마우스에 reserpine을 투여한 결과 A β -42 peptide의 농도 및 해마에서의 축적이 감소되었다. 또한 reserpine 투여는 A β -42 형성 과정에 관여하는 γ -secretase components 중에 full length PS-2 단백질의 감소와, Pen-2와 APH-1 단백질의 회복을 유도하였다. 하지만, reserpine이 마우스의 기억력 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위한 Passive Avoidance Test를 실시한 결과에서는 모든 그룹에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(data not shown). 이는 Tg2576 마우스의 치매 유발로 인한 행동장애는 보통 9개월령에서 확실하게 나타나는데[29], 본 실험에서 사용한 마우스는 약 3개월령의 마우스이기 때문에 정확한 행동 장애가 나타나지 않았던 것으로 예상된다.

알츠하이머 치매 환자의 경우 행동 및 정신심리적 증상(behavior and psychological symptoms of dementia, BPSD)

으로 망상, 환각, 초조/공격성, 우울/낙담, 불안 등을 보이는 데[10], 이 중에 공격성과 사회적 상호작용을 확인한 결과 vehicle 처리그룹은 사회적 상호작용이 낮고 공격적 행동이 높은 전형적인 AD 환자의 행동을 보였지만 reserpine 처리 그룹에서는 공격적 행동을 정상 수준으로 회복시켜주는 효과가 있었다.

이상의 결과에서 살펴본 바와 같이, 본 연구는 reserpine이 Tg2576 마우스 모델에서 행동학적 변화, A β -42 축적감소, NGF 분비증가, NGF 신호전달변화 등 치매질환의 개선 효과를 제시하고 있어 향후 알츠하이머를 치료할 수 있는 효과적인 치료제로서의 가능성을 보여주고 있다.

References

- Ahn, K., Shelton, C. C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M. L., Sisodia, S. S. and Li, Y. M. 2010. Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 21435-21440.
- Arendt, T. 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**, 167-179.
- Arya, U., Dwivedi, H. and Subramaniam, J. R. 2009. Reserpine ameliorates Abeta toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* **44**, 462-466.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Bleuler, M. and Stoll, W. A. 1955. Clinical use of reserpine in psychiatry: comparison with chlorpromazine. *Ann N Y Acad Sci* **61**, 167-173.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekin, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G. and Sisodia, S. S. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*. *Neuron* **17**, 1005-1013.
- Carmichael, S. W., Weber, A. and Winkler, H. 1980. Uptake of nucleotides and catecholamines by chromaffin granules from pig and horse adrenal medulla. *J Neurochem* **35**, 270-272.
- Cavallucci, V., D'Amelio, M. and Cecconi, F. 2012. A β toxicity in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **45**, 366-378.
- Cerejeira, J., Lagarto, L. and Mukaetova-Ladinska, E. B. 2012. Behavioral and psychological symptoms of Dementia. *Front Neurol* **3**, 1-21.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. and Selkoe, D. J. 1992. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases protein production. *Nature* **360**, 672-674.
- di Mola, F. F., Friess, H., Zhu, Z. W., Koliopanos, A., Bley, T., Di sebastiano, P., Innocenti, P., Zimmermann, A. and Büchler, M. W. 2000. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* **46**, 670-679.
- Einarsdottir, E., Carlsson, A., Minde, J., Toolanen, G., Svensson, O., Solders, G., Holmgren, G., Holmberg, D. and Holmberg, M. 2004. A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. *Hum Mol Genet* **13**, 799-805.
- Fabrazzo, M., Costa, E. and Mocchetti, I. 1991. Stimulation of nerve growth factor biosynthesis in developing rat brain by reserpine: steroids as potential mediators. *Mol Pharmacol* **39**, 144-149.
- Frautschy, S. A., Baird, A. and Cole, G. M. 1991. Effects of injected Alzheimer β -amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8362-8266.
- Frautschy, S. A., Yang, F., Irizarry, M., Hyman, B., Saido, T., Hsiao, K. and Cole, G. 1998. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* **152**, 307-317.
- Freund-Michel, V. and Frossard, N. 2008. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* **117**, 52-76.
- Fujiwara, H., Takayama, S., Iwasaki, K., Tabuchi, M., Yamaguchi, T., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., Kase, Y., Arai, H. and Yaegashi, N. 2011. Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid β proteins in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience* **180**, 305-313.
- Goedert, M. and Spillantini, M. G. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**, 777-781.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. and Selkoe, D. J. 1995. The Swedish mutation causes earlyonset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Med* **1**, 1291-1296.
- Heese, K., Low, J. W. and Inoue, N. 2006. Nerve growth factor, Neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals* **15**, 1-12.
- Henry, J. P., Gasnier, B., Roisin, M. P., Isambert, M. F. and Scherman, D. 1987. Molecular pharmacology of the monoamine transporter of the chromaffin granule membrane. *Ann N Y Acad Sci* **493**, 194-206.
- Henry, J. P., Sagne, C., Botton, D., Isambert, M. F. and Gasnier, B. 1998. Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter. *Adv Pharmacol* **42**, 236-239.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102.
- Hwang, D. Y., Chae, K. R., Kang, T. S., Hwang, J. H., Lim, C. H., Kang, H. K., Goo, J. S., Lee, M. R., Lim, H. J., Min, S. H., Cho, J. Y., Hong, J. T., Song, C. W., Paik, S. G., Cho, J. S. and Kim, Y. K. 2002. Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic

- mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* **16**, 805-813.
26. Iwatsubo, T. 2004. The γ -secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 379-383.
 27. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. and Malinow, R. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925-937.
 28. Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6382-6387.
 29. King, D. L. and Arendash, G. W. 2002. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav* **75**, 627-642.
 30. Kirshner, N. 1962. Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *J Biol Chem* **237**, 2311-2317.
 31. Kirshner, N. 1962. Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *Science* **135**, 107-108.
 32. Kowall, N. W., Beal, M. F., Busciglio, J., Duffy, L. K. and Yankner, B. A. 1991. An *in vivo* model for the neurodegenerative effects of β amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7247-7251.
 33. Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E. and Zhang, L. 2001. PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12186-12190.
 34. Link, C. D. 1995. Expression of human-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 9368-9372.
 35. Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M. K., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A. and Gardell, S. J. 2000. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6138-6143.
 36. Lopez-Munoz, F., Bhatara, V. S., Alamo, C. and Cuenca, E. 2004. Historical approach to reserpine discovery and its introduction in psychiatry. *Actas Esp Psiquiatr* **32**, 387-395.
 37. Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G. and Xu, H. 2003. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* **278**, 7850-7854.
 38. Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. 1992. β -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neuro Sci* **12**, 376-389.
 39. Perini, G., Della-Bianca, V., Politi, V., Della, V. G., Dal-Pra, I., Rossi, F. and Armato, U. 2002. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by β -amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med* **195**, 907-918.
 40. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. 1993. Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro* the role of peptide assembly state. *J Neuro Sci* **13**, 1676-1687.
 41. Prajapati, K. D., Sharma, S. S. and Roy, N. 2010. Upregulation of albumin expression in focal ischemic rat brain. *Brain Res* **1327**, 118-124.
 42. Rizzary, M., McNamara, M., Fedorchack, K., Hsiao, K. and Hyman, B. 1997. APPsw transgenic mice develop age-related Ab deposits and neurophil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neuro* **56**, 965-973.
 43. Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T. and Schettini, G. 2002. Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* **277**, 35282-35288.
 44. Saharia, K., Arya, U., Kumar, R., Sahu, R., Das, C. K., Gupta, K., Dwivedi, H. and Subramaniam, J. R. 2012. Reserpine modulates neurotransmitter release to extend lifespan and alleviate age-dependent A β proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* **47**, 188-197.
 45. Salehi, A., Delcroix, J. D. and Swaab, D. F. 2004. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm* **111**, 323-345.
 46. Shearman, M. S., Ragan, C. I. and Iversen, L. 1994. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of β -amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1470-1474.
 47. Slotkin, T. A. and Edwards, K. 1973. Effects of reserpine on the content and properties of rat adrenal medullary storage vesicles. *Biochem Pharmacol* **22**, 549-560.
 48. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. 2002. PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 39062-39065.
 49. Susen, K. and Blöchl, A. 2005. Low concentrations of aggregated β -amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *J Mol Med* **83**, 720-735.
 50. Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T. and Imahori, K. 1993. Tau protein kinase I is essential for amyloid β -protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7789-7793.
 51. Tarr, P. E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P. G. and D'Adamio, L. 2002. Tyrosine phosphorylation of the β -amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc. *J Biol Chem* **277**, 16798-16804.
 52. Thind, K. and Sabbagh, M. N. 2007. Pathological correlates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Paininerva Med* **49**, 191-195.
 53. Tsui-Pierchala, B. A. and Ginty, D. D. 1999. Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* **19**, 8207-8218.
 54. Vakil, R. J. 1949. A clinical trial of Rauwolfia serpentina in essential hypertension. *Br Heart J* **11**, 350-355.
 55. Wasling, P., Daborg, J., Riebe, I., Andersson, M., Portelius, E., Blennow, K., Hanse, E. and Zetterberg, H. 2009. Synaptic retrogenesis and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**, 1-14.
 56. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. and Selkoe, D. J. 1999. Two transmembrane

- aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* **398**, 513-517.
57. Yankner, B. A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β -protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-282.
58. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. and St George-Hyslop, P. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature* **407**, 48-54.

초록 : 알츠하이머질환 모델동물인 Tg2576마우스의 행동, A β -42 침적, 신경성장인자 대사에 미치는 reserpine의 영향

고준 · 최선일 · 김지은 · 이영주 · 박문화 · 고은경 · 송성화 · 성지은 · 황대연*
(부산대학교 생명자원과학대학 바이오소재학과)

Reserpine은 항고혈압제로서 알츠하이머질환의 증상을 나타내는 *Caenorhabditis elegans*에서 세포독성을 감소시켜 마비를 억제하고 수명을 연장시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 reserpine의 효능을 포유동물에서 확인하기 위하여, 알츠하이머질환의 병리적 특성과 연관된 주요인자의 변화를 30일 동안 reserpine을 투여한 Tg2576 마우스에서 관찰하였다. 그 결과, 공격행동(aggressive behavior)은 vehicle 투여 그룹에 비하여 reserpine 투여 그룹에서 유의적으로 감소하였으나 사회적 접촉(social contact)은 유의적인 변화가 없었다. 뇌의 해마부분에서 알츠하이머질환의 원인 중 하나인 A β -42의 축적은 reserpine 투여 그룹에서 유의적으로 감소하였고, A β -42의 농도도 대조군에 비하여 reserpine 투여 그룹에서 감소하였다. 더불어, γ -secretase의 구성단백질 중에서 PS-2, Pen-2, APh-1의 발현은 대조군에 비하여 reserpine 투여군에서 유의적으로 감소하였으나 NCT 발현은 변화가 없었다. 혈청에서 NGF의 농도는 Tg2576 마우스에서 감소하였다가 reserpine 투여한 그룹에서 유의적으로 증가하였으며, high affinity receptor의 신호전달과정에 포함된 단백질 중에서 reserpine 투여 그룹은 TrkA의 인산화가 증가하고 ERK 인산화는 감소되었다. 한편 low affinity receptor의 신호전달과정에서, p75^{NTR}과 Bcl-2의 발현은 vehicle 그룹에 비하여 reserpine 투여 그룹에서 유의적으로 발현이 증가하였으나 RhoA의 발현은 reserpine 투여 그룹에서 감소하였다. 따라서 이러한 결과는 reserpine은 포유동물 치매모델인 Tg2576 마우스에서 행동학적 변화, A β -42의 축적, NGF의 농도, NGF신호전달의 변화 등을 유도하며, 향후 치매치료제로서 가능성을 제시하고 있다.