

綠茶추출물에 의한 치매 치료 및 예방에 관한 연구

林種洵*

Abstract

Studies on the Treatment and Prevention of Dementia by Green-Tea extracts

Lim Jong-Soon

College of Oriental Medicine, Daejeon University.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by amyloid deposition and associated loss of neurons in brain regions involved in learning and memory processes. Several causes of evidence support that the cognitive disturbance is closely associated with the deficit of cerebral acetylcholine neurotransmission, and the effect of carboxyl terminal 105 amino acid fragment (CT105) of the amyloid precursor protein (APP) on the gene expression of proinflammatory cytokines. We tested it on the scopolamine-induced amnesia model of the ICR mouse using the Morris water maze, with repeated orally administration of 1st Green-Tea extract (200 mg/kg) and 2nd Green-Tea extract (200 mg/kg). The Green-Tea prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in mouse models of cognitive disturbance and it demonstrated selectivity for inhibition of acetylcholinesterase (AChE). Furthermore, the repeated administration of Green-Tea, CT105-induced Alzheimer's mouse model showed central cholinergic activity by ameliorates learning and memory impairment, and isolation of CD14 microglia showed significantly decreases intracellular release of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and reactive oxygen species (ROS). Because of its composite profile, oral therapeutic index and a prophylactic, Green-Tea is considered the better therapeutic candidate for the treatment of Alzheimer's disease.

I. 緒論

치매(Dementia)는 점진적인 기억력 장애가 실어

증(aphasia), 실인증(인식불능; agnosia), 실행증(apraxia) 등의 행동적인 장애와 함께 나타나 사회 직업적 기능의 장애를 가져오는 것을 말한다. 이런 치매에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 혈관성치매(vascular dementia), 중독성 치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있

*大田大學校 韓醫科大學

고 여성이 남성에 비해서 2-3배정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다^{6),7),8)}. 그리고 혈관성치매는 20-30%정도이고 약물이나 알코올중독에 의한 중독성 치매는 10-20%정도이다. 사고에 의한 뇌의 손상도 치매의 원인이 되기도 한다^{25),30),37)}.

AD는 많은 원인에 의해서 유발되지만 베타-아밀로이드 단백질(β -amyloid precursor protein; APP)의 침적(deposition)으로 생기는 SPs의 신경독성(neurotoxic)으로 신경세포사(neuronal cell death)를 일으키는 것과 과인산화 타우 단백질(hyperphosphorylation tau protein)의 침적에 의한 NFTs의 작용으로 신경퇴행(neurodegeneration)을 일으키는 것이 대표적이다¹⁴⁾. 이 외에도 에스트로젠(estrogen), 아포리포단백질 E (apolipoprotein E; apoE), 프리시닐린(presenilin), 산화제(oxidants; hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질(neurotransmitter), 신경영양인자(neurotrophic factors) 등 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다^{3),5),42)}.

AD는 신경반과 혈관 아밀로이드의 주성분인 아밀로이드 베타 단백질(amyloid beta protein; $A\beta$)이 질병발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 아밀로이드 베타 단백질의 전구 단백질인 APP의 비정상적인 공정과정으로 형성되며, 이때 β -secretase나 1-secretase에 잘려진다. 또한 presenilin은 465개의 A.A를 가진 단백질로서 APP와 유사한 대뇌분포를 가지며 가족형(familial) AD를 일으키는 것으로 알려져 있다. AD에 있어서 presenilin의 역할은 현재 규명 중에 있으나 APP의 형성을 촉진하고 apoptosis과정에 관여할 것으로 알려지고 있다^{1),18),24),39)}. 즉 presenilin 돌연변이로 인해 비정상적으로 분해된 presenilin 대사물이 APP의 형성을 촉진하여 AD를 일으키는 것으로 생각하고 있다. Presenilin 돌연변이는 presenilin-1의 경우는 최소 33종류, Presenilin-2의 경우는 3종류 이상이 보고되어져 있으며 early-onset alzheimer's disease의 경우 대부분이 presenilin 돌연변이에서 기인한다고 생각하고 있다^{4),16)}.

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 콜린성 신

경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다¹⁰⁾. 비록 원인적인 치료방법은 아니더라도 위에 전술한 바와 같이 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 콜린성신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물을 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체 (acetylcholine precursor)로 Lecithin, 수용체 활성화제 (Receptor agonist)로 RS-86, nicotine 등이 있으며, 아세틸콜린 분해 억제제(Acetylcholinesterase inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용중인 cognex (tacrine)과 최근에 승인된 E2020 (aricept)등이 있으며, 이런 약물들은 아세틸콜린이라고 하는 신경전달물질의 분해를 막아주어 감퇴된 인지기능을 개선시켜주는 효과를 가지고 있다^{2),9),11),2),33)}. 이들은 비록 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이긴 하지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제들보다 알츠하이머병의 치료제로서 효과가 가장 우수한 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 미국과 일본 등 외국의 대형 제약회사들은 현재 많은 후보치료제들을 개발하고 있으며, 임상시험단계에 있는 물질들이 여러 가지가 있다. 그러나 아직까지 이 질환을 근본적으로 치료할 수 있는 약물들의 개발을 위해서는 시간과 노력이 더 필요할 것으로 예상된다. 우리나라에서도 치매의 병인 및 기전 연구와 치료제 개발을 위하여 많은 사람들이 연구하고 있으나 아직까지 뚜렷한 효능을 나타내는 새로운 치료제를 개발한 사례는 없다.

본 연구에서는 綠茶추출물을 장기투여한 생쥐를 scopolamine으로 건망증(amnesia)을 유발시킨 후 Morris water maze 실험으로 분석하여 綠茶투여군이 항콜린성 작용으로 기억회복과 운동량 변화를 관찰하고자 하였다. 또한 ICR계 생쥐에 綠茶추출물을 투여하고, 생쥐의 뇌에 CT105처리한 후 알짜이며 유발 모델 생쥐에서 염증반응 싸이토카인과 reactive oxygen species (ROS)를 측정하여 綠茶의 Alzheimer's disease에 대한 예방 및 치료제로서의 가치를 평가하고자 하였다.

II. 實 驗

1. 동물 및 약제

(1) 동물 및 사육 조건

본 실험을 위하여 사용된 ICR (international cancer research) 생쥐는 한국화학연구소에서 분양 받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%, 조지방 8.0%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) 綠茶 추출물 분리

본 실험에 사용한 綠茶 원료는 인위적으로 1번 綠茶와 2번 綠茶로 구분하여 綠茶 1kg에 증류수 5000 ml을 가하고 80 ℃의 열탕 추출기에서 30분간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축한 후 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 綠茶추출물을 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

(1) Scopolamine에 의한 건망증 생쥐모델의 반복 학습 및 綠茶추출물 투여

1) ICR 생쥐의 반복 학습 및 약물 투여

ICR 생쥐를 1 주일간 Morris water maze에서 1 일 1회 반복학습을 실시하였다. Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 적당한 탈지분유를 부유시키고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10 cm인 원통형 platform을 설치한 수조이다. 1일 1회 학습시 ICR 생쥐가 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하였다. 선별된 ICR 생쥐 40마리를 한 군으로 하

여 대조군, 양성대조군 (Tacrine · HCl, 10mg/kg)으로 하였고, 綠茶군을 1번 綠茶 (1st Green-Tea)와 2번 綠茶 (2nd Green-Tea)로 구분하고, 사람 1일 복용량을 기준으로 하여 각각 40 mg/kg (1 X)과 200 mg/kg (5 X)의 綠茶추출물을 14일 동안 1일 1회 경구투여와 반복 학습을 실시하였다.

2) Water maze 실험

훈련과 綠茶추출물 투여가 종료된 ICR 생쥐에 scopolamine (1 mg/kg)을 복강에 주사한 후 30분과 180분 후에 water maze에 ICR 생쥐 한 마리씩 넣고 videotrack (animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France)으로 행동을 측정 후 videotrack software (Viewpoint, France)로 분석하였다.

3) Acetylcholinesterase (AChE) 활성도 측정

14일간 綠茶추출물을 투여한 ICR 생쥐에 scopolamine (1 mg/kg)을 복강에 주사하고 180분 후에 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다. 혈청중 Acetylcholinesterase (AChE) 활성도를 측정하기 위하여 cholinesterase activity kit (Sigma, USA)를 이용하였다. 혈청 0.2ml과 sodium chloride solution 0.2 ml을 혼합한 후 3.0 ml water, nitrophenol solution 2 ml, acetylcholine chloride solution 0.2 ml을 첨가하였다. 5분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가한 후 시간을 정확히 기록하여 25 ℃ water bath에서 30분간 배양시킨 후 ELISA LEADER (Molecular Devices, USA)로 420 nm에서 absorbance를 측정하였다.

(2) 알짜이머유발 생쥐모델의 뇌세포에서 염증반응 싸이토카인 발현에 대한 綠茶의 영향

1) 재조합 carboxyl-terminal fragment (CT105) 클론

CT105를 E. coli에서 발현 정제하기 위해 APP 105 아미노산을 coding 하는 415개의 nucleotides에 대한 primer를 제조하고, open reading frame이 맞도록 BamHI site를 넣어주었다. PC-12 세포를

LPS로 자극하고 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 415 base pair를 증폭하였다. 증폭된 절편을 BamHI으로 절단하여 insert를 취해 6×his·tag을 갖는 pRSET B vector의 BamHI site에 삽입하고 T7 promoter의 영향을 받도록 방향을 확인하였다. 얻어진 발현 벡터를 E.coli BL21 strain에 재형질 전환하였고 이를 재조합 단백질 생산에 사용하였다. 벡터의 induction은 1 mM IPTG로 3 시간 동안 induction하여 E. coli를 수득하였다. E. coli는 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 터트리고 DNase와 RNase를 처리하고 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취해 세포내 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 histidin affinity column을 (Invitrogen, USA)를 사용하여 native한 APP c-terminal 105 아미노산 (CT105)을 얻었다 (scheme.1).

실험에 사용하였다. PC-12 세포주는 rat adrenal pheochromocytoma (ATCC, CRL1721)로 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% 말 혈청과 5% 우태아 혈청, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) 그리고 10 µg/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air/5% CO₂인 37℃ 배양기에서 배양하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin- EDTA용액으로 단일세포들이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0 x 10⁴개의 세포를 96 well plate에 분주하고 배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 2시간 배양한 후 CT105 (최종 농도 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM)을 72시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4℃에 방치하였다.

2) 세포독성 (cytotoxicity) 측정

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여

Bam HI

F1b : 5-gcatggatccgagatctcggaagtg
gagatctcggaagtg
E I S E V

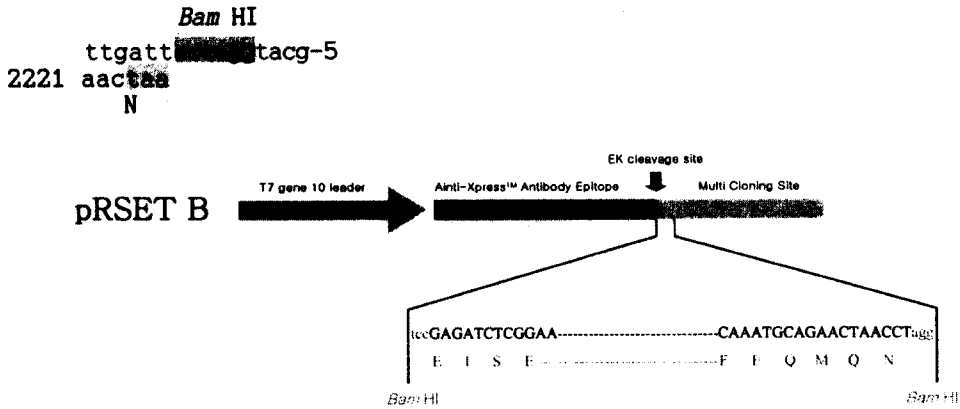
aagatggatgcagaattccgacatgattcaggatttgaagtccaccatcaaaaactggtg
1921 aagatggatgcagaattccgacatgattcaggatttgaagtccgcatcaaaaactggtg
K M D A E F G H D S G F E V R H Q K L V

1981 ttctttgctgaagatgtgggttcgaacaaaggcgcacatcatcggactcatggtgggcggc
F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G

2041 gttgtcatagcaaccggtgattgtcatcaccctggtgatgttgaagaagaacagtacaca
V V I A T V I V I T L V M L K K K Q Y T

2101 tccatccatcatggcgtggtggaggtcgacgcccgcgtgaccccagaggagcgccatctc
S I H H G V V E V D A A V T P E E R H L

OH-ggttgaatgttcaagaaactcgtttacgtc
2161 tccaagatgcagcagaacggatagagaatccaacttacaagttctttgagcaaatgcatg
S K M Q Q N G Y E N P T Y K F F E Q M Q



Scheme 1. Construction of pRSET-CT105.

증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가한고 실온 (room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 생쥐뇌의 Hippocampus에 CT105 주입
 제조합 CT105 (10 μ M)를 준비하고 생쥐를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 stereotaxic frame (Stereo, USA)에 고정한 후 생쥐뇌의 피부를 박리하였다. 알짜이머 유발 생쥐모델을 만들기 위하여 제조합 CT105 (10 μ M)를 Hippocampus에 주입하는데 그 위치는 bregma (두개골 계측점)에서 caudal (꼬리쪽으로) 1.2 mm, midline에서 right 쪽으로 0.7 mm, 그리고 pial 표면에서 깊이 1.1 mm에 microinjector의 injection speed 0.1 μ l/min 와 total volume 0.5 μ l으로 조건을 수행하였다. CT105 주입이 끝난 알짜이머 유발 생쥐모델은 피부를 봉합한 후 2주일 후, 綠茶군을 1번 綠茶 (1st Green-Tea)와 2번 綠茶 (2nd Green-Tea)로 구분하고, 사람 1일 복용량을 기준으로 하여 각각 40 mg/kg

(1 X)과 200 mg/kg (5 X)의 綠茶추출물을 14일 동안 1일 1회 경구투여와 반복 학습을 실시하였다.

4) Water maze 실험

14일간 綠茶투여와 학습을 실시한 알짜이머유발 생쥐를 water maze에 ICR 생쥐 한 마리씩 넣고 videotrack (animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France)으로 행동을 측정한 후 videotrack software (Viewpoint, France)로 분석하였다.

5) Anti-CD14 단일항체로 생쥐뇌의 마이크로글리아 세포 분리

綠茶투여가 종료된 알짜이머유발 생쥐의 두개골을 열고 brain을 적출한다음 2회 D-PBS로 세척하였다. brain을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube (15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 RPMI1640 (containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)과 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO $_2$ 배양기에서 2 시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리여 세척한 후 anti-CD14 단일항

체를 넣고 얼음에서 1시간 배양하였다. 3회 인산완충생리식염수로 세척한 후 Collection Pan anti-mouse IgG-bead (Dynal, USA)로 CD14+ 세포를 분리한 후 세포 release buffer로 anti-CD14+ 세포만 포집하였다.

6) 마이크로글리아 세포내 염증반응 사이토카인 염색법

포집한 마크로글리아 세포를 ice-cold FACS 완충용액 (0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 250 μ l와 동량의 인산완충용액 (2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액 (0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 FITC-anti-IL-1 β 와 FITC-anti-TNF- α 를 30분간 얼음에서 배양하였다. 배양 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 세포를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포 형광분석기로 마이크로글리아 세포내 발현된 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 CellQuest 프로그램으로 분석하였다.

7) 세포내 reactive oxygen species (ROS)의 분석

마이크로글리아 세포내의 ROS를 측정하기 위하여 마이크로글리아 세포에 DCFH-DA 50 μ M을 처리한 후 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

(3) 통계 분석

생쥐들의 행동관찰 및 동물실험에서 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 成績 및 考察

1. Scopolamine으로 학습과 기억력 감퇴를 유발시킨 건망증 생쥐에 대한 회복 효과.

1) Water maze 실험

AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 콜린성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다 (13,43). AD 환자에게서 나타나는 기억력 상실과 다른 인식 결함이 신호를 전달해 주는 화학 물질인 아세틸콜린을 만들어 내는 신경 세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있는데, 이 부족 현상은 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린에스터라아제로 더욱 심화된다 (10,12,27,34). 본 연구에서는 scopolamine (1 mg/kg)으로 학습과 기억력이 감퇴된 건망증 생쥐모델을 이용하여 Morris water maze에서 videotracking으로 綠茶추출물 투여에 대한 효과를 관찰하였다. 실험전 2주일 (14일) 동안 매일 Morris water maze pool에서 platform으로 올라가는 반복학습을 계속 실시하여 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별한 후 각 군을 40마리로 하였고, Scopolamine 투여 30분 후와 180분 후에 videotracking으로 분석한 결과가 Fig. 1과 Fig. 2이다.

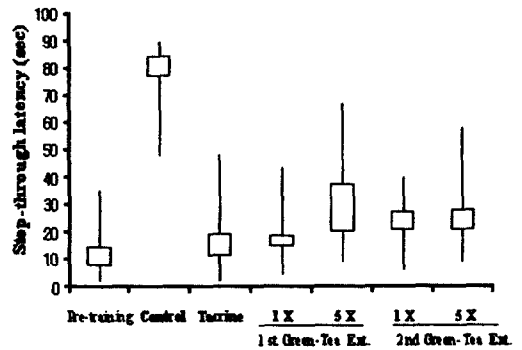


Fig. 1. Effects of green-tea extract on the scopolamine-induced impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 30 min after the injection of scopolamine (1 mg/kg)

and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training). Data represent means \pm S.E (N=40). Control, scopolamine

(1 mg/kg i.p); scopolamine+Tacrine (10 mg/kg, p.o); scopolamine+1st green-tea extract(1X: 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o); scopolamine + 2nd green-tea extract (1X : 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o).

Stop-through latency; each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value compared with scopolamine only group (control) data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 1에서 같이 14일 동안 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 11.2 ± 3.4 (초)인데 scopolamine을 처리한 대조군은 30분 후에 80.6 ± 3.9 (초)로 현저한 기억력 감퇴를 나타내었고, 대조약물인 Tacrine·HCl (10 mg/kg) 처리군은 15.2 ± 4.0 으로 대조군에 비하여 81.1%의 현저한 기억력 감퇴 억제 효과를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.001$). 1번 綠茶추출물 (1st Green-Tea extract) 투여군의 1 X와 5 X는 각각 16.9 ± 2.0 과 23.6 ± 3.8 로 대조군에 비하여 79%와 70.7%의 유의성 있는 현저한 기억력 감퇴 억제효과가 있었다 ($p < 0.001$). 그러나 1 X와 5 X의 차이는 1 X가 더 억제효과가 보이는 것은 과량 투여에 대한 부작용 일거라 사료된다. 2번 綠茶추출물 (2nd Green-Tea extract) 투여군의 1 X와 5 X는 대조군에 비하여 69.7%와 69.6%로 유의성 있는 현저한 억제효과가 있었고 ($p < 0.001$), 1 X와 5 X 투여에 대한 차이는 없었다. 1번 綠茶와 2번 綠茶의 비교는 1번 綠茶의 1 X에서 가장 큰 기억력 감퇴 억제 효과를 나타내었지만 전체적으로 2번 綠茶도 현저한 기억력 감퇴 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

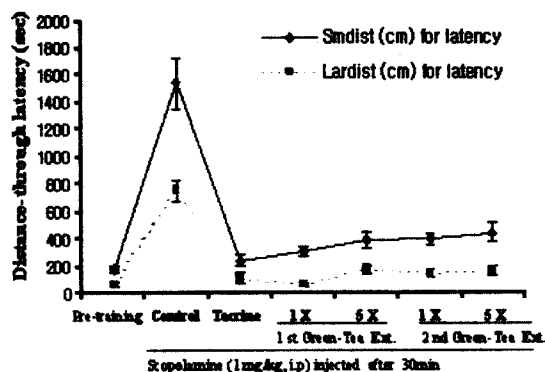


Fig. 2. Effects of green-tea extract on the scopolamine-induced impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 30 min after the injection of scopolamine (1 mg/kg) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training). Data represent means \pm S.E (N=40).Control, scopolamine (1 mg/kg i.p); scopolamine+Tacrine (10 mg/kg, p.o); scopolamine +1st green-tea extract(1X: 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o); scopolamine + 2nd green-tea extract (1X : 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o). lardist; this is the total distance (in cm) covered by the animal in large movement, and smdist; this is total distance covered by the animal in small movement. Statistically significant value compared with scopolamine only group (control) data by T test(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$).

Fig. 2는 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량 (small movement; Smdist)과 많은 운동량 (large movement; Lardist)

을 분석한 결과이다. 운동량은 대조군에 비하여 현저히 감소되었고, 생쥐가 수조에서 움직인 총 운동량 중에서 적은 운동량 (Smdist)과 많은 운동량 (Lardist)의 율은 대조군에 비하여 상대적으로 綠茶 추출물 투여군에서 많은 운동량 (Lardist)의 비율이 감소됨을 알 수 있었다. 이는 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐와 운동량과의 상관관계가 있음을 추측할 수 있었다.

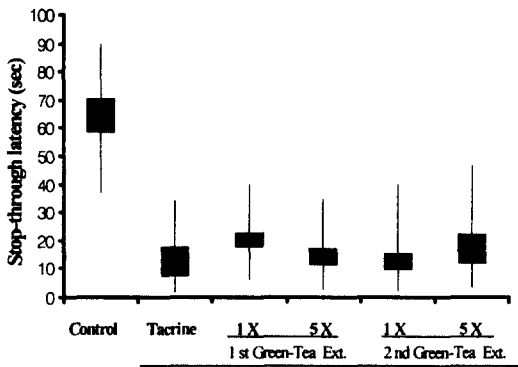


Fig. 3. Effects of green-tea extract on the scopolamine-induced impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 180 min after the injection of scopolamine (1 mg/kg) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training). Data represent means \pm S.E (N=40). Control, scopolamine (1 mg/kg i.p); scopolamine+Tacrine (10 mg/kg, p.o); scopolamine+1st green-tea extract(1X: 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o); scopolamine + 2nd green-tea extract (1X : 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o).

Stop-through latency; each time the animal enters an area, the entries counter for this area is incremented by one. Statistically significant value

compared with scopolamine only group (control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Fig. 3는 scopolamine을 처리 180분 후에 pool에서 platform으로 올라갈 때까지의 결과로 대조군이 64.6 \pm 5.9 (초)로 30분 후에 비하여 약 19.8% 감소되었지만, 대조약물인 Tacrine · HCl (10 mg/kg), 1번 綠茶추출물 (1st Green-Tea extract) 투여군의 1 X와 5 X, 그리고 2번 綠茶추출물 (2nd Green-Tea extract) 투여군의 1 X와 5 X은 30분 후에 측정된 결과와 비슷하였다.

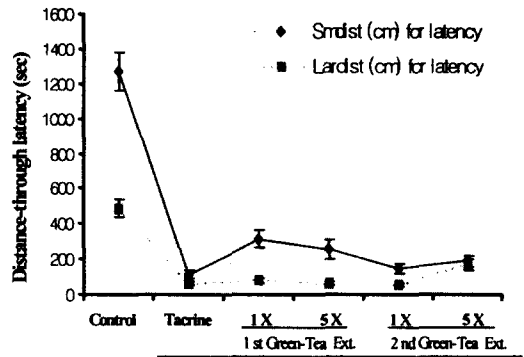


Fig. 4. Effects of green-tea extract on the scopolamine-induced impairment of learning and memory in the stop-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract or Tacrine.HCl and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-VIDEOTRACKING was initiated at 180min after the injection of scopolamine (1 mg/kg) and the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial (pre-training). Data represent means \pm S.E (N=40). Control, scopolamine (1 mg/kg i.p); scopolamine+Tacrine (10 mg/kg, p.o); scopolamine+ 1st green-tea extract(1X: 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o); scopolamine + 2nd green-tea extract (1X : 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o). lardist; this is the total distance (in cm)

covered by the animal in large movement, and smlldist; this is total distance covered by the animal in small movement. Statistically significant value compared with scopolamine only group (control) data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

또한 Fig. 4에서도 30분 후에 측정한 결과와 비슷하게 운동량이 대조군에 비하여 현저히 감소되었고, 생쥐가 수조에서 움직인 총 운동량 중에서 적은 운동량 (Smlldist)과 많은 운동량 (Lardist)의 비율은 대조군에 비하여 상대적으로 綠茶추출물 투여군에서 많은 운동량 (Lardist)의 비율이 감소됨을 알 수 있었다.

그러므로 綠茶추출물이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐에서 효과적인 아세틸콜린 분해를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

2) Acetylcholinesterase (AChE) 활성도 측정

생쥐에 scopolamine의 투여로 AChE가 증가하고 acetylcholine의 양이 급격히 감소하여 기억과 인식의 장애를 유발하는 건망증 생쥐가 되는 것으로 알려져 있다^{17),26),44)}. 본 연구 결과, table 3은 건망증 생쥐의 혈청중 AChE 활성도를 측정한 결과로 tacrine 투여군은 대조군 (100±2.4 %)에 비하여 33.2±3.3(%)로 약 67%의 유의성 있는 억제효과를 보였다 (p<0.001)(Fig. 5). 綠茶추출물 투여군은 대조군에 비하여 약 62%에서 33% 까지 AChE 활성도를 현저하게 억제하였고, 1x 투여군 보다는 5x 투여군이 더 효과가 있었고, 1번 綠茶추출물 보다는 2번綠茶 추출물이 5x 투여군에서 약 30%정도 더 효과가 있었다 (p<0.001)(Fig. 5). 이러한 결과는 綠茶추출물이 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐에서 효과적인 아세틸콜린 분해를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Inhibitory effect of green-tea extract on the acetylcholin-esterase (AChE) activity in scopolamine-induced amnesia mice.

Drugs	Animal No.	AChE activity (% control)
Control	10	100±2.3
Tacrine	10	33.2±3.3
1st GreenTea Extract	1x 10 5x 10	67.1±4.5 56.2±3.0
2nd GreenTea Extract	1x 10 5x 10	60.1±3.8 37.8±4.8

ICR mice were orally administered of green-tea extract or Tacrine. HCl and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The AChE activity was measured after the injection of scopolamine (1 mg/kg). Data represent means±S.E (N=10). Control, scopolamine (1 mg/kg i.p.); scopolamine + Tacrine (10 mg/kg, p.o); scopolamine+1st green-tea extract(1X: 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o); scopolamine + 2nd green-tea extract (1X : 40 mg/kg, 5X : 200 mg/kg, p.o). Statistically significant value compared with scopolamine only group (control) data by T test (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001).

2. 알짜이머유발 생쥐모델의 뇌세포에서 염증반응 사이토카인 발현에 대한 綠茶의 영향

1) 재조합 (CT105) 클론 및 세포독성 Alzheimer's disease에 나타나는 병리학적 소견인 신경섬유다발(Neurofibrillary tangles; NFTs)과 신경반(neuritic plaque)-노인반은 아밀로이드 베타 펩티드의 침착에 의하여 생겨나는데, 베타-아밀로이드 단백질(Aβ)은 APP의 비정상적인 공정과정으로 생성된다고 알려져 있다^{15),20)31),40)}. β-secretase나 1-secretase에 의해 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein: APP)의 일부가 잘라져서 베타-아밀로이드 단백질(Aβ)이 생성되는데, 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39-43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다²³⁾. Amyloid Cascade Hypothesis는 Aβ가 neuron을 손상시킨다는 것이

다. 최근에는 아밀로이드 전구단백질의 C말단 부위인 C단 단백질이 아밀로이드 베타 단백질(Aβ)보다 더 독성이 있다고 알려져 있다.

아밀로이드 베타단백질과 C단 단백질의 독성기전에 대해서는 활발한 연구가 진행되고 있는데 특히 활성산소(Reactive oxygen species)의 형성과 세포내 칼슘 항상성의 저해가 중요한 역할을 할 것으로 믿어지고 있다^{16),22)}. 본 연구에서 알짜이머 유발 동물을 만들기 위하여 재조합 CT105 단백질의 세포독성을 검증하기 위하여 흰쥐의 뇌세포인 PC-12 세포를 96 well plate에 분주하고, 재조합 CT105 단백질 농도를 80 μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 그리고 1 μM로 각각 처리하여 72 시간 배양 한 후에 SRB 방법을 약간 변형하여 세포독성을 측정하였다. (Fig. 5). 대조군의 세포생존율을 100±1.3 (%)라고 할 때, 재조합 CT105 처리군은 20 μM에서 83.1±2.7이었고, 40 μM에서 79.5±3.7이었다. 그리고 80 μM에서 40.0±1.4로 세포독성을 나타내었다 (p<0.001). 이러한 결과는 10 μM에서 92.4±3.4로 가장 낮은 농도를 설정하여 알짜이머 유발 농도로 사용하였다 (p<0.05).

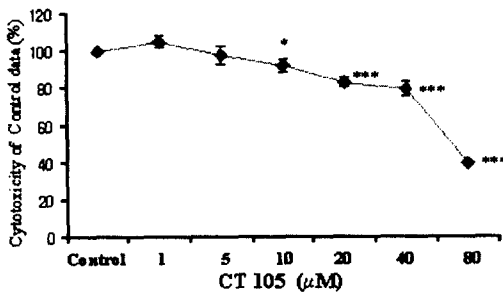


Fig. 5. Cytotoxicity of recombinant CT 105 in PC-12 cell line.

Rat pheochromocytoma cell line (PC-12) were pretreated with 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, and 80 mM of CT105 for 72 h. 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, ***p<0.001).

2) 알짜이머 유발 생쥐의 water maze분석

재조합 CT105를 생쥐의 hippocampus에 주입하여 2주 후 알짜이머 유발 모델을 만들고, 綠茶추출물을 경구투여한 후 videotracking으로 5분간 관찰하였다. Fig.6은 생쥐가 pool에서 platform으로 올라가는 시간을 분석한 것으로 대조군이 약 250±24.0(초)인데 반하여 綠茶추출물 (Green-Tea extract) 투여군은 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었다. 특히 2번綠茶 추출물 투여군은 약 100±15.2로 대조군에 비하여 60%의 기억력 감퇴 억제효과가 있었다. 그리고 Fig.7은 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량 (small movement; Smlldist)과 많은 운동량 (large movement; Lardist)을 분석한 결과이다. 본 연구 결과는 적은 운동량(Smlldist)은 platform에 올라가는 시간과 비례하였고, 많은 운동량(Lardist)은 반비례하는 것으로 관찰되어 알짜이머 유발 생쥐가 綠茶추출물 투여로 활발한 운동량 감소를 억제하는 것으로 사료된다.

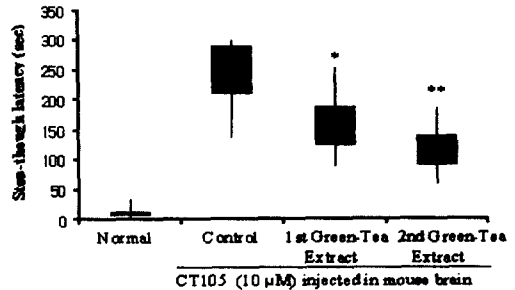


Fig. 6. Effects of a single administration green-tea extract on the spatial working memory deficits induced by CT105-alzheimer disease mouse model in the stop-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-videotracking was initiated, After with the exception of control and the groups were submitted during the

stereotaxic Procedures to CT105-induced alzheimer s disease model followed by the administration of 1st green-tea extract (200 mg/kg, p.o) and 2nd green-tea extract (200 mg/kg, p.o) for 14 days. Data represent means± S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

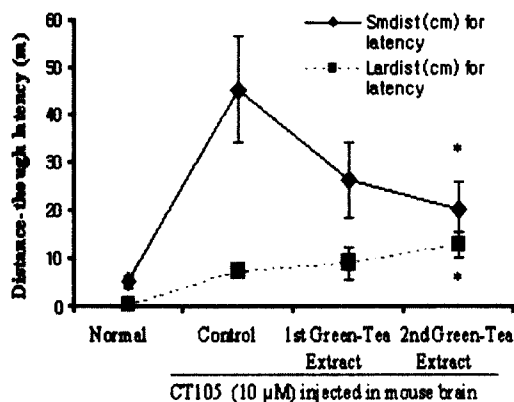


Fig. 7. Effects of a single administration green-tea extract on the spatial working memory deficits induced by CT105-alzheimer disease mouse model in the distance movement-through type Morris water maze test.

ICR mice were orally administered of green-tea extract and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The Stop-videotracking was initiated, After with the exception of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to CT105-induced alzheimer s disease model followed by the administration of 1st green-tea extract (200 mg/kg, p.o) and 2nd green-tea extract (200 mg/kg, p.o) for 14 days. Lardist; this is the total distance (in cm) covered by the animal in large movement, and smdist; this is total distance covered by the

animal in small movement. Data represent means ± S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3) 마이크로글리아 세포내 염증반응 사이토카인 분석

물리적 뇌손상, 감염 및 염증반응에 의한 자극이 가해지면, 이 두 신경교세포는 신경세포 및 회돌기 교 세포의 손상을 가하는 염증반응 사이토카인 (IL-1, IL-6, TNF-α)의 과잉생산을 초래하게 한다^{19),28),36)}. 현재까지 널리 알려진 마이크로글리아의 자극인자로서는 그람음성균의 세포벽 구성성분인 LPS 및 T 림프구에서 생성되는 IFN-γ이며 이들 자극인자에 의해 염증반응 사이토카인인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, TNF-α 등이 유도 발현된다⁴¹⁾. 뇌 손상시 제일 먼저 병변 부위에 나타나는 신경교세포는 마이크로글리아임을 감안할 때, 마이크로글리아는 정상세포의 주요자극인자인 IL-1β 및 TNF-α를 생성하는 세포로서 중추신경계의 염증반응을 개시하는 중요역할을 갖고 있다고 생각된다^{29),32)}. 본 연구에서는 알짜이머 유발 생쥐의 뇌를 적출하여 CD14 positive 세포를 분리한 후 세포내 염색법으로 IL-1β와 TNF-α의 생산량을 flow cytometry로 분석하였다. Fig.8와 Fig.9은 CD14 마이크로글리아 세포내 존재하는 염증유발 사이토카인인 IL-1β와 TNF-α를 관찰한 것으로 綠茶추출물 투여군이 대조군에 비하여 IL-1β와 TNF-α의 생산량을 현저히 억제하는 것으로 나타났다. 위의 결과는 뇌세포의 손상으로 활성화된 마이크로글리아 세포가 염증유발 사이토카인을 과잉 생산하여 초래되는 신경세포 사멸을 綠茶에 의하여 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

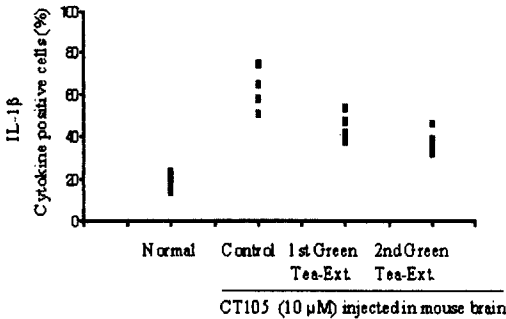


Fig. 8. Intracellular staining of interleukin-1b (IL- 1b) activity on the brain CD14+cells in CT105-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of green-tea extract.

ICR mice were orally administered of green-tea extract and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The intracellular staining were IL-1b activity measured, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to CT105-induced alzheimer s disease model followed by the administration of 1st green-tea extract (200 mg/kg, p.o) and 2nd green-tea extract (200 mg/kg, p.o) for 14 days.

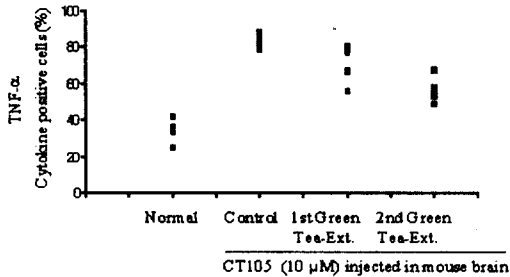


Fig. 9. Intracellular staining of tumor necrosis factor-a (TNF-a) activity on the brain CD14+cells in CT105-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of green-tea extract.

ICR mice were orally administered of green-tea extract and the acquisition training trial continued once a day for 14 days. The intracellular staining were TNF-a activity measured, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to CT105-induced alzheimer s disease model followed by the administration of 1st green-tea extract (200 mg/kg, p.o) and 2nd green-tea extract (200 mg/kg, p.o) for 14 days.

4) 세포내 reactive oxygen species (ROS)의 분석
 중추신경계의 염증반응은 일련의 단계로 진행되는 바, 외부자극인자들에 의하여 활성화된 마이크로글리아는 IL-1β 및 TNF-α를 생산하며, 이들 염증반응 사이토카인들은 정상세포를 활성화시켜 이산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하고 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 일종인 peroxynitrite(ONOO)으로 유도되어 신경세포사를 야기시킨다고 알려져 있다(35). 본 연구에서는 Fig.10에서 보는 것 처럼 정상군에 비하여 CT105를 주입한 알짜이며 유발 생쥐인 대조군에서 ROS 생산이 크게 증가된 것을 알 수 있고, 1번 綠茶추출물과 2번 綠茶추출물의 투여군에서 현저한 ROS 감소를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 綠茶에 의한 뇌손상 억제와 보호효과를 예측할 수 있다.

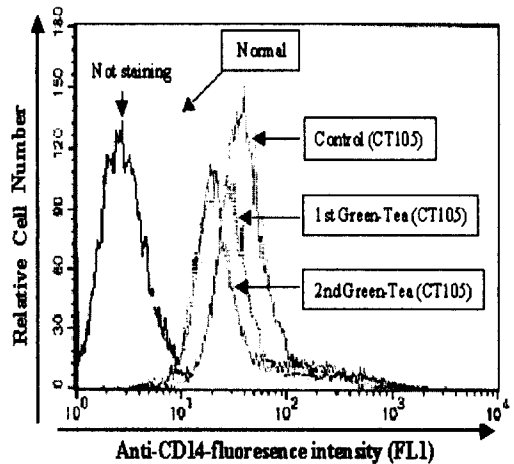


Fig. 10. Inhibitory effect of green-tea extract on the ROS production in CT105-alzheimer disease mouse model with or without by the administration of green-tea extract .

The ROS were measured, number of CD14 positive cells in the mouse brain of control and the groups were submitted during the stereotaxic procedures to CT105-induced alzheimer s disease model followed by the administration of 1st green-tea extract (200 mg/kg, p.o) and 2nd green-tea extract (200 mg/kg, p.o) for 14 days. After 5 min cultured, DCFH-DA reagent (50 mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS producrion by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

參 考 文 獻

1. Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. 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 Oct 1;149(7):2358-66.
2. Alzheimer's Disease Collaboratory Group, The structure of the presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genetics* 11, 219~222.35, 1995.
3. Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK : Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 128:126-128. 1991
4. Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK(1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 128:126-128.
5. Arribas J, Massague J (1995) Transforming growth factor- α and β -amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J Cell Biol* 128:433-441.
6. Baddeley A. D., Bressi S., Sala S, D., Logie R., and Soinnler H. (1991) THE decline of working memeory in Alzheimer's disease. *Brain* 114, 2521-2542.
7. Bierer L. M., Haroutunian V., Gabriel S., Knott P. J., Carlin L. S.,Purohit D. P., Perl D., Dchmeidler J., Kanof P., and Davis K.L. (1995) Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits.*J. Neurochem.* 64,749-760.
8. Borchelt DR, Thinakaren G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS(1996) Familial Alzheimer's diease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
9. Brambilla, A., A. Ghiorzi, N. Pitsicas, and F. Borsini. : DAU 6215, a novel 5-HT sub(3)-receptor antagonist, selectively antagonizes scopolamine-induced deficit in a passive-avoidance task, but not scopolamine-induced hypermotility in rats. *Pharm. Pharmacol.* 45: 841~843, 1993.
10. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB, Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na⁺/Ca²⁺ gradients. *Neuroreport* 2000 Oct 20;11(15):3357-60
11. Buxbaum JD, Greengard P(1996) Regulation of APP processing by intra-and

- intercellular signals, *Ann NY Acad Sci* 777:327-331.
12. Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P(1992) Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3055-3059.
 13. Da Cruz E, Silva OAB, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Greenbard P(1993) Regulated cleavage of Alzheimer β -amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail, *Neuroscience* 57:873-877.
 14. Diez M, Koistinaho J, Kahn K, Games D, Hokfelt T, Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein-initial observations. *Neuroscience* 2000;100(2):259-86.
 15. Echoers MRW, Riorcon JF(1991) Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 30:10065-10074.
 16. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E, Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol* 1982 Dec;129(6):2413-9.
 17. 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 diseases. *Eur J Immunol* 1989 Apr;19(4):689-94
 18. Fukuyama R, Chandrasekaran K, Rapoport SI : Nerve growth factor induced neuronal differentiation is accompanied by differentiated induction and localization of the amyloid precursor protein(APP) in PC12 cells and variant PC12S cells. *Mol Brain Res* 17:17-22. 1993
 19. Fukuyama R, Chandrasekaran K, Rapoport SI(1993) Nerve growth factor induced neuronal differentiation is accompanied by differentiated induction and localization of the amyloid precursor protein(APP) in PC12 cells and variant PC12S cells. *Mol Brain Res* 17:17-22.
 20. Gomez-Isla T., Price J. L., McKeel D. W. Jr. Morris J.C., Growdon J.H., and Hyman B.T. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491-4500.
 21. Gridley KE, Green PS, Simpkins JW, Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res* 1997 Dec 5;778(1):158-65.
 22. Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 2000 Jul;75(1):314-20.
 23. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992) Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.
 24. Hartell NA, Suh YH. Peptide fragments of beta-amyloid precursor protein: effects on parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum. *J Neurochem* 2000 Mar;74(3):1112-21.

25. Hung AY, haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdon JH, Selkoe D (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β -protein. *J Biol Chem* 268:22959-22962.
26. Ida M, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996) Analysis of heterogeneous β a4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271:22908-22914.
27. Kim HJ, Suh YH, Lee MH, Ryu PD, Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein. *Neuroreport* 1999 May 14;10(7):1427-31
28. Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH, Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J* 2000 Aug;14(11):1508-17
29. Lee JP, Chang KA, Kim HS, Kim SS, Jeong SJ, Suh YH, APP carboxyl-terminal fragment without or with abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res* 2000 May 15;60(4):565-70
30. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguche H, Ruiz A, Maritnez A, Maritnez A, Madrigal L, Hincapie L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC (1996) the E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A β 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2:1146-1150.
31. Levisohn L. F. and Osacson O.(1991) Excitotoxic lesions of the ratenorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res*, 565,230-244.
32. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L (1997) Cellular signaling roles of TGF β , TNF α and β APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 23:47-61.
33. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD, Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem* 1999 Aug;73(2):532-7
34. Meltzer, H. Y., B. L. Chai, P. A. Thompson, and B. K. Yamamoto. : Effect of scopolomine on the efflus of dopamine and its metabolites after clozapine, haloperidol or thioridazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1452~1461, 1994.
35. Pandiella A, Massague J (1991) Multiple signals activate cleavage of membrane transforming growth factor- α precursor, *J Biol Chem* 266:5796-5773.
36. Park C. H., Kim S. H.,Choi W., Lee Y.J., Kang S. S., Kim J. S., and Suh Y.H.(1996) Novel anticholinesterase and antiamnesic activities of dehydroevodiamine HCL, A constituent of *Evodia rutaecarpa*, *Planta Medica* 62, 405-409.
37. Refolo LM, Salton SR, Anderson JP, Mehta P, Robakis NK (1989) Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzhiemer amyoid precursor form PC12 cell cultures, *Biochem Biophys*

- Res Commun 164:664-670.
38. Rogers R. L., Meyer J. S., Mortel K. F., Mahurin R. K., and Judd B. W.(1986) Decreased cerebral blood flow precedes multi- infarct dementia, but follows senile dementia of Alzheimer type. *Neurology* 36, 1-6.
39. Song DK, Won MH, Jung JS, Lee JC, Kang TC, Suh HW, Huh SO, Paek SH, Kim YH, Kim SH, Suh YH. Behavioral and neuropathologic changes induced by central injection of carboxyl-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein in mice. *J Neurochem* 1998 Aug;71(2):875-8.
40. Stratton SR, Worley PF, Litz JS, Parsons SJ, Haganir RL, Baraban JM(1991) Electroconvulsive treatment induces a rapid and transient increase in tyrosine phosphorylation of a 40-kilodalton protein associated with micro tubule-associated protein 2 kinase activity. *J Neurochem* 56:147-152.
41. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V, Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Jul;294(1):187-94.
42. Whitehouse P. J., Price D. L., Struble R. G., Clark R. W., Coyle J. T., and DeLong M.R.(1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237-1239.
43. Wolf BA, Wertkin AM, Jolly YC, Yasuda RP, Wolfe BB, Konrad RJ, Manning D, Ravi S, Williamson JR, Lee VM-Y(1995) Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid β -protein production in human neuronal NT2N cells. *J Biol Chem* 270:4916-4922.
44. Zhang HY, and Tang XC, Huperzine B, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2000 Sep 29;292(1):41-4.