

## 녹차추출물/L-Theanine 혼합물의 Secretase 활성 억제 및 세포사 억제를 통한 기억력 회복능

김태일 · 육동연 · 박상기\* · 박형국\* · 윤여경\* · 홍진태#

충북대학교 약학대학, \*LG 생활건강 기술연구원  
(Received July 25, 2008; Revised September 17, 2008)

### Improvement of Memory Impairment of Green Tea Extract/L-Theanine Through Inhibition of Secretase Activity and Cell Death *In Vivo*

Tae Il Kim, Dong Yeon Yuk, Sang Ki Park\*, Hyoung Kook Park\*, Yeo Kyeong Yoon\* and Jin Tae Hong#

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
\*LG Household and Health Care Research Park, Daejeon 305-343, Korea

**Abstract** — We examined the effect of green tea extract (GTE) and L-theanine combination on the  $A\beta_{1-42}$ -induced memory dysfunction. GTE and combination were administrated into mice for 3 weeks followed by injection of  $A\beta_{1-42}$  to induce memory impairment. GTE and L-theanine administration significantly improved cognitive ability and reduced  $A\beta_{1-42}$  level accompanied with the inhibition of neuronal cell death and activities of secretase. These results suggest that GTE and L-theanine combination may be a useful for preventing for the development or progression of Alzheimer's disease.

**Keywords** □ green tea extract, L-theanine, Alzheimer's disease, memory, secretase, amyloid beta, cell death

치매(dementia)는 라틴어인 dementatus에서 유래되었으며 원래의 뜻은 out of mind, 즉 제정신이 아님을 의미한다. 현재 정신의학에서 말하는 치매는 정신박약이 아닌 사람이 의식이 청명한 상태에서 통상적인 사회생활이나 대인관계에 장애를 초래할 정도로 기억을 비롯한 여러 인지기능의 장애가 있는 상태를 말한다.<sup>1-3)</sup> 치매에서 영향을 받는 인지기능은 일반지능, 학습능력과 기억력, 언어기능, 문제해결능력, 지남력(시간, 장소, 사람에 대한 구별 능력), 주의와 집중, 판단력 그리고 사회적 능력이다. 그와 더불어, 환자의 인격 또한 영향을 받게 된다. 따라서 치매는 하나의 질병이 아니라 여러 원인에 의해 나타날 수 있는 증후군으로 볼 수 있다. 결국 치매란 뇌의 기질적 병변으로 인해 후천적으로 발생하는 지적 능력을 포함한 정신기능의 쇠퇴를 뜻하며, 이는 만성이고 대부분 비가역적이다.

현재까지 해외의 연구자들이 밝혀온 치매와 관련되어 나타나는 병리학적 소견으로는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)

와 신경반(neuritic plaque)이 있다.<sup>4)</sup> 신경섬유 덩어리와 신경반은 아밀로이드 베타 펩티드( $A\beta$ ; 아밀로이드 베타)의 침착에 의하여 생겨난다. 아밀로이드 베타는 큰 분자량의 아밀로이드 전구단백질(Amyloid Precursor Protein: APP)의 일부가 잘라져서 생겨나는데 소수성 아미노산 잔기가 대부분인 39~43개의 아미노산으로 구성되어 있어 스스로 응집하는 성질을 가지고 있다.<sup>5)</sup> 최근에 가족성 알츠하이머병을 일으키는 유전자로 꼽히고 있는 presenilin 1(PS1)과 presenilin 2(PS2)는 각각 14번과 1번 염색체에 존재하는데, 이 유전자의 다양한 돌연변이가 조발성(early-onset) 가족성 알츠하이머병의 70% 이상에서 원인으로 작용하는 것으로 보고되고 있는데 이 유전적 원인도 과도한 아밀로이드의 침착의 결과라고 여겨진다.<sup>6)</sup> 따라서 아밀로이드 베타 플라그( $A\beta_{1-42}$  plaques)의 형성을 억제할 수 있는 물질의 개발은 치매치료제로서의 가능성이 높으며 현재 선진국에서 이 분야의 연구에 집중하고 있다.

대부분의 국내연구는 치매의 생물학적 원인 규명 등에 국한되어 있고 치매치료제의 개발에 관한 연구는 아세틸콜린 분해효소 활성억제제(acetylcholinesterase inhibitor)에 관한 연구가 대부분인 상황이다. 그러나 아세틸콜린 분해 효소 활성 억제제는 진

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2813 (팩스) 043-268-2732  
(E-mail) jinthong@chungbuk.ac.kr

정한 의미의 치매 치료제라기 보다는 치매 증상의 완화에 목적을 두고 있고, 또한 간독성, 소화기계 부작용 등이 크며 무엇보다 효과에 대한 확신이 임상에서 인정받지 못하고 있다. 때문에 알츠하이머병을 치료하는데 가장 유망한 접근법인 알츠하이머병 환자의 두뇌에서 특징적으로 나타나는 아밀로이드 베타 플라그의 생성을 억제할 수 있는 물질의 개발이 절실한 상황이다. 최근의 연구 결과는 아밀로이드 베타 화이브릴이 치료를 위한 새로운 표적으로 떠오르게 되었다.<sup>7-9)</sup>

이로 미루어, 천연에서 유래된 물질로 부작용들이 적으며, 아세틸콜린 분해효소 활성억제 효과가 있으며, 아밀로이드 생성을 억제하거나 이에 의한 신경세포사를 억제하는 물질이라면 기억력 개선물질로 바람직한 물질로 판단된다. 따라서 본 연구진에서는 최근 신경보호 효과 및 아세틸콜린 억제효과와 베타 secretase 효소 억제 효과로 인지기능 개선 효과가 알려졌으며,<sup>10,11)</sup> 널리 기호식품으로 애용되어 안전성이 높은 식품 중 하나인 녹차를 선정하였다. 그리고 본 연구진에서 이전 연구에서 아세틸콜린 분해효소 활성억제효과가 있다고 밝힌<sup>12)</sup> 녹차의 구성요소 중 하나인 L-theanine 을 혼합하여 사용할 경우 서로 다른 기전이 서로 상가 또는 상승효과를 일으킬 수 있는 장점이 있을 것으로 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 녹차 추출물과 L-theanine 복합물에 대하여 기억력 개선 효과를 알아보기 위하여 실시하였다. 치매의 원인으로 판단되는 아밀로이드를 마우스 뇌에 직접 주입하여 이 복합물의 인지기능 개선 효과 및 아밀로이드 베타 형성에 관련된 단백질 발현에 대한 억제 효과가 있는지 평가하였다. 또한, 아밀로이드 베타 1-42가 생성되는 과정에 관여하는 효소인 secretase (beta and gamma)의 효소 활성에 미치는 영향을 평가하였으며, 뇌에서 아밀로이드 베타 1-42의 생성 역시 감소시키고 신경 세포 손상을 경감시켜 인지기능 개선 효과가 있는지를 연구하였다.

**실험 방법**

**실험동물 및 시료**

생후 8주된 수컷 ICR 마우스를 중앙실험동물(주)로부터 구입하여, 1주간 순화시키면서 일반증상을 관찰하였고, 체중을 측정하여 건강한 것 만을 선별하여 사용하였다. 실험동물은 충북대

학교 실험동물연구지원센터에서 GLP 수준의 관리기준에 따라 수용하고, 관리, 투여, 실험을 실시하였다. 물과 실험동물용 사료는 자유로이 섭취하도록 하였고, 약물을 물에 녹여 투여하기 위해 1일 평균 물 섭취량을 측정하였다. 본 실험에 사용한 녹차추출물 및 L-theanine(Taiyo Kagaku, Japan)은 (주)LG생활건강으로부터 제공받아 사용하였다.

**녹차추출물/L-theanine 병용 투여**

실험동물은 평균 체중과 분산이 균질하도록 대조군(정상군), 아밀로이드 베타 투여군, 그리고 아밀로이드 베타와 녹차추출물을 함께 투여한 시험군(12 mg/kg 군, 24 mg/kg 군) 및 아밀로이드 베타와 녹차추출물/L-theanine 복합물을 함께 투여한 시험군(녹차추출물 24 mg/kg+L-theanine 2 mg/kg 군, 녹차추출물 24 mg/kg+L-theanine 4 mg/kg 군)의 총 6개 군으로 10마리씩 나누어 실험을 실시하였다(표 I 참고). 시험물질인 녹차추출물/L-theanine 복합물은 mouse의 1일 물 섭취량을 고려하여 음용수에 녹여 3주간 투여하였다. 마우스를 자극할만한 요인을 없애고 같은 조건 내에 사육하였다.

**아밀로이드 베타 1-42의 주입**

Ketamine hydrochloride/xylazine hydrochloride로 마취한 다음, stereotaxic instrument(Stoelting, IL, USA)를 이용하여 bregma로부터 뒤쪽으로 1.0 mm, 왼쪽으로 1.0 mm, 2.5 mm 깊이의 측뇌실로 아밀로이드 베타 1-42(BACHEM, Germany)를 주입하였다. 아밀로이드 베타 1-42는 투여 4일전에 PBS에 녹여 37°C에서 보관하여 응집을 유도한 후, 2 Mg/mouse의 농도로 1 µl/min의 속도로 3 µl를 주입한 다음, 잘 흡수되도록 주사기 바늘을 빼지 않고 1분간 유지하였다. 행동 실험은 아밀로이드 베타 1-42 투여 후, 3일 후에 실시되었다.

**수동회피시험(Passive avoidance test)**

마우스의 기억능을 측정하기 위하여 step through 장치(Med associated Inc., VT, USA)를 사용하였다. 한쪽은 밝고 한쪽은 어두운 부분으로 연결된 상자(4×13×10 cm)로 바닥은 7 mm 간격으로 grid가 설치되어 있으며 어두운 상자 부분에는 전류가 흐르게 되어 있다. 마우스를 밝은 부분에 놓으면 마우스의 어두운

표 I - 녹차추출물 및 L-theanine 투여 인지기능 개선 시험군의 구성, 투여 농도 및 용량

군	성별	동물수	동물 ID	Amyloid beta 농도 (mg/mouse)	녹차추출물 농도 (mg/kg)	Theanine 농도 (mg/kg)
Vehicle(정상군)	Male	10	1~10	0	0	0
Amyloid beta (Aβ)	Male	10	11~20	2	0	0
Aβ+ 녹차추출물(저농도)	Male	10	21~30	2	12	0
Aβ+ 녹차추출물(고농도)	Male	10	31~40	2	24	0
Aβ+ 복합물(저농도)	Male	10	41~50	2	24	2
Aβ+ 복합물(고농도)	Male	10	50~60	2	24	4

부분으로 가려는 성질로 인하여 어두운 곳으로 옮겨가는데 이때 전류를 2초간 0.4 mA로 흐르게 하여 mouse가 다시 밝은 곳으로 옮겨가게 고안되었다. 24시간 후에 마우스를 위와 같은 상자 중 밝은 곳에 놓으면 전날의 전기쇼크로 인하여 상자의 검은 부분으로 들어가지 않게 된다. 이때 밝은 부분에 체류하는 시간(최대 180초, cut off time)을 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다.

#### 수중미로시험(Water maze test)

빛이 물에 비치지 않게 사방에 칸막이를 설치하고 원형 물탱크(지름 100 cm, 높이 35 cm)에 온도 22~25°C의 물을 표식통 위 1 cm 정도까지 채우고 식용색소를 넣어 바닥이 비치지 않게 만든다. 물탱크의 특정한 곳에 표식통(지름 4.5 cm, 높이 14.5 cm)을 위치시키고, 마우스를 입수 시켜 살아 남기 위해 헤엄쳐 표식통을 찾아가게 고안되었다. 마우스가 입수 후 표식통을 찾아 갈 때까지 소요되는 시간, 거리, 속도를 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다. 녹차추출물/L-theanine을 3주간 투여하며 training trial(물에 입수하여 표식통을 찾아가는 능력)을 시행하였다. Training 이후 아밀로이드 베타를 투여하고 3일 후 마우스의 기억력을 측정하기 위하여 수중미로장치를 이용하여 마우스가 표식통에 도달한 체제시간과 거리, 속도를 측정했다. Test trial은 총 6일간 1일 1회씩 총 6회 시행하였다.

#### 뇌 적출 및 보관

행동약리 실험 후 마우스를 chloroform으로 마취시킨 후 PBS로 perfusion하여 혈액을 제거하였다. Brain을 적출 후 -20°C에서 얼린 후 대뇌피질(cortex)과 해마(hippocampus)로 분리하여 extraction buffer를 50~100  $\mu$ l를 넣어 균질화시킨 후 최종 부피가 1 ml이 되도록 extraction buffer를 가해 잘 vortex한 뒤 2시간 동안 4°C에서 lysis시켰다. 여기에 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 3분씩 5번 동안 vortex 하고 4°C 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상정액을 취하였다.

#### Secretase 활성 분석

마우스 뇌의 대뇌피질(cortex)과 해마(hippocampus)에서  $\alpha$ (또는  $\beta$ ,  $\gamma$ )-secretase 활성도를 측정하기 위하여,  $\alpha$ (또는  $\beta$ ,  $\gamma$ )-secretase activity kit(R&D systems, Wiesbaden, Germany)를 이용하였다. Black 96-microwell plate에 50  $\mu$ l의 조직 sample lysate를 넣고 50  $\mu$ l의 reaction buffer와 섞은 후, reporter로써 EDANS/DABCYL가 접합된 기질 5  $\mu$ l를 첨가하여 조심히 섞어준 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. Reporter인 EDANS/DABCYL은  $\alpha$ (또는  $\beta$ ,  $\gamma$ )-secretase에 의해 잘려져 형광을 나타내게 되고, 형광분광계를 이용하여 Ex/Em 355/510 nm 파장으로 형광강도를 측정하였다.  $\alpha$ (또는  $\beta$ ,  $\gamma$ )-secretase 활성도는

fluorometric reaction으로 fluorescence unit 단위를 사용하여 나타냈다.

#### 아밀로이드 베타 1-42의 정량

아밀로이드 베타 1-42의 정량은 Amyloid beta 1-42 assay kit (Immuno- Biological Laboratories Co., Ltd., Japan)을 이용하여 실시하였다. 간략히 설명하면, 뇌를 대뇌피질과 해마로 나누어 얻은 단백질 추출물 100  $\mu$ l를 코팅된 96-well microplate에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 washing buffer로 세척한 후, 표지된 항체 용액을 넣고 4°C에서 1시간 동안 어두운 곳에서 반응시켰다. 다시 세척 후, chromogen을 첨가하고 실온에서 30분 동안 어두운 곳에서 반응시켰다. 그리고 나서 stop 용액을 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 조직처리 및 아밀로이드 축적, 세포사 염색 방법

마우스를 에테르로 마취 후 고정액인 4% paraformaldehyde로 심장 내 관류를 하였다. 그 후 뇌를 적출하여 고정액에 하루 동안 고정 후 cryptoprotection을 위하여 30% sucrose 용액에 48시간 고정을 하였다. 고정이 끝난 조직은 Optimal Cutting Temperature(OCT) compound로 -70°C에서 얼린 후 microtome을 이용하여 40  $\mu$ m의 두께로 조직을 잘랐다. 그 후 DAB 법 염색을 위해 조직을 0.01 M PBS를 이용하여 5분씩 3번 수세 후, endogenous peroxidase를 blocking 하기 위하여 3% hydrogen peroxide으로 15분간 반응시키고 수세를 하였다. 그 후 10% BSA로 상온에서 한 시간 blocking 하였다. Blocking solution을 제거한 후 0.01 M PBS로 희석한 항 아밀로이드 베타 1-42 (1:100 dilution, Covance, USA)로 4°C에서 하룻동안 반응시켰다. 희석된 항체를 제거하고, biotinylated goat anti-rabbit IgG으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, avidin-conjugated peroxidase complex(ABC kit, 1:200 dilution, Vector Laboratories)로 30분간 반응시켰다. 수세 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.02%)로 발색을 시켰다.

그리고 세포사 측정을 위하여 TUNEL assay를 실시하였다. 간략히 설명하면 조직을 4% paraformaldehyde 용액으로 15~25°C에서 20분간 고정한 후 PBS 용액으로 30분간 세척하였다. Permeabilisation solution(0.1% Triton X-100, 0.1% Sodium citrate)으로 2~8°C에서 2분간 incubation한 후 Enzyme solution (vial 1) 50  $\mu$ l을 450  $\mu$ l(Label solution)에 넣어 총 부피가 500  $\mu$ l가 되게 섞어 각 조직절편에 적당량 분배하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 DAPI(4, 2-diamino-2-phenylindole)염색시약으로 15분간 반응시켜서 봉입하였다.

#### 통계

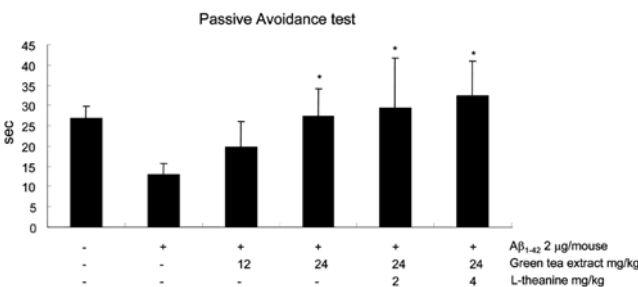
연구 결과치는 one-way ANOVA로 분석하여 군별 유의성

여부를 판결하고 그 결과 군간 유의성은 Dunnett's test로 분석하였다. \*P<0.05, \*\*p<0.01로 유의적 차이를 나타내었다.

**실험 결과**

**수동회피실험에서 아밀로이드 베타로 유도된 기억력 상실에 대한 녹차추출물/L-theanine 혼합물의 기억력 회복능 효과**

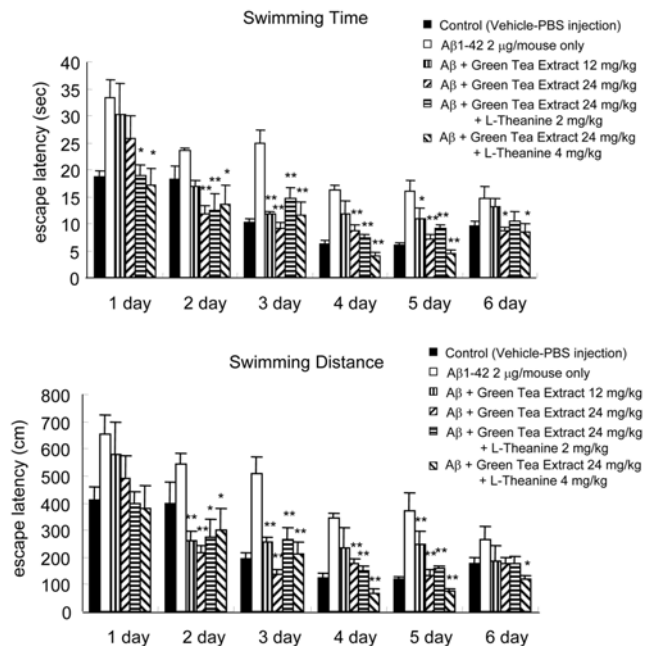
아밀로이드 베타에 의한 기억능 저하와 녹차추출물/L-theanine의 보호효과를 관찰하기 위해 아밀로이드 베타 1-42 투여 3일 후 마우스를 step through 장치에 넣고 어두운 상자로 들어가면 전기쇼크를 준 후 다음 날 밝은 상자에서 어두운 상자로 들어가기까지 걸리는 시간을 측정하여 기억능 정도를 측정하였다. 대조군은 전날에 받은 전기쇼크를 기억해 어두운 상자로 들어가는 시간(26.8±3.0 sec)이 training 때보다 현저히 증가하였으나, 아밀로이드 베타 1-42 투여군은 밝은 상자에 머무른 시간(13.0±2.7 sec)이 현저히 떨어져 기억력 손상이 유발되었음을 확인할 수 있었고, 이에 대해 녹차 추출물(12, 24 mg/kg)을 투여한 군은 체재시간(19.7±6.2, 27.4±6.8 sec)이 용량 의존적으로 증가하여 아밀로이드 베타로 유도된 기억력 손상에 대하여 개선효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, L-theanine(2, 4 mg/kg)과 혼합 처리군에서도 녹차추출물만 투여한 군보다 더 높은 기억력 회복 효과(29.3±12.2, 32.5±8.6 sec)를 나타내어 기억력 손상에 대한 개선효과가 있음을 확인할 수 있었고 혼합물에 대한 효과가 녹차추출물을 단독으로 처리하였을 때 보다 저농도에서 6%(1.9 sec), 고농도에서 약 18%(5.1 sec) 씩 증가하였다 (Fig. 1).



**Fig. 1** – Improving effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on Aβ<sub>1-42</sub>-induced memory impairment using step through type passive avoidance performance test. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks. The passive avoidance performance test was then performed after 3 days of injection Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment. Mice were given electric shock when entered dark room in training trial. After 24 hr of the trial, the retention time was recorded. Each value represents mean±S.E.

**수중미로시험에서 아밀로이드 베타로 유도된 기억력 상실에 대한 녹차추출물/L-theanine 혼합물의 기억력 회복능 효과**

아밀로이드 베타에 의한 인지능 저하와 녹차추출물/L-theanine의 보호효과를 관찰하기 위해 아밀로이드 베타 1-42 투여 전 미리 training이 된 마우스를 아밀로이드 베타 1-42 투여 3일 후 1일 1회씩 6일간 측정을 하여 관찰하였다. 거의 모든 군들은 시간이 경과함에 따라 목표를 찾는 시간 및 거리가 줄어드나, 아밀로이드 베타 1-42 투여 군은 3회 시행까지 다른 군에 비해 시간 및 거리가 줄어드는 정도에서 현저한 차이를 보여 인지능 감소 현상이 나타났음을 확인할 수 있었다. 첫째 날 측정 시 대조군은 목표물을 찾아가는데 평균 시간 18.5±1.2 sec, 이동거리 413.0±44.7 cm를 기록하였으나, 아밀로이드 베타 투여군은 평균 시간 33±3.4 sec, 이동거리 653±71.1 cm를 기록하여 현저한 차이를 나타내었다. 이에 대하여 녹차 추출물 투여군(30.3±5.7 sec, 580.1±116.2 cm and 25.7±4.2 sec, 492.5±81.1 cm) 및 혼합물 투여군(18.8±2.1 sec, 395.9±44.9 cm and 17.1±3.1 sec, 379.9±82.4 cm)은 아밀로이드 베타 투여 군에 비해 녹차 추출물은 고농도에서 37%, 혼합물은 고농도에서 50% 정도로 농도 의존적으로 감

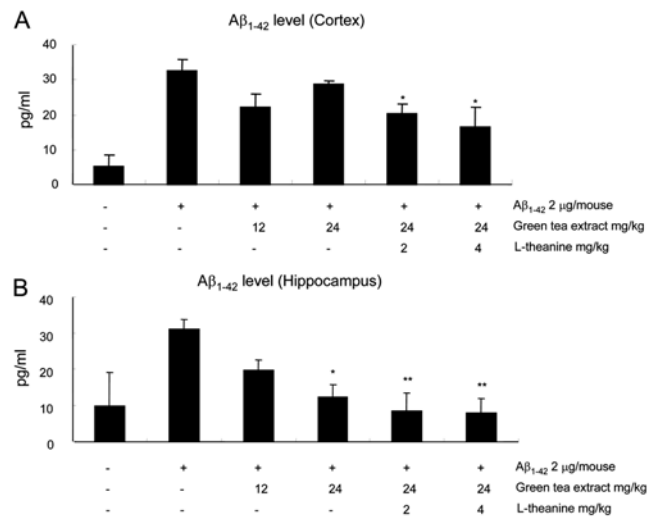


**Fig. 2** – Improving effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on Aβ<sub>1-42</sub>-induced memory impairment using water maze test. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks. Mice were given training 3 times a day for 3 days. The maze test was then performed 1 times a day for 6 days after 3 days of injection Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment. The latency time and distance were recorded. Each value represents mean±S.E. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 indicate significantly different from Aβ<sub>1-42</sub> treated control.

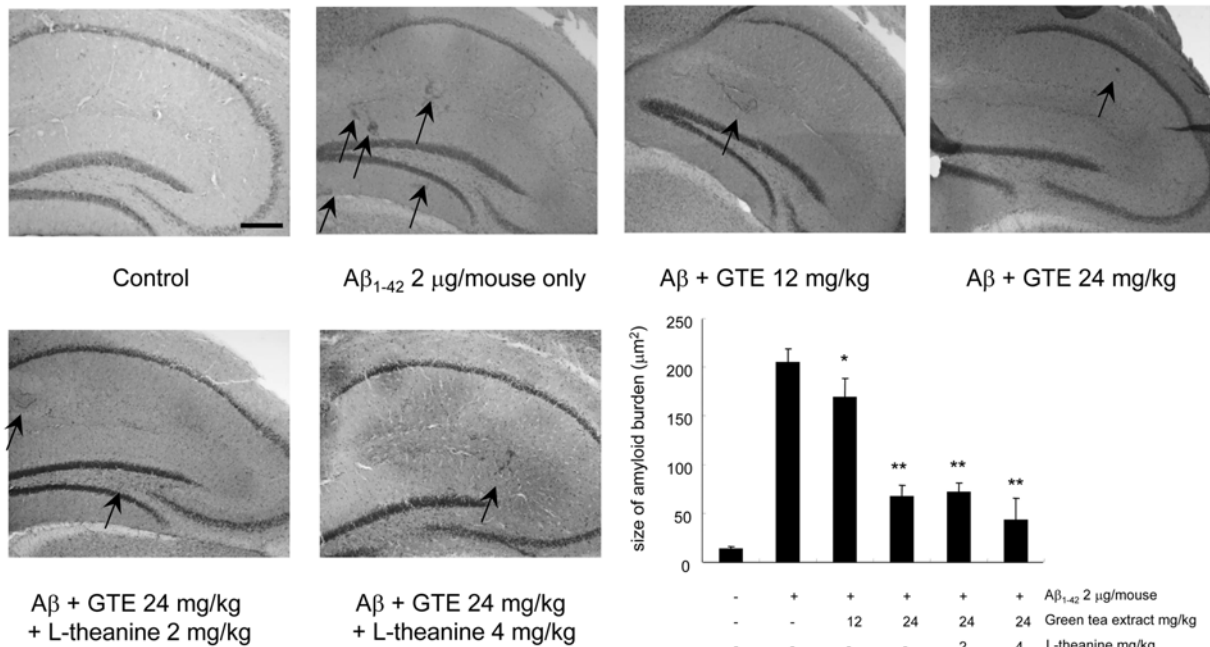
소하는 경향을 나타내었다. 날짜가 경과함에 따라 약간의 변화는 있지만 비슷한 패턴을 유지하며 전체적인 수치가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으며, 4일 째에서는 대조군  $6.2 \pm 0.7$  sec,  $125.5 \pm 13.7$  cm, 아밀로이드 베타 투여군  $16.3 \pm 0.9$  sec,  $345.9 \pm 16.0$  cm 으로 나타났으며 녹차 추출물 투여군은 저농도  $11.7 \pm 2.5$  sec,  $236.3 \pm 71.9$  cm, 고농도  $8.6 \pm 1.2$  sec,  $175.5 \pm 20.6$  cm 그리고 복합물은 저농도  $7.3 \pm 0.6$  sec,  $149.3 \pm 16.9$  cm, 고농도  $4.0 \pm 0.8$  sec,  $68.2 \pm 15.5$  cm으로 역시 농도 의존적으로 목표물을 찾는 시간과 거리가 차이가 나타났다. 하지만, 속력은 군별로 차이가 나지 않아(제시하지 않음), 목표물을 찾는 데 걸리는 시간은 속력이 아닌 공간 기억력에 의지하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

**아밀로이드 베타로 유도된 아밀로이드 베타 축적에 대한 녹차추출물/L-theanine의 억제능 효과**

녹차추출물/L-theanine의 인지능 억제 효과의 아밀로이드 단백질 발현량의 변화와 관련이 된 것인지를 확인하기 위하여 마우스의 뇌를 적출하여, 피질(cortex)과 해마(hippocampus)로 나눈 후, 아밀로이드 베타 1-42 정량 키트(Immuno-Biological Co., Ltd., Japan)를 이용하여 뇌 중 아밀로이드 베타 1-42의 양을 정량하였다. 아밀로이드 베타 및 시료를 처리하지 않은 음성대조군과 녹차추출물만을 투여한 군 및 L-theanine 혼합물 투여군과



**Fig. 3** – Inhibitory effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on Aβ<sub>1-42</sub>-induced Aβ<sub>1-42</sub> level in cortex and hippocampus in mice. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks and injected Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment and then Aβ<sub>1-42</sub> level was measured in each brain region. Each value represents mean ± S.E. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 indicate significantly different from Aβ<sub>1-42</sub> treated control.



**Fig. 4** – Inhibitory effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on Aβ<sub>1-42</sub>-induced Aβ<sub>1-42</sub> accumulation in hippocampus in mice. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks and injected Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment and then immunostaining was done. The each panel representatives each 6 group. Arrow indicated Aβ<sub>1-42</sub>. Scale bar: 200 μm. For quantification, size of amyloid burdens was analyzed by using image analyzer (randomly selected three mouse of each group). Each value represents mean ± S.E. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 indicate significantly different from Aβ<sub>1-42</sub> treated control.

의 비교에서 차이가 나타났다. 아밀로이드 베타 1-42의 투여로 인해 증가한 아밀로이드 베타 1-42의 생성은 녹차추출물 및 L-theanine과의 혼합물의 투여로 인해 감소하였다(Fig. 3).

실제 뇌 신경 조직에서 아밀로이드 베타의 축적을 확인하기 위하여 마우스의 뇌를 적출하여 마찬가지로 피질과 해마로 나눈 후, immunohistochemistry 방법을 이용하여 확인한 결과, 아밀로이드 베타의 축적 정도가 시료를 처리하지 않은 음성대조군과 녹차추출물만을 투여한 군 및 L-theanine 혼합물과의 비교에서 아밀로이드 베타 1-42의 투여로 인해 증가한 아밀로이드 베타 1-42의 생성 및 축적이 녹차추출물 및 L-theanine 과의 혼합물의 투여로 인해 감소하였다(Fig. 4).

**아밀로이드 베타로 유도된 secretase 활성 측정**

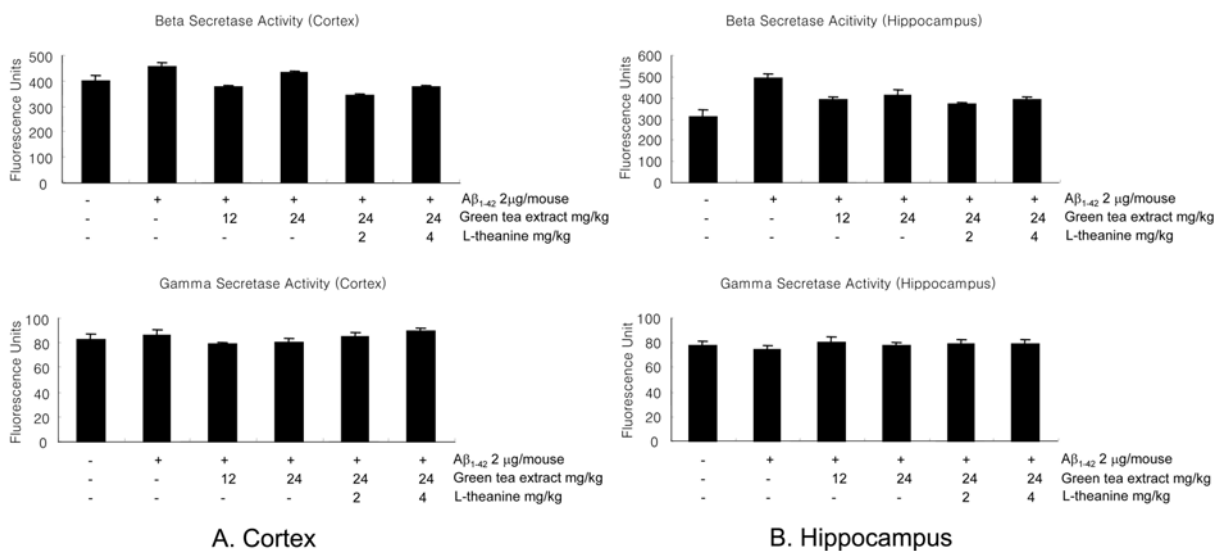
아밀로이드 단백질 발현량의 감소가 베타 아밀로이드 생성에 관여하는 효소의 변화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 secretase 활성을 측정하였다. 아밀로이드 베타는 beta-형의 secretase 를 해마 및 피질 부위에서 과도하게 증가시킴(피질부에서 114%, 해마부에서 157%)이 밝혀졌으며 이로 인하여 아밀로이드 베타 생성이 크게 증가할 수 있음이 밝혀졌고, 상대적으로 gamma 형에는 크게 영향을 주지 않음을 확인하였다. 그러나 녹차추출물 및 L-theanine과의 혼합물 투여군에서는 증가된 secretase의 활성이 억제(Aβ 투여군 대비 피질부에서 20%, 해마부에서 20% 억제) 되었으며 거의 비 투여군 수준으로 회복되었다(Fig. 5).

**아밀로이드 베타로 유도된 세포사에 대한 녹차추출물/L-theanine 의 억제능 효과**

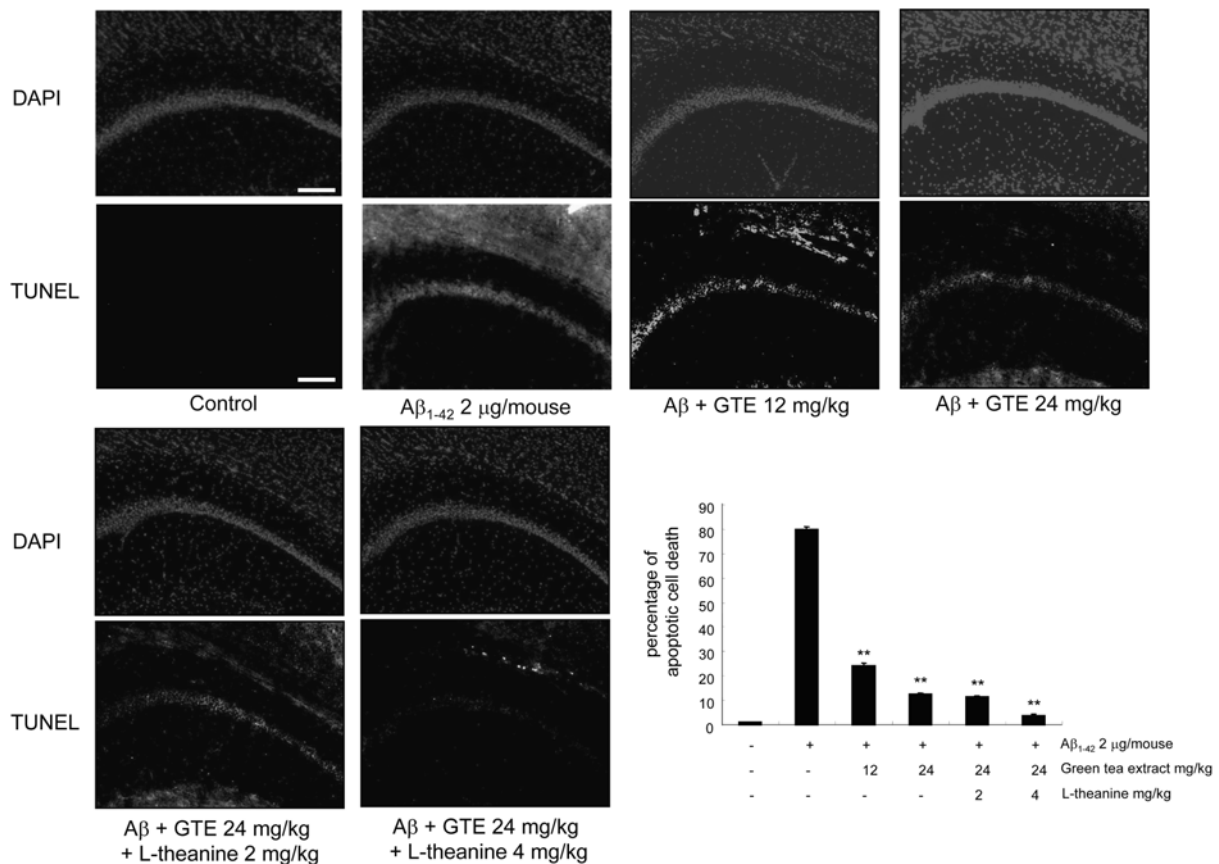
신경독성을 가지는 아밀로이드 베타를 억제함으로써 신경세포사를 억제하였는지를 확인하기 위하여 마우스의 뇌를 적출하여 아밀로이드 베타 처치군 및 시료를 처리하지 않은 음성대조군과 녹차추출물만을 투여한 군 그리고 L-theanine 과의 혼합물을 투여한 군의 신경세포사의 정도를 DAPI와 TUNEL 방법으로 확인하였다. 그 결과 아밀로이드 베타 1-42의 투여로 인해 증가한 신경세포사가 녹차추출물 및 L-theanine 혼합물의 투여로 인해 현저히 감소하였고 혼합물 투여 시 효과가 더 크게 나타났다(Fig. 6).

**고 찰**

알츠하이머는 노인성 치매 질환의 주요 원인 중의 하나이며, 65세 이상의 노인에게서 주로 발병하는 질환이다. 알츠하이머 환자의 뇌에서 특이적으로 보이는 아밀로이드 베타 단백질의 축적이 주요 원인으로 생각되고 있다.<sup>1-4)</sup> 따라서 아밀로이드 베타 단백질의 침착을 막는 것이 병의 진전을 늦추는 주요한 치료방법으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 여러 차폐 보고된 항산화 물질들의 신경세포 보호작용이 신경세포사를 억제하여 인지기력 개선에 효과가 있다는 점이 여러 번 발표된 녹차와,<sup>13-17)</sup> 녹차의 구성성분 중의 하나인 L-theanine을 선정하였다. L-theanine은 Glutamate 유도체 형태를 띠고 있어 Glutamate의 신경독성을 경감시키고, *in vivo* 실험에서 해마 부위에서 신경세포사를 막아주



**Fig. 5** – Inhibitory effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on the Aβ<sub>1-42</sub>-induced secretase activities in cortex and hippocampus in mice. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks and injected Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment and then secretase activities was measured. Effect of combination of GTE and L-theanine on secretase activities in the mice cortex (A) and hippocampus (B). Secretase activities were presented by the unit enzyme activity per protein of each part of brain (nM/min/mg) as described in materials and methods. Each value represents mean ± S.E.



**Fig. 6** – Inhibitory effects of combination of green tea extract (GTE) and L-theanine on the Aβ<sub>1-42</sub>-induced apoptosis in the mice brain. The mice fed drinking water containing GTE (12, 24 mg/kg) and L-theanine (2, 4 mg/kg) and combination for 3 weeks and injected Aβ<sub>1-42</sub> to induce memory impairment. Apoptotic cell death was determined by DAPI staining and TUNEL assay as described in materials and methods. Scale bar: 100 μm. For quantification, 200 cells at 3 randomly selected areas were assessed, and the apoptotic index was determined as the number of TUNEL-positive stained cells divided by the DAPI-positive total cell number counted × 100. Each value represents mean ± S.E. \*\**p* < 0.01 indicate significantly different from Aβ<sub>1-42</sub> treated control.

어 신경보호효과가 있다고 알려졌으며,<sup>18)</sup> 본 연구팀의 연구결과에서도 scopolamine으로 유도된 AChE의 활성을 억제하여 뇌 내 acetylcholine을 유지시켜 인지능 개선에 효능이 있음을 밝힌 바 있다(투고 중 자료). 이 L-theanine을 2가지 농도로 녹차추출물과 혼합하여 그 혼합물의 기억력 및 학습능력 회복에 관한 병용효과를 연구하였다.

두 물질을 병용투여 할 경우 얻어질 수 있는 장점은, 기존에 알려진 녹차의 알려진 항산화 및 신경보호효과로 인한 인지능 개선 효능<sup>19-21)</sup>에 작용 기전이 다른 녹차의 구성요소 중 하나를 추가 병용함으로써 서로 다른 효능기전의 보완을 통해 서로 상승효과를 기대할 수 있었으며, 실제 실험결과 녹차추출물과 L-theanine을 병용투여한 군에서 대부분 가장 기억력 회복 효능이 높게 나타난 결과들을 얻을 수 있었다. 행동약리 실험에서는 step-through test와 water maze test 모두에서 녹차추출물 24 mg/kg과 L-theanine 4 mg/kg을 병용투여한 군이 가장 기억력 회복 효능이 높게 나타났다. 그 후 동물에서 조직을 얻어 기전연구를 수

행한 결과, secretase 활성 실험과 아밀로이드 베타 축적 관찰에서는 뚜렷한 감소효과는 발견되었으나 병용효과를 관찰 할 수는 없었고, 아밀로이드 베타 정량 실험에서 cortex 부분에 확연한 병용효과를 관찰할 수 있었다. 특히 DAPI staining과 TUNEL assay를 통한 신경세포사 실험에서 병용 그룹의 뚜렷한 신경세포사 억제 효과를 확인 할 수 있었다. 이는 녹차의 주요성분인 EGCG의 연구에서 얻은 결과들과 작용기전 면에서 유사한 연구 결과이며 궁극적으로 이 혼합물은 secretase 활성억제를 통하여 아밀로이드 생성을 억제하는 것으로 판단된다. 결국 아밀로이드 억제제는 녹차추출물/L-theanine이 아밀로이드에 의한 신경세포사를 억제함으로써 기억력 감퇴를 개선하는 것으로 판단된다. 녹차추출물의 아밀로이드 베타 응집억제 효과와 L-theanine의 신경세포 보호작용의 시너지 효과로 인해 단독투여에 비해 보다 강력한 기억력 및 학습능력 감퇴 억제 효과를 나타내는 것으로 보여진다.

녹차는 예로부터 동맥경화, 압, 신경계 질환의 예방목적으로 소

비되어오고 있었으며, 항산화, 항염작용등이 일반적으로 알려져 있다.<sup>22,26)</sup> 또한 녹차는 신경계에도 많은 보호 작용이 보고되고 있는데, amyotrophic lateral sclerosis(ALS), parkinson's disease, ischemia 등에 유익하다는 보고가 있으며,<sup>27,30)</sup> 신경세포에서(3-HK), an endogenous metabolite of tryptophan 대사체로 매우 신경독성이 강한 3-Hydroxykynurenine, 6-hydroxydopamine 및 nitric oxide에 의한 신경세포의 독성을 막아주며,<sup>31,32)</sup> 무엇보다도 본 연구결과와 유사하게 아밀로이드에 의한 신경독성도 경감한다고 보고되었다.<sup>33)</sup> 작용기전에 대한 연구결과 동물 조직을 이용한 실험에서 아밀로이드 베타를 형성하는 효소인 secretase 활성 측정시험에서 녹차추출물이 그 활성을 농도별로 억제하는 효능을 나타내었고, 그 결과로 생성되는 아밀로이드 베타 정량 실험에서도 neurotoxic한 아밀로이드 베타 1-42의 생성이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. BACE(beta-site APP cleaving enzyme; identified as beta-secretase)의 발현은 여러가지 기전에 의해 조절되는데, NF- $\kappa$ B(Nuclear factor kappa B), Sp1, YY1(Yin Yang-1), PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptor-gamma) 등의 여러가지 인자들이 활성인자 또는 억제인자로 BACE 전사에 작용을 하며, 무스카린성 콜린 수용체의 신호와 염증 반응, 번역 후 수정 등을 통해 조절된다.<sup>34)</sup> 아밀로이드 자체에 의하여 secretase의 활성이 증가한 보고는 많지 않으나 최근의 연구에 의하면 exogeneous 하게 투입된 베타 아밀로이드가 산화적 스트레스에 의하여 신호전달 체계의 하나인 MAP kinase(stress associated protein kinase)를 자극하여 이것이 다시 positive mechanism에 의하여 BACE 단백질 발현을 증가시켜 아밀로이드를 더 만들어 낸다는 보고가 되고 있다.<sup>35)</sup> 이들 결과를 고려하면 뇌실로 도입된 아밀로이드가 BACE를 과발현시키는 단계에 작용하는 MAP kinase의 활성을 녹차추출물/L-theanine이 BACE의 발현을 억제하고 결과적으로 아밀로이드의 생성을 억제하여 그 결과 인지기능 감퇴를 억제하는 것으로 추정된다. 실제 본 연구진은 아밀로이드에 의하여 유도된 MAP kinase의 활성이 EGCG에 의하여 감소됨을 세포배양에서 확인하였으며,<sup>36)</sup> 이는 녹차추출물/L-theanine의 인지기능 감소 기전 중 하나로 작용할 수 있다고 판단된다.

이처럼 녹차 추출물은 오랜 기간 널리 기호식품으로 복용되어 온 만큼 안전성이 상당히 확립되어 있는 식품이라고 할 수 있겠으며, L-theanine 또한 녹차에 약 15% 포함되어 있는 물질로 보고된 바로는 a no-observed adverse effect level(NOAEL)치가 4000 mg/kg으로 안전역이 매우 넓다.<sup>37)</sup> 녹차의 안전성에 대해서 발표된 여러 가지 자료에 따르면, 500 mg/kg/day로 13주 동안 랫드에 경구 반복투여에서도 특이적인 독성이 없어 NOAEL치가 500 mg/kg/day라고 발표되었으며,<sup>38,39)</sup> 또한 유전독성결과에서도(Salmonella and L5178Y tk+/- mouse lymphoma cell assays 음성) 유전독성이 없고 500, 1000, or 2000 mg EGCG/kg

로 경구투여 후 bone marrow cells에서의 micronuclei formation을 관찰하지 못하였다고 최근 보고 되었다.<sup>40)</sup> 또한 생식발생독성결과 14,000 ppm까지 투여에서도 embryo-fetal toxicity, teratogenicity가 없고 12,000 ppm EGCG에서도 reproduction or fertility에 변화를 초래하지 않는다고 보고되었으며 생식발생독성의 NOAEL치는 200 mg EGCG/kg/day 이상임이 보고되었다.<sup>41)</sup> 본 연구결과를 근거로 살펴볼 때 녹차추출물/L-theanine 복합물은 녹차추출물의 아밀로이드 베타 응집 억제 효과와 L-theanine의 신경세포 보호효과를 동시에 얻을 수 있을 뿐 아니라 그 이상의 시너지 효과를 얻을 수 있어 큰 이점을 가지며 효과적으로 기억력 및 학습능력 감퇴를 막을 수 있는 물질로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 녹차추출물은 동물모델에서 인지기능 개선효과가 있으며, 또한 L-theanine과 혼합 투여시에도 인지기능 개선효과가 있으며 작용기전상 혼합물이 더 우수한 효과를 나타내었다. 그러므로 혼합물질이 단일물질보다 인지기능 개선 효과, 안전성 및 약물효용성 면에서 치매와 같은 인지기능 장애에 대한 개선 및 치료제 등에 사용할 수 있는 유용한 물질로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 실험은 (주)LG 생활건강에서 지원한 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Selkoe, D. J. : Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789 (2002).
- 2) Selkoe, D. J. : Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **81**, 741 (2001).
- 3) Hardy, J. A. and Higgins, G. A. : Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **10**, 184 (1992).
- 4) Govaert, L., Schoenen, J. and Bouhy, D. : Pathogenesis of Alzheimer's disease: molecular and cellular mechanisms. *Rev. Med. Liege.* **62**, 209 (2007).
- 5) Dumery, L., Bourdel, F., Soussan, Y., Fialkowsky, A., Viale, S., Nicolas, P. and Reboud-Ravaux, M. : beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol.* **49**, 72 (2001).
- 6) Howell, W. M. and Brookes, A. J. : Evaluation of multiple presenilin 2 SNPs for association with early-onset sporadic Alzheimer disease. *Am. J. Med. Genet.* **111**, 157 (2002).
- 7) Obregon, D. F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G. W., Shytle, D., Town, T. and Tan, J. : ADAM10 activation is required for green tea(-)epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase



- cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 16419 (2006).
- 8) Okello, E. J., Savelev, S. U. and Perry, E. K. : *In vitro* anti-beta-secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother. Res.* **18**, 624 (2004).
  - 9) Ramassamy, C. : Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* **545**, 51 (2006).
  - 10) Jeon, S. Y., Bae, K. H., Seong, Y. H. and Song, K. S. : Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3905 (2003).
  - 11) Okello, E. J., Savelev, S. U. and Perry, E. K. : *In vitro* anti-beta-secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother. Res.* **18**, 624 (2004).
  - 12) Yuk, D. Y., Kim, T. I., Park, S. G., Park, H. K., Yoon, Y. K. and Hong, J. T. : Improvement of memory impairment by L-Theanine through inhibition of acetylcholinesterase activity in mice. *Yakhak Hoeji* **51**, 409 (2007).
  - 13) Biegon, A., Alvarado, M., Budinger, T. F., Grossman, R., Hensley, K., West, M. S., Kotake, Y., Ono, M. and Floyd, R. A. : Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. *J. Neurochem.* **82**, 924 (2002).
  - 14) Frank, B. and Gupta, S. : A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Psychiatry* **17**, 269 (2005).
  - 15) Kim, H. K., Kim, M., Kim, S., Kim, M. and Chung, J. H. : Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1977 (2004).
  - 16) Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O. and Youdim, M. B. : Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 229 (2006).
  - 17) Zhao, B. : Natural antioxidants for neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **31**, 283 (2005).
  - 18) Kakuda, T. : Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1513 (2002).
  - 19) Lin, C. L., Chen, T. F., Chiu, M. J., Way, T. D. and Lin, J. K. : Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses beta-amyloid-induced neurotoxicity through inhibiting c-Abl/FE65 nuclear translocation and GSK3 beta activation. *Neurobiol. Aging* (2007).
  - 20) Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T. and Youdim, M. B. : Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 506 (2004).
  - 21) Lu, J. H., Guo, J. and Yang, W. H. : Effects of green tea polyphenol on the behaviour of Alzheimer's disease like mice induced by D-galactose and Abeta25-35. *Zhong Yao Cai* **29**, 352 (2006).
  - 22) Friedman, M. : Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 116 (2007).
  - 23) Kaegi, E. : Unconventional therapies for cancer: 2. Green tea. The task force on alternative therapies of the canadian breast cancer research initiative. *CMAJ* **158**, 1033 (1998).
  - 24) Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., Ali, I., Viner, J. L. and Sigman, C. C. : Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.* **130**, 467 (2000).
  - 25) Kumar, N., Shibata, D., Helm, J., Coppola, D. and Malafa, M. : Green tea polyphenols in the prevention of colon cancer. *Front Biosci.* **12**, 2309 (2007).
  - 26) Li, R., Huang, Y. G., Fang, D. and Le, W. D. : (-)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury. *J. Neurosci. Res.* **78**, 723 (2004).
  - 27) Chen, L. W., Wang, Y. Q., Wei, L. C., Shi, M. and Chan, Y. S. : Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* **6**, 273 (2007).
  - 28) Egashira, N., Ishigami, N., Pu, F., Mishima, K., Iwasaki, K., Orito, K., Oishi, R. and Fujiwara, M. : Theanine prevents memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Phytother. Res.* (2007).
  - 29) Koh, S. H., Lee, S. M., Kim, H. Y., Lee, K. Y., Lee, Y. J., Kim, H. T., Kim, J., Kim, M. H., Hwang, M. S., Song, C., Yang, K. W., Lee, K. W., Kim, S. H. and Kim, O. H. : The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neurosci. Lett.* **395**, 103 (2006).
  - 30) Pan, T., Jankovic, J. and Le, W. : Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. *Drugs Aging.* **20**, 711 (2003).
  - 31) Jeong, J. H., Kim, H. J., Lee, T. J., Kim, M. K., Park, E. S. and Choi, B. S. : Epigallocatechin 3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. *Toxicology* **195**, 53 (2004).
  - 32) Jung, J. Y., Han, C. R., Jeong, Y. J., Kim, H. J., Lim, H. S., Lee, K. H., Park, H. O., Oh, W. M., Kim, S. H. and Kim, W. J. : Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **411**, 222 (2007).

- 33) Bastianetto, S., Yao, Z. X., Papadopoulos, V. and Quirion, R. : Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 55 (2006).
- 34) Rossner, S., Sastre, M., Bourner, K. and Lichtenthaler, S. F. : Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-implications for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **79**, 95 (2006).
- 35) Tamagno, E., Guglielmotto, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., Muraca, G., Danni, O., Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G., Jo, D. G., Mattson, M. P. and Tabaton, M. : Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* In press. (2007).
- 36) Lee, S. Y., Lee, J. W., Lee, H., Yoo, H. S., Yun, Y. P., Oh, K. W., Ha, T. Y. and Hong, J. T. : Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **140**, 45 (2005).
- 37) Borzelleca, J. F., Peters, D. and Hall, W. : A 13-week dietary toxicity and toxicokinetics study with L-theanine in rats. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1158 (2006).
- 38) Chow, H. H., Cai, Y., Hakim, I. A., Crowell, J. A., Shahi, E., Brooks, C. A., Dorr, R. T., Hara, Y. and Alberts, D. S. : Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3312 (2003).
- 39) Isbrucker, R. A., Edwards, J. A., Wolz, E., Davidovich, A. and Bausch, J. : Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 636 (2006).
- 40) Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A. and Wolz, E. : Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 626 (2006).
- 41) Isbrucker, R. A., Edwards, J. A., Wolz, E., Davidovich, A. and Bausch, J. : Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: teratogenicity and reproductive toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 651 (2006).