

봉선화 전초의 메탄올 추출물이 신경세포에서 아밀로이드 전구단백질의 대사에 미치는 영향

조운정 · 임재윤*
우석대학교 약학대학

Effects of MeOH Extract of *Impatiens balsamina* L. on the Metabolism of Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Yoon Jeong Jo and Jae Yoon Leem*

College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea

Abstract – One of the most common forms of dementia, Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder symptomatically characterized by impairment in memory and cognitive abilities. AD is characterized pathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptides, believed to be neurotoxic and now is also considered to have a role on the mechanism of memory dysfunction. In this study, we tested that MeOH extract of *Impatiens balsamina* L. (IBM) affects on the processing of APP from the APP_{swE} over-expressing Neuro2a cell line. We found that IBM increased over 2 folds of the sAPP α secretion level, a main metabolite of α -secretase. We shown that IBM reduced the secretion level of A β 42 and A β 40 without cytotoxicity. BACE (β -site APP cleaving enzyme) FRET assay shown that BACE activity was specifically decreased in the presence of IBM. We suggest that *Impatiens balsamina* L. may be an useful source to develop a herbal medicine of BACE inhibitor for Alzheimer's disease.

Key words – Alzheimer's disease, β -Amyloid peptides, *Impatiens balsamina* L., APP_{swE}, BACE

2014년 통계자료에 의하면, 한국은 고령인구 비율이 12.7%이며 2030년에는 24.3%, 2060년에는 40.1%로 증가할 것으로 예상된다. 노인인구의 증가와 더불어 치매환자 수도 급속히 증가하고 있어 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 과도한 의료비 지출로 인한 커다란 사회·국가적 문제로까지 대두되고 있다.¹⁾ 알츠하이머 질환은 치매의 가장 주요한 발병요인으로서 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 나타나는 sporadic type이다.²⁾ Familial type은 amyloid precursor protein(APP), presenilin 1(PS1), presenilin 2(PS2) 유전자의 돌연변이가 병인으로 알려져 있으며,³⁾ sporadic type의 경우는 그 원인이 노화 및 ApoE4 대립형질의 다양성이 병인으로 보고되었다.^{4,5)} β -amyloid(A β)의 축적에 의한 노인 반은 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. A β 는 베타 아밀로이드 전

구단백질인 APP가 2 종류의 protease에 의해 분해되어 생기는데, 아미노 말단을 절단하는 것이 β -secretase,⁶⁾ 카르복시 말단을 절단하는 것이 γ -secretase이다.⁷⁾ 알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin (PS), nicastrin(NCT)과 antheria pharynx defective gene의 단백질 산물인 APH-1, presenilin enhancer gene의 단백질 산물인 PEN-2 등으로 이루어진 complex로서 활성을 나타낸다. β -secretase(BACE, β -site APP cleaving enzyme) knock-out 생쥐는 정상적으로 발육되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다. APP는 기질로서 α -secretase와 β -secretase에 의해 경쟁적으로 대사되므로 α -secretase의 효소활성이 증가되면 BACE의 활성이 감소된다.^{8,9)} 최근 이와 같은 발병기전의 연구와 더불어 효소 저해제 및 A β 백신요법 등과 같은 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 효과적인 치료제가 없는 실정이다.¹⁰⁻¹²⁾

본 연구에 사용한 봉선화(*Impatiens balsamina* L.)는 인도, 말레이시아, 중국 원산으로 봉선화과의 한해살이풀이다. 한방에서 풍을 없애고 혈액순환을 원활하게 하며 염증을 제

*교신저자(E-mail): jyleem@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1575

거하고 통증을 멈추게 하는 효능이 있다. 관절염, 타박상, 종기나 습진을 치료한다고 기록되어 있다. 또한, 봉선화 종자를 급성자(急性子)라고 하는데 소화를 잘 시키며 간장을 보호하는 효능이 있고 몸 안에 쌓인 것과 딱딱한 것을 풀어 주어 신장결석, 요로결석, 어혈산후복통, 월경불순 등에 이용한다.¹³⁾ 최근 봉선화의 약리활성에 관한 보고에 의하면 항암활성, COX-2 억제활성, 항미생물 활성 등이 있는 것으로 알려졌다.¹⁴⁻¹⁶⁾

본 연구에서는 A β 의 분비를 감소시키는 약물을 선별하기 위해 국내 자생식물의 추출물을 스크리닝한 결과, 봉선화 전초의 MeOH 추출물이 APP의 변이 유전자인 APPswe를 발현하는 신경세포주에서 α -secretase의 활성을 증가시키고 동시에 BACE의 활성을 감소시킴으로써 APP의 대사를 조절하고 A β 의 분비를 감소시켰기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 - APP swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주인 Neuro2a(APPswe)를 동경대학의 Iwatsubo 교수로부터 제공받아 5% FBS(Gibco, Grand Island, NY), L-glutamic acid, penicillin/streptomycin, hygromycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, Grand Island, NY)과 OPTI MEM(Gibco, Grand Island, NY)의 혼합 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

시약 - 봉선화(*Impatiens balsamina* L.) 전초의 MeOH 추출물(이하 IBM으로略함)은 한국 추출물은행으로부터 구입하여 DMSO에 100 mg/ml 농도로 용해한 후, 희석하여 사용하였다. β -secretase inhibitor III(Calbiochem, Darmstadt, Germany), protease inhibitor(Sigma, St. Louis, MO), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT(Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20(Calbiochem, Darmstadt, Germany), mouse anti-amyloid precursor protein monoclonal antibody 6E10(BioSource, Camarillo, CA), goat anti-Presenilin 1 polyclonal antibody N-19(Santa cruz Biotech., Santa cruz, CA), rabbit anti-actin polyclonal antibody(Sigma, St. Louis, MO), human amyloid β assay kit(ABL, Kunma, Japan), Cell Counting Kit-8(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

A β 의 분비에 대한 저해효과 검증 - APPswe 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA¹⁷⁾를 실시하였다. 1 \times 10⁶ 세포를 60 mm dish에서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16 시간이 경과한 후 DMSO에 용해시킨 IBM 1, 10 μ g/ml 또는 양성대조군인 β -

secretase inhibitor III¹⁸⁾ 1.5 μ g/ml를 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였다. A β (35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 A β (38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating 된 plate에 100 μ l의 시료를 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시키고 7회 세척한 후, HRP conjugation된 A β (11-28) 특이적 monoclonal antibody를 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 9회 세척한 후 tetramethyl benzidine(TMB) 기질액을 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 정지액 100 μ l를 첨가하여 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

세포독성 분석 - IBM의 APPswe 세포주에 대한 독성을 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8 assay를 실시하였다. 5 \times 10³ 세포를 96 well plate에서 배양하여 DMSO에 용해시킨 IBM을 1, 10, 50, 100 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였다. CCK-8 용액(Water-soluble tetrazolium salt) 10 μ l를 첨가하여 2시간 배양한 후, 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

단백질 분석 - 단백질 분석은 Western blotting 방법에 의해 수행하였다.¹⁹⁾ 1 \times 10⁶ 세포를 60 mm dish에서 배양하여 24시간 후에 DMSO 또는 IBM 1, 10 μ g/ml를 처리하였다. 24 시간 후, 배양액을 PMSF 존재 하에 회수하고 PBS로 세척한 세포에 protease inhibitor를 첨가한 cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA)를 넣고 초음파 분쇄하여 시료로 사용하였다. 단백질 50 μ g을 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, sAPP α , PS1 등의 단백질 양상을 분석하였다. 3회 반복 실험에 의해 얻어진 단백질 밴드를 Image J 1.37 software(NIH 제공)에 의해 정량하였으며 actin 밴드를 기준으로 보정하였다.

β -secretase 저해 활성 분석 - β -secretase에 대한 저해활성은 BACE-1 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 분석 키트(PanVera Co, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다.²⁰⁾ 96 well plate에 DMSO 또는 IBM 1, 10 μ g/ml, BACE-1 기질(Rh-EVNLDAEFK quencher, in 50 nmol/L ammonium bicarbonate), BACE-1 효소 [in 50 mM Tris (pH7.5), 10% glycerol, (1.0 U/ml)]를 각각 10 μ l씩 넣은 후 차광하여 실온에서 반응시킨다. 반응 1시간 후 정지액(2.5 mol/L sodium acetate) 10 μ l를 넣고 multiwell spectrofluorometer(Infinite M200, TECAN)를 이용하여 emission 585 nm, excitation 545 nm에서 형광을 측정하였다.

통계처리 - 각 실험군(n=3) 간의 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며, P값이 0.05 및 0.01 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결 과

A β 분비 저해효과 및 세포독성 - APPswe 세포주에 IBM을 처리한 후 배양액으로 분비된 A β 의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량하였다. 즉, 음성 대조군(CON)인 DMSO를 처리한 시료의 A β 의 분비량을 100%로 하여 IBM을 처리한 경우의 분비량을 백분율로 표시하였다. IBM 1, 10 μ g/ml 처리시 A β 40의 분비량이 음성대조군의 각각 93.76 \pm 2.1, 73.09 \pm 2.4%이었으며 A β 42의 분비량은 각각 88.51 \pm 3.1, 56.22 \pm 2.5%이었다. 양성 대조군인 β -secretase inhibitor III도 저해 활성을 나타내었다(Fig. 1). 한편, IBM의 APPswe 세포주에 대한 독성을 관찰하기 위해 CCK assay를 실시한 결과, 100, 50 μ g/ml 처리 세포의 생존력은 대조군의 세포 생존력과 비교하여 각각 113.8 \pm 2.9%, 104.17 \pm 3.2을 나타내었다. 본 실험에 사용한 농도인 1, 10 μ g/ml을 처리한 세포의 생존력은 각각 103.13 \pm 3.3, 110.35 \pm 3.6%를 나타내었다(Fig. 2).

APP 및 관련 단백질 양상에 미치는 효과 - 위에서 확인한 IBM에 의한 A β 분비 감소효과의 메커니즘을 규명하기 위해 IBM을 처리한 APPswe 세포주로부터 lysate를 회수하여 Western blotting에 의해 APP, sAPP α , PS1의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. IBM은 APP의 단백질 양상에는 큰 영향이 없었으나, 배양세포주의 배양액으로부터 sAPP α 단백질 양상을 분석한 결과, IBM 1, 10 μ g/ml로 처리한 경우 DMSO 처리군(CON)에 비해 각각 2.33,

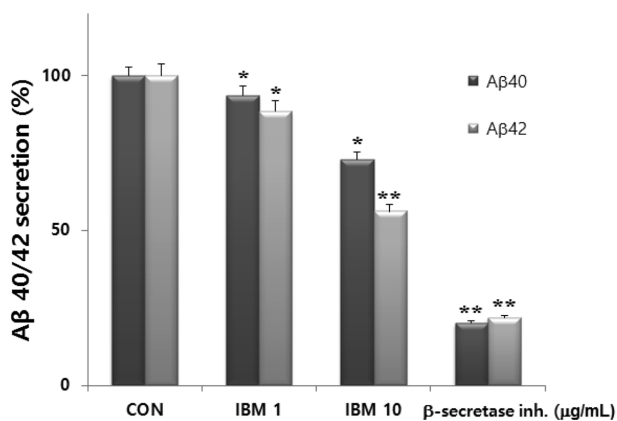


Fig. 1. Effects of IBM on the secretion of A β peptides. APPswe cells were treated with DMSO (control), 1, or 10 μ g/ml of IBM for 24 h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted A β x-40 and A β x-42 in the conditioned media was performed using sandwich ELISAs. The secreted A β peptides were significantly decreased in the presence of IBM. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 IBM; *Impatiens balsamina* MeOH extract, A β ; β -amyloid, CON; control

2.95배로 현저히 증가시켰다(Fig. 4A). sAPP α 의 증가는 α -secretase의 활성증가를 시사하는 것이며 이 결과를 통해 β -secretase의 활성감소를 예상할 수 있기 때문에 β -secretase의 활성을 측정하기 위해 BACE FRET 분석을 실시하였다. 그 결과, IBM 1, 10 μ g/ml 처리는 BACE 활성을 저해하여 DMSO 처리군(CON)에 비해 각각 79.07 \pm 3.5%, 55.23 \pm 1.8%

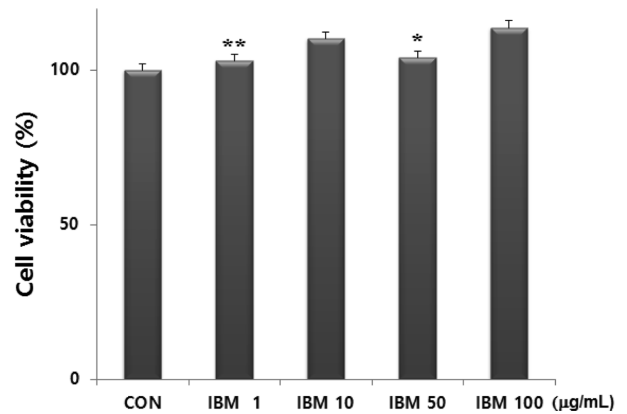


Fig. 2. Effect of IBM on the cell viability of APPswe cell lines. APPswe cells were cultured at confluency in a 96 well plate with various concentrations of IBM for 24 h. Cells were subjected to CCK-8 solution and incubated for 2 h. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA). IBM does not show a toxicity at a concentration of 1, 10, 50, 100 μ g/ml. *P<0.05, **P<0.01 IBM; *Impatiens balsamina* MeOH extract, CON; control

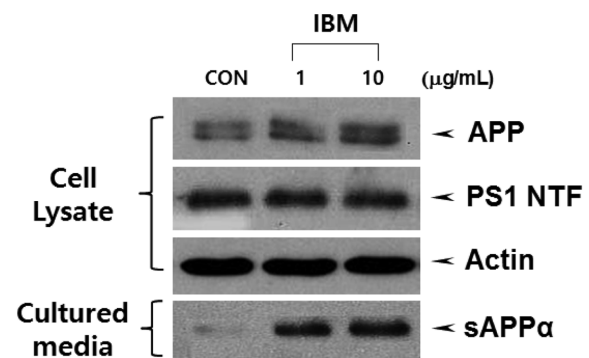


Fig. 3. Effects of IBM on the protein level of APP, sAPP α , PS1. APPswe cells were treated with DMSO (control), 1, or 10 μ g/ml of IBM for 24 h, then collected conditioned media and lysed with cell lysis buffer. Medium or detergent lysates were loaded on the 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-APP polyclonal antibody, rabbit anti-PS1 polyclonal antibody, rabbit anti-actin polyclonal antibody, or anti-APP monoclonal antibody. Note that sAPP α was increased. Actin was used as a control protein. IBM; *Impatiens balsamina* MeOH, CON; control, APP; Amyloid precursor protein, PS1-NTF; Presenilin 1-NH₂ terminal fragment, sAPP α ; soluble APP α .

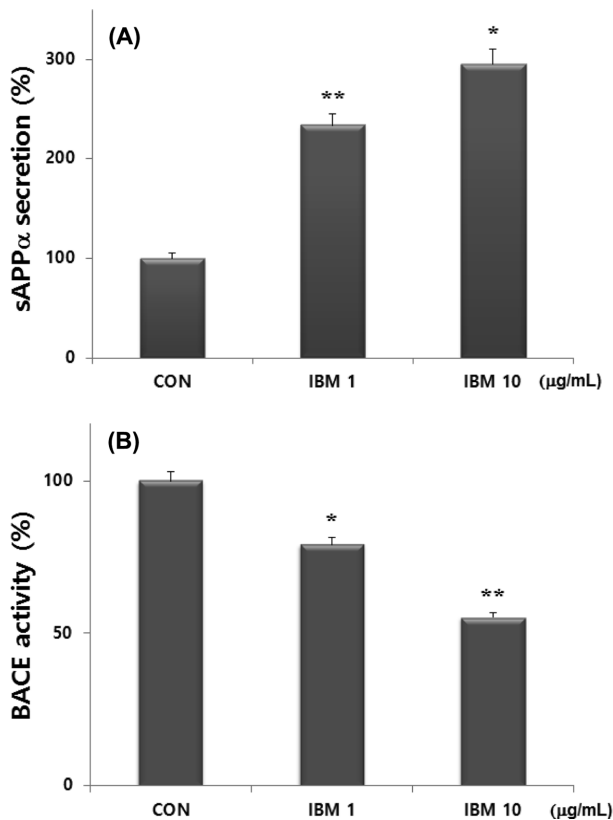


Fig. 4. The quantification of sAPP α and BACE activity. The levels of protein, shown in Fig. 3 were analyzed by relative density using Image J 1.37 software. (A) sAPP α secreted by α -secretase was significantly increased in the presence of IBM. (B) BACE1 FRET assay shown that BACE activity was specifically decreased in the presence of IBM. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 IBM; *Impatiens balsamina* MeOH extract, CON; control, BACE; β -site APP cleaving enzyme, APP; amyloid precursor protein, sAPP α soluble APP α .

의 효소활성을 나타냈다. sAPP α 의 단백질 양상과 BACE 활성은 Fig. 4A와 4B에서 나타낸 바와 같이, 서로 상반되는 결과를 나타냈다. 한편, γ -secretase의 구성분자인 PS1의 아미노 말단 단편인 PS1-NTF 단백질 양상은 아무런 변화가 없었다(Fig. 3).

고 찰

치매(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력 저하와 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 질환을 일컫는다.²¹⁾ 현재 치매 개선약물로서 donepezil, rivastigmine 등이 사용되고 있으나 치료효율이 낮고 부작용이 심하며 A β

또는 tau를 표적으로 하는 치료제는 아직 개발되지 않았다. 한편, 안전성을 고려하여 기억력 개선 효과가 있는 천연물 및 한약 처방 연구도 활발히 이루어지고 있다.^{22,23)}

알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin(PS)을 비롯하여 여러 단백질의 complex로서 활성을 나타내며 이 효소는 많은 물질을 기질로 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점 때문에²⁴⁻²⁶⁾ 최근에는 BACE를 저해하는 치료제 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 추세이다. 한편, APP는 합성된 후, endoplasmic reticulum(ER)과 골지체로 이동하며 당의 수식과정을 거쳐 성숙한 APP가 된 후, 다시 trans-golgi network(TGN)를 거쳐 세포막으로 이동한다. 이 과정에서 α -secretase, β -secretase 및 γ -secretase 등에 의해 대사되어 A β 를 비롯한 대사물질을 생성한다.^{27,28)} β -secretase 및 γ -secretase에 의해 생성되는 A β 40 및 A β 42는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다.²⁹⁾ 특히 치매 환자의 뇌 및 척수액에서 A β 42가 정상인의 경우보다 많이 검출된다.³⁰⁾ 본 실험에 사용한 APP^{swe} 세포주는 치매환자의 병리와 유사하게 A β 42의 분비량이 정상세포에 비해 2배 이상 증가되어 있어 분비저해 활성을 검색하기에 용이하다.³¹⁾

결과에 기술한 바와 같이, IBM은 A β 40 및 A β 42의 분비량을 감소시켰다. 반면에 IBM은 sAPP α 의 분비량을 현저하게 증가시켰으며 이는 α -secretase의 활성이 증가했음을 의미하는 것으로 동시에 APP와 경쟁적으로 작용하는 β -secretase의 활성은 감소되었음을 간접적으로 시사한다. APP를 기질로 하여 A β 의 생성에 관여하는 β -secretase의 효소 활성을 농도 의존적으로 저해하는 것도 확인하였다.

한편, γ -secretase의 구성분자인 PS1의 아미노 말단 단편인 PS1-NTF의 단백질 양상은 아무런 변화가 없었다. 이 결과를 통하여 APP의 최종 대사과정에 관여하는 효소 γ -secretase 복합체의 중요한 구성분자인 PS-NTF의 안정성에는 영향이 없으며, 다른 구성분자인 NCT, PS1-CTF, PEN2, APH-1 등의 안정성에도 변화가 없음을 추정할 수 있다.

최근 보고에 의하면 sAPP α 가 BACE1과 직접 결합함으로써 A β 의 생성을 저해하는 것으로 알려졌다.³²⁾ 이는 IBM이 sAPP α 의 분비를 증가시켰으므로 BACE를 저해할 가능성을 뒷받침한다. 이상의 결과를 종합해보면, IBM을 치매 치료제 개발을 위한 β -secretase 저해 후보약물로 응용할 수 있다고 사료된다. 향후 봉선화에 의한 A β 분비저해활성의 기전을 명확히 규명하기 위해서는 면역형광염색법에 의해 APP 및 관련 분자의 세포내 분포를 확인하고, BACE 및 γ -secretase의 *in vitro* 효소활성도 측정해야 할 것이다. 나아가 봉선화의 유효성분의 규명과 치매 동물모델에서의 기억력 개선효과의 검증도 필요하다.

결 론

봉선화 메탄올 추출물은 APP의 대사 과정 중 α -secretase 효소활성을 증가시키고 β -secretase를 저해함으로써 A β 의 분비를 감소시켰다. γ -secretase의 구성분자인 PS1의 단백질 양상에는 영향이 없었으며 활성을 나타내는 농도의 10배 농도에서도 세포독성은 관찰 되지 않았다. 이러한 결과를 종합해보면 IBM은 β -secretase를 표적으로 하는 치매 치료제 개발을 위한 후보자원으로서 개발가치가 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2014학년도 우석대학교 LINC와 지식경제부 및 한국산업기술진흥원의 재원으로 광역경제권연계협력사업(R0002019)의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 통계청 (2014) 2014 고령자통계(<http://sgis.kostat.go.kr/publicmodel/>).
- Morris, J. C. (1996) Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **165**: 41-50.
- Selkoe, D. J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**: 447-453.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8098-8102.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**: 921-923.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**: 735-741.
- Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**: 23-31.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Wong, P. C. (2001) BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neurosci.* **4**: 233-234.
- Fu, H., Dou, J., Li, W., Cui, W., Mak, S., Hu, Q., Luo, J., Lam, C. S., Pang, Y., Youdim, M. B. and Han, Y. (2009) Promising multifunctional anti-Alzheimer's dimer bis(7)-Cognitin acting as an activator of protein kinase C regulates activities of alpha-secretase and BACE-1 concurrently. *Eur. J. Pharmacol.* **623**: 14-21.
- Sugimoto, H. (2001) Donepezil hydrochloride. a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* **1**: 63-73.
- Zarotsky, V., Sramek, J. J. and Cutler, N. R. (2003) Galantamine hydrobromide. an agent for Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **60**: 446-452.
- Jann, M. W. (2000) Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **20**: 1-12.
- 안덕균 (2003) 한국본초도감, 533. 교학사, 서울.
- Ding, Z. S., Jiang, F. S., Chen, N. P., Lv, G. Y. and Zhu C. G. (2008) Isolation and identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules.* **13**: 220-229.
- Oku, H. and Ishiguro, K. (2002) Cyclooxygenase-2 inhibitory 1,4-naphthoquinones from *Impatiens balsamina* L. *Biol Pharm Bull.* **25**: 658-660.
- Wang, Y. C., Wu, D. C., Liao, J. J., Wu, C. H., Li, W. Y. and Weng, B. C. (2009) In vitro activity of *Impatiens balsamina* L. against multiple antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. *Am J Chin Med.* **37**: 713-722.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E. and Sissodia, S. S. (1996) The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* **271**: 31894-31902.
- Tung, J. S., Davis, D. L., Anderson, J. P., Walker, D. E., Mamo, S., Jewett, N., Hom, R. K., Sinha, S., Thorsett, E. D. and John, V. (2002) Design of substrate-based inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **45**: 259-262.
- Leem, J. Y., Saura, C. A., Pietrzik, C., Christianson, J., Wanamaker, C., King, L. T., Veselits, M. L., Tomita, T., Gasparini, L., Iwatsubo, T., Xu, H., Green, W. N., Koo, E. H., Thinakaran, G. (2002) A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* **11**: 64-82.
- Harun A., Muhammad J. J. R., Lim S. M, Bakar A. M. A., Cole A. L J , Ramasamy K. (2011) BACE1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement Altern. Med.* **11**: 79.
- Iqbal, K., Sisodia, S. S. and Winblad, B. (2001) Alzheimer's disease. Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics. John Wiley & Sons, Ltd.
- Li, N., Zhou, L., Li, W., Liu Y., Wang, J. and He, P. (2015) Protective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on an Alzheimer's disease mouse model: A metabolomics study. *J. Chro-*

- matogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **985C**: 54-61.
23. Uchida N, Takasaki K, Sakata Y, Nogami A, Oishi H, Watanabe T, Shindo T, Egashira N, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Nishimura R, Iwasaki K. (2013) Cholinergic involvement and synaptic dynamin 1 expression in Yokukansan-mediated improvement of spatial memory in a rat model of early Alzheimer's disease. *Phytother. Res.* **27**: 966-972.
 24. 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**: 39062-39061.
 25. Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
 26. Sambamurti, K., Hardy, J., Refolo L. M. and Lahiri, D. K. (2002) Targeting APP metabolism for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **56**: 211-227.
 27. Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. and Lee, V. M. (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* **275**: 2568-2575.
 28. Nunan, J. and Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**: 6-10.
 29. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. and Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3**: 67-72.
 30. Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J. and Roher, A. E. (1996) Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* **271**: 4077-4081.
 31. Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T. and Iwatsubo, T. (2003) Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation. *J. Biol. Chem.* **278**: 18664-18670.
 32. Obregon, D., Hou, H., Deng, J., Giunta, B., Tian, J., Darlington, D., Shahaduzzaman, M., Zhu, Y., Mori, T., Mattson, M. P. and Tan, J. (2012) Soluble amyloid precursor protein- α modulates β -secretase activity and amyloid- β generation. *Nat. Commun.* **3**: 777.
- (2015. 3. 2 접수; 2015. 3. 17 심사; 2015. 3. 20 게재확정)