

Hopea chinensis (Merr.) Hand.-Mazz. 메탄올 추출물이 신경세포에서 아밀로이드 전구 단백질 대사에 미치는 영향

쉬레스타 아비나쉬 찬드라¹ · 김주은¹ · 함하늘¹ · 조윤정¹ · 트란 더 바이트² · 엄상미³ · 임재윤^{1*}
¹우석대학교 약학대학, ²베트남 생태 생물자원연구소, ³한국생명공학연구원

The Effects of MeOH Extract of *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz. on the Metabolism of Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Shrestha Abinash Chandra¹, Ju Eun Kim¹, Ha Neul Ham¹, Youn Jeong Jo¹, Tran The Bach², Sang Mi Eum³, and Jae Yoon Leem^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk 55338, Korea

²Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam

³Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Korea

Abstract – Many plant derived phytochemicals have been considered as the main therapeutic strategy against Alzheimer’s disease (AD). AD is a progressive neurodegenerative disorder, and the most predominant cause of dementia in the elderly. Cholinergic deficit, senile plaque/ β -amyloid ($A\beta$) peptide deposition and oxidative stress have been identified as three main pathogenic pathways which contribute to the progression of AD. We screened many different plant species for their effective use in both modern and traditional system of medicines. In this study, we tested that MeOH extract of the stem bark of *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz. (HCM) affects on the processing of Amyloid precursor protein (APP) from the APPswe over-expressing Neuro2a cell line. We showed that HCM reduced the secretion level of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ in a dose dependent manner. We found that HCM increased over 1.5 folds of the secretion level of sAPP α , a metabolite of α -secretase. Furthermore, we found that HCM inhibited acetylcholinesterase activity *in vitro*. We suggest that the stem bark of *Hopea chinensis* may be a useful source to develop a therapeutics for AD.

Keywords – *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz., Alzheimer’s disease, β -amyloid, Acetylcholinesterase, APPswe, sAPP α

2018년 현재, 국내의 65세 이상의 노인인구 비율은 14.3% 이나 2030년에는 약 24%, 2060년에는 약 40%로 증가할 것으로 예상된다. 고령화와 더불어 치매환자 수도 급속히 증가하고 있어 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 과도한 의료비 지출로 인한 커다란 사회·국가적 문제로까지 대두되고 있다.¹⁾ 치매의 가장 주요한 발병요인인 알츠하이머 질환은 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 경우

는 그 원인이 노화 및 ApoE4 대립형질의 다양성이 병인으로 보고되었다.^{4,5)} $A\beta$ (β -amyloid)의 축적에 의한 senile plaque은 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. $A\beta$ 는 베타 아밀로이드 전구단백질인 APP(Amyloid precursor protein)가 β -secretase(BACE)⁶⁾ 및 γ -secretase에 의해 분해되어 생기는 펩티드이다.⁷⁾ 알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적 중 하나인 γ -secretase는 presenilin(PS), nicastrin(NCT)과 anterior pharynx defective gene의 단백질 산물인 APH-1, presenilin enhancer gene의 단백질 산물인 PEN-2 등으로 이루어진 복합체이다. 한편, BACE knock-out 생쥐는 정상적으로 발육되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다. APP는 기질로서 α -secretase와 BACE에 의해 경쟁적으로 대사되므로 α -secretase의 효소활성이 증가되면 BACE의 활성이 감소된

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

다.⁷⁻⁹⁾ 최근 이와 같은 발병기전의 연구와 더불어 효소 저해제 및 A β 백신요법 등과 같은 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 임상에서는 acetylcholinesterase (AChE) 저해제가 증상개선제로서 사용되고 있을 뿐 효과적인 치료제는 없는 실정이다.¹⁰⁻¹²⁾

본 연구에 사용한 *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz.는 이우시과(Dipterocarpaceae)에 속하는 상록관목으로 높이는 15~20 m, 잎은 장타원 모양의 피침형이며 베트남 북부와 중국 남부에 분포한다. 수피의 에틸 아세테이트 추출물로부터 분리한 hopeachinol C, caraphenol A, α -viniferin, neoisohopeaphenol, hemsleyanol C 등이 AChE의 저해 활성 성분이며 이들의 IC₅₀ 값은 4.81~11.71 μ M인 것으로 보고되었다.^{13,14)} 한편, 수피의 에탄올 추출물로부터 면역억제 활성을 나타내는 hopeachinol A와 B, diptoindonesin G 등의 활성성분이 보고되었다.¹⁵⁾

본 연구에서는 A β 의 분비를 감소시키는 약물을 선별하기 위해 A β 를 과량 발현하는 알츠하이머 질환의 신경세포 모델(APP 변이유전자 APP^{swe} 발현세포주)에서 해외자원생약의 추출물 효능을 스크리닝한 결과, *Hopea chinensis* 수피의 메탄올 추출물이 α -secretase의 활성을 증가시키고 동시에 A β 의 분비를 감소시켰으며 *in vitro*에서 AChE에 대한 저해활성을 나타내었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 - APP swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주인 Neuro2a(APP^{swe})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.

추출방법 - *Hopea chinensis* 수피 MeOH 추출물(이하 HCM으로略함)은 해외생물소재센터(Daejeon, Korea, 엄상미 박사)로부터 분양받아 일정량의 DMSO에 용해하여 사용하였다. 추출방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. *Hopea chinensis*(Merr.) Hand.-Mazz.는 2008년 베트남에서 수집되고 생태 생물자원 연구소(IEBR)에서 인증 받은 것을 사용하였다. 건조한 수피부분 63 g을 99.9% MeOH 600 ml을 가하여 초음파로 15분간 추출하고 3일 동안 3시간씩, 45°C에서 방치하였다. 추출액은 비형광 면화를 사용하여 여과한 뒤 45°C조건에서 감압농축기(N-1000SWD, EYELA, NY, USA)를 사용하여 농축한 뒤, 동결건조 하여 8.505 g의 추출물을 얻었다.

시약 - β -secretase inhibitor III(Calbiochem, Darmstadt, Germany), Galantamine hydrobromide(USP, Rockville,

MD), Tacrine hydrochloride(Cayman, Ann arbor, MI) protease inhibitor(Sigma, St. Louis, MO), anti-human sAPP α monoclonal antibody 2B3(ABL, MN, USA), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT (Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20(Calbiochem, Darmstadt, Germany), rabbit anti-actin polyclonal antibody(Sigma, St. Louis, MO), human amyloid β assay kit(ABL, Kunma, Japan), Enhanced Cell Viability Assay Kit, Ez-Cytox (Daeil, Korea)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

A β 의 분비에 대한 저해효과 검정 - APP^{swe} 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA를¹⁶⁾ 실시하였다. 1×10^6 세포를 6 well plate에서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16시간이 경과한 후 DMSO, HCM 1, 10, 25, 50 μ g/ml 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III¹⁷⁾ 10 μ M/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 - EZ-CYTOX 키트를 사용하여 HCM의 APP^{swe} 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다. 5×10^3 세포를 96 well plate에서 배양하여 DMSO에 용해시킨 HCM을 1, 10, 25, 50 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였다. Water-soluble tetrazolium 용액 10 μ l를 첨가하여 1시간 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.¹⁸⁾ 1×10^6 세포를 6 well plate에서 배양하여 24시간 후에 DMSO, HCM 1, 10, 25, 50 μ g/ml, 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III¹⁷⁾ 10 μ M/ml를 처리하였다. 24시간 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% 또는 10% Tris-glycine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP와 sAPP α 의 단백질 양상을 Azure C-600 (Azure Biosystems, Dublin, CA)을 이용하여 분석하였다.

3회 반복 실험에 의해 얻어진 단백질 밴드를 AzureSpot software(Azure Biosystems, Dublin, CA)에 의해 정량하였다.

Acetylcholinesterase 저해 활성 분석 - Acetylcholinesterase(AChE)에 대한 저해 활성은 Acetylcholinesterase Activity Colorimetric assay 키트(BioVision, Milpitas, CA)를 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 DMSO, HCM 10, 50, 100 µg/ml, 또는 양성 대조군인 tacrine 1 µM, 그리고 acetylcholinesterase 효소를 각각 30, 10 µl씩 넣은 후 reaction mixture를 50 µl씩 넣고 차광하여 실온에서 반응시킨다. 570 nm에서 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

통계처리 - 각 실험군(n=3) 간의 유의성 검정은 one-way ANOVA(Prism5) 프로그램으로 하였으며, P값이 0.05, 0.01 및 0.001 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결 과

Aβ 분비 저해효과 및 세포독성 - APPsw 세포주에 HCM을 처리한 후 배양액으로 분비된 Aβ의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량하였다. 즉, 음성 대조군(CON)인 DMSO를 처리한 시료의 Aβ의 분비량을 100%로 하여 HCM을 처리한 경우의 분비량을 백분율로 표시하였다. HCM 1, 10, 25, 50 µg/ml 처리 시 Aβ40의 분비량이

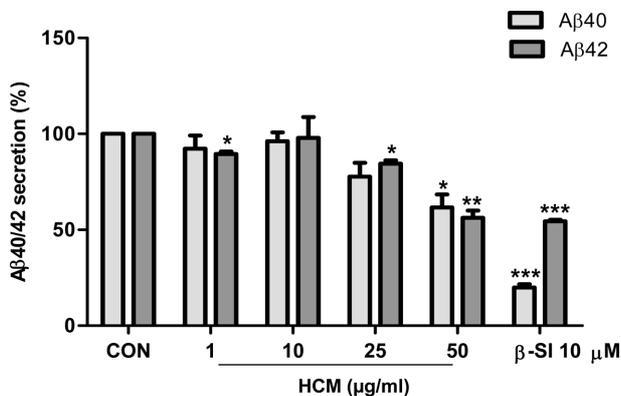


Fig. 1. Effects of HCM on the secretion of Aβ peptides. APPsw cells were treated with DMSO (CON), 5, or 50 µg/ml of HCM for 24 h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted Aβ x-40 and Aβ x-42 in the conditioned media was performed using sandwich ELISAs. The secreted Aβ peptides were significantly decreased in the presence of HCM in a dose dependent manner. β-SI at a concentration 10 µM were used as positive control. The means ± SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 CON; control, HCM; *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz MeOH extract, β-SI; β-secretase inhibitor III, Aβ; β-amyloid

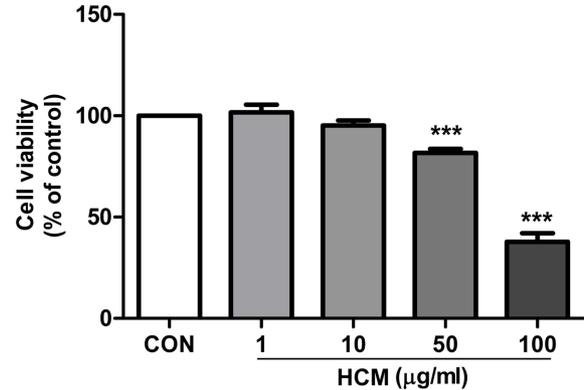


Fig. 2. Effect of HCM on the cell viability of APPsw cell lines. APPsw cells were cultured at confluency in a 96 well plate with various concentrations of HCM for 24 h. Cells were subjected to water-soluble tetrazolium solution and incubated for 1 h. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA). HCM does not show a toxicity at a concentration of 1, 5, 10, 50 µg/ml. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 CON; control, HCM; *Hopea chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz MeOH extract

음성대조군의 각각 92.21±6.9, 96.19±4.6, 77.67±7.2, 61.66±6.7%이었으며 Aβ42의 분비량은 각각 89.47±1.3, 97.93±10.9, 84.47±1.7, 56.28±3.8%이었다. 양성 대조군으로 사용한 β-secretase inhibitor III(β-SI) 10 µM도 두 종의 Aβ에 대하여 각각 19.87±1.3, 54.38±0.8%의 저해활성을 나타내었다(Fig. 1). 한편, HCM의 APPsw 세포주에 대한 독성분석을 실시한 결과, 1, 10, 50, 100 µg/ml 처리 세포의 생존력은 대조군의 세포 생존력과 비교하여 각각 101.74±3.6, 95.25±2.4, 81.68±2.0, 37.77±4.3%을 나타내었다(Fig. 2).

APP 및 관련 단백질 양상에 미치는 효과 - 위에서 확인한 HCM에 의한 Aβ 분비 감소효과의 메커니즘을 규명하기 위해 HCM을 처리한 APPsw 세포주로부터 배양액 또는 lysate를 회수하여 Western blotting에 의해 APP와 sAPPα의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. HCM 처리 세포주의 배양액으로부터 sAPPα 단백질 양상을 분석한 결과, HCM 1, 10, 25, 50 µg/ml로 처리한 경우 DMSO 처리군(CON)에 비해 각각 109, 122, 131, 159%로 농도 의존적으로 현저히 증가하였다(Fig. 3A). 반면 APP의 단백질 발현은 HCM 1, 10 µg/ml에서 110, 122%로 증가하였다가, HCM 25, 50 µg/ml에서는 각각 94, 67%로 감소하였다.

Acetylcholinesterase 저해 활성 - 현재 임상에서 사용하고 있는 치매 개선제의 표적 중의 하나인 AChE에 대한 저해활성을 분석한 결과, HCM 10 µg/ml의 농도에서는 저해활성은 보이지 않았으나, 50, 100 µg/ml의 농도에서 16.82±9.9%, 43.13±10.4%의 저해활성을 나타내었다. 반면, 해당농도에서의 활성을 세포독성에 의한 것으로 생각할 수도 있

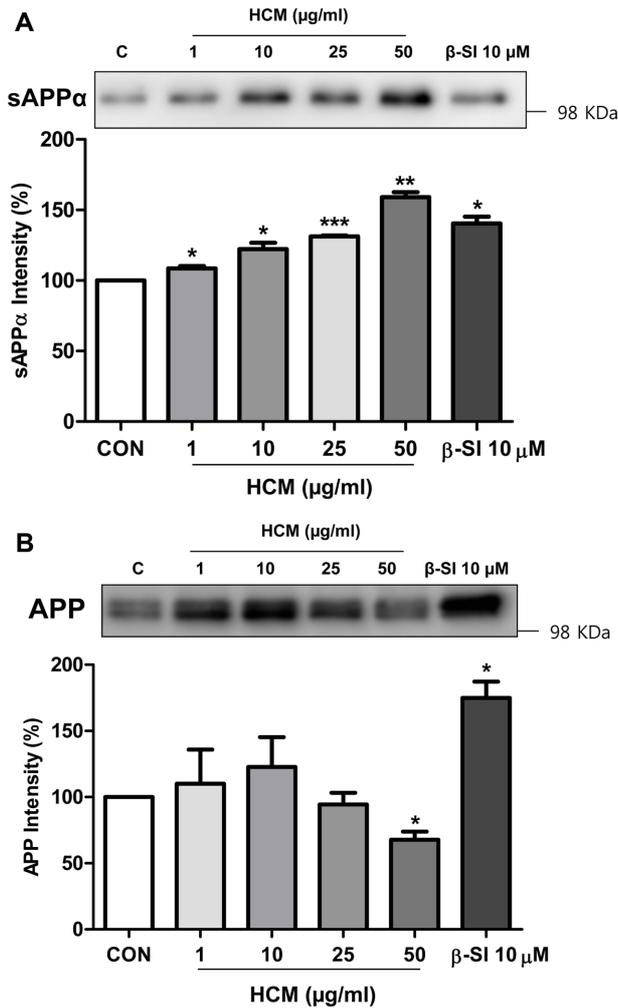


Fig. 3. Effects of HCM on the protein level of APP, sAPP α . APPsw cells were treated with DMSO (CON), 1, 10, 25, or 50 μ g/ml of HCM for 24 h, then collected conditioned media and lysed with cell lysis buffer. (A) Medium were loaded on the 7% Tris-glycine SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-human sAPP α monoclonal antibody 2B3. The levels of protein were analyzed by relative density using Azurespot software. Note that sAPP α secreted by α -secretase was increased in the presence of HCM in a dose dependent manner. (B) Detergent lysates were loaded on the 7% Tris-glycine SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT. The levels of protein were analyzed by relative density using Azurespot software. Note that APP was decreased at a concentration of 50 μ g/ml. Actin was used as a control protein. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 CON; control, HCM; *Hoepa chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz MeOH extract, sAPP α ; soluble APP α , APP; Amyloid precursor protein

으나, 이 실험은 세포를 사용하지 않고 추출물 고유의 AChE 저해 활성을 측정한 실험이기 때문에 세포독성에 의한 영

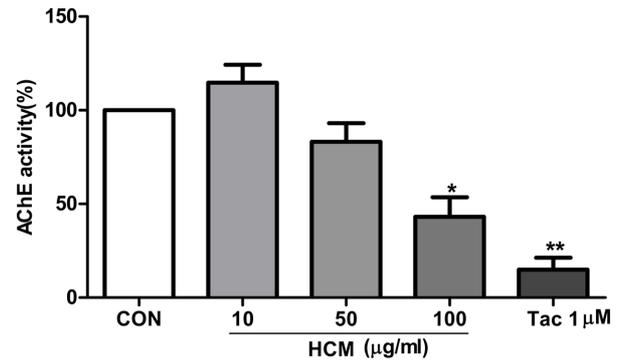


Fig. 4. The AChE inhibitory activity of HCM. AChE inhibitory activity was assessed using an Acetylcholinesterase Activity Colorimetric assay (BioVision). The 30 μ l of HCM were added into 96-well plate at concentration of 10, 50, 100 μ g/ml. The 1 μ M of tacrine was used as a positive control. Then 50 μ l of reaction mixture was added into each sample, after 10 μ l of diluted AChE was added. The absorbance was measured at 570 nm by using an ELISA reader (Bio-Rad). The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. * p <0.05, ** p <0.01 CON; control, HCM; *Hoepa chinensis* (Merr.) Hand.-Mazz MeOH extract, AChE; Acetylcholinesterase, tac; tacrine

향으로 볼 수 없다. 양성대조군 tacrine은 1 μ M 농도에서 74.66 \pm 5.9%의 저해 활성을 보였다(Fig. 4).

고 찰

알츠하이머 질환을 비롯한 치매는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 senile plaque의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력 저하와 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 질환을 말한다.²⁰⁾ 현재 치매 개선약물로서 memantine, donepezil, galantamine, rivastigmine 등이 사용되고 있으나 치료효율이 낮고 부작용이 심하며 β 또는 tau를 표적으로 하는 치료제는 아직 개발되지 않았다. 한편, 안전성을 고려하여 기억력 개선 효과가 있는 천연물 및 한약 처방 연구도 활발히 이루어지고 있다.^{21,22)} 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 때문에²³⁻²⁵⁾ 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, BACE 및 γ -secretase 등에 의해 대사되어 $A\beta$ 를 비롯한 대사물질을 생성한다.^{26,27)}

BACE 및 γ -secretase에 의해 생성되는 A β 40 및 A β 42는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다.^{28,29} 특히 치매 환자의 뇌 및 척수액에서 A β 42가 정상인의 경우보다 많이 검출된다.²⁹ 본 실험에 사용한 APP^{swe} 세포주는 치매 환자의 병리와 유사하게 A β 42의 분비량이 정상세포에 비해 2배 이상 증가되어 있어 분비저해 활성을 검색하기에 용이하다.³⁰

결과에 기술한 바와 같이, HCM은 A β 40 및 A β 42의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 양성 대조군인 β -SI가 A β 40에 대해 강한 저해활성을 나타낸 반면, HCM은 A β 40 보다는 A β 42에 대한 저해 활성이 크게 나타났다. 이는 HCM이 γ -secretase의 APP의 A β 1-40 및 A β 1-42 절단 부위에 대한 각각의 affinity에 선택적 영향을 주는 것으로 추측된다. 또한 HCM은 sAPP α 의 분비량을 농도 의존적으로 현저하게 증가시켰으며 이는 α -secretase의 활성이 증가했음을 의미하는 것으로 동시에 APP와 경쟁적으로 작용하는 BACE의 활성은 감소되었음을 간접적으로 시사한다.

최근 보고에 의하면 sAPP α 가 BACE1과 직접 결합함으로써 A β 의 생성을 저해하는 것으로 알려졌는데,³¹ 이는 HCM이 sAPP α 의 분비를 증가시킴으로써 BACE를 저해할 가능성을 뒷받침한다. 한편, Ge 등은 수피의 에틸 아세테이트 추출물로부터 폴리페놀 성분을 분리하여 AChE 저해활성을 보고하였지만,¹³ 본 연구에서는 메탄올 추출물에서 직접 AChE 저해활성을 확인하고 동시에 치매 병인 중 하나인 A β 에 대한 분비저해활성을 발견하였다는데 큰 의미가 있다. 결국, *Hopea chinensis*의 치매에 대한 약리활성의 표적이 BACE 및 AChE 두 가지에 모두 유효한 활성을 가질 것으로 추정할 수 있다. 이상의 결과를 종합해보면, HCM을 치매 치료제 개발을 위한 BACE 및 AChE 저해 후보약물로 응용할 수 있다고 사료된다. 향후 *Hopea chinensis*에 의한 A β 분비저해활성의 기전을 명확히 규명하기 위해 면역형광 염색법에 의해 APP 및 관련 분자의 세포내 분포를 확인하고 *Hopea chinensis*의 약리활성 성분과의 상호작용 여부와 α -secretase, BACE 및 γ -secretase의 *in vitro* 효소활성도 측정할 것이다. 나아가 치매 동물 모델에서의 전임상 시험도 수행하여 식의약 소재로서의 개발 가능성을 검토할 것이다.

결 론

Hopea chinensis 메탄올 추출물은 APP의 대사 과정 중 α -secretase 효소활성을 증가시키고 A β 의 분비를 감소시켰다. 또한 *in vitro*에서 AChE를 100 μ g/ml의 농도에서 58%의 저해 활성을 보였다. 이러한 결과를 종합해보면 *Hopea chinensis*는 A β 및 AChE를 표적으로 하는 치매 치료제 개발을 위한 후보자원으로서 개발가치가 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 우석대학교 교내 연구지원사업으로 수행하였으며, 시료를 제공해준 KRIBB(Initiative Program)에 감사드립니다.

인용문헌

1. 통계청 자료(http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1B35001)
2. Morris, J. C. (1996) Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **165**: 41-50.
3. Selkoe, D. J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**: 447-453.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**: 23-31.
8. 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.
9. 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.
10. Sugimoto, H. (2001) Donepezil hydrochloride. a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* **1**: 63-73.
11. 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.

12. Jann, M. W. (2000) Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **20**: 1-12.
13. Ge, H. M., Zhu, C. H., Shi, D. H., Zhang, L. D., Xie, D. Q., Yang, J., Ng, S. W. and Tan RX. (2008) Hoehainol A: an acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chem. Eur. J.* **14**: 376-381.
14. Yan, T., Wang, T., Wei, W., Jiang, N., Qin, Y. H., Tan, R. X. and Ge, H. M. (2012) Polyphenolic acetylcholinesterase inhibitors from *Hopea chinensis*. *Planta Med.* **78**: 1015-1019.
15. Ge, H. M., Yang, W. H., Shen, Y., Jiang, N., Guo, Z.K., Luo, Q., Xu, Q., Ma, J. and Tan, R. X. (2010) Immunosuppressive resveratrol aneuploids from *Hopea chinensis*. *Chemistry*. **16**: 6338-6345.
16. 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.
17. Harun A., Muhammad J. J. R., Lim S. M, Bakar A. M. A., Cole A. L. J. and Ramasamy K. (2011) BACE1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement Altern. Med.* **11**: 79.
18. 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. and Thirumangalakudi, G. (2002) A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* **11**: 64-82.
19. Tung, J. S., Davis, D. L., Anderson, J. P., Walker, D. E., Mamo, S., Jewett, N., Hom, R. K., Sinha, S. and Thorsett, E. D., John, V. (2002) Design of substrate-based inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **45**: 259-262.
20. Iqbal, K., Sisodia, S. S. and Winblad, B. (2001) Alzheimer's disease. Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics. John Wiley & Sons, Ltd.
21. 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. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **985**: 54-61.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Nunan, J. and Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**: 6-10.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Obregon, D., Hou, H., Deng, J., Giunta, B., Tian, J., Darlington, D., Shahaduzzaman, M., Zhu, Y., Mori, T., Mattson, MP. and Tan, J. (2012) Soluble amyloid precursor protein- α modulates β -secretase activity and amyloid- β generation. *Nat. Commun.* **3**: 777.

(2018. 6. 23 접수; 2018. 6. 27 심사; 2018. 6. 28 게재확정)