



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

HEK293-APP695 세포에서
coptisine이 아밀로이드 베타 펩타이드
발현에 미치는 영향



2014년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

변 정 수

이 학 석 사 학 위 논 문

HEK293-APP695 세포에서
coptisine이 아밀로이드 베타 펩타이드
발현에 미치는 영향



2014년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

변 정 수

변정수의 이학석사 학위논문을 인준함.

2014년 2월 21일



주 심 이학박사 남택정 (인)

위 원 이학박사 류은순 (인)

위 원 약학박사 최재수 (인)

목 차

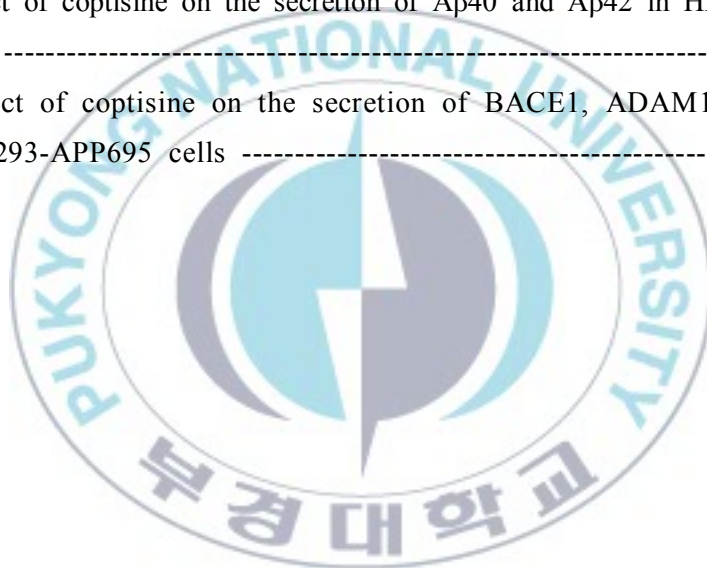
LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 실험방법	6
1. 재료	6
2. 시약 및 기기	6
2-1. 시약	6
2-2. 기기	7
2-3. 실험 세포주	7
3. 실험방법	9
3-1. HEK293-APP695 세포주의 배양	9
3-2. HEK293-APP695 세포에서의 A β 분비 저해 평가	9
3-2-1. 세포독성 측정	9
3-2-2. Coptisine의 A β 분비 저해에 대한 효과	9
3-2-3. Western blot 을 통한 발현 분석	10
4. 통계처리	11

III. 결과	12
1. HEK293-APP695 세포에 대한 세포독성 평가	12
2. HEK293-APP695 세포에서 A β 분비 저해에 대한 평가	14
2-1. Alkaloid 화합물들의 HEK293-APP695 세포에서 A β 분비 저해에 대한 효과	14
2-2. Coptisine의 HEK293-APP695 세포에서 A β 분비 저해에 대한 효과	18
3. HEK293-APP695 세포에서 Coptisine이 BACE1, ADAM10 및 PS1 단백질 발현에 미치는 영향	22
IV. 고찰	25
V. 요약	31
VI. 참고문헌	33



LIST OF FIGURES

Figure		Page
Fig. 1. Structures of alkaloids from Coptidis rhizoma	-----	8
Fig. 2. Cytotoxicity of alkaloids in HEK293-APP695 cells	-----	13
Fig. 3. Effects of alkaloids from Coptidis rhizoma on the secretion of A β 40 and A β 42 in HEK293-APP695 cells	-----	16
Fig. 4. Effect of coptisine on the secretion of A β 40 and A β 42 in HEK293-APP695 cells	-----	19
Fig. 5. Effect of coptisine on the secretion of BACE1, ADAM10 and PS1 in HEK293-APP695 cells	-----	23



ABBREVIATIONS

AD	: Alzheimer's disease
ADAM10	: A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
A β	: amyloid beta peptide
BACE1	: Beta-secretase 1
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: Deuterated dimethylsulfoxide
FBS	: fetal bovine serum
Fig.	: Figure
HEK293 cells	: Human embryonic kidney 293 cells
HRP	: horseradish peroxidase
PVDF	: polyvinylidene fluoride
PS1	: Presenilin 1

Effect of coptisine on expression of amyloid beta peptide in HEK293-APP695 cells

Jeong Su Byeon

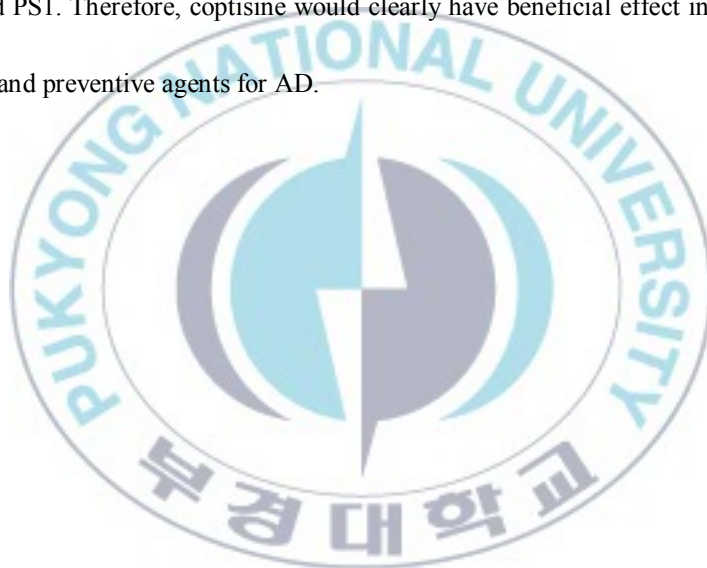
Department of Food and Life science, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is regarded as the main cause of dementia and characterized by neurodegenerative disorder. Amyloid-beta ($A\beta$) appears in the brain of AD, it's hallmarks in AD pathology and is typically deposited as senile plaques in cerebral. $A\beta$ is generated from amyloid precursor protein (APP) by proteases, β -secretase and γ -secretase. β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, called BACE1, it cleaves at the N-terminal domain of APP to release sAPP β and C99, and C99 converted by γ -secretase to release diverse forms of $A\beta$. On the other hand, α -secretase, cleaves APP in the center of the $A\beta$ domain, thus it prevents the generation of $A\beta$. Although the exact mechanism is unknown, $A\beta$ is strongly involved in the etiology of all forms of AD. Thus, compounds that enhance α -secretase, but inhibit β - or γ -secretase activity, have therapeutic potential in the treatment of AD. Coptidis rhizoma (*C. rhizoma*) and its isolated alkaloids such as berberine, coptisine, palmatine, jateorrhizine, epiberberine, and groenlandicine

has been reported to exhibit anti-AD and antioxidant activity through multiple pharmacological effects including cholinesterase inhibitory activity, as well as ONOO⁻, and ROS scavenging activity. It has also been demonstrated that berberine, a major alkaloid from *C. rhizoma* can reduce the production of A β , which plays a critical role in the pathogenesis of AD. Also, berberine, the potent alkaloid on A β production has similar chemical structure with other minor alkaloids from *C. rhizoma*. However, despite these chemical structure similarity, the inhibitory effect on A β secretion of minor alkaloids have not been investigated. Therefore the effect of six alkaloids of A β expression were evaluated using HEK293 cells stably transfected with APP695 and its activity was compared with their structure activity relationship. Among these alkaloids, berberine, epiberberine, groenlandicine, and coptisine significantly exhibited A β inhibitory effect and also has common structure with dioxymethylene group. On the other hand, palmatine and jateorrhizine showed low inhibition of A β peptide on HEK293-APP695 cells and the absence of dioxymethylene group in their structure further helps to predict the structure activity relationship. This result suggests that the presence of dioxymethylene group may attribute for the inhibitory activity of A β expression. Among these minor alkaloids, coptisine exhibited strong inhibition of A β expression. So, the focus of our investigation was the effect of coptisine on A β expression as well as on enzymes responsible in its cleavage using HEK293-APP695 cells. As a result, coptisine dose-, and time- dependently reduced the A β and the expression of β -, and γ -secretase in

HEK293-APP695 cells. Therefore, coptisine from *C. rhizoma* seems to have a BACE inhibitor as well as PS1 inhibitor-like activity that β -, and γ -secretase induced APP processing and A β secretion. These results indicate that minor alkaloids such as epiberberine, groenlandicine, and coptisine have strong potential of inhibition and prevention of AD. In particular, coptisine may be a promising anti-AD agent due to its potent inhibitory activity of A β by inhibiting the expression of BACE1 and PS1. Therefore, coptisine would clearly have beneficial effect in the development of therapeutic and preventive agents for AD.



I. 서론

최근 고령화 사회로 접어든 이래로 노년층의 증가와 더불어 노인성 질환의 유병률도 크게 증가하는 추세이며, 대표적인 노인성 질환이라고 할 수 있는 치매 (dementia)환자가 급증함에 따라 치매의 예방과 치료에 대한 사회적인 관심도 높아지고 있다. 치매는 뇌의 신경세포 (neurons)가 죽거나 제 기능을 못할 때 발생하는 다양한 질병 및 상태를 의미한다. 신경세포의 기능 장애 또는 신경세포의 사멸은 개인의 기억이나 행동, 명료하게 사고하는 능력의 변화를 야기하고, 이러한 뇌의 변화는 결국 걷거나 삼키는 등의 기본적인 신체 기능 수행 마저도 어렵게 만든다. 치매의 여러 유형 중에서 알츠하이머 질환 (Alzheimer disease; AD)은 치매 환자의 60%에서 80%를 차지하는 가장 흔한 질환이며, 그 외에 혈관성 치매 (vascular dementia), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루이 소체 치매 (dementia with Lewy body), 헌팅톤병 (Huntington's disease) 등이 있다 (Thies and Bleiler, 2013).

AD은 가장 보편적인 신경퇴행성 질환으로 인지기능과 기억력에 손실을 주는 특징을 가진다 (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2002). AD 환자의 뇌에서는 병리학적으로 노인반 (senile plaque)과 신경섬유다발 (neurofibrillary tangle)이 관찰되는데 (Triaboschi *et al.*, 2004), 노인반은 주로 신경세포의 외부에 아밀로이드 베타 펩타이드 (amyloid beta peptide; A β)가 축적되면서 생성되고, 신경섬유다발은 과인산화된 tau protein로 부터 형성된다 (Takashima *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1999). AD의 정확한 원인과 메커니즘에 대해서는 현재까지 밝혀진 것이 없지만, 수많은 연구 결과들은 A β 또는 tau protein이 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하고 있다 (Goedert and Spillantini, 2006; Golde *et al.*, 2006). A β 는

일생 동안 뇌를 비롯해 인체 다른 조직에서 소량씩 생성되지만 빠른 속도로 분해되기 때문에 인체에 쌓이지 않는다. 반면 AD 환자에서는 A β 가 비정상적으로 많이 생성되며 쉽게 분해되지 않고 축적되면서 apoptosis와 염증, 칼슘 항상성 방해, 산화적 스트레스, 보체 (complement)의 활성화 등을 통해 신경독성 (neurotoxicity)을 유도한다. 따라서 A β 의 생성 또는 A β 로 유도되는 세포 독성을 감소시키는 것은 AD 치료의 주요한 전략으로 고려되어지고 있다 (O'Brien and Wong, 2011; Takaomi and Malcolm, 2012; Kurz and Perneczky, 2011). A β 는 type-1 transmembrane glycoprotein인 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein; APP)이 가수분해됨으로써 생성되는 40-42개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이 중 A β 42가 신경세포에 더 큰 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Barril *et al.*, 2001). A β 는 두 개의 다른 경로로부터 생성될 수 있는데 우선, 아밀로이드 생성 경로 (amyloidogenic pathway)에서 APP는 β -secretase에 의해 N-terminal domain 부분에 있는 두 개의 활성화 site가 절단되어 soluble amyloid precursor protein β (sAPP β)와 membrane-bound C-terminal fragment (CTF β)가 생성된다. CTF β 는 γ -secretase (Presenilin-1; PS1)에 의해 연속적으로 분해되어 다양한 형태의 A β 와 APP intracellular domain (AICD)을 생성한다. 반면, 비아밀로이드 생성 경로 (non-amyloidogenic pathway)에서 APP는 α -secretase와 γ -secretase에 의해 연속적으로 분해되어 α soluble amyloid precursor protein α (sAPP α), p3 peptide, AICD를 생성한다 (Lichtenthale and Haass, 2004; Mattson, 2004). BACE1이라고 불리는 β -secretase는 aspartyl protease로 A β 생성의 속도 제한 단계에서 중요한 효소라고 알려져 있으며 (De Strooper 2003; Zhou *et al.*, 2011; Sinha and Lieberburg, 1999), BACE1 knockout 생쥐에서 기초 신경 및 생리 기능의 결손을 나타내지 않았다. 이것으로 볼 때 BACE1 저해제는 인체에도 무해할 것으로 생각된다 (Luo *et al.*, 2001, Cai *et al.*, 2001). γ -secretase는 presenilin (PS) 1 또는 2,

nicastrin, presenilin enhancer 2 그리고 anterior pharynx defective 1 을 포함하는 단백질 복합체이다 (Wolfe *et al.*, 2008). 한편 α -secretase는 대부분 ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) family에 속하는 효소로 ADAM-17 (TACE), ADAM-10, and ADAM-9을 포함하며 (Kojro and Fahrenholz, 2005), APP의 A β domain 중앙 부분을 가수분해하여 A β 생성을 감소시키는 역할을 한다고 알려져 있다 (Buxbaum *et al.*, 1998). 이와 같이 APP의 분해 및 발현 조절에 관여하는 물질에 대한 연구는 A β 생성이나 축적에 대한 세포 경로 조사를 통한 AD의 잠재적인 치료 및 예방의 표적으로 이용 될 수 있을 것이다 (Haugabook *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2013).

Coptisine은 황련 (*Coptis chinensis* (Franch))으로부터 분리된 alkaloid이며, 항진균활성 (Kong *et al.*, 2009), 항산화 및 심장보호효과 (Gong *et al.*, 2012), 파골세포의 분화 저해기능 (Lee *et al.*, 2012), 쥐 대동맥에서의 혈관 이완 작용 (Gong *et al.*, 2012), 항콜린에스테라제 활성과 peroxynitrite 소거 및 ROS 소거 활성 (Jung *et al.*, 2009), 항고혈당 및 HepG2 세포에서의 세포독성 효과 (Chen *et al.*, 2012), 항경련제 및 신경안정제 효과(Hiller *et al.*, 1998), monoamine oxidase type A 저해 효과 (Ro *et al.*, 2001), 점막보호활성 (Hirano *et al.*, 2001), rat lens aldose reductase 저해 효과 (Jung *et al.*, 2008), 항간암 및 항백혈병 효과 (Lin *et al.*, 2004), 항증식 활성 (Hara *et al.*, 2005), 하이드록시 라디칼 소거에 효과가 있다고 연구되어졌다 (Jang *et al.*, 2009).

황련에서 분리된 alkaloid 화합물에는 coptisine 외에도 palmatine, berberine, jatrorrhizine, epiberberine, groenlandicine과 같은 다양한 종류의 화합물들이 포함된다 (Fan *et al.*, 2012). 이들 alkaloid는 인지능력 향상 및 콜린에스테라제 억제와 같은 AD와 관련된 증상을 완화시키는데 효과를 나타낼 것이라고 보고되어있다 (Asai *et al.*, 2007). 특히, berberine은 의학적으로 중요한

isoquinoline alkaloid 화합물로 항콜린에스테라제 효과, 콜레스테롤과 glucose 수준 감소, 항염증, 신경보호 및 신경영양 효과 등의 여러 약리학적 작용을 하는 것으로 알려져 있고, AD 관련 주요 활성 성분으로 광범위하게 연구되고 있는 화합물로 최근 연구에서는 berberine이 APP695 유전자가 과잉 발현된 HEK293 세포주에서 BACE1 활성 저해를 통해 A β 의 발현을 감소시킨다고 보고되었다 (Zhu *et al.*, 2011). 또한 황련에서 분리된 다른 alkaloid 화합물들도 생리 활성성분으로 잘 알려진 berberine과 매우 유사한 구조를 가지고 있지만, berberine 외에 다른 alkaloid 화합물들의 A β 저해 효과에 대해서는 아직까지 연구되지 않았다. 이에 본 연구의 목적은 황련으로부터 분리된 alkaloid 화합물들의 A β 발현량에 대한 효과를 구조적 상관관계에 근거하여 검토하고, 그 중 가장 효과있는 화합물이었던 coptisine에 대한 자세한 A β 저해 효과와 이와 관련된 메커니즘을 확인하고자 하였다. 황련으로부터 분리된 berberine, epiberberine, groenlandicine, jateorrhizine, palmatine, coptisine의 A β 저해효과를 확인하기 위해 HEK293 세포에 APP695 유전자를 transfection시켜 APP를 안정하게 발현시킨 HEK293-APP695 세포주를 사용하여 각각의 화합물의 농도에 따른 독성을 MTT 방법으로 확인하였다. 그리고 여섯 개의 alkaloid 화합물들의 효과를 비교하기 위해 HEK293-APP695 세포에 화합물을 24시간과 48시간 동안 처리한 뒤, ELISA kit (Wako Pure Chemical industries, Osaka, Japan)로 배지 상층액의 A β 수준을 측정하였다. 그 중 A β 를 가장 효과적으로 저해시켰던 coptisine을 선택하여 농도 및 시간에 따른 A β 발현량을 조사하였다. 뿐만 아니라 coptisine의 A β 저해효과가 어디에서 기인하는 것인지 알아보기 위해 A β 조절에 대한 검사를 수행하여, western blot 분석방법을 통해 APP로부터 A β 가 생성될 때 관여하는 효소인 ADAM10, BACE1, 그리고 PS1 단백질 발현에 대한 효과를 알아보았다. 따라서 본

연구는 황련으로부터 분리한 **coptisine**의 HEK293-APP695 세포에서의 A β 분비
저해에 대한 효과를 평가하여 알츠하이머 질환을 치료하고 예방하기 위한
기능성 식품 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다.



II. 실험재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 화합물들은 Jung *et al.* (2008)의 황련 뿌리줄기 (The rhizome of *C. chinensis*)로 부터 분리한 berberine, epiberberine, groenlandicine, jateorrhizine, palmatine, coptisine을 사용하였으며, 그 구조는 Figure 1 에서 나타내었다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Fetal bovine serum (FBS)은 GenDEPOT (Barker, TX, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)은 BioWhittaker® (Walkersbille, MD, USA)에서 구입 하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Trypsin-EDTA solution, Penicillin-Streptomycin mixture solution, RIPA Buffer는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, protein inhibitor cocktail은 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)에서 구입하였다. Western blot 용 1차 항체는 anti-BACE-1은 R&D systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서, anti-ADAM 10, anti-Presenilin-1, anti- β -actin과 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies는 Millipore co. (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P)은 Millipore Co. (Billerica, MA, USA)에서 구입하였으며, Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate는 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)에서, X-ray film은 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. β

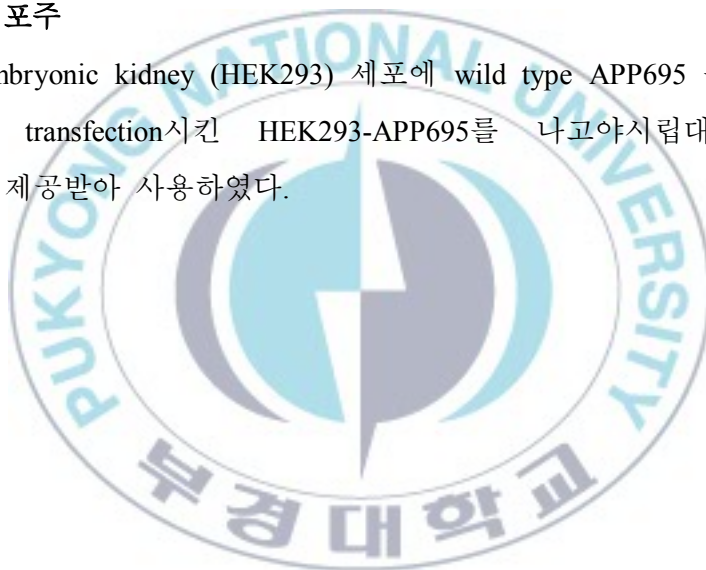
Amyloid (40), β Amyloid (42) ELISA kit는 Wako Pure Chemical (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

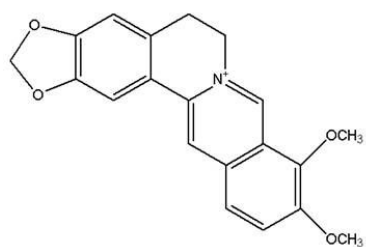
2-2. 기기

HEK293-APP695 세포에서의 세포독성과 $A\beta$ 발현량의 측정은 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 하였다.

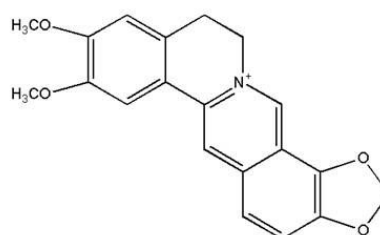
2-3. 실험 세포주

Human embryonic kidney (HEK293) 세포에 wild type APP695 유전자가 과잉 발현되도록 transfection시킨 HEK293-APP695를 나고야시립대학의 정차균 교수로부터 제공받아 사용하였다.

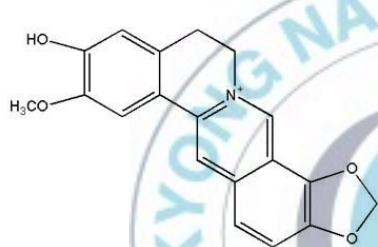




Berberine



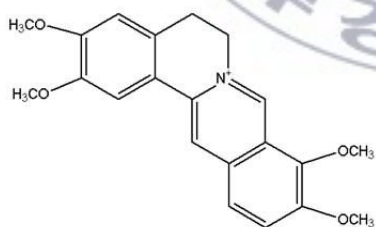
Epiberberine



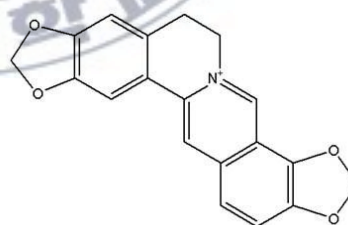
Groenlandicine



Jateorrhizine



Palmatine



Coptisine

Fig. 1. Structures of alkaloids from *Coptidis rhizoma*

3. 실험방법

3-1. HEK293-APP695 세포주의 배양

HEK293-APP695 세포를 10 % heat-inactivated FBS, 100 µg/ml penicillin과 100 Unit/ml streptomycin을 포함하고 있는 DMEM 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂/air mixture 조건에서 배양하였다.

3-2. HEK293-APP695 세포에서 Aβ 생성 저해 평가

3-2-1. 세포독성 측정

HEK293-APP695 세포에 대한 독성은 MTT assay 방법으로 분석하였다. HEK293-APP695 세포를 96-well plate 에 well 당 1×10^4 세포가 되도록 분주하였다. 24시간 후 세포의 부착을 확인한 뒤 각 농도 별의 시료가 포함된 serum-free DMEM을 각 well 에 100 µl씩 분주하였다. 48시간 배양 후 100 µl의 MTT 용액 (0.5 mg/ml in PBS)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 2시간 동안 배양 후 배양액을 제거하고 100 µl의 DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 용해시키고 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 시료를 처리하지 않은 대조군과 대비하여 계산하였으며, 결과는 mean $\pm$ standard deviation ($n=3$)으로 나타내었다.

3-2-2. Coptisine의 Aβ 분비 저해에 대한 효과

HEK293-APP695 세포로부터 분비되는 Aβ 40과 42의 양은 β Amyloid (40),

(42) ELISA kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 각각 측정하였다. HEK293-APP695 세포를 60 mm dish 에 7×10^5 세포가 되도록 분주하였다. 24시간 후 세포의 부착을 확인한 뒤 각 농도 별의 시료가 포함된 배양액을 각 dish에 5 ml씩 처리하였다. 배양기에서 48시간 배양 후 상층의 배양액 1 ml를 회수하여 $10,000 \times g$, 4°C 에서 15분 동안 원심 분리한 뒤 그 중 상층액을 실험에 사용하였다.

A β 40 또는 A β 42 특이적 monoclonal antibody가 coating 된 Plate에 표준용액 (Human β -Amyloid (1-40, 1-42), 100pmol/L)과 샘플을 각각 100 μl 씩 넣고 4°C 에서 밤새 배양하였다. 다음날 내용물을 제거하고 세척액으로 5회 세척한 뒤 HRP conjugation된 A β 특이적 antibody를 첨가하여 4°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 내용물을 제거하고 5회 세척한 뒤 tetramethylbenzidine (TMB)기질액을 100 μl 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 stop solution 100 μl 을 첨가하여 반응을 종결시켰고 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로 표준점량곡선을 작성하여 A β 의 농도를 계산하고, 시료를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 상대적인 분비량을 평가하였다. 결과는 mean $\pm$ standard deviation ($n=2$)으로 나타내었으며, 단백질 정량은 Bradford assay를 통해 시행한 후 보정하였다.

3-2-3. Western blot 을 통한 발현 분석

화합물의 A β 저해 경로를 조사하기 위해서 HEK293-APP695 세포에 샘플을 농도 별로 처리한 뒤 48시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고 lysis buffer를 넣고 scrapper로 cell을 모

은 뒤 4℃에서 30분 동안 반응시킨 후 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 세포 내 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 정량하였다.

단백질을 gel buffer (Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끓여 변성시킨 후, 20 µg의 단백질을 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 wet transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해 blocking solution (5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1 % Tween-20, pH 7.4 (TBST buffer))으로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 TBST buffer에 희석한 1차 항체 (anti-AMAM10, anti-BACE1, anti-PS1, and anti-β-actin)를 4℃에서 밤새 반응시켰다. ADAM10, BACE1, PS-1의 발현 양은 2.5 % skim milk in TBST 에 희석시킨 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시킨 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 확인하였다. 분자량은 full-range rainbow molecular weight markers (Amersham)을 이용하여 확인하였다. Western blotting data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하였다.

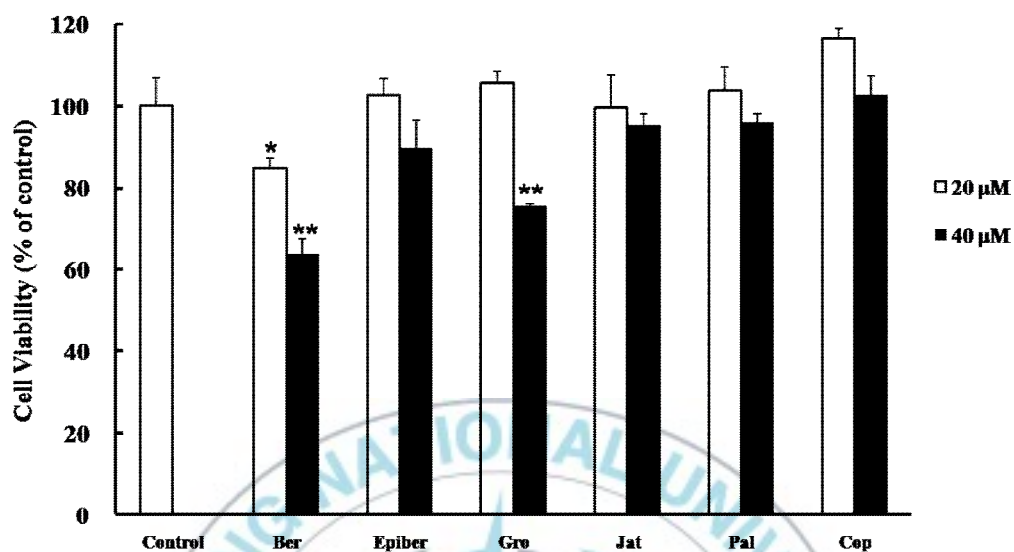
4. 통계처리

모든 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 SPSS를 이용하여 Student *t*-test로 검정하였다.

III. 결과

1. HEK293-APP695 세포에 대한 세포독성 측정

HEK293-APP695 세포에 대한 황련 alkaloid 화합물들의 세포독성은 MTT assay를 통해 측정하였으며, 이는 대조군에 대한 백분율로 값을 평가하였다. HEK293-APP695 세포에 황련으로부터 분리되었다고 보고된 berberine, epiberberine, groenlandicine, jateorrhizine, palmatine, coptisine 을 20, 40 μ M 농도로 48시간 동안 처리하였다. 세포독성을 측정한 결과 20, 40 μ M의 농도에서 berberine은 각각 84.69 ± 2.41 , $63.71 \pm 3.82\%$ 의 세포생존율을 보였고, epiberberine은 각각 102.55 ± 3.93 , $89.49 \pm 6.89\%$ 의 세포생존율을 보였으며, groenlandicine은 각각 105.63 ± 2.72 , $75.32 \pm 0.59\%$ 의 세포생존율을 나타냈다. 그리고 20, 40 μ M의 농도에서 jateorrhizine은 각각 99.50 ± 8.09 , $95.27 \pm 2.87\%$ 의 세포생존율을 coptisine은 각각 116.48 ± 6.74 , $102.55 \pm 4.56\%$ 의 세포 생존율을, palmatine은 각각 103.58 ± 5.95 , $96.00 \pm 2.11\%$ 의 세포 생존율을 나타냄으로써 (Figure 2), berberine은 20, 40 μ M 농도에서 groenlandicine은 40 μ M 농도에서 세포생존율이 감소하는 것을 관찰하였다. 따라서 비교적 독성이 적은 20 μ M 농도를 사용하여 alkaloid 화합물들의 A β 분비 저해 효과를 비교하였다.



Ber : berberine; Epiber : epiberberine; Gro : groenlandicine;
Jat : jateorrhizine; Pal : palmatine; Cop : coptisine

Fig. 2. Cytotoxicity of alkaloids in HEK293-APP695 cells

HEK293-APP695 cells were treated with the alkaloids from *Coptidis rhizoma* at indicated concentrations. After 48 h, cell viability was measured by MTT assay. The values are expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicates significant differences from the untreated group.

2. HEK293-APP695 세포에서 A β 분비 저해에 대한 평가

2-1. Alkaloid 화합물들의 HEK293-APP695 세포에서 A β 분비 저해에 대한 효과

HEK293-APP695 세포에 alkaloid 화합물들을 각각 20 μ M 농도로 24시간과 48시간 동안 처리한 후 배양액으로 분비된 A β 40 및 A β 42 의 양을 ELISA kit 를 통해 측정하였으며 그 결과는 Figure 3 에서 나타내었다.

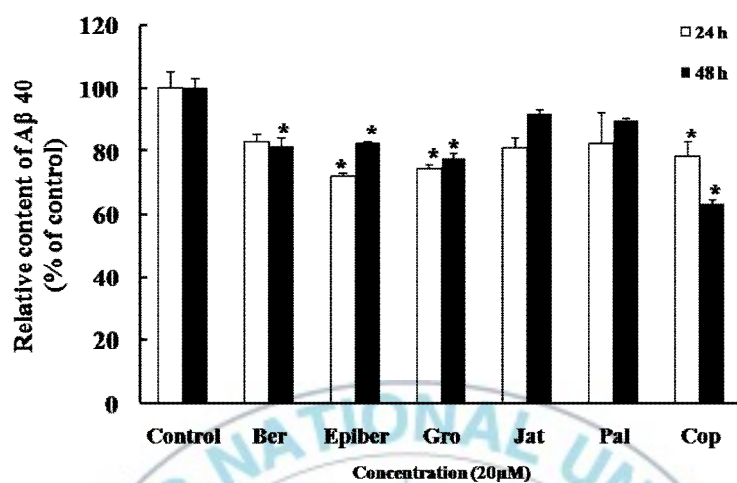
먼저 A β 40 발현량을 측정한 결과 berberine, epiberberine, Groenlandicine, 그리고 coptisine 이 대조군과 비교하여 유의미하게 감소한 것으로 나타났다. 특히 coptisine을 48시간 동안 처리했을 때 A β 40 발현량이 크게 감소하였다. 또한 A β 42의 발현량을 조사한 결과에서도 마찬가지로 berberine과 epiberberine, groenlandicine, 그리고 coptisine이 A β 42의 발현량을 유의미하게 감소시켰으며, 이 중 48시간에서 coptisine 이 A β 42를 감소시키는 효과가 큰 것으로 나타났다. 화합물들을 48시간 동안 처리하였을 때 berberine은 A β 40과 A β 42의 분비량을 각각 81.82 ± 2.40 , $78.73 \pm 0.68\%$ 로 감소시켰으나 이 농도에서 berberine은 세포독성을 나타내었다. Epiberberine은 세포독성이 없는 농도에서 A β 40과 A β 42의 분비량을 각각 82.67 ± 0.56 , $79.11 \pm 1.12\%$ 감소시켰으며, groenlandicine은 각각 77.78 ± 1.48 , $87.37 \pm 0.56\%$ 감소시켰고, jateorrhizine은 91.89 ± 1.20 , $90.40 \pm 0.30\%$ 로 감소시켰으며, palmatine은 각각 89.76 ± 0.70 , $90.89 \pm 1.08\%$ 로 coptisine은 각각 63.14 ± 1.26 , $57.73 \pm 1.65\%$ 로 감소시켰다. 이 결과를 바탕으로 alkaloid 화합물들의 구조를 비교했을 때 A β 저해 효과가 유의미하게 나타난 berberine을 비롯하여 epiberberine, groenlandicine, coptisine 에는 공통적으로 methylenedioxy 구조가 있는 것이 확인되었다. 반면에 methylenedioxy 구조가 없는 화합물인 jateorrhizine과 palmatine에서는 A β 저해 효과가 크게 나타나지 않았다. 따라서 alkaloid 화합물들의 A β 발현량 감소 효과는 methylenedioxy

구조에 의한 것으로 생각되어진다.

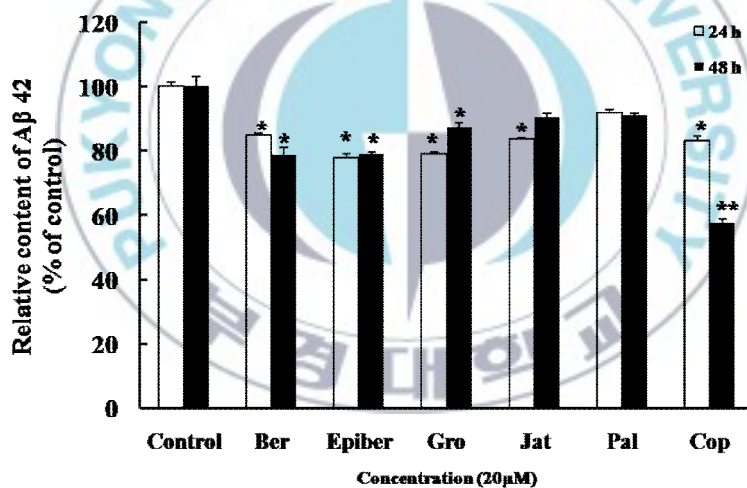
하지만, berberine에 대한 A β 저해 효과는 이미 연구되었기 때문에, 그 외에 epiberberine, grolandicine, coptisine 중 A β 40과 A β 42를 가장 효과적으로 감소시켰던 화합물인 coptisine을 선택하여 자세한 A β 저해 효과와 이와 관련된 메커니즘을 확인해보았다.



(A)



(B)



Ber : berberine; Epiber : epiberberine; Gro : groenlandicine;
Jat : jateorrhizine; Pal : palmatine; Cop : coptisine

Fig. 3. Effects of alkaloids from *Coptidis rhizoma* on the secretion of Aβ40 and Aβ42 in HEK293-APP695 cells

HEK293-APP695 cells were incubated with alkaloids from *Coptidis rhizoma* at same concentration (20 μ M) from 24 h to 48 h. Secreted A β in the medium of HEK293-APP695 cells were evaluated by ELISA kit. Values are the mean $\pm$ SD of two independent experiments. Control was untreated group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicates significant differences from the untreated group.

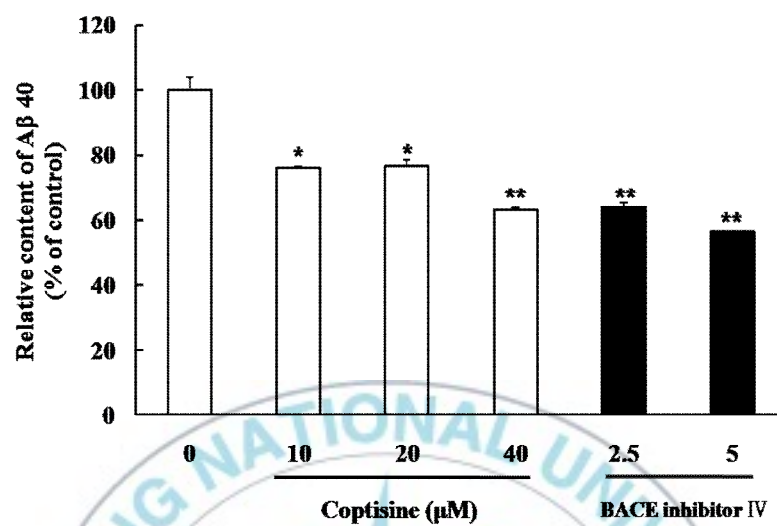


2-2. Coptisine의 HEK293-APP695 세포에서 A β 의 분비 저해에 대한 효과

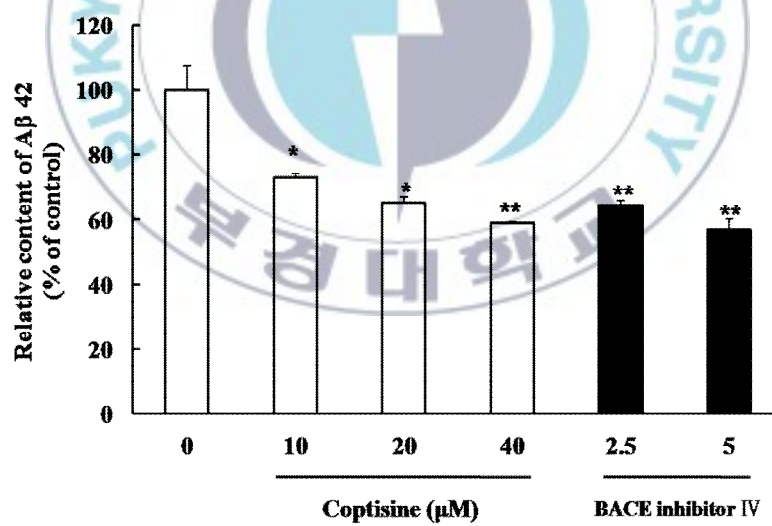
HEK293-APP695 세포에 Coptisine을 각각 10, 20, 40 μ M 에서 48시간 동안 처리하였을 때와 40 μ M 농도로 12시간에서 48시간 동안 처리하였을 때 분비된 A β 의 양을 ELISA kit를 통해 측정하였으며 그 결과는 Figure 4 에서 나타내었다. Coptisine은 세포독성이 없는 농도에서 A β 40과 A β 42의 분비량을 유의미하게 감소시키는 경향을 나타내었는데, 10, 20, 40 μ M 농도에서 A β 40를 75.92 ± 0.32 , 76.73 ± 1.58 , $62.96 \pm 0.64\%$ 로 감소시켰으며 A β 42는 72.90 ± 1.15 , 65.05 ± 1.97 , $58.72 \pm 0.77\%$ 로 감소시켰다. 즉, coptisine은 40 μ M농도에서 A β 40과 A β 42의 분비량을 대조군보다 각각 37%, 41% 감소시켰다. Positive control로 사용한 BACE inhibitor IV 또한 A β 분비량을 대조군과 비교하여 유의미하게 감소시키는 것을 확인하였으며, 2.5, 5 μ M 농도에서 A β 40를 63.75 ± 1.49 , $56.30 \pm 0.21\%$ 로 감소시켰고, A β 42는 64.37 ± 1.45 , $56.82 \pm 3.36\%$ 로 감소시켰다.

또한 coptisine을 40 μ M 에서 시간별로 처리하였을 때 coptisine 처리 시간에 비례하여 A β 40과 A β 42의 분비량을 감소시키는 경향을 내었는데, 12시간, 24시간, 48시간에서 각각 A β 40을 88.49 ± 4.09 , 71.15 ± 1.58 , $60.44 \pm 0.28\%$ 로 감소시켰으며, A β 42는 83.45 ± 8.41 , 71.47 ± 9.90 , $59.51 \pm 2.37\%$ 로 감소시켰다. 즉, coptisine 은 농도와 시간 의존적으로 A β 의 분비를 감소시키는 결과를 나타내었으며, 이것은 화합물이 세포에서 A β 생성에 관여하는 효소에 영향을 주었기 때문으로 생각되어진다.

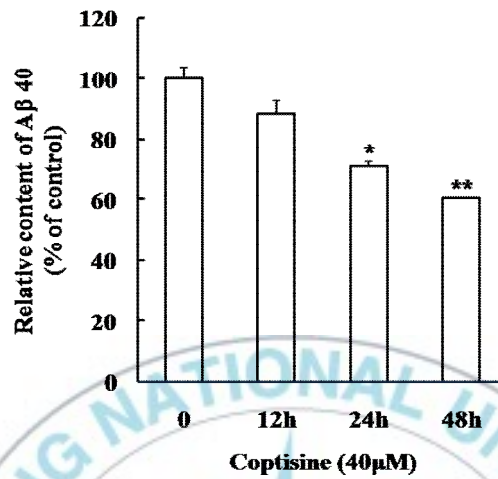
(A)



(B)



(C)



(D)

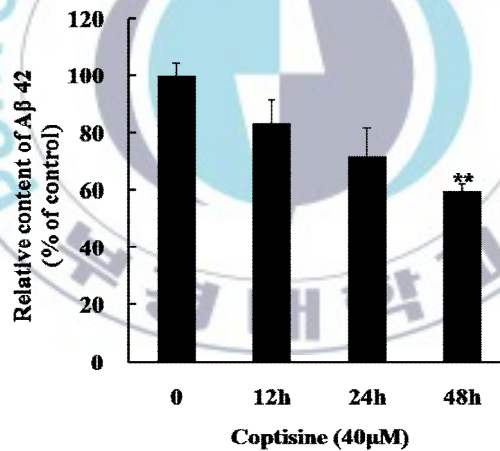


Fig 4. Effect of coptisine on the secretion of Aβ40 and Aβ42 in HEK293-APP695 cells
Secreted Aβ in the medium of HEK293-APP695 cells were evaluated by ELISA kit. (A) Coptisine (10 μM, 20 μM and 40 μM) can decrease the expression of Aβ40 and (B) Aβ42 in a dose-dependent manner for 48 h of incubation. (C) Coptisine (40 μM) can decrease

the expression of A β 40 and (D) A β 42 from 12 to 48 h of incubation. Values are the mean $\pm$ SD of two independent experiments. Control was untreated group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicates significant differences from the untreated group.



3. Coptisine이 HEK293-APP695 세포에서 BACE1, ADAM10 및 PS1 단백질 발현에 미치는 영향

Coptisine이 A β 분비량을 농도 및 시간 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였으므로 화합물의 A β 의 저해 경로를 확인하기 위해 western blot 분석방법을 수행하였다. A β 가 감소되었다는 것은 세포내에서 BACE1이나 PS1 효소의 발현량이 감소하였거나, ADAM10 효소의 발현량이 증가하였다는 것을 의미한다. 이것을 확인하고자 ADAM10, BACE1, PS1 단백질 발현량을 다음과 같이 연구하였다. 먼저, HEK293-APP695 세포에 화합물을 10, 20, 40 μ M 농도로 48시간 동안 처리한 뒤, western blot 방법으로 세포 단백질의 BACE1, ADAM10과 PS1 단백질 발현량을 관찰하였고, positive control로써 BACE inhibitor IV를 처리했을 때 BACE1 발현량 또한 확인하였다. 그리고 40 μ M 농도를 시간별로 처리하였을 때 단백질의 변화량을 관찰하여 그 결과는 Figure 5 에서 나타내었다. 그 결과 coptisine을 농도별로 처리하였을 때 ADAM10의 발현량은 별다른 변화가 나타나지 않았으며, BACE1 과 PS1 의 발현량은 coptisine의 농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. Positive control로 사용한 BACE inhibitor IV를 처리하였을 때에도 BACE1 발현량이 대조군에 비해 감소되는 경향을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 시간에 따른 발현량을 관찰한 결과에서도 마찬가지로 BACE1 과 PS1의 발현량이 coptisine의 처리 시간에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 coptisine은 A β 생성 과정 중 BACE1과 PS1의 발현량을 저해함으로써, A β 생성을 감소시키는 것으로 사료된다.

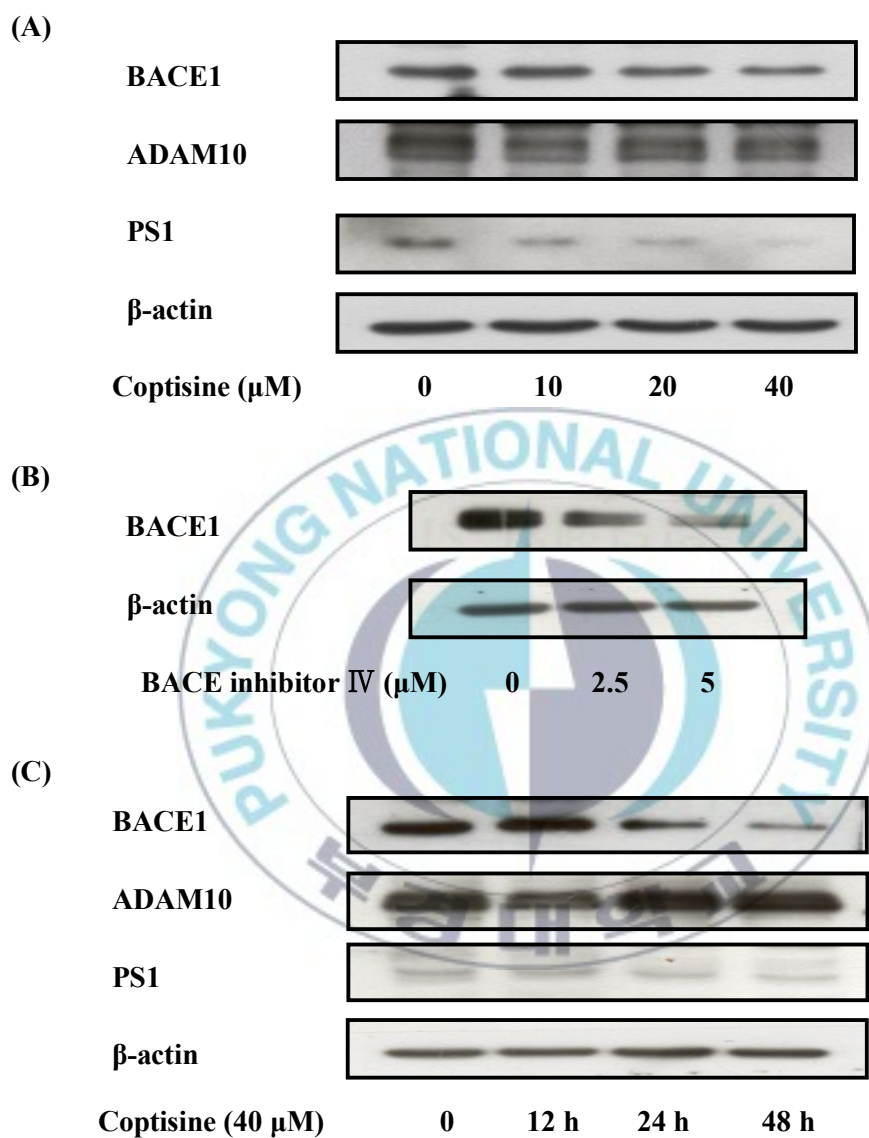


Fig 5. Effect of coptisine on the expression of BACE1, ADAM10 and PS1 in HEK293-APP695 cells

(A) Coptisine (10 μM , 20 μM and 40 μM) can decrease the expression of BACE1 and

PS1 in a dose-dependent manner for 48 h of incubation. (B) BACE inhibitor IV (2.5 μ M, and 5 μ M) can decrease the expression of BACE1 for 24 h of incubation. (C) Coptisine (40 μ M) can decrease the expression of BACE1 and PS1 from 12 to 48 h of incubation.



IV. 고찰

AD는 노인에게서 주로 발생하는 신경퇴행성 장애로 전 세계적으로 수많은 사람들에게 영향을 주고 있다. 알츠하이머 질환은 기억력과 인지 기능이 저하되는 특징을 가지며, 병리학적으로는 신경섬유다발과 노인반이 생성되는 특징을 가진다 (Hardy and Higgins, 1992). AD가 발병하는 정확한 원인에 대해 밝혀진 것은 없으나 현재 AD 환자들의 기억력 손상의 원인은 콜린 가설 (cholinergic hypothesis)과 아밀로이드 증폭 가설 (amyloid cascade hypothesis)이 유력한 가설로써 주목받고 있다 (Parihar and Hemnani, 2004). 많은 사람들이 AD를 치료하고 예방하기 위해 콜린성 가설에 근거하여 콜린 결핍 (cholinergic deficit) 과 신경전달을 방해하는 acetylcholinesterase (AChE) 및 butyrylcholinesterase (BChE) 저해제를 개발하는데 중점을 두었다 (Rao *et al.*, 2007). AD 치료를 위한 약으로 이용되고 있는 AChE 저해제로는 Donepezil hydrochloride (Aricept), Rivastigmine (Exelon) (Jann, 2000), 그리고 Galantamine (Reminyl) (Zarosky *et al.*, 2003)가 있으며, 이 중에서 Donepezil은 가장 강력한 AChE 저해제로 가벼운 인지장애를 가진 환자들의 콜린 활성을 강화시키는데 이용되고 있다 (Saykin *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004). 하지만 이러한 저해제는 위장관 장애와 서맥 등의 심각한 부작용을 야기할 수 있으며 (Hsieh *et al.*, 2008), 이들 약물들은 AD를 야기하는 근본적인 신경병리학적인 원인에 대해서는 다루지 않고 겉으로 드러난 증상을 치료하는 것에만 이용되고 있다 (Kasa *et al.*, 1997; Gualtieri *et al.*, 1995). 따라서 최근에는 아밀로이드 증폭 가설에 따라 뇌에 A β 가 축적되는 것이 AD가 발병하는 주요한 요인이라고 생각되어 이것을 저해하는 약물을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

A β 축적에 기여하는 요소들은 복잡하기 때문에, 이것에 관련된 메커니즘을

연구하기 위해 많은 노력들이 있어왔다. A β 는 주로 APP가 β - 또는 γ -secretase에 의해 순차적으로 분해되어 생성되며 (Suh and Checler, 2002), 과잉으로 생성된 A β 는 신경세포의 외부에 축적되어 AD의 병리학적 특징 중 하나인 노인반을 형성한다 (Russo *et al.*, 2005). 이 때문에 AD치료를 위해 많은 제약회사 및 연구소에서 β - 또는 γ -secretase 저해제를 개발하려고 노력하였으나, 아직까지 FDA 승인을 받은 저해제는 없으며 계속해서 임상연구가 진행되고 있다 (Jarrett and Lansbury, 1993; Jarrett *et al.*, 1993; Henley *et al.*, 2009).

AD 환자의 뇌에서 BACE 효소의 발현량 증가는 A β 의 생성의 증가와 직접적인 관련성을 가지기 때문에 매우 중요하다 (Sastre *et al.*, 2006). 이러한 이유 때문에 BACE 효소는 AD의 중요한 치료 표적으로써 고려되어지고 있으나, BACE 저해제를 개발하기 위한 접근은 매우 까다롭다. 혈관 뇌 장벽 (blood brain barrier)을 통과할 수 있는 크기와 체내에서의 대사작용 또한 고려하여야 하기 때문인데, 이전에 개발되었던 peptidomimetic 저해제는 혈관 뇌 장벽을 통과하기엔 크기가 너무 컸고, 체내에서 대사작용으로 인하여 불안정했다 (Ghosh *et al.*, 2002). 또한 약물학적으로 secretase를 조절하여 A β 수준을 변화시키는 것은 환자에게 적용했을 때 매우 강한 부작용들을 동반할 수 있기 때문에 치료법으로 이용되기 어렵다. 그러므로 AD 치료를 위한 대안적인 방법으로 천연물을 이용하는 것이 주목받고 있으며 이러한 천연물들은 부작용 없이 A β 를 감소시킬 수 있을 것이라 기대되고 있다 (Essa *et al.*, 2012).

예를 들어, 병풀 (*Centella asiatica*) 추출물이 생쥐의 해마에서 A β 40과 A β 42를 감소시킨 연구 결과가 보고되어 있으며 (Dhanasekaran *et al.*, 2009), 은행나무 추출물은 작업 기억력과 정보처리 능력 향상을 향상시킬 수 있다고 보고되어 있다 (Solomon *et al.*, 2002). 또한 모란 (*Paeonia suffruticosa*) 추출물과 그것의 활성 성분은 A β 생성 저해 뿐만 아니라 아밀로이드로부터 형성된 섬유다발을

분해하는 효과를 나타내었고 (Fujiwara *et al.*, 2009), docosahezaenoic acid (DHA) 같은 오메가-3 다중불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid; PUFA)은 A β 로 유도되는 신경 독성과 아밀로이드 플라그의 형성을 감소시키는 효과를 나타내었다 (Hooijmans *et al.*, 2007). 이와 같은 연구 결과에 근거하여 천연물로부터 AD를 예방하고 치료하는데 효과를 나타내는 물질을 찾고자 황련으로부터 분리된 alkaloid 화합물들의 A β 감소 효과에 대해 조사하게 되었다.

황련 (*Coptidis rhizoma*)은 미나리아재비과의 *Coptis chinensis* (Franch)의 뿌리줄기를 의미하며, 중국 전역에 분포하는 다년생의 줄기가 없는 약초이다 (Feng *et al.*, 2008). 또한 중국에서 가장 널리 이용되고 있는 중국 전통 의학으로서 설사나 눈의 염증, 그리고 여성의 복부 통증과 같은 각종 질병이나 증후군을 치료하는데 이용되어 왔으며 (Tang *et al.*, 2009), 최근에는 황련이 항고혈당 및 항고지혈증 효과 (Wang *et al.*, 2012), 항산화 효과 (Jang *et al.*, 2009), 저콜레스테롤 활성 (Yuan *et al.*, 2006), 암세포에서 항증식 활성 (Iizuka *et al.*, 2000) 간보호 효과 (Ye *et al.*, 2009), 항고혈압효과 (Sanae *et al.*, 2001) 등의 다양한 생리활성 효과를 가지는 것으로 연구되었다. 또한 황련은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 저항성을 향상시키고, 3T3-L1 지방전구세포의 유도 및 분화를 저해하는 효과를 나타내었는데, 황련의 alkaloid 화합물 중에서 coptisine이 세포분화를 가장 효과적으로 억제하였으며, jatrorrhizine은 포도당 이용율을 크게 향상시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 했을 때 황련의 생리활성 효과가 berberine에 의해서만 나타난 것이 아니라 다른 효과 있는 alkaloid 성분들의 시너지 효과에 의한 것임을 유추해볼 수 있다 (Li *et al.*, 2010). 황련은 berberine, coptisine, palmatine, jatrorrhizine, 그리고 epiberberine (Sun *et al.*, 2006)등의 다양한 alkaloid 화합물들을 포함하고 있는데 이러한 alkaloid 화합물들은 황련 외에도 황백 (*Phellodendri Cortex*) (Ikuta *et al.*, 1998)과 골든실 (*Hydrastis canadensis* L.)의 뿌리 (Avula *et al.*,

2012), 현호색(*Corydalis yanhusuo*) 등에 포함되어 있다고 보고되었다 (Xiao *et al.*, 2011). 이들 alkaloid는 당뇨병 및 당뇨 합병증 활성화 (An and Cui, 2008), 항암 및 항 말라리아 활성화 (Kinuko *et al.*, 1999)을 가지며, 또한 PC12 세포에서 A β 로 유도된 신경 독성에 대해 보호효과를 나타내었다 (Xian *et al.*, 2013). 그 중 berberine은 황련에 가장 풍부하게 포함되어있는 화합물로서, 혈중 콜레스테롤과 중성지질을 조절하고, 혈당을 감소시키며, 인슐린 저항을 완화시켜서 당뇨병을 치료하는데 효과를 낸다고 알려져 있으며 (Shen *et al.*, 2010), aldose reductase 활성화 저해 효과 (Jung *et al.*, 2008), 항 알츠하이머 및 항산화 효과 (Jung *et al.*, 2009), HepG2 세포에서의 세포 독성 효과와 항고혈당 효과 (Chen *et al.*, 2012), indoleamine 2,3-dioxygenase 저해 효과 (Shi *et al.*, 2011)가 있는 것으로 알려져 있다. 이처럼 황련에서 분리된 주요 alkaloid 화합물인 berberine이 다양한 생리활성 기능을 나타내고, 특히 알츠하이머와 관련해서 A β 1-42 fibril 형성 저해 효과 (Yu *et al.*, 2010), A β 1-40으로 유도된 인지적 장애 개선 효과 (Zhu and Qian 2006), AD transgenic 쥐 모델에서 신경교증 (gliosis)와 인지 장애 개선 효과 (Durairajan *et al.*, 2012), PC12 세포에서 bovine adrenal tyrosine hydroxylase (TH) 활성화 저해와 도파민 함량 감소효과 (Shin *et al.*, 2000)를 비롯하여, HEK293-APP695 세포에서 BACE1 감소를 통해 A β 감소 효과를 나타내었기 때문에 berberine과 유사한 구조를 가진 coptisine 및 다른 alkaloid들도 A β 저해에 효과를 나타낼 것이라 생각되어 본 연구를 진행하게 되었다. APP 분비량이 안정하도록 transfection 시킨 HEK293-APP695 세포주에 alkaloid 화합물들을 20 μ M 농도로 처리한 뒤, A β 40 과 A β 42 발현량을 측정한 결과 berberine, epiberberine, Groenlandicine, 그리고 coptisine이 대조군과 비교하여 유의미하게 감소한 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 알칼로이드 화합물들의 구조를 비교해 보면 A β 저해 효과가 유의미하게 나타난

berberine을 비롯하여 epiberberine, groenlandicine, coptisine 에는 공통적으로 methylenedioxy 구조가 있는 것이 확인되었다. 따라서 화합물들의 A β 발현량 감소 효과는 이 구조에 의한 것으로 생각되어지며, 이와 관련하여 methylenedioxy 구조를 지닌 화합물이 A β 독성에 대해 신경보호 효과를 나타내었다는 연구결과가 보고되어져 있다 (Song *et al.*, 2011). 하지만, berberine에 대한 A β 저해 효과는 이미 연구되었기 때문에, 그 외에 epiberberine, groenlandicine, coptisine 중 A β 40과 A β 42를 가장 효과적으로 감소시켰던 화합물인 coptisine을 선택하여 자세한 A β 저해 효과에 대해 연구하였다. Coptisine은 berberine과 매우 유사한 구조를 가진 화합물로 dimethoxy기 대신에 methylene dioxy기가 치환된 구조를 가진다. 먼저, coptisine을 10, 20, 40 μ M로 농도로 처리하였을 때 A β 40과 A β 42가 모두 농도 의존적으로 감소되는 결과를 확인할 수 있었으며, 동시에 동일한 농도로 12시간에서 48시간 동안 처리하였을 때 A β 40과 A β 42가 시간의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 이와 같이 coptisine은 알츠하이머 질환의 주요 원인 중 하나인 A β 를 농도 및 시간 의존적으로 감소시키는 시키는 결과를 나타냈다. 또한 coptisine이 세포에서 어떤 메커니즘으로 A β 생성을 감소시켰는지 확인하기 위해 APP분해에 관여하는 BACE1, ADAM10, PS1 단백질 발현을 western blot으로 조사하였다. 그 결과 coptisine을 처리했을 때 BACE1 과 PS1 발현량이 감소하는 경향을 나타냈으며, ADAM10의 발현량은 큰 변화를 보이지 않았다. 따라서 coptisine은 BACE1과 PS1 발현량을 감소시킴으로써 세포에서의 A β 생성을 저해하는 것으로 생각되어진다.

정리해보면 본 연구는 황련으로 부터 분리한 alkaloid 화합물들의 A β 저해 효과를 연구하였다. A β 는 APP로부터 가수분해되어 생성되는 단백질로 신경세포에서 A β 생성이 지속적으로 증가하거나 또는 제거량이 감소하게되면

점진적으로 oligomers 와 fibrils 형태를 거쳐 plaques를 형성한다. 이후 신경세포가 손상을 입어 제 기능을 하지 못하면 결과적으로 신경퇴행성 질환으로 연결될 수 있다. 본 연구에서는 황련의 알칼로이드 화합물 중 epiberberine, groenlandicine, 그리고 coptisine이 A β 저해에 효과가 있다는 사실을 밝혔다. 이들 화합물들의 구조적 상관관계를 조사한 결과 A β 를 유의미적으로 감소시킨 화합물에는 공통적으로 methylenedioxy 구조가 있는 것이 확인되었다. 따라서 알칼로이드 화합물들의 A β 발현량 감소 효과는 methylenedioxy 구조에 의한 것으로 생각되어지며, 효과를 보인 세 화합물 중 A β 발현량 저해에 가장 큰 효과를 보였던 coptisine을 선택하여 A β 저해 및 메커니즘에 대해 자세히 연구하였다. 그 결과 coptisine은 A β 40과 A β 42를 모두 농도 및 시간 의존적으로 감소시켰고, 메커니즘을 확인한 결과 A β 생성에 관여하는 β -secretase와 γ -secretase의 발현량이 저해되었다. 따라서 coptisine은 HEK293-APP695세포에서 β -secretase와 γ -secretase 발현량 감소를 통해 A β 생성을 억제하며, 여기에는 coptisine의 구조 중 methylenedioxy 기가 관여한다고 생각할 수 있다. 앞으로 BACE1과 PS1에 관여하는 다른 전사인자에 대한 조사와 epiberberine, groenlandicine에 대한 A β 저해 메커니즘에 대해서는 좀 더 조사되어야 할 것이다. 종합해보면 본 연구는 황련에 포함된 coptisine이 AD 예방과 치료를 위한 기능성 식품 소재로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

V. 요약

AD은 가장 보편적인 신경퇴행성 질환으로 이것을 예방하고 치료하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있다. AD의 중요한 발병 원인으로 생각되어지는 A β 의 생성 또는 A β 로 유도되는 세포 독성을 감소시키는 것은 AD 치료의 주요한 전략으로 고려되어지고 있기 때문에 A β 를 타겟으로 한 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서 다양한 생리활성 기능을 가지고 있는 황련으로부터 분리된 alkaloid 화합물들의 A β 분비 저해 효과를 검색하고 이 중 효과있는 화합물에 대한 A β 생성과 A β 저해 메커니즘을 확인하고자 하였다.

1. Alkaloid 화합물들의 A β 생성 저해를 통한 항알츠하이머 효과를 조사하기 위하여 HEK293-APP695세포에 berberine, epiberberine, groenlandicine, jateorrhizine, palmatine, coptisine 을 처리하여 A β 분비량 변화를 관찰하였으며, 그 결과를 바탕으로 화합물들의 구조적 상관관계를 조사하여, methylenedioxy구조를 가진 berberine, epiberberine, groenlandicine을 비롯하여 coptisine이 A β 생성 저해에 효과가 있다는 사실을 밝혔다.

2. Coptisine의 A β 발현량 감소와 그 메커니즘에 대해 자세한 연구를 수행하고자 coptisine의 농도 및 시간에 따른 A β 분비량 변화를 조사하였다. Coptisine은 20, 40 μ M 농도에서 A β 40을 각각 23.2%, 37.1%, A β 42를 각각 34.5%, 41.3% 감소시켰다. 또한 12시간, 24시간, 48시간으로 처리하였을 때 A β 40을 각각 11.5%, 28.6%, 39.6%, A β 42를 각각 16.6%, 28.6%, 39.4% 감소시켰다. 즉, coptisine은 A β 발현량을 농도 및 시간의존적으로 감소시키는 결과를 나타내었다.

3. HEK293-APP695 세포에서 coptisine이 A β 분비를 효과적으로 저해하는 것을 확인하였으므로, 저해 메커니즘을 확인하기 위해 western blot 분석방법으로 단백질 발현량을 조사하였다. APP가 β -secretase와 γ -secretase에 의해 순차적으로 가수분해되면 A β 가 생성되고, 반면 α -secretase에 의해 가수분해되면 A β domain 중앙 부분이 절단되므로 A β 생성이 저해된다. 따라서 A β 분비 저해에 α -secretase, β -secretase, γ -secretase 중 어떤 효소가 관여하는지 확인하기 위해 각각 ADAM10, BACE1, PS1 단백질 발현을 조사하였다. 그 결과 coptisine을 처리하였을 때 BACE1 과 PS1 단백질이 농도 및 시간 의존적으로 감소되었으며, ADAM10 단백질 발현량에는 변화가 나타나지 않았다.

요약하면, 본 연구는 황련으로부터 분리된 alkaloid 화합물들의 A β 분비 저해 효과에 대해 구조적 상관관계에 근거하여 연구하였으며, methylenedioxy구조를 가진 berberine, epiberberine, groenlandicine을 비롯하여 coptisine이 A β 생성 저해에 효과가 있다는 사실을 밝혔다. 또한 coptisine이 BACE1 과 PS1 효소를 저해함으로써 A β 분비를 감소시킨다는 메커니즘을 밝혔다. 이와 같은 연구 결과는 향후 coptisine이 AD 예방과 치료를 위한 유망한 기능성 의약품으로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

VI. 참고문헌

- An, X. P., and Cui, Q. R., Study advances on antidiabetes of rhizoma Coptidis. *Gansu. J. Tradit. Chin. Med.*, **21**, 57-58 (2008).
- Asai, M., Iwata, N., Yoshikawa, A., Aizaki, Y., Ishiura, S., Saido, T. C., and Maruyama, K., Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Abeta secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 498-502 (2007).
- Avula, B., Wang, Y. H., and Khan, I. A., Quantitative determination of alkaloids from roots of *Hydrastis canadensis* L. and dietary supplements using ultra-performance liquid chromatography with UV detection. *J. AOAC. Int.*, **95**, 1398-1405 (2012).
- Barril, X., Orozco, M., and Luque, F. J., Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. *Mini Rev. Med. Chem.*, **1**, 255-266 (2001).
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A., Evidence that tumor necrosis factor a converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27765-27767 (1998).
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C., BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**, 233-234 (2001).
- Chen, H. Y., Ye, X. L., Cui, X. L., He, K., Jin, Y. N., Chen, Z., and Li, X. G., Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from rhizoma Coptis in HepG2 cells. *Fitoterapia*, **83**, 67-73 (2012).
- De Strooper, B., Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neurons*, **38**, 9-12 (2003).
- Dhanasekaran, M., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Tharakan, J. W., Porter, K. A., Young, K.

- A., and Manyam, B. V., *Centella asiatica* extract selectively decreases amyloid beta levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytother. Res.*, **23**, 14–19 (2009).
- Durairajan, S. S., Liu, L. F., Lu, J. H., Chen, L. L., Yuan, Q., Chung, S. K., Huang, L., Li, X. S., Huang, J. D., and Li, M., Berberine ameliorates β -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging.*, **33**, 2903–2919 (2012).
- Essa, M. M., Vijayan, R. K., Castellano-Gonzalez, G., Memon, M. A., Braidy, N., and Guillemin, G. J., Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, **37**, 1829–1842 (2012).
- Fan, G., Zhang, M. Y., Zhou, X. D., Lai, X. R., Yue, Q. H., Tang, C., Luo, W. Z., and Zhang, Y., Quality evaluation and species differentiation of *Rhizoma coptidis* by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica. Chimica. Acta.*, **747**, 76–83 (2012).
- Fan, L. F., Xu D. E., Wang, W. H., Yan, K., Wu, H., Yao, X. Q., Xu, R. X., Liu, C. F., and Ma, Q. H., Caspr interaction with amyloid precursor protein reduces amyloid- β generation in vitro. *Neurosci. Lett.*, **548**, 255–260 (2013).
- Feng, Y. B., Luo, W. Q., and Zhu, S. Q., Explore new clinical application of Huanglian and corresponding compound prescriptions from their traditional use. *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.*, **33**, 1221–1225, (2008).
- Fujiwara, H., Tabuchi, M., Yamaguchi, T., Iwasaki, K., Furukawa, K., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T. C., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Yaegashi, N., Kase, Y., and Arai, H., A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins in vitro and in vivo. *J. Neurochem.*, **109**, 1648–1657 (2009).

- Ghosh, A. K., Hong, L., and Tang, J., Beta-secretase as a therapeutic target for inhibitor drugs. *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1135–1144 (2002).
- Goedert, M., and Spillantini, M. G., A century of Alzheimer's disease. *Science*, **314**, 777-781 (2006).
- Golde, T. E., Dickson, D., and Hutton, M., Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **3**, 421–430 (2006).
- Gong, L. L., Fang, L. H., Qin, H. L., Lv, Y., and Du, G. H., Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of coptisine in rat aortic rings. *Am. J. Chin. Med.*, **40**, 309-320 (2012).
- Gong, L. L., Fang, L. H., Wang, S. B., Sun, J. L., Qin, H. L., Li, X. X., Wang, S. B., and Du, G. H., Coptisine exert cardioprotective effect through anti-oxidative and inhibition of RhoA/Rho kinase pathway on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Atherosclerosis*, **222**, 50–58 (2012).
- Gualtieri, F., Dei, S., Manetti, D., Romanelli, M. N., Scapecchi, S., and Teodori, E., The medicinal chemistry of Alzheimer's and Alzheimer-like diseases with emphasis on the cholinergic hypothesis. *Farmaco*, **50**, 489-503 (1995).
- Hara, A., Iizuka, N., Hamamoto, Y., Uchimura, S., Miyamoto, T., Tsunedomi, R., Miyamoto, K., Hazama, S., Okita, K., and Oka, M., Molecular dissection of a medicinal herb with anti-tumor activity by oligonucleotide microarray. *Life. Sci.*, **77**, 991-1002 (2005).
- Hardy, J. A., and Higgings, G. A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, **256**, 184-185 (1992).
- Hardy, J., and Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356 (2002).
- Haugabook, S. J., Yager, D. M., Eckman, E. A., Golde, T. E., Younkin, S. G., and Eckman, C. B., High throughput screens for the identification of compounds that alter the accumulation of the Alzheimer's amyloid beta peptide (A β). *J. Neurosci. Methods.*,

108, 171-179 (2001).

- Henley, D. B., May, P. C., Dean, R. A., and Siemers, E. R., Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **10**, 1657–1664 (2009).
- Hiller, K. O., Ghorbani, M., and Schilcher, H., Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta. Med.*, **64**, 758-760 (1998).
- Hirano, H., Osawa, E., Yamaoka, Y., and Yokoi, T., Gastric-mucous membrane protection activity of coptisine derivatives. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1277–1281 (2001).
- Hooijmans, C. R., Rutters, F., Dederen, P. J., Gambarota, G., Veltien, A., van Groen, T., Broersen, L. M., Lutjohann, D., Heerschap, A., Tanila, H., and Kiliaan, A. J., Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched typical western diet (TWD). *Neurobiol. Dis.*, **28**, 16–29 (2007).
- Hshieh, T. T., Fong, T. G., and Marcantonio, E. R., Cholinergic deficiency hypothesis in delirium :a synthesis of current evidence. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **63**, 764-772 (2008).
- Iizuka, N., Miyamoto, K., Okita, K., Tangoku, A., Hayashi, H., Yosino, S., Abe, T., Morioka, T., Hazama, S., and Oka, M., Inhibitory effect of Coptidis rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Cancer. Lett.*, **148**, 19-25 (2000).
- Ikuta, A., Nakamura, T., and Urabe, H., Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues. *Phytochemistry*, **48**, 285-291 (1998).
- Jang, M. H., Kim, H. Y., Kang, K. S., Yokozawa, T., and Park, J. H., Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis*. *Arch.*

- Pharm. Res.*, **32**, 341-345 (2009).
- Jann, M. W., Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, **20**, 1-12 (2000).
- Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T. Jr., Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?. *Cell*, **73**, 1055-1058 (1993).
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T. Jr., The C-terminus of the beta-protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **695**, 144-148 (1993).
- Jung, H. A., Min, B. S., Yokozawa, T., Lee, J. H., Kim, Y. S., and Choi, J. S., Anti-alzheimer and antioxidant activities of Coptidis rhizoma alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1433-1438 (2009).
- Jung, H. A., Yoon, N. Y., Bae, H. J., Min, B. S., and Choi, J. S., Inhibitory activities of the alkaloids from Coptidis rhizoma against aldose reductase. *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 1405-1412 (2008).
- Kasa, P., Pakonczay, Z., and Gulya, K., The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, **52**, 511-535 (1997).
- Kinuko, I., Yumi, N., Momoyo, I., Masataka, M., Kim, H. S., Yusuke, W., Takao, Y., Turuo, T., and Lee, D. U., Structure activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **34**, 1077-1083 (1999).
- Kojro, E., and Fahrenholz, F., The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.*, **38**, 105-127 (2005).
- Kong, W. J., Zhao, Y. L., Xiao, X. H., Li, Z. L., Jin, C., Li, and H. B., Investigation of the anti-fungal activity of coptisine on *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1072-1080 (2009).
- Kurz, A., and Perneczky, R., Amyloid, clearance as a treatment target against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, **24**, 61-73 (2011).

- Lee, J. W., Iwahashi, A., Hasegawa, S., Yonezawa, T., Jeon, W. B., Cha, B. Y., Nagai, K., and Woo, J. T., Coptisine inhibits RANKL-induced NF- κ B phosphorylation in osteoclast precursors and suppresses function through the regulation of RANKL and OPG gene expression in osteoblastic cells. *J. Nat. Med.*, **66**, 8-16 (2012).
- Li, J., Meng, X., Fan, X., Lai, X., Zhang, Y., and Zeng, Y., Pharmacodynamic material basis of rhizoma Coptidis on insulin resistance. *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.*, **35**, 1855-1858 (2010).
- Lichtenthale, S. F., and Haass, C., Amyloid at the cutting edge: activation of α -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.*, **113**, 1384-1387 (2004).
- Lin, C. C., Ng, L. T., Hsu, F. F., Shieh, D. E., and Chiang, L. C., Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukemia cell growth. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, 65-69 (2004).
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R., Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.*, **4**, 231-232 (2001).
- Mattson, M. P., Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **430**, 631-639 (2004).
- O'Brien, R. J., and Wong, P. C., Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 185-204 (2011).
- Parihar, M. S., and Hemnani, T., Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J. Clin. Neurosci.*, **11**, 456-467 (2004).
- Rao, A. A., Sridhar, G. R., and Das, U. N., Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses.*, **69**, 1272-1276 (2007).

- Ro, J. S., Lee, S. S., Lee, K. S., and Lee, M. K., Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life. Sci.*, **28**, 639-645 (2001).
- Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P., and Schettini, G., The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins : physiological and pathological implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 257–264 (2005).
- Sanae, F., Komatsu, Y., Chisaki, K., Kido, T., Ishige, A., and Hayashi, H., Effects of San' o-shashin-to and the constituent herbal medicines on theophylline-induced increase in arterial blood pressure of rats. *Biol.. Pharm. Bull.*, **24**, 1137–1141 (2001)
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B. O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D. R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., van, Leuven. F., and Heneka, M. T., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 443-448 (2006).
- Saykin, A. J., Wishart, H. A., Rabin, L. A., Flashman, L. A., McHugh, T. L., Mamourian, A. C., and Santulli, R. B., Cholinergic enhancement of frontal lobe activity in mild cognitive impairment, *Brain*, **127**, 1574-1583 (2004).
- Selkoe, D. J., Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, **298**, 789-791 (2002).
- Shen, N., Li, C. N., Huan, Y., and Shen, Z. F., Advances of the mechanism study on berberine in the control of blood glucose and lipid as well as metabolism disorders. *Acta. Pharm. Sin.*, **45**, 699–704 (2010).
- Shi, A., Huang, L., Lu, C., He, F., and Li, X., Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel triazole-containing berberine derivatives as acetylcholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2298-2305 (2011).
- Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M., and Lee, M. K., Inhibition of Dopamine Biosynthesis by Protoberberine Alkaloids in PC12 Cells. *Neurochem. Res.*, **25**, 363-368 (2000).

- Sinha, S., and Lieberburg, I., Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11049-11053 (1999).
- Solomon, P. R., Adams, F., Silver, A., Zimmer, R., and DeVeaux, R., Ginkgo for memory enhancement: a randomized controlled trial. *JAMA*, **288**, 835–840 (2002).
- Song, J. X., Lin, X., Wong, R. N., Sze, S. C., Tong, Y., Shaw, P. C., and Zhang, Y. B., Protective effects of dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* against beta-amyloid and homocysteine neurotoxicity in PC12 cells. *Phytother. Res.*, **25**, 435-443 (2011).
- Suh, Y. H., and Checler, F., Amyloid precursor protein, presenilins, and alphasynuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.*, **54**, 469–525 (2002).
- Sun, J., Ma, J. S., Jin, J., Wang, H. S., Wen, Q. H., Zhang, H. G., and Zhou, Q. L., Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiedu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao.*, **41**, 380-384 (2006).
- Takaomi, S., and Malcolm, A. L., Proteolytic degradation of amyloid beta protein. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, **2**, a006379 (2012).
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., and Imahori, K., Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7789-7793 (1993).
- Tang, J., Feng, Y., Tsao, S., Wang, N., Curtain, R., and Wang, Y., Berberine and Coptidis rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations. *J. Ethnopharmacol.*, **126**, 5–17 (2009).
- Thies, W., and Bleiler, L., ; Alzheimer's association, 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, **9**, 208-245 (2013).
- Triaboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., and Corey-Bloom, J., The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, **62**,

1984–1989 (2004).

- Wang, J., Yuan, Z., Kong, H., Li, Y., Lu, X., and Xu, G., Exploring the mechanism of rhizoma coptidis in treating type II diabetes mellitus based on metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry. *Se. Pu.*, **30**, 8-13 (2012).
- Wolfe, M. S., Inhibition and modulation fo γ -secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.*, **5**, 391–398 (2008).
- Xian, Y. F., Lin, Z. X., Ip, S. P., Su, Z. R., Chen, J. N., and Lai, X. P., Comparison the neuroprotective effect of Cortex *Phellodendri chinensis* and Cortex *Phellodendri amurensis* against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Phytomedicine*, **15**, 20, 187-193 (2013).
- Xiao, H. T., Peng, J., Liang, Y., Yang, J., Bai, X., Hao, X. Y., Yang, F. M., and Sun, Q. Y., Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.*, **25**, 1418-1422 (2011).
- Yamada, K., Ren, X., and Nabeshima, T., Perspectives of pharmacotherapy in Alzheimer's disease. *Jpn. J. Pharmacol.*, **80**, 9-14 (1999).
- Ye, X., Feng, Y., and Tong, Y., Ng, K. M., Tsao, S., Lau, G. K., Sze, C., Zhang, Y., Tang, J., Shen, J., and Kobayashi, S., Hepatoprotective effects of Coptidis rhizoma aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **124**, 130-136 (2009).
- Yu, C. J., Zheng, M. F., Kuang, C. X., Huang, W. D., and Yang, Q., Oren-gedoku-to and its constituents with therapeutic potential in Alzheimer's disease inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase activity in vitro. *J. Alzheimers. Dis.*, **22**, 257–266 (2010).
- Yuan, L. J., Tu, D. W., Ye, X. L., and Wu, J. P., Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of Coptis chinensis Franch inflorescence. *Plant. Foods. Hum. Nutr.*, **61**, 139–144 (2006).
- Zarotsky, V., Sramek, J. J., and Cutler, N. R., Galantamine hydrobromide: an agent for

- Alzheimer's disease. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, **60**, 446-452 (2003).
- Zhou. L., Chávez-Gutiérrez, L., Bockstael, K., Sannerud, R., Annaert, W., May, P. C., Karran, E., and De Strooper, B., Inhibition of β -secretase in vivo via antibody binding to unique loops (D and F) of BACE1. *J. Biol. Chem.*, **286**, 8677–8687 (2011).
- Zhu, F., and Qian, C., Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC. Neurosci.*, **7**, 78 (2006).
- Zhu, F., Wu, F., Ma, Y., Liu, G., Li, Z., Sun, Y., and Pei, Z., Decrease in the production of beta-amyloid by berberine inhibition of the expression of beta-secretase in HEK293 cells. *BMC Neurosci.*, **12**, 125-131 (2011).
- Zimmermann, M., Gardoni, F., Marcello, E., Colciaghi, F., Borroni, B., Padovani, A., Cattabeni, F., and Di, Luca. M., Acetylcholinesterase inhibitors increase ADAM10 activity by promoting its trafficking in neuroblastoma cell lines. *J. Neurochem.*, **90**, 1489–1499 (2004).

감사의 글

본 논문이 완성되기 까지 많은 분들의 관심과 도움이 있었습니다. 이 자리를 빌어 그 모든 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 부족한 점이 많은 저에게 항상 지속적인 관심과 가르침으로 주시며, 연구에 대한 끊임없는 열정으로 올바른 연구자의 길로 갈 수 있도록 이끌어주신 최재수 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한 바쁘신 와중에 귀중한 시간을 내주셔서 논문을 심사해주시고, 조언을 해주신 남택정 교수님, 류은순 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 평소에 항상 올바른 가르침을 주신 김형락 교수님, 변대석 교수님, 류홍수 교수님, 김재일 교수님께도 깊이 감사드립니다. 그리고 많은 가르침과 도움을 주시고, 항상 격려해 주신 정현아 교수님께도 깊이 감사 드립니다.

2년 남짓한 시간을 함께 하며 많은 도움을 주셨던 실험실 선·후배님들께 감사의 말을 전합니다. 누구보다 저에게 힘이 되어주고 제가 의지할 수 있었던 언지언니에게 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 희진언니, 찬미언니, 유란언니, 아람이, 그리고 교육대학원의 미희언니, 나연언니에게도 감사 드립니다. 먼 이국땅에 와서 열심히 연구하는 Ali, Subash, 지금은 졸업한 Sabiha와 올해 함께 졸업하는 Nurul, 그리고 항상 제 옆자리를 지켜줬던 Ishita에게 고마움을 전하고 싶습니다. 여러가지로 도움을 주시고 신경 써주신 식품생명과학과 조교 선생님과 대학원 선·후배님들에게, 또한 저에게 많은 도움을 주셨던 일본의 정차균 박사님께도 감사의 말을 전합니다.

힘이 들고 지칠 때마다 따뜻한 위로의 말로 격려해준 사랑하는 친구들과 동문의 선·후배들에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

마지막으로 부족한 저를 믿어주시고 응원해주시며 버틸 수 있는 큰 힘을 주신 가족에게 진심으로 감사드립니다. 부모님의 큰 사랑과 도움이 없었다면 지금의 이 결실도 없었을 것이라고 생각합니다. 이것이 끝이 아니라 또 다른 시작이라고 생각합니다. 앞으로도 가족들의 큰 사랑에 보답할 수 있도록 밝고 긍정적인 모습으로 올바르게 살아가겠습니다.

2013년 12월
변 정 수 드림

