

해바라기씨 추출물의 뇌세포에 대한 사멸 보호 효과

박자영 · 우상욱 · 허진철¹ · 이상한[†]
경북대학교 식품공학과 및 ¹식품생물산업연구소

Protective Effects of *Helianthus annuus* Seed Extract against Chemical-Induced Neuronal Cell Death

Ja-Young Park, Sang-Uk Woo, Jin-Chul Heo¹, and Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science & Technology,

¹Food and Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

To develop an anti-dementia agent with potential therapeutic value in the protection of neuronal cells, we selected a water extract of *Helianthus annuus* seed for analysis. We measured acetylcholinesterase inhibitory activity in the extract, and analyzed the protective effect of the extract on neuronal cell death induced by hydrogen peroxide, or amyloid β -peptide, of SH-SY5Y neuroblastoma cells. The results showed that the extract exerted protective effects of 83%, 72%, and 53%, respectively, on cell death induced by 100 M, 200 M, and 500 M hydrogen peroxide. Also, when 50 M of amyloid β -peptide was added to the cells, the extract showed a protective effect (up to 80%) on cell death. Overall, the results showed that the *H. annuus* extract inhibited acetylcholinesterase activity in a dose-dependent manner, and the extract also strongly protected against cell death induced by hydrogen peroxide or amyloid β -peptide.

Key words : Amyloid β -peptide, Hydrogen peroxide, Neuronal cell death, *Helianthus annuus* seed extract

서 론

노령화 사회에서 노인의 건강수명을 단축시키는 큰 요인 중의 하나인데(1), 노인성 치매 즉 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 cholinergic 가설(2), 유전자 가설(3), microtubule 가설(4) 등과 같은 여러 가지 가설이 있다. 이 질환은 presenilin 1과 2 단백질을 합성하는 유전자 (PS1/PS2)와 amyloid precursor protein (APP)을 합성하는 유전자 (APP)의 돌연변이(3,5), amyloid precursor 단백질을 가수분해하고 이의 세포신호 조절(6), apolipoprotein E (apoE)(7), tau의 과인산화 등의 조절 이상에서 기인한다.

알츠하이머병은 학습과 기억에 관계된 중추신경계 (central nervous system; CNS)에 분포하는 amyloid plaque와 neurofibrillary tangles의 형성이 가장 특징적이다(9), 이는

나이가 많아짐에 따라 증가하며 알츠하이머병 환자의 뇌에서 특히 많이 발견되어진다(10). Senile plaque의 주요 구성 성분은 precursor protein으로부터 유도된 42개의 아미노산으로 구성된 β -amyloid protein (A β)인데, 이들이 비특이적 구조로 응집되는 경향이 있으며, 이들은 tau 과인산화와 microtubule 안정성의 감소와 신경 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 A β 의 과도한 축적은 apoptosis pathway를 활성화시키고(11), free radical을 유도하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포를 지속적으로 파괴시키며(12), 인지기능 및 기억능력을 점진적으로 상실하게 함으로써 지속적인 신경퇴행화(neurodegeneration)을 유도한다(13). 뿐만 아니라 뇌 속의 A β 의 축적은 acetylcholine의 합성을 저해시킴으로써(14) 뇌신경세포의 콜린성 신경전달물질의 결핍을 초래하고 이는 대뇌의 기억 및 인지기능 장애를 유발할 수 있다고 보고되어 있다(15).

한편, reactive oxygen species (ROS)는 주로 미토콘드리아의 세포 대사산물에 의해서 생성되어(16), 하루에 한 개의

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

세포당 10^4 개의 ROS가 DNA, 지질, 단백질 등을 공격한다. ROS는 반응성이 높아서 반감기가 아주 짧으며 superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($HO \cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), alkoxy radical ($ROS \cdot$) 등이 있다. 이러한 free radical과 hydrogen peroxide는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, glutathione reductase (GR) 같은 항산화효소와 비타민 E, 비타민 C, glutathione, ubiquinone과 같은 항산화제에 의해서 제거되나, 세포의 항산화능을 초과할 때, 노화는 물론 암을 비롯한 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장 질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(17,18). 특히 알츠하이머와 관련하여 amyloid β -peptide에 의해 유도되는 세포 독성이 ROS의 생성과정을 통해 이루어지고 결국엔 병을 더 악화시키게 된다는 보고가 있으며, 최근에는 이러한 ROS와 amyloid β -peptide의 생성을 억제시키는 물질을 찾는데 관심이 집중되고 있다.(19,20). 본 연구는 이러한 알츠하이머병의 억제를 위한 천연물질을 스크리닝하는 과정 중 해바라기 씨 추출물이 활성이 있음을 알았고 본 연구에서는 이의 활성에 초점을 맞추었다.

해바라기(向日葵)는 한방의 재료로 이용되어지고 있는데, 그 효능으로 해열이나 류마티스의 치료, 이노제로 탁월한 것으로 알려져 있다(21). 또한 해바라기 씨의 기름은 비타민 함량이 많아 영양학적으로 우수한 식품으로 권장되고 있다(22). 최근에는 해바라기 씨가 콜레스테롤의 일종인 저밀도지단백질(LDL; low density lipoprotein)의 혈중수치를 저하시키는 효과가 크다는 연구 결과가 보고되어 있다(23). 메티오닌과 라이신이 각각 0.46%, 0.57% (89.5% dry matter 중)로 비교적 많아 영양적으로 우수하며(24), 칼륨, 칼슘, 철분 등의 무기질과 일반 곡류가 정제 과정에서 상실하기 쉬운 비타민 B1, B2 복합체가 각각 2.1 mg, 0.24 mg으로 풍부하기 때문에 고혈압이나 신경과민에 탁월한 효과를 보인다고 한다(24).

본 연구에서는 기존에 영양학적인 측면 이외에 이의 기능적인 측면에서의 활성을 찾을 목적으로, 먼저 해바라기 씨 추출물을 이용하여 뇌 속의 콜린성 신경전달물질인 acetylcholine의 수준을 조절하는 acetylcholinesterase 활성 억제효과를 검토하고, H_2O_2 와 A β 로부터 유도된 SH-SY5Y의 세포사멸 억제 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

시료 조제

본 실험에 사용된 재료인 해바라기 씨는 시내 대형 농산물 전문 유통단지(전남 함평, 국산)에서 구입하였다. Human

neuroblastoma SH-SY5Y cell line은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, RPMI-1640, fetal bovine serum, streptomycin-penicillin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서, 배양조는 Corning (Rochester, NY, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 시약 중 acetylcholinesterase, acetylthiocholine iodide, diethio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), hydrogen peroxide (H_2O_2), β -amyloid protein(25-35)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, cell proliferation kit I은 Roche Diagnostics Korea(Seoul, Korea)로부터, CCK-8 kit는 DOJINDO(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 실험에서의 모든 시약들은 분석용 등급 (analytical grade) 이상으로 사용하였다.

추출물 제조

일반 가정용 분쇄기(blender, Sanyo, Japan)로 잘게 갈아 가루를 만든 후 분말 1 g당 증류수 1 mL를 넣고 60°C에서 24 시간 동안 추출(DWP-1800T, Separable Glass Pot, Seoul, Korea)하였다. 추출물을 원심 분리하여 상등액만을 실험에 사용하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 methanol에 400 μ M의 농도로 녹인 DPPH solution에 추출물을 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도(Victor3, Wallac, Finland)를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산 (% inhibition = $[A_{control} - A_{sample} / A_{control}] \times 100$)을 하였다.

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

$C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ 와 acetic acid를 이용하여 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM)를 만든다. 이후 HCl과 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 이용하여 TPTZ solution을 만들었다. 실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어서 실험 직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액에 추출물을 혼합한 후 40분 동안 10분 간격으로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 상대비교를 하였다.

Acetylcholinesterase 억제활성 측정

Acetylcholinesterase (AChE)의 활성은 Ellman 등의 방법(25)을 응용하였다. 즉 96 well-plate 에 37 °C로 보온한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) 140 μ L 가하고, 기질용액 0.03 m acetylthiocholine iodide 10 μ L, 0.01 M diethio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)/phosphate buffer (pH 8.0) 20 μ L를 각각 가하여 잘 혼합한 다음 적정 농도의 시료를 첨가하고 acetylcholinesterase를 첨가하여 효소반응을 시

작하였으며 효소활성도는 450 nm에서 효소반응초기부터 5분 간의 흡광도 변화를 측정하여 산출하였다. 시료의 AChE 억제활성도는 시료를 가하지 않은 상태의 효소활성도로부터 환산하였다.

Cell culture

SH-SY5Y 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 units/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 5×10^5 cells/mL의 밀도로 유지하면서 5% CO₂가 공급되는 포화습도 상의 37°C의 배양기에서 2-3일마다 계대 배양하였다.

Hydrogen peroxide에 유도된 세포사멸 억제효과

MTT (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay에서 세포 수 측정은 cell proliferation kit I (Roche)를 사용하여 실험하였다. 이 kit는 수용성의 tetrazolium salt를 포함하고 있으며 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)는 살아 있는 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소 (dehydrogenases)에 의해서 크리스탈 모양의 보라색 산물 (formazan crystal)로 환원되는데 살아있는 세포의 수와 직접적으로 비례하여 생성되는 formazan의 양을 560 nm에서 측정함으로써 세포의 생존율을 관찰할 수 있다. 본 실험에서는 H₂O₂로 산화 스트레스를 주어서 세포사멸을 유도한 다음 세포의 생존율을 이용하여 해바라기씨 추출물이 가지는 항산화 활성을 측정하였다. 배양 세포들을 96 well plate에 4×10^4 cells/mL 수준으로 접종하여 24 시간 후 H₂O₂ 단독처리와 추출물을 함께 처리하여 24 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay에 의하여 측정하였다. 즉, 각 well에 solution I을 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan crystal을 현미경으로 관찰하고 solution II를 가하여 37°C에서 다시 overnight하여 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율 (%)은 다음의 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{AS}{AC} \times 100$$

AS : H₂O₂ 무첨가구의 흡광도

AC : 시료 첨가구의 흡광도

Amyloid β-peptide 유도성 신경세포 사멸의 보호 작용 측정

Amyloid β-peptide에 의해서 유도되는 세포 사멸을 억제할 수 있는지 상기에서 설명한 MTT assay를 이용하여 실험하였다. 배양 세포들을 96 well plate에 4×10^4 cells/mL

수준으로 접종하여 24 시간 후 amyloid β-peptide(25-35) 단독처리와 추출물을 함께 처리하여 48 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay에 의하여 측정하였다. 세포의 생존율 (%)은 상기의 계산식을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성 측정

항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH와 FRAP assay를 실시하였다. 먼저 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자체가 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의해서 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 방법이다. 실험 결과, 기존의 알려진 항산화 물질인 BHT (butylated hydroxytoluene, Sigma)의 DPPH radical 소거활성은 72%로 나타났으며, 해바라기씨 추출물의 소거활성은 각각 43%, 47%, 54%로 나타났다. Kang 등이 밤꽃 추출물의 전자공여능을 비교한 결과 17.22%이었으며(26), Kim 등이 한국 약용 및 식물자원의 항산화성 식물자원이 20% 미만의 활성을 보고한 바와 비교하였을 때(27), 해바라기씨 추출물은 매우 높은 전자공여능을 가진 자원으로 확인되었다(Fig. 1). FRAP assay는 화합물의 환원력 (ferric reducing ability)을 측정하는 것으로 3.6의 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ) 복합체가 환원제에 의해서 파란색의 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{II}-TPTZ) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여 검색하고자 하는 화합물에 대한 환원력을 보는 것이다(26). 실험결과, 추출물 처리 농도가 높을수록, 시간이 지날수록 환원력이 증가되는 것을 볼 수 있으며, BHT보다 환원력이 더 좋은 것으로 나타났다(Fig. 2).

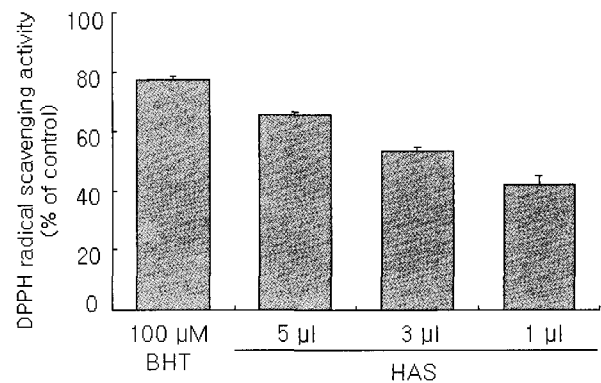


Fig. 1. Effects of HAS extract on DPPH radical assay.

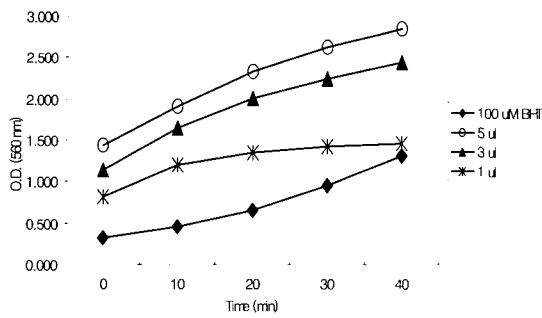


Figure 2. Antioxidant activity of *Helianthus annuus* seed (HAS) extract by FRAP assay in a dose- or time-dependent manner.

Acetylcholinesterase 억제활성능

노인성 치매로부터 유발되는 기억력 상실, 학습력 저하 등 각종 인지기능장애는 주로 대뇌 기저부의 acetylcholine 성 신경세포의 손상으로부터 기인된다는 연구 가설에 의하여 무스카린성 acetylcholine 수용체에 대한 효능제, acetylcholine 생성 촉진제, acetylcholinesterase 저해제 등 여러 가지 작용기전에 따라 acetylcholine 성 신경세포의 기능을 강화시켜 줄 수 있는 많은 성분들이 개발되고 있다. Kim 등이 37종의 식물 추출물에서 AChE 저해 활성을 살펴본 결과, 당근에서 28.3%, 고추나물에서 21.5%, 딸기에서 19.4%로 약 20% 이상의 AChE 저해활성을 보였고 박하에서 13.2%의 저해활성을 나타내고 있었으나, 그 외 추출물에서는 10% 이하의 활성을 나타내거나 또는 활성을 전혀 나타내지 않았다 (28). 따라서 해바라기 씨 추출물의 AChE 활성에 미치는 영향을 분석해 보았다. 그 결과 추출물의 첨가 농도가 높을수록 AChE 억제활성이 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). Berberine 및 관련 protoberine계 화합물이 acetylcholine 수용체 M1 subtype (mAChR-M1)에 대하여 유의성 있는 친화력을 나타내었으며(29), 별도로 시행한 여러 가지 약리학적

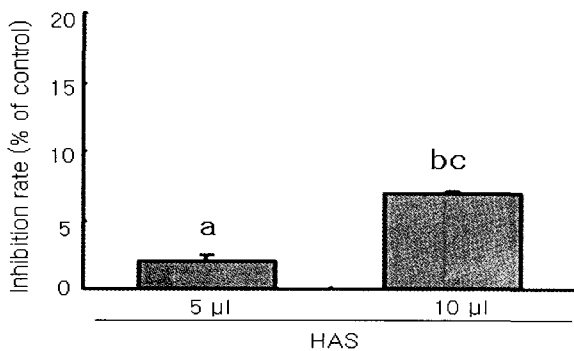


Figure 3. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Helianthus annuus* seed (HAS) extract.

^{a-c}Values with different letters are significantly different by SPSS with Duncan's multiple range test and t-test at P<0.005.

연구결과에서도 이들 alkaloid들이 acetylcholinesterase에 대한 저해효과 및 각종 cholinergic receptor에 대하여 효능이 있는 것으로 알 수 있다(30). Tacrine, Donepezil, Rivastigmine 등의 AChE inhibitor를 인지기능이 손상된 환자에게 투여함으로써 뇌중의 acetylcholine 함량을 증가시켰고, 이는 곧 알츠하이머병 환자들에게서 인지기능과 학습 기능의 개선이 있었다는 많은 연구 보고가 있다. 이러한 점에서 볼 때 해바라기 씨 추출물도 in vitro에서 AChE 억제작용이 있다고 판단되나 더 자세한 성분 등은 추후 분석이 필요하다.

Hydrogen peroxide에 유도된 세포사멸 억제효과

H₂O₂는 생물학적으로 반응성이 매우 약하지만 주요 효소 활성 부위에 있는 thiol group을 산화시켜 불활성화를 초래하거나 10-100 μM 이상의 농도에서 세포에 직접적인 손상을 유발할 수도 있다. 또 superoxide 등의 radical이 생체막을 통과하지 못하는 반면 이들은 생체막을 통과할 수 있으며, transition metal (Fe²⁺, Cu²⁺)이 존재할 때는 Fenton 반응에 의해서 반응성이 매우 큰 hydroxyl radical로 환원될 수 있으며 이러한 이유로 H₂O₂는 ROS로 분류된다(16). SH-SY5Y에 대한 농도별 H₂O₂ 따른 해바라기 씨 추출물의 세포 사멸 억제를 알아보기 위해 H₂O₂를 농도별로 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 먼저 농도별 H₂O₂에 따른 세포 사멸 정도를 알아보았다. 그 결과 100 μM, 200 μM, 500 μM 농도별로 H₂O₂를 처리한 군에서는 대조군에 비해 세포가 각각 57%, 37%, 28%의 생존율을 보여 H₂O₂ 농도가 증가

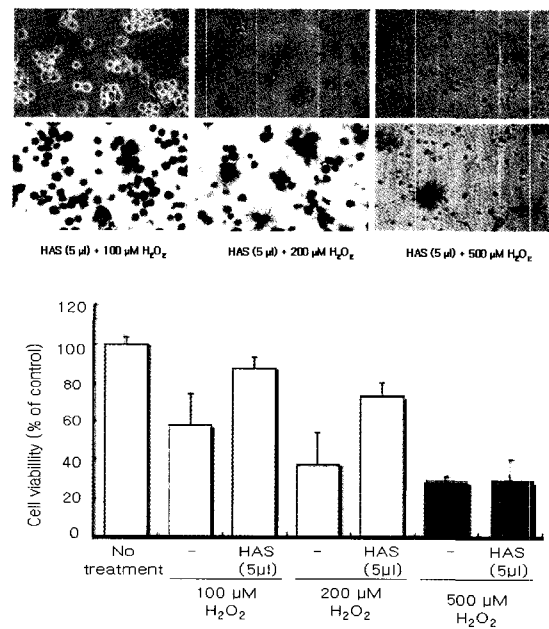


Figure 4. Protective effect of *Helianthus annuus* seed (HAS) extract on H₂O₂-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells.

Cell viability was determined by MTT assay. SH-SY5Y cells were treated with indicated concentrations of H₂O₂ with/without HAS extract for 24 h. Values are means ± S.D. from four independent experiments.

함에 따라 세포사멸율도 증가한다는 것을 볼 수 있었다. 다음으로 농도별 H₂O₂에 따른 해바라기 씨 추출물의 세포 보호능을 살펴보았다. 100 μM의 H₂O₂를 처리했을 때 해바라기 씨는 87%의 세포생존율을 보여 H₂O₂ 단독 처리했을 때보다 세포생존율이 높은 것으로 나타났다. 그리고 200 μM H₂O₂를 처리했을 때 해바라기 씨 추출물은 72%의 생존율을 보여 H₂O₂ 단독 처리했을 때보다 세포생존율이 높은 것으로 나타났다. 마지막으로 500 μM의 H₂O₂를 처리했을 때는 해바라기 씨 추출물은 29%의 세포생존율을 보여 낮은 농도의 H₂O₂를 처리했을 때보다는 세포보호능이 적게 나타났다(Fig. 4). 이는 너무 높은 농도의 H₂O₂를 처리했을 때는 보호하지 못하였다.

Aβ에 의하여 유도된 세포사멸 억제효과

Human β-amyloid sequence로부터 유도된 peptide₍₁₋₄₂₎는 신경세포 계통과 *in vivo*에서 뿐만 아니라 신경세포 기원의 일차 배양세포에 독성 효과를 일으키는 것으로 알려져 있다. 더욱이 Aβ를 rat의 뇌에 중격막이나 확대세포성 핵에 주사하였을 경우 신경 퇴행성을 일으키고, 콜린 작동성 표식인자 (cholinergic marker)의 수준을 감소시킨다. 이러한 Aβ에 의해 유도되는 세포사멸의 회복을 조사하기 위해

본 실험에서는 인간 유래의 뇌종양세포인 SH-SY5Y에 Aβ₍₂₅₋₃₅₎를 농도별 MTT assay를 실시하여 해바라기 씨 추출물이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 그 결과 Aβ₍₂₅₋₃₅₎의 농도가 증가함에 따라 세포 사멸이 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었고, 50 μM의 Aβ를 처리했을 때 대조군에 비해 약 50%의 세포 사멸율을 나타내었다. 또한 대조군의 정상 세포들이 신경돌기를 가지고 있는 것과는 이들은 부정형이었으며 세포들이 well 중앙으로 모여 영기는 모습이 관찰되었고 처리 농도가 높을수록 이러한 경향이 뚜렷하게 나타났다. 다음으로 50 μM Aβ와 추출물을 함께 처리하여 보았다. 두 추출물 중 해바라기 씨 추출물을 처리한 군에서 세포 생존율이 약 90%를 나타내어 Aβ를 단독처리한 군이 50%정도의 생존율을 보이는 것이 비해 높은 사멸을 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5). 한편, 비교군에 사용한 melatonin은 Aβ에 의한 oxidative damage와 *in vitro*에서 amyloid fibrils의 형성을 억제한다고 보고(31)된 바 있으며 해바라기 씨 추출물을 처리했을 시 melatonin을 처리했을 때보다 더 높은 생존율을 나타내는 것을 보아 세포보호활성이 더 높은 것을 알 수 있었다.

요 약

퇴행성 뇌질환의 하나인 알츠하이머는 가벼운 기억력의 장애에서부터 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 해마 (hippocampus)를 포함한 신경세포에서 세포사멸 관련이 있는 것으로 보고 되어왔다. Aβ의 자체 독성과 산화 스트레스, Aβ plaque에서 나오는 free radical은 세포내 Ca²⁺를 높이고 이로 인해 calpain이 활성화되어 신경 세포사가 촉진되며 microtubule과 같은 cytoskeleton을 파괴시킨다. 이러한 ROS와 Aβ에 의해 유도되는 세포사멸을 보호하는 물질을 해바라기 씨 추출물을 이용하여 실험을 실시하였다. 우선 추출물이 항산화 효과 (DPPH, FRAP assay), acetylcholinesterase (AChE)의 활성 및 SH-SY5Y cell의 세포 사멸에 미치는 영향을 검토하였다. 항산화 활성과 AChE에 대한 억제활성은 해바라기 씨 추출물 처리농도가 높을수록 유의적으로 높게 나타났다. H₂O₂와 Aβ에 의해 유도된 SH-SY5Y에 대한 세포사멸 억제효과 실험 (MTT assay)에서 해바라기 씨 추출물이 모두 높은 활성을 나타내었으므로, 이의 성분분리는 뇌세포 보호를 위한 좋은 식품재료가 될 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 경북대학교학술진흥연구비에 의하여 연구되었습니다.

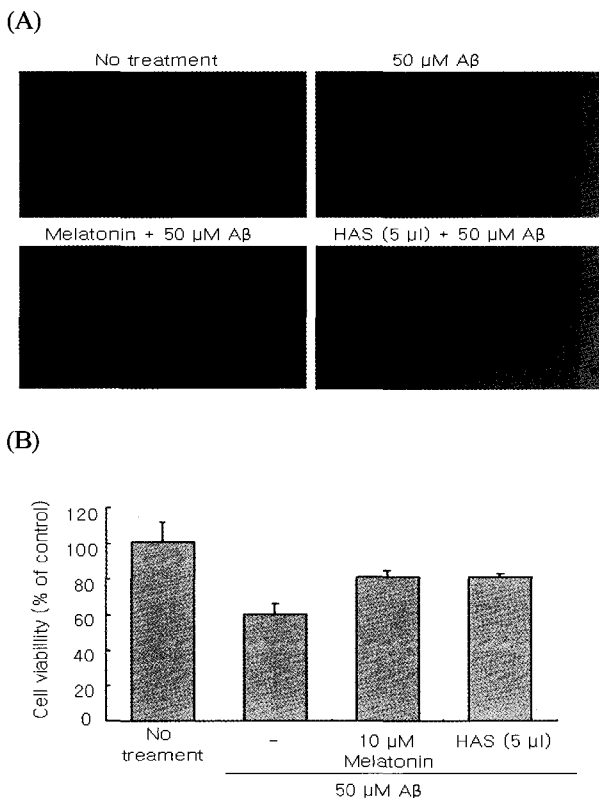


Figure 5. Protective effect of *Helianthus annuus* seed (HAS) extract on Aβ-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells.
 A : Representative micrographs showing SH-SY5Y cells with or without extract for 48 h. B : Cell viability was determined by MTT assay.

참고문헌

1. Choi, K.G. (2003) The long-term care and dementia policy in welfare states. *Soc. Welfare Policy*, 17, 55-75
2. Lemiere, J., Van, G.D. and Dom, R. (1999) Treatment of Alzheimer's disease: an evaluation of the cholinergic approach. *Acta. Neurol. Belg.*, 99, 96-106
3. Hardy, G. (2003) Alzheimer's disease: genetic evidence points to a single pathogenesis. *Ann. Neurol.*, 54, 143-144
4. Avila, J. (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett.*, 580, 2922-2927
5. Farquhar, M.J., Gray, C.W. and Breen, K.C. (2003) The over-expression of the wild type or mutant forms of the presenilin-1 protein alters glycoprotein processing in a human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Lett.*, 346, 53-56
6. Cai, D., Leem, J.Y., Greenfield, J.P., Wang, P., Kim, B.S., Runsheng, W., Lopes, K.O., Kim, S.H., Zheng, H., Greengard, P., Sisodia, S.S., Thinkaran, G. and Xu, H. (2003) Presenilin-1 regulates intracellular trafficking and cell surface delivery of β -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 278, 3446-3454
7. Roks, G. (2003) Alzheimer's disease. Present and role of genetics. *Tijdschr. Gerontol. Geriatr.*, 34, 13-20
8. Golde, T.E. and Echman, C.B. (2001) Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov. Today*, 6, 1049-1055
9. Luigi, P., Rudolph, E.T. and Dora, M.K. (2003) Alzheimer's disease : the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.*, 6, 345-351
10. Harada, J. and Sugimoto, M. (2000) Activation of caspase-3 in β -amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res.*, 843, 311-323
11. Goodman, Y. and Mattson, M.P. (1994) Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.*, 128, 1-12
12. Selkoe, D.J. (2000) Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 924, 17-25
13. Pederson, W.A., Kloczewiak, M.A. and Bluszajin, J.K. (1996) Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8068-8071
14. Talesa, V.N. (2001) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.*, 122, 1961-1969
15. Kosik, K.S., Joachim, C.L. and Selkoe, D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4044-4048
16. Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., Taniguchi, N. (2003) oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol. Chem.*, 384, 567-574
17. Metodiewa, D. and Koska, C. (2000) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res.*, 1, 197-233
18. Li, M.H., Jang, J.H., Sun, B. and Surh, Y.J. (2004) Protective effects of oligomers of grape seed polyphenols against beta-amyloid-induced oxidative cell death. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1030, 317-29
19. Varadarajam, S., Yatin, S., Aksenava, M. and Butterfield, D. (2000) Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.*, 130, 184-208
20. Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., leighton, F. and Inestrosa, N.C. (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid- β peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, 62, 633-648
21. Simopoulos, A.P. (2003) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Forum Nutr.*, 56, 67-70
22. Warner, K. (2005) Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9906-9910
23. Selvaraj, R.K. and Purushothaman. M.R. (2004) Nutritive value of full-fat sunflower seeds in broiler diets. *Poult. Sci.*, 83, 441-446
24. Meydani, S.N., Lichtenstein, A.H., White, P.J., Goodnight, S.H., Elson, C.E., Woods, M., Gorbach, S.L. and Schaefer, E.J. (1991) Food use and health effects of soybean and sunflowers oils. *J. Am. Coll. Nutr.*, 10, 406-428
25. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.V. and Feathstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95

26. Kang, M.J, Shin, S.R. and Kim, R.S. (2002) Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion (*Taraxacum officinale*). Korean J. Food Preserv., 9, 253-259
 27. Kim, Y.C. and Chung, S.K. (2002) Relative oxygen radical species scavenging effects of Korean medical plant leaves. Food Sci. Biotechnol., 11, 407-411
 28. Kim, D.I., Lee, S.H., Hur, E.Y., Cho, S.M. and Park, H.J. (2005) Screening of Natural Plant Resources with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 34, 427-432
 29. Schmeller, T., Lats-Bruning, B. and Mink, M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivorce. Phytochemistry, 44, 257-266
 30. Wang, W., Chen, K. and Guan, Y. (1999) Effect of berberine hydrochloride on muscarinic receptors. Acta. Pharm. Sinica, 34,260-263
 31. Matsubara, E., Bryant, T.T., Pacheco, Q.J., Henry, T.L., Poeggeler, B., Herbert, D., Cruz, S.F., Chyan, Y.J., Smith, M.A., Perry, G., Shofi, M., Abe, K., Leone, A., Grundke, II, Wilson, G.L., Ghiso, J., Williams, C., Refolo, L.M., Pappolla, M.A., Chain, D.G. and Neria, E. (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. J. Neurochem., 85, 1101-1108
 32. Mahoney, J.M. and Graf, E. (1986) Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model system. J. Food Sci., 54, 1293-1296
-
- (접수 2007년 1월 2일, 채택 2007년 3월 23일)