

化香樹 樹皮의 메탄올 추출물이 신경세포에서 아밀로이드 전구단백질의 대사에 미치는 영향

강귀보 · 임재윤*

우석대학교 약학대학

Effects of MeOH Extract from Stem Bark of *Platycarya strobilacea* on the Metabolism of Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Gui bao Jiang, Jae Yoon Leem*

College of Pharmacy, Woosuk University

Alzheimer's disease (AD), one of the most common forms of dementia, is characterized pathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptides of 40-42 residues, which are generated by processing of amyloid precursor protein (APP). $A\beta$ has been believed to be neurotoxic and now is also considered to have a role on the mechanism of memory dysfunction. Here, we show that MeOH extract from stem bark of *Platycarya strobilacea* Sieb. et. Zucc. (PSM) affects on the processing of APP from the APPswe over-expressing Neuro2a cell line. We found that PSM may regulate the processing of APP and increase the sAPP α . PSM does not change the protein level of presenilin and nicastrin, however, it reduces the protein expression level of BACE1. In addition, PSM reduces the secretion level of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ from the cell line without toxicity. We suggest that *Platycarya strobilacea* may be useful as a herbal medicine to treat Alzheimer's disease.

Key words : Alzheimer's disease, β -amyloid peptides, *Platycarya strobilacea*, APPswe, BACE

서 론

이미 고령화 사회로 진입한 한국은 2012년 현재 노인인구 비율이 11.8%이며 2030년에는 24.3%로 증가해 국민 4명 중 1명이 노인일 것으로 예상된다. 노인인구의 증가와 더불어 치매환자 수도 급속히 증가하고 있다. 이러한 현실은 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 과도한 의료비 지출로 인한 국가 경쟁력 저하에 따라 커다란 사회·국가적 문제로까지 대두되고 있다¹⁾.

치매는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 혈관성 치매 및 파킨슨 질환에 의한 퇴행성 질환, 감상선 기능 저하증에 의한 대사성 질환, 뇌종양 또는 감염성 질환 등에 기인하는 기타 치매로 분류된다²⁾.

알츠하이머 질환자의 뇌 조직에서는 신경세포 주위에서 생성되는 노인반과 세포내부에서 생성되는 neurofibrillary tangle과

같은 병리학적 특징을 관찰할 수 있다. Neurofibrillary tangle은 tau 단백질의 과인산화에 의하여 형성되며, 노인 반은 세포 밖으로 분비된 β -amyloid ($A\beta$)가 신경세포 주변에서 응집되어 형성된다^{3,4)}. $A\beta$ 는 베타 아밀로이드 전구단백질인 APP(Amyloid precursor protein)가 2 종류의 protease인 β -secretase⁵⁾와 γ -secretase⁶⁾에 의해 분해되어 생긴다. 또 다른 APP의 대사산물인 P3 단편은 α -secretase와 γ -secretase에 의해 생성되며 $A\beta$ 와는 달리 신경세포에 대한 독성은 없는 것으로 알려져 있다. APP는 기질로서 α -secretase와 β -secretase에 의해 경쟁적으로 대사되므로 α -secretase의 효소활성이 증가되면 BACE의 활성이 감소된다⁷⁾.

알츠하이머 질환 치료제 개발을 위한 표적으로서 γ -secretase는 다수의 중요한 생체분자를 기질로 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점을 안고 있는 반면⁸⁻¹¹⁾, β -secretase (β -site APP cleaving enzyme, BACE)의 경우는 BACE 녹아웃 생쥐의 실험에서 알 수 있듯이 생체에 유해하지 않을 것으로 추측되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다¹²⁾.

최근 이와 같은 발병기전의 연구와 더불어 효소 저해제 및

* 교신저자 : 임재윤, 전북 완주군 삼례읍 우석대학교 약학대학 약학과

· E-mail : jyileem@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1575

· 접수 : 2013/01/04 · 수정 : 2013/02/19 · 채택 : 2013/02/21

A β 백신요법 등과 같은 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 효과적인 치료제가 없는 실정이다¹³⁻¹⁵.

한편, 본 연구에 사용한 化香樹(또는 化果樹)는 한방에서 順氣祛風, 消腫, 止痛, 乾濕, 殺蟲의 효능이 있어 內傷에 의한 胸膈腹痛, 筋骨疼痛, 癰腫, 濕瘡, 疥癬을 치료한다고 기록되어 있으며 최근에는 항염증, 항노화 및 주름제거 작용을 갖고 있다는 보고가 있다^{16,17}. 민간에서는 열매를 化香樹果라고 하며 9-18 g을 달여 복용한다.

본 연구에서는 전통약물로부터 A β 의 분비를 감소시키는 약물을 선별하기 위해 국내 자생식물의 추출물을 스크리닝한 결과, 化香樹 수피의 MeOH 추출물이 APP의 변이 유전자인 APP^{swe}를 발현하는 신경세포주에서 α -secretase의 대사산물인 sAPP α 의 세포의 분비를 증가시켰으며 β -secretase의 대사산물인 β -CTF의 단백질 양을 감소시켰다. 또한 A β 40 및 A β 42의 분비와 BACE의 단백질 발현을 감소시켰기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 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.

2. 시약

化香樹 (*Platycarya strobilacea* Sieb. et. Zucc.) 수피의 MeOH 추출물 (이하 PSM으로略함)은 한국 식물추출물은행으로부터 구입하여 일정량의 DMSO에 용해하여 사용하였다. β -secretase inhibitor III (Calbiochem, Darmstadt, Germany), protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT (Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), mouse anti-human sAPP α monoclonal antibody 2B3 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), anti-BACE1 polyclonal antibody LK-16 (Sigma, St. Louis, MO), goat anti-Presenilin 1 polyclonal antibody N-19 (Santa cruz Biotech., Santa cruz, CA), rabbit anti-actin polyclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO), human amyloid β assay kit (IBL, Kunma, Japan), Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

3. A β 의 분비에 대한 효과검정

APP^{swe} 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA(18)를 실시하였다. 1×10^6 세포를 60 mm dish에

서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16 시간이 경과한 후 DMSO에 용해시킨 PSM 1, 10 μ g/ml 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III¹⁹ 1.5 μ g/ml를 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였다. A β (35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 A β (38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating된 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 30분간 반응시킨 후 정지액 100 μ l를 첨가하여 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4. 세포독성 분석

PSM의 APP^{swe} 세포주에 대한 독성을 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) assay를 실시하였다. 5×10^3 세포를 96-well plate에서 배양하여 DMSO에 용해시킨 PSM을 10, 50, 100 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였다. CCK-8 용액(Water-soluble tetrazolium salt) 10 μ l를 첨가하여 2시간 배양한 후, 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 단백질 분석

단백질 분석은 Western blotting 방법에 의해 수행하였다²⁰. 1×10^6 세포를 60 mm dish에서 배양하여 24시간 후에 DMSO 또는 PSM 1, 10 μ g/ml를 처리하였다. 24 시간 후, 배양액을 PMSF 존재 하에 회수하고 PBS로 세척한 세포에 protease inhibitor를 첨가한 cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA)를 넣고 분쇄하여 시료로 사용하였다. 단백질 50 μ g을 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE 및 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, β -CTF (COOH terminal fragment), sAPP α , BACE1, PSI, NCT 등의 단백질 양상을 분석하였다. 3회 반복 실험에 의해 얻어진 단백질 밴드를 Image J 1.37 software (NIH 제공)에 의해 정량하였으며 actin 밴드를 기준으로 보정하였다.

6. 통계처리

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

결 과

1. A β 분비 저해효과 및 세포독성

APP^{swe} 세포주에 PSM을 처리한 후 배양액으로 분비된 A β 의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량하였다.

즉, 음성 대조군(CON)인 DMSO를 처리한 시료의 A β 의 분비량을 100%로 하여 PSM 처리시 분비량을 백분율로 표시하였다. PSM 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 A β 40의 분비량이 음성대조군의 각각 77.5 ± 2.5 , 50.2 ± 2.2 %이었으며 A β 42의 분비량은 각각 79.2 ± 3.2 , 64.5 ± 2.4 %이었다. 즉, PSM은 A β 의 분비량을 농도 의존적이며 유의성 있게 감소시켰다. 양성 대조군인 β -secretase inhibitor III도 저해 활성을 나타내었다 (Fig 1). 한편, PSM의 APPswe 세포주에 대한 독성을 관찰하기 위해 CCK assay를 실시한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 9.1 ± 3.9 %의 세포독성을 보였으나, 본 실험에 사용한 PSM의 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 그의 5배인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서의 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig 2).

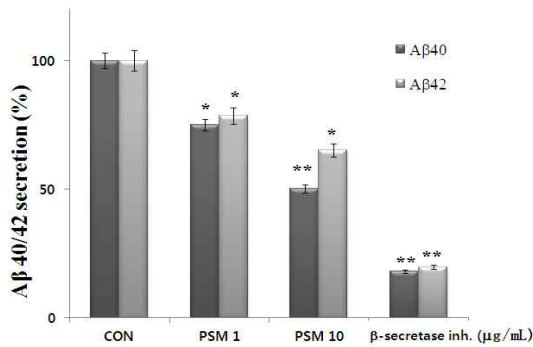


Fig. 1. Effects of PSM on the secretion of A β peptides. APPswe cells were treated with DMSO (control), 1, or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PSM for 24h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted A β x-40 and A β x-42 in the conditioned media was performed using sandwich ELISAs. The secreted A β peptides were specifically decreased in the presence of PSM. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. *P<0.05, **P<0.01 PSM: Plantocracy strobilacea MeOH extract, A β : β -amyloid, C: control

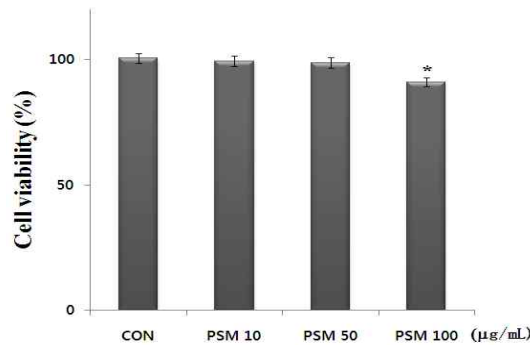


Fig. 2. Effect of PSM on the cell viability of APPswe cell lines. APPswe cells were cultured at confluency in a 96 well plate with various concentrations of PSM for 24 h. Cells were subjected to CCK-8 solution and incubated for 2h. The absorbance at 450nm was measured using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA). PSM does not show a toxicity at a concentration of 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, although it shows 10% of toxicity at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *P<0.05, **P<0.01 PSM: Plantocracy strobilacea MeOH extract, CON: control

2. APP 및 관련 단백질 양상에 미치는 효과

위에서 확인한 PSM에 의한 A β 분비 감소효과의 기전을 확인하기 위해 PSM을 처리한 APPswe 세포주로부터 Western blotting에 의해 APP, sAPP α , β -CTF, BACE1, PS1, NCT의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. BACE1 및 그에 의한 APP의 대사체인 β -CTF와 α -secretase에 의한 대사체인

sAPP α 의 단백질 양상을 분석함으로써 β -secretase의 효소활성을 간접적으로 측정하였다. PSM은 γ -secretase 복합체의 구성분자인 PS 및 NCT의 단백질 양상에는 영향을 주지 않은 반면, BACE에 의한 대사 물질인 β -CTF의 경우는 PSM의 농도 의존적으로 감소 양상을 보여, DMSO 처리군(CON)에 비해 PSM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 45.1 ± 2.2 %가 감소되었다(Fig. 4A). 또한, PSM 농도 의존적으로 세포내 holo APP의 양은 감소시켰으며 세포외로 분비되는 sAPP α 양은 현저히 증가시켜 DMSO 처리군(CON)에 비해 PSM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 230.7 ± 10.8 %가 증가되었다(Fig. 4B). PSM은 농도 의존적으로 BACE1의 단백질 발현을 감소시켜 DMSO 처리군(CON)에 비해 PSM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 27.3 ± 2.2 %가 감소되었다(Fig. 4C).

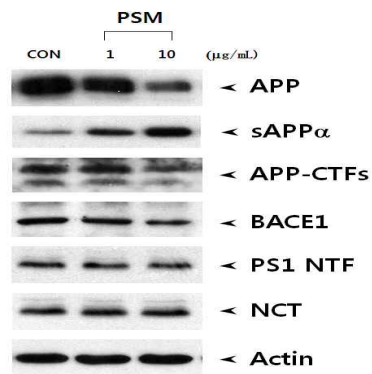
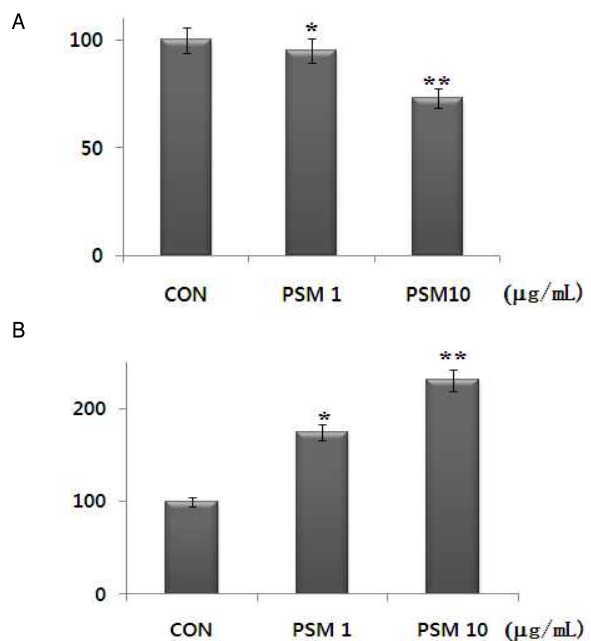


Fig. 3. Effects of PSM on the protein level of APP, sAPP α , β -CTF, BACE1, PS1, NCT. APPswe cells were treated with DMSO (control), 1, or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PSM for 24h, then collected conditioned media and lysed with cell lysis buffer. Medium or detergent lysates were loaded on the 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE, or 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. Note that β -CTF and BACE1 were decreased, however, sAPP α was increased in a dose dependent manner. Actin was used as a control protein. PSM: Plantocracy strobilacea MeOH, CON: control, APP: Amyloid precursor protein, PS1-NTF: Presenilin 1-NH2 terminal fragment, β -CTF: β -COOH terminal fragment, sAPP α : soluble APP α .



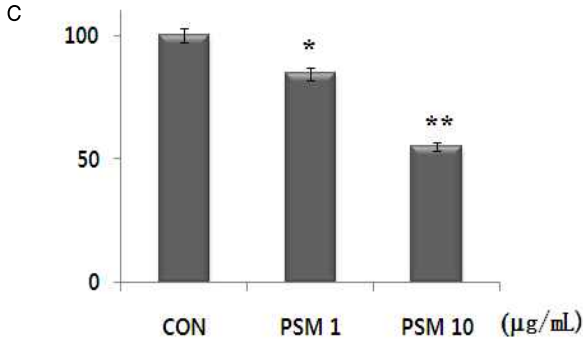


Fig. 4. The quantification of β -CTF and sAPP α for the estimation of BACE activity. The levels of protein, shown in Fig. 3 were analyzed by relative density using Image J 1.37 software. (A) β -CTF of intracellular APP metabolite by BACE was specifically decreased in the presence of PSM. (B) sAPP α secreted by α -secretase was specifically increased in the presence of PSM. (C) BACE1 was specifically decreased in the presence of PSM. The means \pm SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ PSM; Plantocracy strobilacea MeOH, CON: control, BACE: β -site APP cleaving enzyme, APP: amyloid precursor protein, β -CTF: β -COOH terminal fragment, sAPP α soluble APP α .

고찰

치매(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력 저하와 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 증후군을 일컫는다²¹. 특히 한의학적으로 치매는 氣虛, 血虛, 心火亢盛, 血瘀氣滯, 肝腎의 陰虛, 心肥의 兩虛, 肝鬱陽亢, 精髓의 缺乏, 濕痰의 心竅 등이 원인이 되어 나타난다고 알려져 있다. 치매의 임상적 특징은 그 병세가 완만히 진행되면서 지적 능력 상실과 함께 감정 성격 그리고 행위의 개변 상태가 동반됨으로써 健忘症이나 癲狂症 또한 虛勞 등의 증세도 포함한다. 치매치료제 개발을 위한 한약 처방 연구도 활발히 이루어지고 있는데, 健腦飲, 扶正祛邪를 위해 治呆飲, 加味神仙不老丹, 壯元丸加減方, 孔子大聖智枕中方, 半夏白朮天麻湯, 六味地黃湯, 台封飲이 있으며, 사상체질방을 활용한 연구는 調胃升清湯과 荊防地黃湯이 있다²². 이중 壯元丸加減方은 APP 형질 전환 초파리 모델에서의 활성연구가 보고되었다²³. 현재 서양의 학에서는 치매 개선약물로서 donepezil, rivastigmine 등이 사용되고 있으나 치료효율이 낮고 부작용이 심하며 A β 또는 tau를 표적으로 하는 치료제는 아직 개발되지 않았다.

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 complex로서 활성을 나타내며 이 효소는 많은 물질을 기질로 반응하므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점 때문에⁷⁻¹⁰ 최근에는 BACE를 저해하는 치료제 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 추세이다.

한편, APP는 endoplasmic reticulum (ER)에서 합성되어 골지체로 이동하며 당의 수식과정을 거쳐 성숙한 APP가 된 후, 다시 trans-golgi network (TGN)를 거쳐 세포막으로 이동한다. 이 과정에서 α -secretase, β -secretase 및 γ -secretase 등에 의해 대사되어 A β 를 비롯한 대사물질을 생성한다^{24,25}. β -secretase 및 γ

-secretase에 의해 생성되는 A β 40 및 A β 42는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다²⁶. 결과에 기술한 바와 같이, PSM은 A β 40 및 A β 42의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰는데, 이는 APP의 대사에 관여하는 β -secretase 또는 γ -secretase의 활성이 저해되었음을 시사한다. 한편, γ -secretase의 구성분자인 PS1의 아미노 말단 단편인 PS1-NTF와 NCT의 단백질 양상은 아무런 변화가 없었다. 이 결과를 통하여 APP의 최종 대사과정에 관여하는 효소 γ -secretase 복합체의 중요한 구성분자인 PS-NTF와 NCT의 안정성에는 영향이 없으며, 다른 구성분자인 PS1-CTF, PEN2, APH-1 등의 안정성에도 변화가 없음을 추정할 수 있다.

PSM은 sAPP α 의 분비량을 현저하게 증가시켰으며 이는 α -secretase의 활성이 증가했음을 의미하는 것으로 동시에 APP와 경쟁적으로 작용하는 β -secretase의 활성은 감소되었음을 간접적으로 시사한다. 따라서 β -secretase의 산물인 β -CTF와 α -secretase의 산물인 sAPP α 의 단백질 양상은 서로 상반되는 결과를 보인다. 더불어 BACE1의 단백질 발현도 β -CTF와 같은 양상으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 PSM은 BACE1의 단백질 발현을 감소시키는 활성을 갖고 있으며, β -secretase를 저해할 것으로 추정할 수 있다.

최근 보고에 의하면 sAPP α 가 BACE1과 직접 결합함으로써 A β 의 생성을 저해하는 것으로 알려졌다²⁷, 이는 PSM이 sAPP α 의 분비를 증가시킴으로써 BACE를 저해할 가능성을 뒷받침한다. 이상의 결과를 종합해보면, PSM을 치매 치료제 개발을 위한 β -secretase 저해 후보약물로 응용할 수 있다고 사료된다. 향후 化香樹에 의한 A β 분비저해활성의 기전을 명확히 규명하기 위해서는 면역형광염색법에 의해 APP 및 관련 분자의 세포내 분포를 확인하고, BACE 및 γ -secretase의 in vitro 효소활성도 측정해야 할 것이다. 나아가 化香樹의 유효성분의 규명과 치매 동물모델에서의 기억력 개선효과의 검증도 필요하다.

결론

化香樹는 APP의 대사 과정 중 α -secretase의 활성을 증가시키며 BACE1의 단백질 발현을 저해하고 A β 의 분비를 감소시켰다. 이는 β -secretase를 간접적으로 저해하는 것을 시사하며 따라서 β -secretase를 표적으로 하는 치매 치료제 개발을 위한 후보약물로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 우석대학교 교내학술연구비와 지식경제부 및 한국산업기술진흥원의 재원으로 광역경제권연계협력사업의 지원을 받아 수행된 연구임. (R0002019)

참고문헌

- Vellas, B. and Fitten, L.J. Research and practice in

- Alzheimer's disease. Springer Publishing Co. 2000.
2. Morris, J.C. Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 165: 41-50, 1996.
 3. Braak, H., Braak, E. and Strothjohann, M. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett.* 171: 1-4, 1994.
 4. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736, 1987.
 5. 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., Citron, M. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741, 1999.
 6. Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: 23-31, 1999.
 7. 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. 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(1-3):14-21, 2009.
 8. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogoava, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogoav, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St. George-Hyslop, P. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407: 48-54, 2000.
 9. Lee, S.F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., Yu, G. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J. Biol. Chem.* 277: 45013-45019, 2002.
 10. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. 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, 2002.
 11. 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.
 12. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., Wong, P.C. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neurosci.* 4: 233-234, 2001.
 13. Sugimoto, H. Donepezil hydrochloride. a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* 1: 63-73, 2001.
 14. 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.
 15. Jann, M.W. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.* 20: 1-12, 2000.
 16. Babu, D., Lee, J.S., Park, S.Y., Thapa, D., Choi, M.K., Kim, A.R., Park, Y.J., Kim, J.A. Involvement of NF-kappaB in the inhibitory actions of *Platycarya strobilacea* on the TNF-alpha-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells and chemokine expression. *Arch Pharm Res.* 31(6):727-735, 2008.
 17. Kim, Y.H., Kim, K.H., Han, C.S., Yang, H.C., Park, S.H., Jang, H.I., Kim, J.W., Choi, Y.S., Lee, N.H. Anti-wrinkle activity of *Platycarya strobilacea* extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *J. Cosmet. Sci.* 61(3):211-224, 2010.
 18. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E. and Sissodia, S.S. The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* 271: 31894-31902, 1996.
 19. Tung, J.S., Davis, D.L., Anderson, J.P., Walker, D.E., Mamo, S., Jewett, N., Hom, R.K., Sinha, S., Thorsett, E.D., John, V. Design of substrate-based inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* 45: 259-262, 2002.
 20. Leem, J.Y., Saura, C.A., Pietrzik, C., Christianson, J., Wanamaker, C., King, L.T., Veselits, M.L., Tomita, T., Gasparini, L., Iwatsubo, T., Xu, H., Green, W.N., Koo, E.H., Thinakaran, G. A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* 11: 64-82, 2002.
 21. Iqbal, K., Sisodia, S.S. and Winblad, B. Alzheimer's disease. *Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics.* John Wiley & Sons, Ltd. 2001.
 22. 구진숙, 서부일, 박지하, 노성수. 치매 치료 한약(처방 및 한약제) 연구 논문 동향 분석. *大韓本草學會誌* 25(3):131-137, 2010.
 23. 김상태, 강형원, 한평림, 조형권, 김태현, 류영수, 손형진. 壯元丸加減方인 LMK02가 아밀로이드 前驅蛋白質으로 形質轉換된 초파리에 미치는 효과. *동의신경정신과학회지* 19(2):151-163, 2008.

24. Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., Lee, V.M. 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, 2000.
25. Nunan, J., Small, D.H. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483: 6-10, 2000.
26. 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. 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, 1997.
27. Obregon, D., Hou, H., Deng, J., Giunta, B., Tian, J., Darlington, D., Shahaduzzaman, M., Zhu, Y., Mori, T., Mattson, M.P., Tan, J. Soluble amyloid precursor protein- α modulates β -secretase activity and amyloid- β generation. *Nat Commun.* 3: 777, 2012.