

캠벨얼리(*Vitis labruscana* B.) 잎 에탄올 추출물이 신경세포에서 아밀로이드 전구 단백질의 발현과 아세틸콜린에스테라제 활성에 미치는 영향

최하연^{2,#} · 김주은^{1,3,#} · 마상용² · 조형권⁵ · 김대성⁵ · 임재윤^{1,3,4*}

¹우석대학교 약학대학, ²우석대학교 식품생명영양학과

³우석대학교 스마트융복합라이프케어연구소, ⁴우석대학교 종합약학연구소, ⁵한풍제약

The Effect of *Vitis labruscana* B. Leaves Ethanol Extract on the Expression of Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells and on the Acetylcholinesterase Activity

Ha Yeon Choi^{2,#}, Ju Eun Kim^{1,3,#}, Sang Yong Ma², Hyung Kwon Cho⁵,
Dae Sung Kim⁵, and Jae Yoon Leem^{1,3,4*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55338, Korea

²College of Food Science and Nutrition, Woosuk University, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55338, Korea

³Smart Convergence Life-care Research Center, Woosuk University, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55338, Korea

⁴Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Woosuk University, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55338, Korea

⁵Hanpoong Pharm. Co., LTD, Wanju, Jeollabuk-do, 55316, Korea

Abstract – Alzheimer’s disease (AD) is the most common form of dementia, and the accumulation of β -amyloid ($A\beta$) in the brain triggers AD, followed by hyperphosphorylation of tau protein, neurofibrillary tangles, and synapses loss, neuronal cell death, and cognitive decline occur in a chain. In APP^{swe} neuronal cell line, 50 μ g/ml of Campbell early (*Vitis labruscana* B.) leaves 50% ethanol extract (VLL) treatment inhibited the secretion of $A\beta$ 1-42 by about 63% and the secretion of $A\beta$ 1-40 by about 50%. VLL did not target the enzymatic activity of the amyloidogenic pathway and decreased the protein expression of APP. As a result of RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative real-time PCR) of the APP^{swe} cell line treated with VLL, it is thought that the protein expression of APP was reduced by inhibiting the transcription process of the APP gene. In addition, VLL inhibited acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity in vitro by 27.6% and 54.7%, respectively, at 50 and 100 μ g/ml concentrations. We found that VLL inhibited the production of $A\beta$, a dementia-inducing substance, by suppressing the transcription of the APP gene, and that VLL inhibited AChE activity. We suggest that VLL has the potential as a natural drug material that modulates the alleviation of dementia symptoms.

Keywords – Alzheimer’s disease, β -amyloid, Amyloid precursor protein, Acetylcholinesterase, *Vitis labruscana* B.

알츠하이머 질환(Alzheimer’s disease; AD)은 가장 일반적인 치매의 형태로 전체 치매 환자의 60~80%를 차지하며 뇌의 베타아밀로이드(β -amyloid; $A\beta$)의 축적이 AD를 촉발시키며, 타우(tau) 단백질의 과인산화와 신경섬유매듭 형성, 시냅스 소실, 신경세포 사멸과 인지기능 저하가 연쇄적으로

발생하게 된다.^{1,2)} 아밀로이드 전구 단백질(Amyloid precursor protein; APP)의 대사경로는 아밀로이드 생성경로(Amyloidogenic pathway)와 비 아밀로이드 생성경로(non-amyloidogenic pathway)로 나눌 수 있다. APP가 β -secretase에 의해 절단되어 soluble amyloid precursor protein β (sAPP β)와 β -carboxyl-terminal fragment(β -CTF)로 나뉘며, β -CTF가 γ -secretase에 의해 절단되면 $A\beta$ 와 APP intracellular domain(AICD)이 생성되는 것을 아밀로이드 생성경로라고

#공동 제1저자로 동등한 기여를 하였음.

*교신저자(E-mail): jyleem@woosuk.ac.kr

(Tel): +82-63-290-1575

한다. 한편, β -secretase와 γ -secretase 활성이 증가되면 아밀로이드 생성경로가 비정상적으로 활성화되어 $A\beta$ 가 증가되고, 이것이 뇌에 응집·축적되어 신경독성 및 신경세포 사멸을 일으킨다.^{3,4)} $A\beta$ 를 조절하기 위한 연구는 다양하게 이루어지고 있으며, 본 연구 그룹도 천연물을 이용하여 아밀로이드 생성경로와 연관된 효소 활성을 조절함으로써 $A\beta$ 의 생성을 줄인다고 보고하였다.⁵⁾ 한편, 최근 Arrozi 등은 토코페롤 이성체의 하나인 알파 토코페롤이 신경세포에서 APP의 전사 단계를 유의적으로 억제한다고 보고하였다.⁶⁾ Reznichenko 등은 녹차의 활성 성분 중 하나인 epigallocatechin gallate(EGCG)가 SH-SY5Y 세포주에서 과발현시킨 APP의 전사 후 과정을 조절하여 APP의 단백질 발현을 현저히 억제한다고 보고하였다.⁷⁾

뇌 신경전달물질의 하나인 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)은 cholineacetyl transferase에 의해 콜린과 acetyl-CoA로부터 특정 뉴런에서 합성된다. 정상인에게서는 ACh이 일정 농도로 유지되어 신경 말단에서 시냅스로 신경 자극을 전달하지만, 치매 환자의 경우 ACh을 분해하는 효소인 AChE의 농도가 높아 ACh을 아세트산과 콜린으로 가수분해함으로써 ACh의 결핍을 가져와 신경 자극이 전달되지 못하여 기억력 장애를 비롯하여 인지능력 장애를 일으키게 된다.⁸⁻¹⁰⁾

현재 임상에서는 치매 치료를 위해 도네페질(donepezil), 갈란타민(galantamine) 및 리마스티그민(rivastigmine) 등 AChE 억제제와 NMDA 수용체 길항제인 메만틴(memantine)이 사용되고 있으며, 최근 AD치료제로서 $A\beta$ 올리고머와 플라크를 타겟하는 단클론항체인 아두카누맙(aducanumab)이 FDA의 승인을 받음으로써 $A\beta$ 가설이 인정받게 되었다.¹¹⁾ 이와 같이, AD의 발병 원인이 다양하고 복잡하기 때문에 최근에는 AD의 예방 및 치료제 개발을 위해 multi-target을 조절하는 약물 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹²⁻¹⁴⁾

한편, 포도속 식물은 갈매나무목(Rhamnales), 포도과(Vitaceae)에 속하며, 본 연구에 사용한 캠벨얼리(*Vitis labruscana* B., Campbell early)는 국내에서 주로 재배하고 있는 품종으로 중앙아시아·지중해 군에 속하는 유럽종(*Vitis vinifera* L.)과 미국종(*Vitis labrusca* L.)의 교배종이다.¹⁵⁾ 포도는 주로 과육 또는 종자가 많이 사용되며 다량의 당분과 무기질을 포함하여 알려진 대표적 성분으로는 안토시아닌(anthocyanin), 카테킨(catechin), 퀘세틴(quercetin)과 같은 플라보노이드와 레스베라트롤(resveratrol)과 탄닌(tannin) 등 다양한 폴리페놀 성분들이 보고 되어있다.¹⁶⁾ 포도 잎은 맛이 시고 떼어서 식용으로 사용하지 않다가, 최근 많은 생리 활성물질이 잎에도 분포하는 것으로 알려져 이를 활용한 차, 장아찌와 같은 식품 가공품이 개발되어 이용되고 있다.^{17,18)} 포도 잎에는 anthocyanin인 delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin-3-glucoside 등과 quercetin, kaempferol, quercetin-3-O-glucuronide 등이 보고 되어있으며 그 약리활성으로는

혈관 이완 효과,¹⁹⁾ 심근 기능 개선 효과,²⁰⁾ 항산화 효과,²¹⁾ 항염증 효과,²²⁾ 기관지 확장 효과²³⁾ 등이 보고되었다. 한편, 포도 농가에서는 포도를 재배할 때, 품질을 높이기 위해 생육시기별로 포도 잎의 순을 따주는데 이때 포도 잎은 전량 폐기 되고 있어 포도 잎의 효능을 규명하고 기능성을 밝힘으로써 버려지는 포도 잎의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 캠벨얼리 잎 에탄올 추출물의 AD 치료제 및 건강기능식품의 후보 소재로서의 가능성을 검토한 결과, $A\beta$ 분비 및 AChE 효소 활성에 대한 효능을 확인하였다. 이에 AD의 치료제 및 기억력 개선 건강기능 식품의 후보 소재로 캠벨얼리 잎이 사용될 수 있을 것으로 사료되는 바 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 - APP Swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐 유래 신경 세포주인 Neuro2a(APP^{swe})는 5% fetal bovine serum(FBS, SERENA Science for life, Brandenburg, Germany), penicillin streptomycin(P/S, Lonza, Walkersville, MD, USA), L-glutamine(GE healthcare Hyclone, Logan, UT, USA), hygromycin B(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Lonza, Walkersville, MD, USA) & Opti-MEM(Gibco, Grand Island, NY, USA)의 혼합 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 사용하였다.

시료 제조 및 시약 - 캠벨얼리 잎(*Vitis labruscana* B. leaves; VLL) 추출물(표본번호: HP-01-2019)은 한풍제약(Wanju, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 캠벨얼리 잎은 2019년 7월~8월 전라북도 김제시 백구면에서 채취하였으며, 건조 시료(2.2 kg)를 3% 아세트산이 첨가된 50% EtOH로 85°C에서 3시간 동안 2회 환류 추출하였다. 추출액은 여과 후 60°C 이하에서 감압 농축 및 진공 건조하여 추출물 300 g을 얻었다(수율 13.6%). 추출물은 일정량의 DMSO(dimethyl sulfoxide, Biolife solution Inc, Bothel, WA, USA)에 용해하여 실험에 사용하였다.¹⁹⁾ 사용한 시약은 다음과 같다. β -secretase inhibitor IV, γ -secretase inhibitor IX(Calbiochem, Darmstadt, Germany), galantamine(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA), acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*, protease inhibitor(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), anti-human sAPP α monoclonal antibody 2B3(Immunobiological Laboratories, Gunma, Japan), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20(Calbiochem, Darmstadt, Germany), rabbit anti-actin polyclonal antibody(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), rabbit APP369 polyclonal antibody human amyloid β (1-40),²⁴⁾ human amyloid

β (1-42), cell viability EZ-cytox assay kit(CCK-8), acetylcholinesterase assay kit (Dogen bio Co. Ltd, Seoul, Korea), easy-spin™ total RNA extraction kit(iNtRON biotechnology, Seoul, Korea), TOPreal™ one-step RT qPCR kit(enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용했다.

β -amyloid(A β)의 분비 억제 효과 검정 - APP_{swe} 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA를 수행하였다. APP_{swe} 세포주를 6 well plate(SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 1×10^6 cells/well이 되게 배양한 다음, serum-free DMEM으로 희석한 VLL을 1, 10, 25, 50 μ g/mL의 농도로 16시간 동안 처리한 후 배양액을 PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였으며 양성대조군으로 β -secretase inhibitor IV 10 μ M를 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, horseradish peroxidase(HRP) conjugation된 A β (11-28) 특이적 monoclonal antibody를 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 9회 세척한 후 tetramethyl benzidine(TMB) 기질액을 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 정지액 100 μ L를 첨가하여 450 nm에서 microplate reader(Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

세포독성 분석 - EZ-cytox kit를 사용하여 VLL의 APP_{swe} 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다. 96 well plate(SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 5×10^3 cells/well이 되도록 배양한 뒤 VLL을 1, 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 16시간 처리하였다. Water-soluble tetrazolium 용액 10 μ L를 첨가하여 1시간 배양한 후, 450 nm에서 microplate reader (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

단백질 발현 분석 - APP_{swe} 세포주를 6 well plate(SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 1×10^6 cells/well이 되도록 배양한 뒤 serum-free DMEM으로 희석한 VLL 1, 10, 25, 50 μ g/mL 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor IV 10 μ M을 16시간 처리하였다. Protease inhibitor(GenDEPOT, Katy, TX, USA)가 포함된 cell lysis buffer(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA)를 넣고 초음파 분쇄하여 시료로 사용하였다. Bicinchonnic acid(BCA) protein assay reagent (Thermo Fisher Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 정량한 뒤, 단백질 50 μ g을 7%, 10% tris-glycine 또는 16.5% tris-tricine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, sAPP α , APP carboxyl-terminal fragment (CTF) 등의 단백질 양상을 Azure C-600(Azure Biosystems, Dublin, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 3회 반복 실험으로 얻

어진 단백질 밴드를 Image J software(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)에 의해 정량 하였으며 α -tubulin 밴드를 기준으로 보정하였다.²⁵⁾

Total RNA의 분리 및 RT-qPCR(Reverse transcription-quantitative real-time PCR) 분석 - APP_{swe} 세포주를 6 well plate(SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 1×10^6 cells/well이 되도록 배양한 뒤 serum-free DMEM으로 희석한 VLL 1, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 7시간 처리하였다. 배지 상등액을 제거한 후 easy-spin™ total RNA extraction kit(iNtRON biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 프로토콜 매뉴얼에 따라 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정(Nanodrop ND-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Inc., San Jose, CA, USA)하여 total RNA를 정량하였다. 각 시료는 200 ng/2 μ L이 되도록 희석하여 사용하였다.

APP의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 RT-qPCR을 실시하였다. 실험에 사용한 APP primer sequence는 forward가 TGG CCA ACA TGA TTA GTG ACC 이며 reverse가 AAG ATG GCA TGA GAG CAT CGT 이었다. GAPDH의 primer sequence는 forward가 AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG 이며 reverse가 GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT 이었다.²⁶⁾ PCR tube에 10 pmol로 희석한 primer; 1 μ L, Enzyme mix; 1 μ L, 2 \times reaction mix; 10 μ L, 희석한 RNA; 2 μ L, sterile water(RNase free); 7 μ L 를 넣은 다음 분석을 진행하였다. 반응은 reverse transcription 50°C에서 30분, initial denaturation 95°C에서 10분, denaturation 95°C에서 5초, annealing & elongation 60°C에서 30초, cycle의 반복은 40 회로 설정하여 Rotor-gene 3000(Corbett research, Mortlake, Sydney, Australia)을 이용하여 분석하였으며, 결과는 Rotor-gene 6프로그램으로 분석결과를 수치화 하였다.

Acetylcholinesterase(AChE) 억제 활성 분석 - VLL의 AChE 억제 활성을 측정하기 위해 acetylcholinesterase activity colorimetric assay kit(Dogen bio Co. Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 DMSO 또는 VLL을 1, 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 첨가하고, AChE (*Electrophorus electricus*)를 10 μ L씩 넣은 후 reaction mixture (AChE assay buffer; 45 μ L, AChE enzyme mix; 2 μ L, AChE probe; 2 μ L, AChE substrate; 1 μ L: 1 assay 기준)를 50 μ L씩 넣고 차광하여 실온에서 20분 반응 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로 10 μ M galantamine을 사용하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 AChE의 활성 100%로 하여, 각 시료에 대한 억제 활성을 백분율로 3회 반복하여 분석한 후 통계 처리하였다.

통계처리 - 모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험(n=3)을

통해 mean ± standard error 값으로 나타내었다. 각 반복 실험에 사용한 음성대조군(control)을 100%로 하여 각 시료의 값을 백분율로 구했으며 3회 반복실험에서의 각 시료 값의 통계 분석은 Student's *t*-test와 one-way ANOVA test(Graph Pad Prism 5 software, La Jolla, CA, USA)를 실시한 후 0.1%, 1% 및 5%의 유의수준으로 검정하였다(**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

결과 및 고찰

캠벨얼리 50% 에탄올 추출물(VLL)의 β-amyloid(Aβ) 분비억제 활성과 세포독성 - VLL을 농도별로 APP_{swe} 세포주에 처리한 후 세포배양액으로 분비된 Aβ를 sandwich ELISA 방법으로 측정하였다. DMSO를 처리한 시료인 음성대조군(C)의 Aβ의 분비량과 비교하여 백분율로 표시하였다. VLL 1, 10, 25, 또는 50 μg/mL 처리 시 Aβ₁₋₄₀의 분비량은 각각 음성대조군의 97.01±1.5, 77.08±10.7, 64.53±16.0, 49.61±12.4%이었으며, Aβ₁₋₄₂의 분비량은 각각 음성대조군의 106.4±7.7, 80.23±10.1, 58.80±7.2, 36.74±7.1%이었다. VLL은 농도 의존적으로 두 종의 Aβ에 대해 그 분비량을 감소시켰으며 특히 Aβ₁₋₄₀에 대한 억제 효과보다 Aβ₁₋₄₂에 대하여 더 강한 분비 억제 효과를 나타냈다. 즉, VLL 50 μg/mL 처리는 Aβ₁₋₄₂의 분비를 약 63% 억제하였으며 Aβ₁₋₄₀의 분비는 약 50% 억제하였다. 한편, 양성대조군으로 사용한 10 μM의 β-SI(β-secretase inhibitor IV)는 Aβ₁₋₄₀와 Aβ₁₋₄₂에 대하여 각각 약 63%, 67%의 분비억제 활성을 보였다(Fig. 1). Aβ₁₋₄₂는

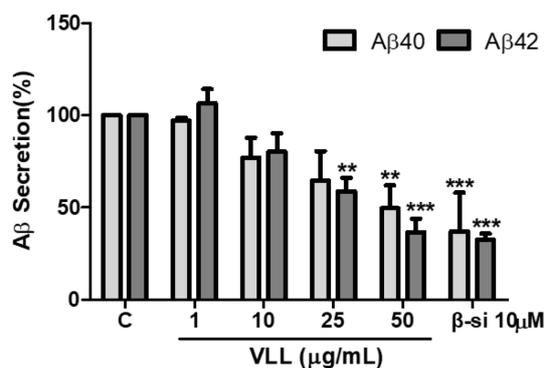


Fig. 1. Effects of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves on the secretion of β-amyloid. APP_{swe} cells were treated with DMSO (C) or various concentrations (1, 10, 25, or 50 μg/mL) of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves (VLL) for 16 h. The supernatant was used for Aβ40/42 ELISA. Data are mean ± SE of three independent experiments. (***p* < 0.01, ****p* < 0.001 between treated and control cells by one-way ANOVA test using Graph Pad Prism 5 software. C; negative control, treatment of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO), β-secretase inhibitor 10 μM (β-si); positive control, treatment of 10 μM of β-secretase inhibitor, Aβ40; β-amyloid 40, Aβ42; β-amyloid 42).

Aβ₁₋₄₀에 비해 소수성이 상대적으로 커 신경 독성이 강하며 Aβ 응집 및 섬유화를 유도하기 때문에 Aβ₁₋₄₂ 단량체의 증가는 AD의 원인으로 알려져 있으며, 치매 환자의 진단을 위해 뇌척수액의 Aβ₄₂/Aβ₄₀ 비율이 중요한 바이오마커로서 사용되고 있다.^{27,28)}

따라서 Aβ₁₋₄₂를 선별적으로 표적화 할 수 있는 치매 치료제를 개발하는 것이 필요하다고 할 수 있다. 한편, Aducanumab 임상시험 결과, Aβ를 감소시킴으로써 신경독성을 차단하고 타우 병리를 감소시켰다. 이는 Aβ 독성이 과인산화 타우(tau) 형성과 축적을 유도한다는 기존의 가설을 증명해준다.²⁹⁾

VLL의 APP_{swe} 세포주에 대한 세포독성을 분석한 결과, VLL 각각 1, 10, 50, 또는 100 μg/mL 처리 세포의 생존율은 각각 대조군 처리 세포의 생존율의 101.8±4.7, 100.1±3.2, 88.96±2.1, 76.26±2.4%를 나타내었다(Fig. 2). 100 μg/mL의 VLL은 APP_{swe} 세포주에 대해 약 24% 세포독성을 나타내어 이하의 실험에는 50 μg/mL을 최고 농도로 처리하였다. 50 μg/mL의 VLL 처리시 약 11%의 APP_{swe} 세포주가 사멸한 반면에, Fig 1에서 본 바와 같이, 50 μg/mL의 VLL 처리시 Aβ₁₋₄₂의 분비량은 대조군 대비 약 63%가 감소하였다. 약 11%의 세포 사멸이 Aβ₁₋₄₂의 분비를 일정 부분 감소시켰을 수는 있지만, Aβ₁₋₄₂의 분비량을 감소시킨 주된 기전이 VLL의 세포 독성에 의한 것이 아님을 의미한다. 한편, VLL은 세포주에 따라 세포 독성이 다르게 나타나는 경향이 있는데, Pariyar 등의 보고에 의하면 동일한 시료를 신경세포

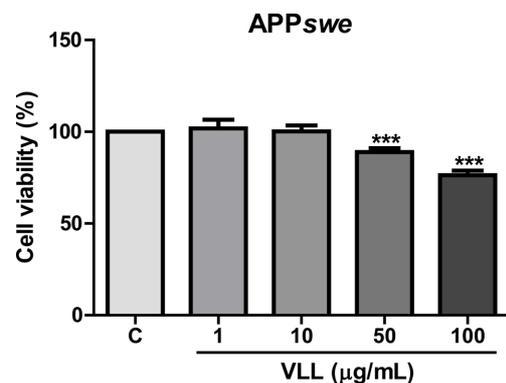


Fig. 2. Effects of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves on the APP_{swe} cell viability. APP_{swe} cells were cultured at confluency in a 96 well plate with various concentrations (1, 10, 50, or 100 μg/mL) of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves (VLL) for 16 h. Cells were added to the EZ-Cytox reagent and incubated for 1 h. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader. Data are mean ± SE of three independent experiments. (***p* < 0.01, ****p* < 0.001 between treated and control cells by one-way ANOVA test using Graph Pad Prism 5 software. C; negative control, treatment of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO).

주인 SH-SY5Y 세포주에 처리했을 경우, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서도 세포 독성이 전혀 나타나지 않았으며 오히려 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였다.³⁰⁾ 현재 본 연구팀도 VLL의 효능 검정을 위해 SH-SY5Y 세포를 이용하여 APP^{swe} 과발현 세포주를 제작하고 있어 향후, 세포주에 따른 VLL의 효능을 더욱 면밀히 규명할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

캠벨얼리 50% 에탄올 추출물(VLL)이 APP(amyloid precursor protein)와 관련 단백질 발현 및 mRNA 발현에 미치는 영향 - Fig. 1의 결과를 바탕으로 VLL이 A β 의 분비를 억제하는 데 있어 어떤 기전으로 작용하는지 규명하기 위해 VLL 1, 10, 25, 또는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 APP^{swe} 세포주로부터 세포 분획 또는 배양액을 회수하여 APP 및 관련 단백질인 sAPP α 와 CTF의 단백질 발현 수준을 western blot 방법으로 검정하였다. A β 의 억제 기전은 첫째, APP의 아밀로이드 대사 경로에 작용하는 β -secretase를 억제하는 것으로 기질 경쟁적 효소인 α -secretase의 활성이 증가하게 되고 결국 APP의 분해산물인 sAPP α , P3 단편, α -CTF의 단백질 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있다. Fig. 1과 Fig. 3의 A-C에서 보는 바와 같이, 양성대조군인 β -SI 를 처리한 세포주는 배양액에서 음성대조군 대비 sAPP α 를 약 5배 더 검출할 수 있었다. 두번째 기전으로는 α -secretase와 β -secretase의 분해산물인 α -CTF와 β -CTF를 분해하는 γ -secretase를 억제하는 것인데, 결국 기질인 α -CTF와 β -CTF가 세포 내에 축적되며 분해산물인 A β 는 감소하게 된다. Fig. 3D에서 보는 바와 같이, 양성대조군으로 사용한 γ -si(γ -secretase inhibitor)를 처리한 세포주는 α -CTF와 β -CTF가 세포 내에 축적된다. VLL을 농도별로 처리한 후, 세포주의 세포 분획으로부터 APP와 APP-CTF 단백질을 검정하였고, 세포 배양액으로부터는 sAPP α 단백질을 western blot 후에 Image J로 분석하였다. Fig. 3A와 3B에 나타난 바와 같이, VLL 1, 10, 25 또는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 APP 단백질의 발현량은 음성대조군(DMSO 처리군)에 비해 각각 100.9 \pm 12.0, 117.7 \pm 19.8, 84.9 \pm 19.0, 50.6 \pm 10.1%를 나타냈다. APP 단백질의 발현량이 감소하게 되면 그 분해 산물은 당연히 감소할 것으로 예상된다. 위에서 기술한 2가지의 A β 의 억제 기전이 아닌 다른 기전으로서, A β 의 출발 물질인 APP의 발현을 제어함으로써 A β 를 억제할 수 있는 것이다. 앞에서 A β 억제의 주된 기전에 대해 고찰한 바와 같이, 약 11%의 세포 사멸이 APP의 단백질 발현을 일정 부분 감소시켰을 수는 있지만, APP의 단백질 발현을 감소시킨 주된 기전이 VLL의 세포 독성에 의한 것이 아닌 것으로 예측된다. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 VLL 처리시 약 11%의 APP^{swe} 세포주가 사멸한 반면에, Fig 3B에서 본 바와 같이, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 VLL 처리시 APP의 발현량은 대조군 대비 약 49%가 감소하였다. 그리고 대조단백질인 α -tubulin은 VLL에 의해 그 발현량에는

변화가 없었다.

한편, 배지에 분비된 sAPP α 단백질의 경우 VLL 1, 10, 25, 또는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 음성대조군에 비해 각각 113.1 \pm 13.3, 105.6 \pm 19.6, 57.7 \pm 13.8, 45.1 \pm 17.9%로 분비량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A, 3C). sAPP α 단백질은 APP 단백질이 α -secretase에 의해 대사되어 배양액으로 분비되는 단백질로 출발 물질인 APP의 단백질 발현량이 감소한 만큼 동반하여 감소할 것으로 예상할 수 있다. 즉, VLL 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 APP 단백질의 발현량(84.9 \pm 19.0, 50.6 \pm 10.1%)와 배양액에서 검출된 sAPP α 단백질량(57.7 \pm 13.8, 45.1 \pm 17.9%)를 비교하면 유사한 수준이다(Fig. 3B, 3C).

다음으로 VLL의 γ -secretase에 대한 영향을 확인하고자 VLL 처리 세포분획물을 tris-tricine gel로 분리하여 α -CTF와 β -CTF 단백질 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, VLL 1, 10, 25 또는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 α -CTF 단백질 양은 음성대조군에 비해 각각 123.9 \pm 17.4, 109.7 \pm 23.4, 104.5 \pm 20.2, 109.4 \pm 13.7%를 나타냈다. β -CTF 단백질은 음성대조군에 비해 각각 111.3 \pm 12.9, 98.9 \pm 14.8, 80.8 \pm 5.4, 85 \pm 8.6%로 α -CTF 단백질과 비슷한 발현량의 변화 양상을 보였다(Fig. 3D, 3E, 3F). 즉, VLL 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 APP와 sAPP α 의 단백질 양이 음성대조군에 비교해 약간 증가한 양상을 보였으며, APP-CTF 단백질 역시 음성대조군에 비교해 약간 증가하거나 비슷한 수준의 발현량을 확인할 수 있다. 그러나 VLL 처리한 세포분획물의 APP-CTF 단백질 양상을 양성대조군인 γ -si 처리시 세포분획물에 축적된 2종의 CTF와 비교하면, VLL 농도 의존적으로 증가하지 않았으며 VLL 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 β -CTF 단백질은 오히려 감소하는 경향을 보였는데, 그 이유는 동일 농도 처리시 기질분자인 APP의 발현량이 감소하였기 때문이라고 생각한다. 반면 α -CTF 단백질은 VLL 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 APP의 발현량이 감소했음에도 음성대조군에 비해 그 발현량이 감소하지 않았다. 양성대조군인 γ -si 처리시 α -CTF 단백질의 축적 양상은 β -CTF 단백질의 축적된 양보다 약 8배 정도 많은 양상을 보였다. 따라서 VLL 역시 β -CTF 단백질의 양에 비해 α -CTF 단백질이 약 3배 정도 많이 검출되는 경향을 보였기 때문에 VLL의 활성 가운데는 γ -secretase에 대한 약한 저해 활성을 가지고 있을 수 있다고도 생각된다. 향후, 시험관내 γ -secretase 저해 활성을 확인하고 그 유효성분을 규명하는 연구도 수행되어야 한다. 이상 살펴본 바와 같이, VLL이 A β 생성을 억제하는 주된 기전은 APP의 아밀로이드 대사 경로에 작용하는 β -secretase 또는 γ -secretase를 표적하는 것이 아니라, APP 단백질 발현을 감소시키기 때문이라고 생각한다. 이러한 결과를 바탕으로 VLL이 APP^{swe} 세포주에서 APP mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별 VLL(1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 APP^{swe} 세포주의 RNA를 분리하

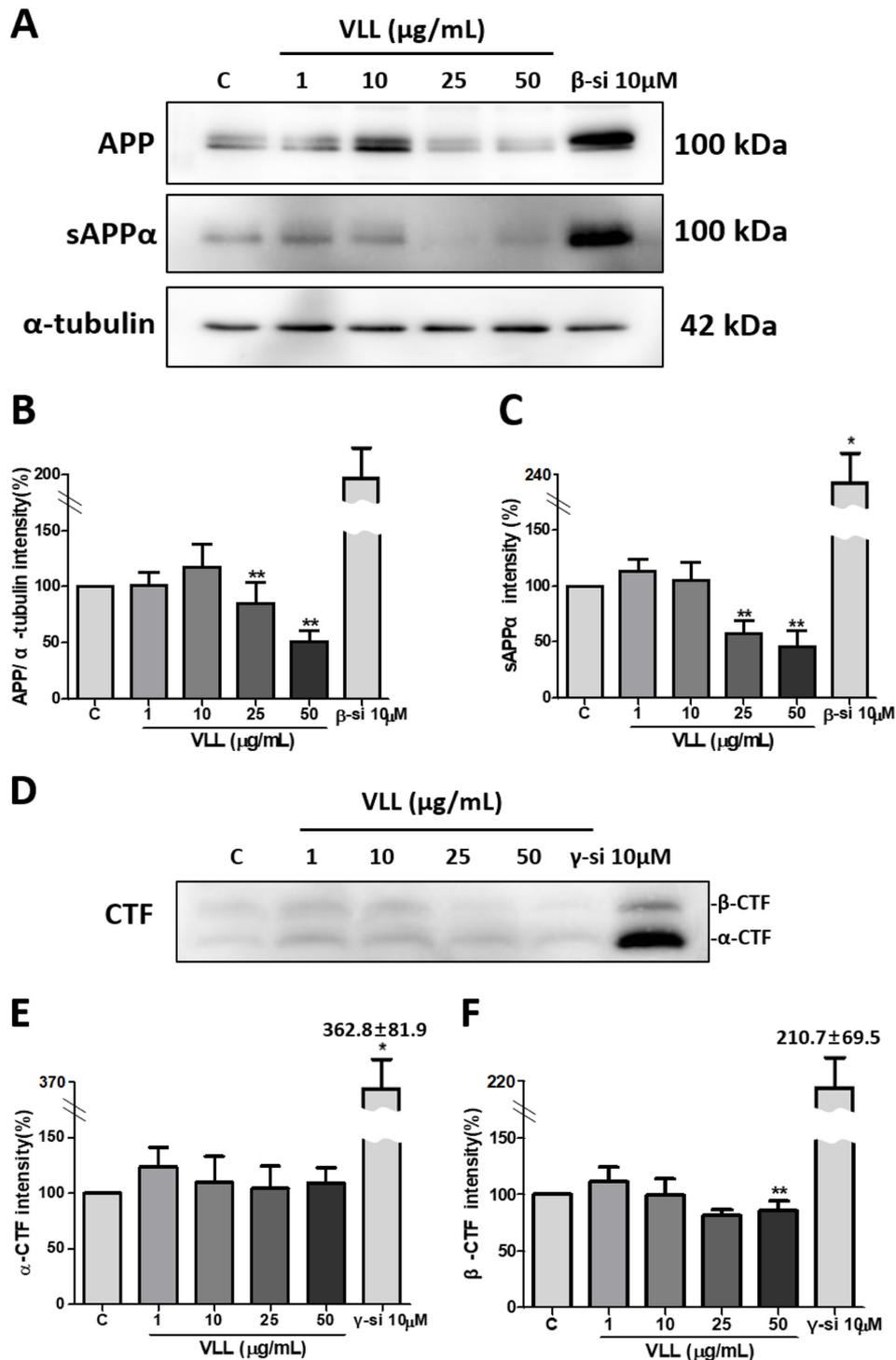


Fig. 3. Effects of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves on the metabolism of amyloid precursor protein. APP_{swE} cells were treated with DMSO (C) or 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves (VLL) for 16 h and lysed with a cell lysis buffer. The cell lysate or condition media was loaded on 7% SDS-PAGE and 16.5% Tris-tricine gel analyzed by immunoblotting. (A), (C): mouse anti-sAPPα (2B3) monoclonal antibody (1 : 400) (A), (B): rabbit anti-APP polyclonal antibody (1 : 10,000) (D), (E), (F): rabbit APP369 polyclonal antibody (1 : 1,000). α-tubulin was used as the control protein. Protein levels were quantified by the relative expression to α-tubulin using the Image J 1.37 software. Data are mean ± SE of three independent experiments. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01 between treated and control cells by one-way ANOVA test using Graph Pad Prism 5 software. C; control, treatment of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO), APP; Amyloid precursor protein, sAPPα; soluble APPα, CTF-α; APP carboxyl-terminal fragment α, CTF-β; APP carboxyl-terminal fragment β).

여 RT-qPCR(Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction)을 실시하였다. 기준 유전자는 house keeping gene인 GAPDH를 사용하였다. 그 결과 VLL 1, 10, 25, 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 APP mRNA 발현양은 음성대조군과 비교하여 각각 91 ± 18.9 , 82.7 ± 30.1 , 56.5 ± 7.4 , $40.7 \pm 10.4\%$ 을 나타냈으며, 결국 VLL 처리한 APP_{Swe} 세포 주에서 VLL 농도의존적으로 APP의 mRNA 발현량을 감소시켰다(Fig. 4). Fig. 3A에서 살펴본 바와 같이, APP 단백질의 발현량의 감소는 APP mRNA 양에 따른 것으로 결론지을 수 있다. 유 등은 VLL이 quercetin-3-O-glucuronide, quercetin, kaempferol 등의 플라보노이드 성분을 주성분으로 가지고 있다고 보고하였다.¹⁹⁾ 한편, 녹차의 유효성분인 EGCG는 노화, 염증을 억제하며 A β 의 독성으로부터 항산화 작용과 항염증 작용 등을 통하여 신경세포 보호 작용을 나타낸다.³¹⁾ 서론에서도 기술한 바와 같이, EGCG가 APP를 과발현시킨 세포주에서 APP 전사 후 수식 과정을 조절하여 APP 단백질의 발현을 현저히 억제한다고 보고하였다.⁷⁾ 또한, EGCG는 햄스터 구강암세포와 생체내에서 APP 유전자의 전사 및 단백질 발현 과정을 모두 억제하여 mRNA 및 단백질 발현량을 현저히 저해하였다고 보고하였다.³²⁾ 또 다른 천연 성분인 알파 토크페롤이 신경세포에서 APP의 전사 단계를 유의적으로 억제한다고 보고되었다.⁶⁾ VLL이 신경세포주인 APP_{Swe} 세포에서 APP 유전자의 전사 과정을 억제함으로써 단백질 발현량을 저해하였으며 그 결과 A β 생성을 억제하였는데, 이는 VLL의 활성성분으로 예측되는 EGCG를 비롯한 여러 화학성분이 직접 또는 간접적으로 APP의 전사 과

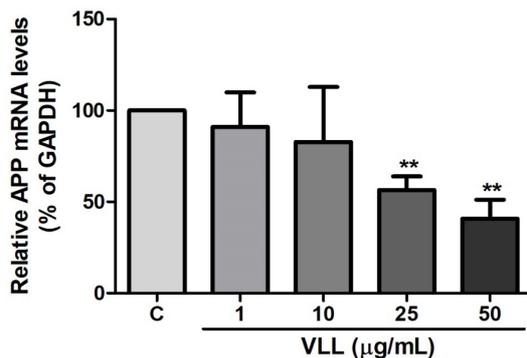


Fig. 4. Effects of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves on the inhibition of APP mRNA expression. The APP_{Swe} cells were cultured in 6 well plate (SPL life science Inc., Pocheon, Korea) to be 1×10^6 cells/well, and then treated with serum-free DMEM for 7 h at a concentrations of VLL 1, 10, 25, or 50 $\mu\text{g/mL}$. Data are mean \pm SE of three independent experiments (** $p < 0.01$ between treated and control cells by one-way ANOVA test using Graph Pad Prism 5 software. C; control). Primer used in the Real-time PCR was synthesized by Bioneer, and the base sequence information is as follows.

정을 조절한 것으로 생각된다.

캠벨얼리 50% 에탄올 추출물(VLL)의 AChE(acetylcholinesterase) 억제 활성 - VLL의 AChE 활성에 대한 영향을 확인하기 위해 농도별 VLL(1, 10, 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$)의 시험관 내 AChE 효소 활성을 검정하였다. 효소 활성 검정은 세포를 사용하지 않고 시험관 내에서 효소에 대한 직접적인 영향을 측정하는 실험이므로 VLL의 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지 사용하였으며, 양성대조군으로 galantamine을 사용하였다. 그 결과, 음성대조군과 비교하여 VLL 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 저해 활성을 보이지 않았으나 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 각각 27.6, 54.7%의 저해 활성을 나타냈다(Fig. 5). 한편 galantamine 10 μM 은 $58.3 \pm 4.5\%$ 의 저해 활성을 나타냈다. 현재 치매의 진행을 경감시키는 약물로 AChE 저해제인 도네페질(donepezil), 갈란타민(galantamine) 및 리바스티그민(rivastigmine) 등 AChE 억제제가 주로 사용되고 있어 천연물의약품으로서 새로운 AChE 억제제를 개발하는 것이 또한 요구되고 있다. VLL의 항AChE 유효성분을 규명한다면, 새로운 AChE 억제제 개발에 기여할 것으로 생각된다.

아두카누맙(aducanumab)이 AD치료제로서 FDA의 승인을 받음으로써 많은 단클론항체 치료제가 임상시험 단계에 있어 기대가 된다. 최근에는 장내 정상세균총을 표적으로 하는 다당류 성분을 AD 치료 후보 약물로 개발하여 임상시험 중이며, 많은 다국적 제약사와 연구자들이 다양한 타겟 발굴을 통해 치료제 개발에 박차를 가하고 있다. 최근 VLL과 그 주성분인 quercetin-3-O-glucuronide가 Akt, ERK와 CREB

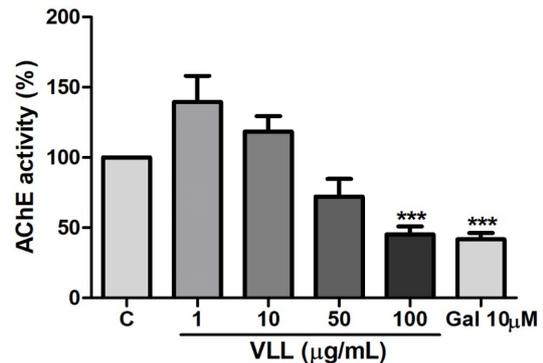


Fig. 5. Effects of 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves on acetylcholinesterase activity. 50% ethanol extract of *Vitis labruscana* B. leaves (VLL) was prepared at final concentrations of 1, 10, 50, or 100 $\mu\text{g/mL}$ with the acetylcholinesterase (AChE) assay buffer. Galantamine was used as the positive control. Data are mean \pm SE of three independent experiments (***) $p < 0.001$ between treated and control cells by one-way ANOVA test using Graph Pad Prism 5 software. C; negative control, treatment of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO), Galantamine 10 μM (Gal); acetylcholinesterase inhibitor).

신호전달을 활성화 시킴으로써 스코폴라민 유도에 의한 기억 손상을 회복시킨다고 보고되었다.

이런 관점에서 APP의 전사 및 단백질 발현 과정을 조절하는 치료기술 개발도 모색되고 있는 바 VLL이 APP의 전사 조절을 통해 치매 유발 물질인 A β 생성을 억제하는 연구결과는 시사하는 바가 크다고 할 수 있다.^{33,34)}

결 론

VLL이 APP 유전자의 전사를 억제함으로써 치매 유발 물질인 A β 생성을 억제하였으며, AChE 효소 활성을 억제하여 치매 증상의 경감을 조절하는 천연물의약품 소재로서의 개발 가능성이 제시되었다. 향후, VLL과 그 효능 성분을 규명하고 APP^{swe} 형질전환 동물을 이용한 체계적인 전임상 시험을 통해 그 효능 기전이 규명된다면 천연물 의약품 개발에 한 걸음 더 나갈 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 성과물은 중소벤처기업부에서 지원하는 2021년도 맞춤형 기술파트너 지원사업(No. S3170274)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

인용문헌

1. Wiley, J. (2021) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **17**: 327-406.
2. Panza, F., Lozupone M., Logroscin, G. and Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **15**: 73-88.
3. Jiang, S., Li, Y., Zhang, X., Bu, G., Xu, H. and Zhang, Y. W. (2014) Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **9**: 6.
4. Kim, S. M., Mun, B. R., Lee, S. J., Joh, Y. C., Lee, H. Y., Ji, K. Y., Choi, H. L., Lee, E. J., Kim, E. M., Jang, J. H., Song, H. W., Jung, I. M., Choi, W. S. and Kang, H. S. (2017) TREM2 Promotes A β phagocytosis by upregulating C/EBP α -dependent CD36 expression in microglia. *Nature* **7**: 11118.
5. Kim, J. E. and Leem, J. Y. (2021) Acetylcholinesterase inhibitory activity and anti-amyloidogenic effect of *Cercis chinensis* Bunge seed ethanolic extract. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **29**: 337-344.
6. Arrozi, A. P., Shukri, S. N. S., Murshid, N. M., Shahzalli, A. B. A., Ngah, W. Z. W., Damanhuri, H. A. and Makpol, S. (2022) Alpha-and gamma-tocopherol modulates the amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein in an in vitro model of Alzheimer's disease: a transcriptional study. *Front Cell Neurosci.* **16**: 846459.
7. Reznichenko, L., Amit, T., Zheng, H., Avramovich-Tirosh, Y., Youdim, M. B., Weinreb, O. and Mandel, S. (2006). Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **97**: 527-536.
8. Seo, D. S., Jang, J. H., Kim, N. M. and Lee J. S. (2009) Optimal extraction condition and characterization of antidementia acetylcholinesterase inhibitor from Job's Tears (*Coix lachrymajobi* L.). *Kor. J. Med. Crop Sci.* **17**: 434-438.
9. Wurtman, R. J., Blusztajn, J. K., Ulus, I. H., Coviella, I. L., Buyukutsal, R. L., Growdon, J. H. and Slack, B. E. (1990) Choline metabolism in cholinergic neurons: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Adv. Neurol.* **51**: 117-125.
10. Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P. and Cavallaro, V. (2013) Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr. Neuropharmacol.* **11**: 388-413.
11. Sevigny, J., Chiao, P., Bussiere, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J. and Sandrock, A. (2016) The Antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**: 50-56.
12. Kim, S. Y. (2018) Past and future of drug treatments for Alzheimer's disease. *J. Kor. Neuropsychiatr. Assoc.* **57**: 30-42.
13. Talesa, V. N. (2001) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **122**: 1961-1969.
14. Kim, J. H., He, M. T., Kim, M. J., Park, C. H., Lee, J. Y., Shin, Y. S. and Cho, E. J. (2020) Protective effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **28**: 85-94.
15. Jeon, J. S., Joo, H. E., Choi, Y. M. and Chung, M. G. (2020) Vitamin B1, B2 and B3 contents of grape cultivated in Korea. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **49**: 814-821.
16. Sung, K. C. (2009) A study on the pharmaceutical and chemical characteristics of natural grape extract. *J. Kor. Oil Chemists Soc.* **26**: 341-349.
17. Lee, O. S., Moon, S. W., Kim, E. J. and Kang, B. S. (2008) Studies on physicochemical and sensory characteristics of new grape leaves tea by roasting treatment. *Intentional J. of Integrative and Alternative Medicine* **4**: 17-24.
18. Simpoulos, A. P. (2003) The traditional diet of Greece and cancer. *The First Michael J. Hill Memorial Lecture* **13**: 219-230.
19. Yu, J. J. and Kim H. Y. (2021) physiologically active components and vasorelaxation effect of *Vitis lавruscana* B. and *Vitis coignetiae* grapevine leaves at growth stages. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **53**: 40-45.
20. Hong, M. H. and Kim, H. Y. (2021) Effects of campbell early leaves extract on heart-kidney improvement cardiomyopathy in isoprenaline-induced rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **50**:

- 211-218.
21. Kim, J. H., Choi, S. K., Yu, Y. S., Yoon, K. S. and Seo J. S. (2012) Physiologically active components and antioxidant capacity of grapevine leaves at growth stages. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**: 772-778.
 22. Yoon, C. S., Kim, D. C., Ko, W. M., Kim, K. S., Lee, D. S., Kim, D. S., Cho, H. K., Seo, J. W., Kim, S. Y., Oh, H. C. and Kim Y. C. (2014) Anti-neuroinflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 17-22.
 23. Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P. and Bordignon-luiz, M. T. (2014) Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labruscana* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchem. J.* **114**: 115-163.
 24. Gandy, S., Simon, A. J., Steele, J. W., Lublin, A. L., Lah, J. J., Walker, L. C., Levey, A. I., Krafft, G. A., Levy, E., Checler, F., Glabe, C., Bilker, W. B., Abel, T., Schmeidler, J. and Ehrlich, M. E. (2010) Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann. Neurol.* **68**: 220-230.
 25. Leem, J. Y., Saura, C. A., Pietrzik, C., Christianson, J., Whnaker, C., King, L. S. T., Veselits, M. L., Tomuta, T., Gasparini, L., Iwatsubo, T., Xu, H., Green, W. N., Koo, E. H. and Thirnakaran, G. (2002) A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* **11**: 64-82.
 26. Schrötter, A., Pfeiffer, K., Magraoui, F. E. I., Platta, H. W., Erdmann, R., Meyer, H. E., Egensperger, R., Marcus, K. and Muller, T. (2012) The amyloid precursor protein (APP) family members are key players in S-adenosyl methionine formation by MAT2A and modify BACE1 and PSEN1 gene expression-relevance for Alzheimer's disease. *Mol. Cell proteomics* **11**: 1274-1288.
 27. Coimbra, J. R. M., Marques, D. F. F., Baptista, S. J., Pereira, C. M. F., Moreira, P. I., Dinis, T. C. P. Santos, A. E. and Salvador, J. A. R. (2018) Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Front Chem.* **6**: 178.
 28. Baldeiras, I., Santana, I., Leitao, M. J., Gens, H., Pascoal, R., Tabuas-Pereira, M., Beato-Coelho, J., Duro D., Almeida, M. R. and Oliveira, C. R. (2018) Addition of the A β 42/40 ratio to the cerebrospinal fluid biomarker profile increases the predictive value for underlying Alzheimer's disease dementia in mild cognitive impairment. *Alzheimer's Res. Ther.* **10**: 33.
 29. Cummings, J., Aisen, P., Lemere, C., Atri, A., Sabbagh, M. and Salloway, S. (2021) Aducanumab produced a clinically meaningful benefit in association with amyloid lowering. *Alzheimer's Res. Ther.* **13**: 98.
 30. Pariyar, R., Yoon, C. S., Svay, T., Kim, D. S., Cho, H. K., Kim, S. Y., Oh, H., Kim, Y. C., Kim, J., Lee, H. S. and Seo, J. (2017) *Vitis labruscana* leaf extract ameliorates scopolamine-induced impairments with activation of Akt, ERK and CREB in mice. *Phytomedicine* **36**: 8-17.
 31. Payne, A., Nahashon, S., Taka, E., Adinew, G. M. and Soliman, K. (2022) Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): New therapeutic perspectives for neuroprotection, aging, and neuroinflammation for the modern age. *Biomolecules* **12**: 371.
 32. Ko, S. Y., Chang, K. W., Lin, S. C., Hsu, H. C. and Liu, T. Y. (2007) The repressive effect of green tea ingredients on amyloid precursor protein (APP) expression in oral carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer lett.* **245**: 81-89.
 33. Cha, H. J., Shen, J. and Kang, J. (2022) Regulation of gene expression by the APP family in the adult cerebral cortex. *Sci. Rep.* **12**: 66.
 34. Chang, J. L., Hinrich, A. J., Roman, B., Norrbom, M., Rigo, F., Marr, R. A., Norstrom, E. M. and Hastings, M. L. (2018). Targeting amyloid- β precursor protein, APP, splicing with antisense oligonucleotides reduces toxic amyloid- β production. *Mol. Ther.* **26**: 1539-1551.

(2022. 6. 13 접수; 2022. 6. 22 심사;
2022. 6. 24 게재확정)