

Sesaminol Glucosides의 기억력 회복능 및 β , γ -Secretase 활성에 미치는 영향

이선영 · 손동주 · 하태열* · 홍진태#

충북대학교 약학대학, *한국식품개발연구원

(Received February 3, 2005; Revised March 21, 2005)

Protective Effect of Sesaminol Glucosides on Memory Impairment and β , γ -Secretase Activity *In Vivo*

Sun Young Lee, Dong Ju Son, Tae Youl Ha* and Jin Tae Hong#

College of Pharmacy, Chungbuk National University, 48, Gaesin-dong, Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

*Korea Food Research Institute, 46, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam, Keongki-do 463-746, Korea

Abstract — Alzheimers disease (AD) is the most prevalent form of neurodegenerations associated with aging in the human population. This disease is characterized by the extracellular deposition of beta-amyloid (A β) peptide in cerebral plaques. The A β peptide is derived from the β -amyloid precursor protein (β APP). Photolytic processing of β APP by β -secretase (beta-site APP-cleaving enzyme, BACE) and γ -secretase generates the A β peptide. Several lines of evidence support that A β -induced neuronal cell death is major mechanisms of development of AD. Accordingly, the β - and γ -secretase have been implicated to be excellent targets for the treatment of AD. We previously found that sesaminol glucosides have improving effect on memory functions through anti-oxidative mechanism. In this study, to elucidate possible other mechanism (inhibition of β - and γ -secretase) of sesaminol glucosides, we examined the improving effect of sesaminol glucosides in the scopolamine (1 mg/kg/mouse)-induced memory dysfunction using water maze test in the mice. Sesaminol glucosides (3.75, 7.5 mg/kg/6 ml/day p.o., for 3 weeks) reversed the latency time, distance and velocity by scopolamine in dose dependent manner. Next, β - and γ -secretase activities were determined in different regions of brain. Sesaminol glucosides dose-dependently attenuated scopolamine-induced β -secretase activities in cortex and hippocampus and γ -secretase in cortex. This study therefore suggests that sesaminol glucosides may be a useful agent for prevention of the development or progression of AD, and its inhibitory effect on secretase may play a role in the improving action of sesaminol glucosides on memory function.

Keywords □ sesaminol glucosides, Alzheimers disease, memory, β -secretase

진행성 치매의 일종인 Alzheimer's disease(AD)는 대부분 65세 이상의 고령인구에서 발병한다.¹⁻⁴⁾ 고령인구의 증가에 따라 AD 환자는 더욱 증가될 것이며 AD 환자를 돌보는 보호자들의 고통과 치료비용을 포함한 경제적인 손실까지 고려한다면 AD는 점차 공중보건문제에 있어서 더욱 중요한 위치를 차지하게 될 것이다. 이러한 AD 상태에서 신경전달물질을 통한 신경세포간의 정보교환과정이 파괴됨에 따라 신경세포의 기능이 정지되고 신경세포간의 연결이 끊어짐으로써 결과적으로 신경세포가 죽게 되는 질병이다.⁵⁻⁹⁾ 이 중에서 뇌의 학습, 기억, 사고, 행동, 감정

조절 등과 관련된 중추신경 영역, 특히 cortex와 hippocampus의 신경과피는 기억력장애와 사고능력저하로 이어지게 된다. hippocampus는 뇌의 깊은 부분에 존재하며 기억을 조절하는 부위로서 이곳이 파괴되면 단기기억력(short-term memory)이 감소하고 친숙한 일을 수행하는 능력이 떨어진다. Cortex는 사고능력을 조절하는 부위로서 이곳의 파괴에 의해 언어능력과 사고능력이 감소하게 된다.^{9,10)} AD는 비가역적인 행동과 인성의 변화, 사고능력의 저하를 나타내지만 이러한 병의 정확한 원인과 치료법은 밝혀지지 않았다. 주요 원인으로 APP가 β , γ -secretase에 의해 잘라진 beta-amyloid(A β)가 과형성되어 활성산소종을 유발하여 신경세포내 senile plaques를 형성하는 것이 제안되었다.¹¹⁻¹⁶⁾ 이러한 과량의 활성산소 형성은 신경세포사를 유발하며 여러 종류의 항산화물질들이 활성산소 형성을 억제하여 신경세

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2813 (팩스) 043-268-2732
(E-mail) jinthong@chungbuk.ac.kr

포사를 방어하여 치매치료에 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁷⁻²³⁾ 또한 AD 환자들 중에서는 APP 유전자의 돌연변이가 일어나 단백질의 구조 변화로 β , γ -secretase에 노출이 더 잘 되므로 많은 양의 A β 를 형성하게 되는데 이러한 A β 는 42개의 아미노산 잔기의 펩타이드로 기억 및 인식과 관련된 뇌 영역에 침착 되어 뇌세포사를 유발하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 최근 세포사와 관련된 caspase-3 단백질 분해 효소가 APP 유전자 돌연변이를 절단하며 이렇게 절단된 APP는 β , γ -secretase에 의해 보다 용이하게 A β 를 형성한다고 알려져 있으며, APP 과다 발현 형질전환쥐의 경우 노인반과 특이적 공간지각 기억 및 학습 저하되는 결과가 나타났다고 보고되어 있다.^{4,16)} 또한 콜린성 신경계의 기능손상과 밀접한 관련이 있는 무스카린 수용체 길항제인 scopolamine은 콜린 재흡수와 아세틸콜린 합성을 감소시키는데, 이 아세틸콜린 수용체 효현제들이 sAPP의 유리를 증진시켜주어 β , γ -secretase를 작용을 감소시킨다는 보고가 있다.^{24,25)} 그러므로 A β 의 생성에 중요한 역할을 하고 있는 β , γ -secretase를 억제하는 방법이 근본적인 AD 치료제로서 매우 효과적일 것이다.

참깨는 sesamin lignan 화합물인 sesamin, sasamol인 이들의 배당체인 sesaminol glucosides 등의 강력한 항산화물질을 함유하고 있어 산패에 대한 안정성이 높고 국민보건상 매우 중요한 전통식품으로 이용되고 있다.^{26,27)} 본 실험에서는 scopolamine에 의한 기억력 상실을 sesaminol glucosides가 β , γ -secretase enzyme의 억제를 통한 A β 생성 저해로 기억력 회복에 관여하는지를 행동약리 및 bioassay를 통해 알아보았다.

실험 방법

실험동물 및 시료

온도 20~23°C, 습도 50~60%에서 3주령 IcrTacSam:ICR (Samtako, INC., Korea) 수컷 생쥐를 3주간 sesaminol glucoside 3.75, 7.5 mg/kg/6 ml/day를 음용수로 투여하여 사용하였다. 실험 1군에 5마리를 사용하였다. 본 실험에 사용한 참깨는 sesaminol glucosides를 분리 추출하였다. 즉, 건조한 참깨에 n-Hexane으로 기름을 제거하고, 90~95°C에서 60% ethanol로 추출한다. 추출물을 Diaion HP20(구멍 지름, 90 Å)로 column chromatography를 한다. Sesaminol glucosides 총량은 UV 분광계로 정하며, HPLC로 구조를 정하였다.²³⁾

Sesaminol glucosides 및 scopolamine의 투여

생쥐를 5마리씩 4군으로 나누어 각각 다른 통에 넣어 대조군과 sesaminol glucosides 3.75, 7.5 mg/kg/6 ml/day를 음용수에 투여하여 3주간 투여한 군으로 구별하였다. 생쥐를 자극할만한 요인을 없애고 같은 조건 내에 사육하였다. Scopolamine 1 mg/

kg을 실험 30분 전에 복강 내 투여하였다.

Water maze 방법에 의한 기억능 시험

빛이 물에 비치지 않게 사방에 칸막이를 설치하고 원형 물탱크(지름 100 cm, 높이 35 cm)에 온도 22~25°C의 물에 표식통(지름 4.5 cm, 높이 14.5 cm)을 4등분 중 하나의 부채꼴 중앙에 위치하도록 하여 표식통 상단이 수면 1 cm 정도 까지 채우고 우유를 넣어 바닥이 비치지 않게 만든다. 생쥐를 입수 시켜 살아남기 위해 헤엄쳐 표식통을 찾아가게 고안되었다. Training trial은 1일 2회 실시한다. 일단 생쥐가 표식통을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 cage로 돌아가 있도록 한 5분 후에 다음 trial을 실시하여 120초 이내 표식통은 생쥐를 사용한다. Training이 끝난 생쥐를 대상으로 training trial 24시간 후에 probe test를 실시하여 표식통을 찾아 갈 때까지 체류하는 시간, 거리, 속도를 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다. Sesaminol glucosides를 3주간 투여하여 마지막 날에 훈련을 시행한다. 24시간 후에 water maze 장치를 이용하여 생쥐가 표식통에 도달한 체제시간과 거리, 속도를 측정한다.

β -Secretase assay

행동약리 실험 후 생쥐의 뇌를 hippocampus, cortex로 나눈다. PRO-PREP Protein Extraction Solution(iNtRON Bio technology Co., Ltd.)로 균질 분쇄한 뒤 10분간 vortex한 후 4°C에서 15,000 rpm로 2시간 원심 분리하여 상등액만 취한다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit(Bio-rad Co.)를 사용하여 측정한다. 단백질양의 측정방법은 다음과 같다. 1.46 mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 희석하여 standard를 준비한다(standard 희석배수; 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml). 단백질 standard와 준비한 시료를 각각 20 μ 씩 96 well microplate에 넣고 Bio-rad protein dye reagent를 180 μ 씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도를 측정하여 standard에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출한다. BACE1(β -secretase) FRET Assay kit(PANVERA)를 이용하여 β -secretase를 정량 하였다. 즉, 96 well plate에 10 μ /well로 넣고 BACE1 Assay Buffer (50 mM sodium acetate, pH 4.5)로 희석한 750 nM BACE1 substrate(Rh-EVNLDAEFK-Quencher in 50 mM ammonium bicarbonate)를 10 μ 를 넣어 조심스럽게 잘 섞어 준 후 빛을 차단한 상태에서 BACE1 Assay Buffer로 희석한 1 unit/ml BACE1 enzyme(50 mM Tris, pH 7.5 including 10% glycerol)를 10 μ 를 첨가한다. 실온에서 1시간 반응시킨 다음 BACE1 stop buffer (2.5 M sodium acetate) 10 μ 를 넣어 반응을 종료시킨다. Spectrofluorometer를 이용하여 excitation은 545 nm, emission은 585 nm에서 측정한다.

γ-Secretase assay

행동약리 실험 후 생쥐의 뇌를 hippocampus, cortex로 나눈다. PRO-PREP Protein Extraction Solution(iNtRON Bio technology Co., Ltd.)로 균질 분쇄한 뒤 10분간 vortex한 후 4°C에서 15,000 rpm로 2시간 원심 분리하여 상등액만 취한다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit(Bio-rad Co.)를 사용하여 측정한다. 단백질양의 측정방법은 다음과 같다. 1.46 mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 희석하여 standard를 준비한다(standard 희석배수; 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml). 단백질 standard와 준비한 시료를 각각 20 μl씩 96 well microplate에 넣고 Bio-rad protein dye reagent를 180 μl씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도를 측정하여 standard에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출한다. γ-Secretase Activity Kit (R&D systems)를 이용하여 γ-secretase를 정량 하였다. 즉, 96 well plate에 10 μl/well로 넣고 2X reaction buffer 50 μl를 첨가한다. EDANS/DABCYL substrate 5 μl를 넣어 조심스럽게 잘 섞어 준 후 빛을 차단한 상태에서 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 다음 Spectrofluorometer를 이용하여 excitation은 355 nm, emission은 510 nm에서 측정한다.

통계

연구 결과치는 one-way AVOVA로 분석하여 군간 유의성 여부를 판별하고 그 결과 군간 유의성은 Tukeys test로 분석하였다. P<0.05로 유의적 차이를 나타내었다.

실험 결과

Scopolamine로 유도된 기억력 상실에 대한 sesaminol glucosies의 기억력 회복능 효과

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물은 기억력 상실로 인하여 비교적 다른 경로를 거치지 않고 자신이 헤엄쳐 다닌 위치를 기억하여 표식통을 찾는 대조군에 비해 이동거리와 체제시간이 늘어났다. sesaminol glucosides를 투여한 생쥐에서는 대조군과 유사한 결과를 얻었다(자료 미제시). 반면 3주간 sesaminol glucosides를 투여한 후 scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 체제 거리는 sesaminol glucosides 3.75 mg/kg/6 ml/day 투여 시 5배 정도, 7.5 mg/kg/6 ml/day 투여 시는 30배 정도로 농도 의존적으로 현저하게 감소함으로써 기억력 회복기능을 보였으며, 체제 시간은 sesaminol glucosides 3.75 mg/kg/6 ml/day 투여 시 3배 정도, 7.5 mg/kg/6 ml/day 투여 시는 20배 정도로 농도 의존적으로 현저하게 감소함으로써 기억력 회복기능을 보였다. 또한 scopolamine 1 mg/kg을 처리한 동물에서 대조군에 비해 2배 정도 찾는 속도가 느려졌으며, sesaminol glucoside 3.75,

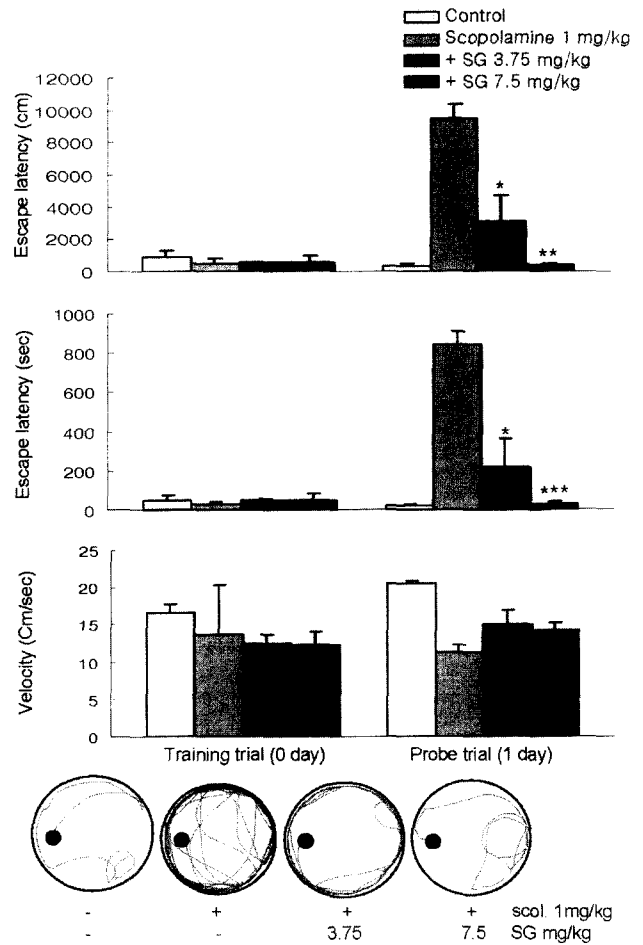


Fig. 1 – Inhibitory effect of sesaminol glucosides on memorial impairment induced by scopolamine 1 mg/kg in the water maze test. Sesaminol glucosides at 3.75 and 7.5 mg/kg/6 ml/day were administrated by p.o. for 3 weeks. The mice were given the swimming test task training trial. After 24 hr, swimming test was measured. Scopolamine (i.p. 1 mg/kg) was treatment 30 min before trail as a positive control. Each values are means ±S.E. from three separated experiments (n=5). *Significantly different from positive control (p<0.05).

7.5 mg/kg/6 ml/day를 투여한 후 scopolamine 1 mg/kg 처리한 군에서는 대조군 보다는 느리지만 scopolamine에 의해 느려진 속도를 0.5배 정도 개선하였다(Fig. 1).

Scopolamine로 유도된 기억력 상실에 대한 sesaminol glucosies의 β, γ-secretase 억제효과

Cortex에 비해 hippocampus가 β-secretase 양이 많았으며, scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물이 대조군과 비교해서 β-secretase의 형성이 낮았지만, 3주간 sesaminol glucosides를 투여 후 scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 β-secretase 활성은 cortex와 hippocampus에서 sesaminol glucosides 3.75,

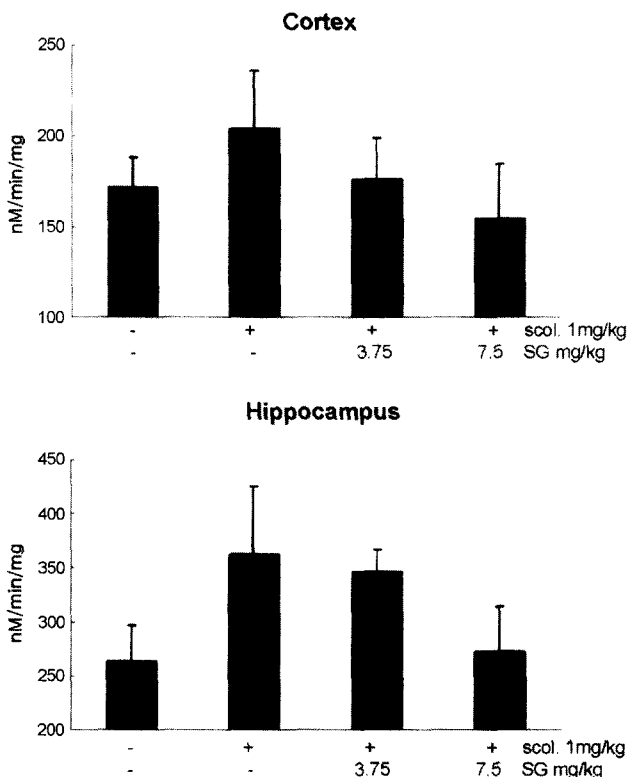


Fig. 2 - Inhibitory effect of sesaminol glucosides on β -secretase activity induced by scopolamine 1 mg/kg in cortex, hippocampus. Sesaminol glucosides at 3.75 and 7.5 mg/kg/6 ml/day were administrated by i.p for 3 weeks. Scopolamine (i.p. 1 mg/kg) was treatment 30 min before trail as a positive control. β -Secretes was determined by the method described in methods and materials in each portion of brain. Each values are means \pm S.E. from three separated experiments (n=5).

mg/kg/6 ml/day 투여 시 1배 정도, 7.5 mg/kg/6 ml/day 투여 시는 1.30배 정도로 농도 의존적으로 개선되었다(Fig. 2). 반면 γ -secretase 경우 cortex가 hippocampus에 비해 더 많이 발현하였으며, 대조군에 비해 scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 β -secretase 발현이 낮았다. Cortex의 경우 sesaminol glucosides 3.75 mg/kg/6 ml/day 투여 시 1.6배 정도, 7.5 mg/kg/6 ml/day 투여 시는 1.4배 정도로 농도 의존적으로 억제되었지만 hippocampus에서는 거의 변화가 없었다(Fig. 3). sesaminol glucosides를 투여한 생쥐에서는 대조군과 유사한 결과를 얻었다(자료 미제시).

고찰

퇴행성 신경질환인 AD는 비가역적으로 진행되는 치매로 60세 이상의 인구에서 나타나는 치매의 50% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있으며,^{1,4)} 사고력 및 학습과 기억력 저하 증상을 나타낸

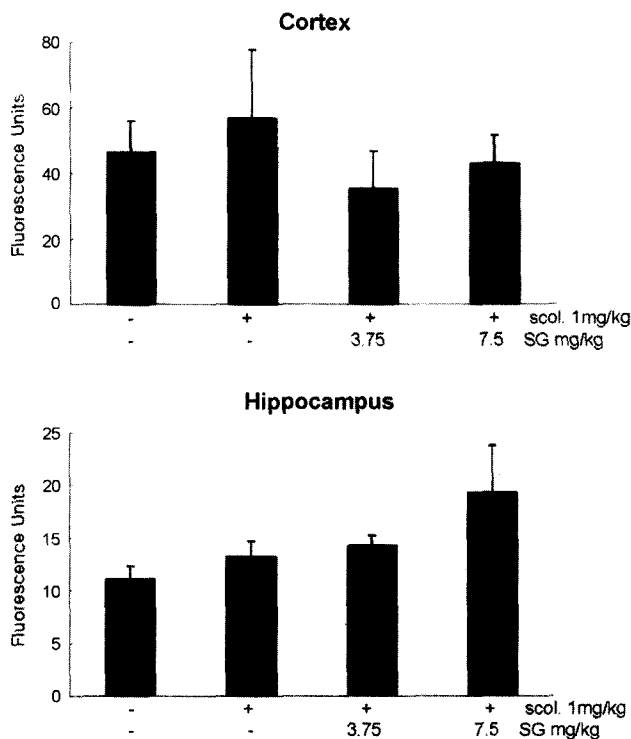


Fig. 3 - Inhibitory effect of sesaminol glucosides on γ -secretase activity induced by scopolamine 1 mg/kg in cortex, hippocampus. Sesaminol glucosides at 3.75 and 7.5 mg/kg/6 ml/day were administrated by i.p for 3 weeks. Scopolamine (i.p. 1 mg/kg) was treatment 30 min before trail as a positive control. γ -Secretes was determined by the method described in methods and materials in each portion of brain. Each values are means \pm S.E. from three separated experiments (n=5).

다. 주 병변으로는 cortex과 hippocampus에서 발견되는 비정상적으로 인산화 되어 있는 tau가 주성분인 neurofibrillary tangle와 세포밖에 축적되는 A β 가 주성분인 neuritic plaque이 있으며^{29,30)} 발병원인은 산화적 손상 즉, 세포내 다양한 활성산소종이 과도하게 생성되면¹¹⁾ amyloid precursor protein(APP)의 돌연변이를 유발하여 질병 원인 물질인 A β 를 축적시켜 세포사를 유도하는 질병으로 판단된다.¹²⁻¹⁵⁾ A β 는 40~42개의 아미노산으로 구성되어 있으며 APP의 분열과정을 통해서 생기며, 정상적으로 α -secretase는 APP 아미노산 배열순서 중간에 작용하여 A β 일부분을 포함하는 ectodomain 가용성 아밀로이드 전구단백질(soluble APP, sAPP α) 이 분열됨으로써 A β 의 생성은 억제되지만, β -secretase에 의해 APP의 세포바깥쪽에 위치한 A β 의 N-terminal에서 분열이 발생하면 가용성 APP(sAPP β)와 C-terminal APP가 생성된다. C-terminal APP는 γ -secretase에 의하여 가용성 A β 로 변환되어 분비되어 신경독성을 나타내게 된다.¹⁶⁾ 이러한 A β 는 free radical의 산화적 스트레스를 통해 더 생성이 촉진되어 신경세포사를 유발한다. 현재 A β 생성에 대한 신경세포사

를 억제하는 항산화제로 비타민류 중 E, C, A와 무기물 중 Zn, Li, Se과 flavonoid계 화합물인 Kampferol, Quercetin과 천연물에서 참깨, 녹차, curcumin, resveratrol 등이 치매치료 가능성이 있는 물질로 보고되고 있다.¹⁷⁻²³⁾

이전 연구에서 항산화물질이 신경세포사 억제 가능성으로 치매치료제 개발가능성에 착안하여 참깨 추출물 중 sesaminol glucosides이 PC12 cell에서 A β 신경독성 억제를 확인하였다.³¹⁾ 본 연구에서는 sesaminol glucosides의 A β 생성에 원인을 제공하는 β 및 γ -secretase를 억제하는지를 동물모델에서 sesaminol glucosides를 장기 투여하여, 공간 학습능력을 측정하는 water maze 방법을 통하여 scopolamine에 의한 기억력 손상에 대한 보호효과를 관찰한 결과 sesaminol glucosides 자체로는 기억능 자체변화에는 영향이 없었지만, scopolamine에 의한 기억 및 학습 억제에 대한 회복능력이 농도의존적으로 나타났다. 또한 생쥐 뇌의 cortex와 hippocampus에서 scopolamine에 의하여 유도된 β -secretase 활성을 억제여부를 측정된 결과 sesaminol glucosides가 cortex와 hippocampus에서 농도 의존적으로 억제하며, γ -secretase 활성도 cortex에서 농도 의존적으로 억제함으로써 A β 과형성을 억제함을 확인하였다. 이는 A β 생성과정에 있어서 동일한 APP에서 어떤 단백질 분해 효소가 작용하는가에 따라 amyloigenic pathway나 non-amyloigenic pathway를 거칠 수 있는데, α -secretase에 의해서는 sAPP α 가 되어 p53을 형성하면 무독하지만, β -secretase에 의해서는 sAPP β 와 C-terminol APP를 생성하는데 이 C-terminol APP 자체도 독성을 강하게 나타내는 데다가 다시 γ -secretase에 의해 또 잘려서 A β 를 생성하면 뇌세포에 노화와 퇴행성 신경질환을 유발하게 된다. 따라서 sesaminol glucosides의 치매 예방 및 치료 효과는 원인 물질 A β 생성하는 β -secretase 활성억제 능력과 관련성이 있는 것으로 판단된다. sesaminol glucosides는 AD 유발시키는 관련 효소 중 A β 생성에 가장 중요한 역할을 하고 있는 β -secretase를 γ -secretase보다 억제하는 것을 알 수 있다. 형성된 A β 의 산화 스트레스에 의한 산화적 손상을 매개하여 세포사 및 세포사 조절 유전자의 발현을 조절하는 중요한 기능을 가지고 있기 때문에 치매 발전 이전에 중요한 요소이다.¹⁶⁾ 또한 이전 연구에서 동물모델에 직접적으로 A β 를 투입했을 때 손상된 기억력을 sesaminol glucosides에 의해 회복되는 결과를 보았다.²⁷⁾ 이는 sesaminol glucosides가 A β 에 의한 뇌세포사를 직접적으로 방어하는 것으로 사료된다. 따라서 sesaminol glucosides는 A β 의 생성억제와 A β 독성 억제를 동시에 하여 예방과 치료에 병행이 가능성을 제시할 수 있다. 실제로 신경세포 PC12 cell의 경우에서도 A β 를 처리하였을 때 산화독성을 완화시켜주는 것을 확인할 수 있었으며, 뇌세포에 대부분을 차지하는 astrocyte 세포에서 염증 유도 물질 LPS를 처리했을 때 sesaminol glucosides에 의해 β , γ -secretase가 감소하는 양상을 보았다(자료 미제시). 다만, γ -

secretase 경우 활성을 억제하게 되면 Notch 단백질도 동시에 억제하여 다양한 부작용들이 예상되고 있어 치료제로 사용하는 데 논란이 많은 상태이다.²⁸⁾ 이상의 결과로 보아 sesaminol glucosides가 scopolamine에 의한 β , γ -secretase 활성 억제 및 A β 생성 억제를 통한 신경세포를 보호작용과 기억력회복의 중요한 기전임을 제시한다.

감사의 말씀

본 논문은 한국식품개발연구원의 연구비 지원에 의하여 수행된 과제로 지원에 감사드립니다.

문헌

- 1) Hardy, J. A. and Higgins, G. A. : Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **10**, 184 (1992).
- 2) Checler, F. : Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **65**, 1431 (1995).
- 3) Hardy, J. : Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **4**, 154 (1997).
- 4) Hwang, D. Y., Chae, K. R., Kang, T. S., Hwang, J. H., Lim, C. H., Kang, H. K., Goo, J. S., Lee, M. R., Lim, H. J., Min, S. H., Cho, J. Y., Hong, J. T., Song, C. W., Paik, S. G., Cho, J. S. and Kim, Y. K. : Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **16**, 805 (2002).
- 5) Ho, P. I., Collins, S. C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E. and Shea, T. B. : Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* **78**, 249 (2001).
- 6) Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchon, M. R. : Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci.* **15**, 5088 (2003).
- 7) Parks, J. K., Smith, T. S., Trimmer, P. A., Bennett, J. P. Jr. and Parker, W. D. Jr. : Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress *in vivo* through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition *in vitro*. *J. Neurochem.* **76**, 1050 (2001).
- 8) Butterfield, D. A. : beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity : implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 495 (1997).
- 9) Pappolla, M. A., Chyan, Y. J., Omar, R. A., Hsiao, K., Perry, G., Smith, M. A. and Bozner, P. : Evidence of oxidative stress and *in vivo* neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse

- model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **152**, 871 (1998).
- 10) Jain, N. K., Patil, C. S., Kulkarni, S. K. and Singh, A. : Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging- and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice. *Behav. Brain Res.* **133**, 369 (2002).
 - 11) Zhu, X., Raina, A. K., Lee, H. G., Casadesus, G., Smith, M. A. and Perry, G. : Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1000**, 32 (2004).
 - 12) Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A. and Carney, J. M. : Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* **131**, 193 (1995).
 - 13) Wang, J. Y., Shum, A. Y., Ho, Y. J. and Wang, J. Y. : Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J. Neurosci. Res.* **72**, 508 (2003).
 - 14) Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. and Nitsch, R. M. : Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **22**, 547 (2003).
 - 15) De Pietri Tonelli, D., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Codazzi, F., Grohovaz, F. and Zacchetti D. : Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1808 (2004).
 - 16) Zhao, J., Paganini, L., Mucke, L., Gordon, M., Refolo, L., Carman, M., Sinha, S., Oltersdorf, T., Lieberburg, I. and McConlogue, L. : Beta-secretase processing of the beta-amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 31407 (1996).
 - 17) Dajas, F., Rivera, F., Blasina, F., Arredondo, F., Echeverry, C., Lafon, L., Morquio, A. and Heizen, H. : Cell culture protection and *in vivo* neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox. Res.* **5**, 425 (2003).
 - 18) Lin, A. M., Chyi, B. Y., Wu, L. Y., Hwang, L. S. and Ho, L. T. : The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat brain. *Chin. J. Physiol.* **41**, 189 (1998).
 - 19) Choi, Y. T., Jung, C. H., Lee, S. R., Bae, J. H., Baek, W. K., Suh, M. H., Park, J., Park, C. W. and Suh, S. I. : The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci.* **21**, 603 (2001).
 - 20) Mazzio, E. A., Harris, N. and Soliman, K. F. : Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta. Med.* **64**, 603 (1998).
 - 21) Hong, J. T., Ryu, S. R., Kim, H. J., Lee, J. K., Lee, S. H., Yun, Y. P., Lee, B. M. and Kim, P. Y. : Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res.* **5**, 11 (2001).
 - 22) Kang, M. H., Naito, M., Tsujihara, N. and Osawa, T. : Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney. *J. Nutr.* **128**, 1018 (1998).
 - 23) Grundman, M., Grundman, M. and Delaney, P. : Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. *Proc. Nutr. Soc.* **61**, 191 (2002).
 - 24) Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J. and Growdon, J. H. : Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304 (1992).
 - 25) Mori, F., Lai, C. C., Fusi, F. and Giacobini, E. : Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* **6**, 633 (1995).
 - 26) Katsuzaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T. : Sesaminol glucosides in sesame seeds. *Phytochemistry* **35**, 773 (1994).
 - 27) Kim, S. R., Um, M. Y., Ahn, J. Y., Hong, J. T. and Ha, T. Y. : The Protective effects of sesaminol glycosides against cognitive deficits and oxidative stress induced by beta-amyloid protein in mice. *Physiologic Functions and Disease Risk Reduction* **3**, 120 (2003).
 - 28) Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L. and Hass, C. A. : A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling *in vivo* and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* **3**, 633 (2002).
 - 29) Selkoe, D. J. : Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimers disease. *J. Biol. Chem.* **271**, 18295 (1996).
 - 30) Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. : Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817 (1994).
 - 31) Lee, S. Y., Ha, T. Y., Son, D. J., Oh, K. W. and Hong, J. T. : Effect of sesaminol glucosides on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neurosci. Res.* in press.