

연구노트

TMT 유도성 인지 기능 상실에 대한 대보(밤 품종) 내피 추출물의 효과

김현주 · 정지희 · 조유나 · 진동은 · 진수일 · 김만조¹ · 허호진*
경상대학교 응용생명과학부, 농업생명과학연구원, ¹산림과학원 특용자원연구과

Effect of Daebo (*Castanea crenata*) Inner Skin Extract on TMT-induced Learning and Memory Injury

Hyeon Ju Kim, Ji Hee Jeong, Yu Na Jo, Dong Eun Jin, Su Il Jin, Man-Jo Kim¹, and Ho Jin Heo*

Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

¹Department of Special Purpose Trees, Korea Forest Research Institute

Abstract The aim of this study was to investigate the anti-amnesic effect of daebo (*Castanea crenata*) extract on trimethyltin chloride (TMT)-induced learning and memory impairment, *in vivo*. The inner skin of daebo was extracted using distilled water under reflux conditions. At the end of the adaptation period, ICR mice were divided into a control group, a TMT injection group (negative control), and a sample group (C5: 5 mg/kg body weight; C10: 10 mg/kg body weight; and C20: 20 mg/kg body weight), and were tested with learning and memory tests. The ethylacetate fraction of the daebo inner skin extract was found to increase TMT-induced memory deficit in the Y-maze and passive avoidance test. Brain tissue analysis showed that the ethylacetate fraction of daebo extract lowered the acetylcholine esterase (AChE) activity and malondialdehyde (MDA) content of neuronal cells, both of which are indicative of lipid peroxidation.

Keywords: acetylcholinesterase, cognitive effect, daebo, trimethyltin

서 론

밤은 농·임업 전체 수출품목 가운데 단일품목으로는 수출액이 가장 많은 품목 중의 하나이며, 밤나무는 다른 과수에 비해 재배관리에 노력이 적게 들고 경사가 급한 지형에서도 비교적 쉽게 재배할 수 있는 장점이 있다(1). 2000년 이상의 재배역사를 가진 것으로 추정되는 밤(*Castanea crenata*)은 참나무과에 속하는 밤나무의 열매로서 과육의 대부분 전분이고 소량의 단백질과 지방으로 이루어져 있다. 껍질은 이중으로 되어있으며 속껍질에는 다량의 탄닌 성분이 들어있어 떫은맛을 내지만, 이러한 밤은 우리의 기호 식생활과 밀접한 관련이 있고 식품의 원료로 가공하기도 하며 직접 삶거나 구워먹는 기호식품이다(2,3). 현재 우리나라에서 밤의 소비는 제사 때 제수용으로 소량 소비되는 이외에 일부 통조림과 당과류 등으로 이용하는 정도로 소량으로 소비되고 있으며, 생산 및 가공 수출되는 밤의 형태는 간밤, 통조림, 냉동밤, 생물의 순으로 밤의 고부가가치성 상품개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다(4,5). 지금까지 보고된 밤에 관한 연구로는 밤 전분의 물리·화학적 특성에 관한 연구(6), 동결건조에 관한 성분변화(7), 저장 온도에 따른 품질 변화(8), 밤 부위별 추출물의 항균활성에 관한 연구(9) 등이 진행되었다.

대립이고 병충해에 강하나 맛이 없고 추위에 약한 일본 밤, 맛이 좋고 추위에 강하나 병충해에 약한 우리나라 토종밤, 맛은 좋지만 밤알이 작은 중국 밤 등의 좋은 점만을 지닌 품종 육성을 위한 삼원교배로 다수의 자목을 얻어, 장기간의 형질발현, 안정성 등의 검정을 거쳐 가장 바람직한 형질을 지닌 개체를 최종 선발하여 신품종 대보(Daebo)가 육성되었다(10). 대보는 그동안 밤 주산지에서 시범재배 등 현장적응성 검정 과정에서 우수성을 인정받아 산림분야 최초로 ‘대한민국 우수품종상’ 수상과 교육과학기술부가 선정하는 ‘2008 과학기술 분야 우수과제 100선’에도 선정된 바 있다. 대보 품종은 재수용 등 고품질의 생식용으로 개발된 품종으로서 내피 박피성이 우수하고 과실품질이 우수하며 외관이 뛰어난 뿐만 아니라 당도가 높고 식미가 우수하며 더불어 저장성이 우수한 특성을 가지고 있어 재배자들로부터 선호도가 높은 품종으로 알려지고 있다(10). 또한 밤나무 줄기마름병 및 밤나무 흑별에 저항성을 지니고 있고, 내한성이 강하여 전국적으로 재배가 가능하다는 장점이 있다. 특히, 국제적으로 날로 강화추세에 있는 품종 보호제도에 맞서 우리나라 밤나무 재배면적의 약 70% 이상을 차지하고 있는 일본 도입품종을 경쟁력 있는 한국산 브랜드의 신품종으로 대체할 수 있어 재배농가의 소득증대는 물론 밤 관련 산업의 경쟁력 확보에 크게 이바지할 것으로 기대된다(10).

우리나라는 지난 30여 년간 비약적인 경제발전과 생활수준의 개선, 의학의 발달 등으로 평균수명이 연장되고 있으며, 전 세계적으로 노인 인구가 지속적으로 증가함에 따라 알츠하이머(Alzheimer's disease, AD)를 비롯한 퇴행성 뇌신경계 질환의 발병률이 급격히 증가하고 있다. 또한 복잡한 현대 사회에서 인지 기능과 기억력은 청소년기에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이 되고 있다. 기억력의 저하는 현대 사회활동에서 문제

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1907
Fax: 82-55-772-1909
E-mail: hjher@gnu.ac.kr
Received April 15, 2013; revised June 13, 2013;
accepted June 30, 2013

점을 야기하며, 특히 고령화로 인해 자연적으로 또는 치매 등의 퇴행성 질환에 의해 인지능력이 감퇴된 경우, 본인의 사회 활동 뿐 아니라 주변인들의 생활에 많은 장애를 초래한다는 점에서 이에 대한 연구의 중요성은 증대되고 있다(11,12). 현대 과학에서 기억력 손상의 원인은 콜린 가설(Cholinergic Hypothesis in AD)을 이용하여 설명될 수 있다. 알츠하이머 환자는 여러 종류의 신경이 손상되는데, 그 중에서 콜린성 신경의 손상이 가장 심각한 것으로 알려졌고, 이런 콜린성 신경의 손상에 의하여 기억력 감퇴, 언어, 공간 지각력 및 판단장애 등의 증상이 나타난다는 것으로 간주하고 있다(13,14).

결국 단기소득 임산물 중 생산 및 수출 부문에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 밤 품종 중 신규 육종된 대보(Daebo)를 활용하여 고부가가치 가공제품을 다양하게 개발하고 소비하는데 있어 해당 품목에 대한 식품 품질 기준으로서의 생리활성 효과에 대한 고부가가치 산업화 기초 연구 자료 역시 필요한 부분이다. 이를 위해 본 연구에서는 대보(Daebo) 밤 품종의 생리활성 효능 검증 연구로 TMT 유도성 인지 기능 상실에 대한 효과에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물의 제조

본 실험에서 사용된 밤(*Castanea crenata*; Daebo)은 국립 산림과학원에서 2012년 3월 산지 저장조건인 냉장 2-4°C에서 저장한 밤을 제공받아 사용하였다. 제공받은 생밤을 이용하여 과육에 손상이 가지 않도록 외피와 내피를 제거한 후, 이 중 내피만을 기내 생리활성 연구로서 인지능력 개선에 대한 밤 추출물의 유효 효능 평가에 활용되었다. 대보 내피 추출물의 폐놀성 화합물을 선택적으로 분리하기 위해 내피 50 g에 증류수를 500 mL 첨가하여 환류 냉각 하에 70°C에서 3시간 추출한 후, 이 추출물에 동량의 에틸아세테이트를 첨가·혼합한 후 에틸아세테이트 층의 분리·추출을 3회 반복하고 농축하여 -40~-60°C, 50 psi에서 24시간 동결건조기(FDU-1200, EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조 한 것을 사용하였다(15). 실험에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상을 사용하였다.

실험동물 사육 및 실험군의 구성

4주령의 ICR-male mouse를 실험동물 공급업체(Samtako, Osan, Korea)로부터 구입하여 7일간의 환경 적응 기간을 거치게 하였고, 모든 실험동물은 2마리씩 한 개의 사육케이스에 넣고 항온(22±2°C), 항습(50-55%)을 일정하게 유지하였고, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 동일한 실험실 환경에서 충분한 양의 식수와 사료를 공급하며 사육하였다. 이들 흰쥐들은 7일간의 적응기간이 종료된 후 control group과 trimethyltin chloride (TMT) injection group(인지결함유발 대조군), sample group (C5, C10 and C20)으로 분류하여 각 군마다 8마리씩 5군으로 나누어 4주간 실험하였다. Sample group은 21일 동안 대보 내피 추출물(5, 10 and 20 mg/kg body weight)을 증류수에 혼합하여 매일 경구 투여하였고, 28일째 되는 날 0.85% 식염수에 녹인 TMT (2.5 mg/kg of body weight: 12.5 µM)를 100 µL씩 마우스의 복강에 주사하여 인지결함을 유발시켜 2일 후 Y-maze test, 및 passive avoidance test와 같은 마우스 행동 실험을 3일간 진행하였다.

TMT injection을 통한 Y-maze test

TMT injection 2일 후 Y-maze 실험을 실시하였고, 실험에 사용되는 Y-maze는 검은색 플라스틱 재질로 3개의 arm으로 구성되어

있으며, 각 arm의 길이, 높이, 너비는 33, 15, 10 cm이다. 각 arm을 A, B, C로 정한 후 한쪽 arm에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 arm의 이동경로를 기록하였다. 3개의 서로 다른 arm에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 이용하여 다음의 식을 통해 계산하였다(16).

$$\text{Alternation behavior (\%)} = \frac{\text{Actual alternation}}{\text{Maximum alternation}^*} \times 100$$

$$^* \text{Maximum alternation} = \text{total number of arm entry} - 2$$

TMT injection을 통한 passive avoidance test

Passive avoidance 실험기구는 조명이 있는 light chamber와 dark chamber, 2개의 구역으로 구분되어 있으며 바닥은 철망으로 이루어져 있다. TMT 복강주사 3일 후 passive avoidance 학습 시험(training trial)을 실시하였다. 각 마우스는 조명이 있는 chamber에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후, 조명을 켜고 2분 동안 다시 적응시킨 다음 마우스가 dark chamber로 이동하자마자 전기충격을 0.5 mA, 1초 동안 가한다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 마우스들을 대상으로 기억 시험(test trial)을 실시하였고, 조명을 켜 chamber에 마우스를 놓고 마우스의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다(16).

마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정

Passive avoidance 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 10 volume의 lysis buffer를 넣고 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였으며, 그 상등액을 효소 실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정을 4°C에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ Protein Assay kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 효소 5 µL에 50 mM sodium phosphate buffer 65 µL를 넣고 37°C에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman's reaction mixture 70 µL를 첨가한 후 microplate reader (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 405 nm에서 10분간 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성은 정상군 대비 % 활성으로 나타내었다(17).

마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정

Phosphate buffered saline을 이용하여 추출한 마우스 뇌조직 균질액 160 µL에 1% phosphoric acid 960 µL을 혼합한 후 0.67% thiobarbituric acid 320 µL를 넣고 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 원심분리기(Combi-514R, Hanil Co. Ltd., Seoul, Korea) 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 532 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 mg protein 당 nmole의 농도로 표시하였다(18).

통계처리

모든 *in vitro* 실험은 3회 반복하였고, *in vivo* 동물실험의 경우 각각 8회 반복 실시하여 mean±SD로 나타내었다. 실험군 간 차이의 통계적 유의성은 SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의성 검정을 시행하였다($p < 0.05$).

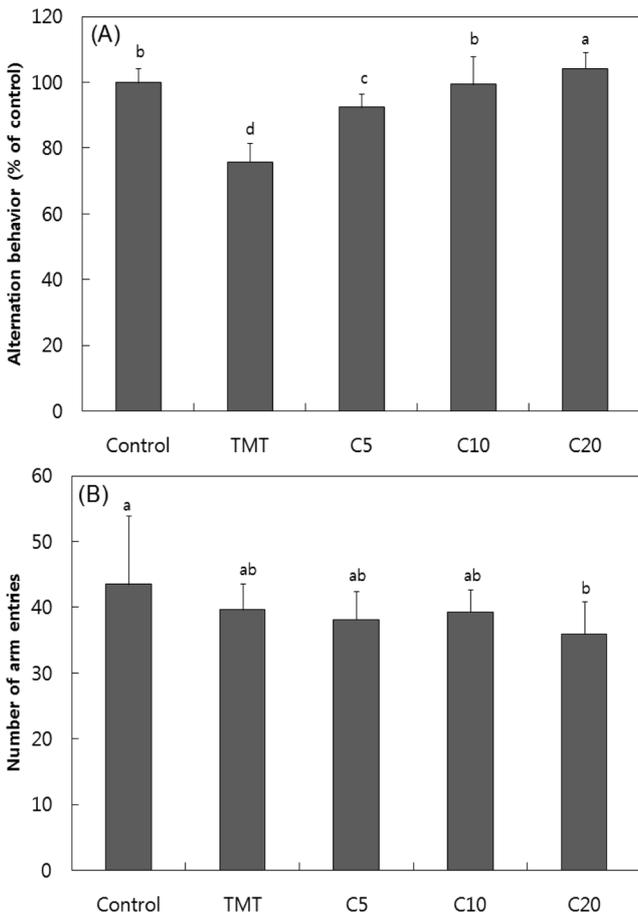


Fig. 1. Effect of ethylacetate fraction from Daebo inner skin on spontaneous alternation behavior. Alteration behavior (A), number of arm entries (B). Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with ethylacetate fraction from daebo inner skin (5, 10 and 20 mg/kg per day, respectively). Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Result shown are means±SD (n=8), and small letters represent statistical differences.

결과 및 고찰

TMT injection을 통한 Y-maze test

Y-maze test는 단기기억형태의 순간 공간인지력을 평가하기 위한 방법으로(19) 뇌의 해마부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 AD와 유사한 증상을 나타내는 TMT를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 Y-maze를 실시하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. 8분 동안 Y-maze에서의 마우스의 행동을 관찰한 결과, TMT group은 control group (100%) 대비 약 75%로 기억력 저하(약 24% 감소)를 보였다(Fig. 1A). 이에 반해 C5, C10, 그리고 C20 group은 각각 92, 99, 104%로 TMT group과 비교하였을 때 농도 의존적으로 기억력을 개선시킬 뿐만 아니라 control group과 유사하거나 높은 수준으로 나타났다. Fig. 1B는 8분 동안 마우스들이 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수를 나타낸 것으로 마우스의 기본적인 운동능력에는 큰 문제를 보이지 않은 것으로 나타났으며, 따라서 Fig. 1A에서 보여준 결과는 TMT 복강 주사에 의한 인지결함으로부터 유도된 행동 장애에 대한 개선 효과임을 나타내고 있다.

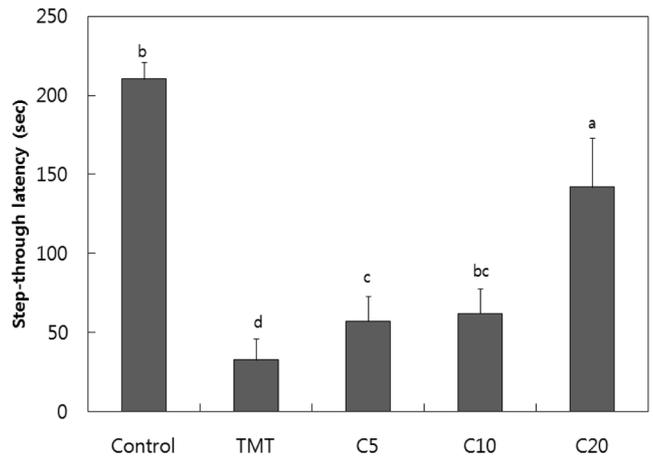


Fig. 2. Effect of ethylacetate fraction from Daebo inner skin on passive avoidance test. Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with ethylacetate fraction from daebo inner skin (5, 10 and 20 mg/kg per day, respectively). The step-through latency was measured during 300 s. Result shown are means±SD (n=8), and small letters represent statistical differences.

TMT injection을 통한 passive avoidance test

Passive avoidance test는 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이며 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 실험으로 명시적 기억을 반영한다(20). 대보 내피 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 기억 및 학습 효과를 확인하기 위해 passive avoidance test를 실시하였다. TMT group의 latency time은 32.6s로 control group (210.5s)에 비하여 기억 및 학습효과가 현저히 감소되는 것으로 나타났다(약 85% 감소). 그러나 각각의 sample group을 TMT group과 비교하였을 때 C5, C10 및 C20 group은 그 섭취량이 증가됨에 따라 기억 및 학습 효과가 크게 회복되는 것으로 나타났다. 특히, C20 group (20 mg/kg body weight)은 TMT group에 비해 학습 및 인지기능을 control group 대비 약 69% 수준으로 개선시킨 것으로 나타났다(Fig. 2). Choi 등(21)은 TMT 유도성 ICR mice에 phenolics로서의 quercetin을 농도별로 투여하였고 TMT injection group에 비해 sample group의 공간인지 능력이 개선된다고 보고하였다. 밤 내피에는 다양한 phenolics가 함유되어 있는 것으로 보고된 바(15), 대보 내피에서 phenolics를 포함한 에틸아세테이트 분획물을 활용한 본 실험의 결과와도 유사한 경향을 나타낸 것은 phenolics의 효과로 기대된다.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 acetylcholinesterase (AChE) 활성

Acetylcholine (ACh)의 합성과 분해에 관련된 효소로는 choline acetyltransferase (ChAT)와 AChE가 있다. 따라서 체내의 신경전달이 원활하게 이루어지려면 ACh 수준에 영향을 미치는 ChAT와 AChE 효소활성이 매우 중요하다(22). 다만 ACh 분해효소로서의 AChE가 활성화되면 ACh의 농도가 줄어들어 체내 신경전달이 저하되어 인지능력이 떨어지므로 퇴행성 치매 환자의 치료에 있어 AChE 효소를 억제해 체내의 ACh의 농도를 증가시키는 방법이 이용되고 있다(22). TMT에 의한 신경손상의 기본 mechanism 중 하나는 TMT가 muscarinic receptor 손상을 통한 cholinergic neu-

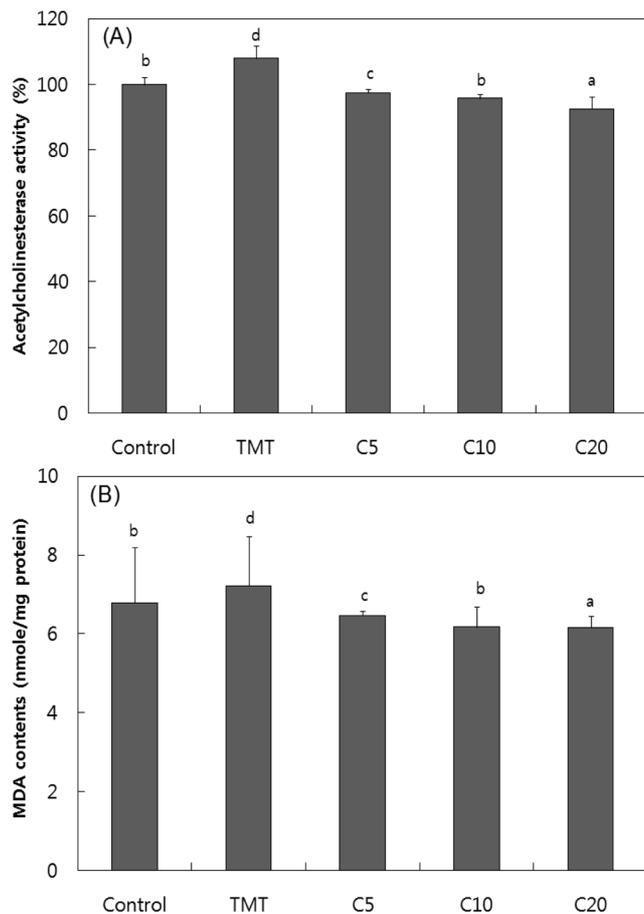


Fig. 3. Effect of ethylacetate fraction from Daebo inner skin on AChE and lipid peroxidation. Acetylcholinesterase activity (A), MDA contents (B). Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with ethylacetate fraction from daebo inner skin (5, 10 and 20 mg/kg per day, respectively). Result shown are means \pm SD (n=8), and small letters represent statistical differences.

ronal transportation에서의 변화를 유도하여 신경 전달의 손상을 유발하며, 이 손상은 특히 hippocampal neuron에서 발생하는 것으로 나타난다(23,24). 결국 TMT가 hippocampal region의 ACh의 농도를 감소시킨다는 것으로(25) 미루어 볼 때 TMT와 AChE 활성 사이에 직접적인 관계는 알려지지 않았지만 마우스 뇌 조직에 존재하는 AChE의 활성을 증가시키는 것으로 판단된다(26). 따라서 Y-maze와 passive avoidance 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 TMT group은 control group 대비 약 107%로 나타난 반면, 대보 내피 에틸아세테이트 분획물 처리 group은 농도에 따라 AChE 활성을 다소 저해 시키는 것으로 나타났다(C5, 97%; C10, 95%; C20, 92%). 결국 TMT에 의한 AChE activity의 증가효과를 일정 수준에서 감소시키는 것은, 대보 내피 에틸아세테이트 분획물이 TMT에 의한 손상을 일부 저해하여 AChE가 불활성화 되므로 실험동물에서의 인지기능 개선효과가 있었을 것이라 판단된다.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량

조직을 구성하는 세포에서의 과산화현상은 세포막 주요구성성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산에 산소유리기와 결합하여

생기게 되며, 과산화지질은 세포막의 불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄 반응하여 부산물로 MDA를 생산한다(27). MDA는 산화적 스트레스시 뇌의 각 영역에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, 축적시 DNA와 축합물을 형성하는 등 조직에 산화적 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다(27). 특히 뇌세포는 다른 장기에 비하여 불포화 지방산의 함량이 높아 산화적 손상을 받기 쉬어, 뇌 신경세포에 산화적 스트레스를 가하게 되면 염증반응에 이은 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸이 촉진된다. 결국 이런 산화적 스트레스가 뇌 조직 내에서 지속되면 기억손상 및 손실로 이어지기도 한다(27). 이에 본 실험에서는 대보 내피 분획물을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 측정하였다(Fig. 3B). Control group은 6.78 nmole/mg protein이었으며, TMT group은 이보다 증가한 7.22 nmole/mg protein로 나타났다. C5, C10, C20 group과 TMT group이 유의적 차이를 보이지 않았지만, C20 group은 TMT group과 정량 비교하였을 때 MDA 생성을 약 9% 수준으로 억제하였다. 따라서 본 실험 결과에서 TMT는 뇌 특정부위의 신경세포를 손상하는 것으로 사료되며 TMT에 의해 유도되는 뇌 신경세포 손상을 대보 내피 에틸아세테이트 분획물이 일정 수준에서 저해할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 국내 대표 밤 품종인 대보(Daebo)의 내피를 활용하여 TMT 유도성 인지 기능 상실에 대한 개선 효과를 연구하였다. 실험에서 각 농도별(5, 10, 20 mg/kg of body weight)로 대보 내피 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 mouse를 TMT로 인지 기능 손상을 유발하여 Y-maze test와 passive avoidance test한 결과, Y-maze test에서 분획물을 섭취한 group이 TMT 단독 처리군과 비교하였을 때 공간 인지기능을 개선시켰고, passive avoidance test 또한 latency time이 증가한 것으로 나타나 TMT에 의해 유발되는 뇌 신경독성 동물 모델로부터 기억 및 학습능력 개선 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 또한 *in vivo* 동물 실험 후 mouse로부터 적출된 whole brain tissue를 대상으로 *ex vivo* AChE 활성 및 MDA 함량측정 실험한 결과, 에틸아세테이트 분획물이 TMT 효과 대비 AChE의 활성을 일부 유의적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 대보 내피 에틸아세테이트 분획물은 신경 전달물질인 AChE의 활성을 저해하고 뇌 신경세포 보호 효과를 통하여 인지기능 개선 효과를 유도할 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 한국연구재단의 일반연구지원사업(NRF-2011-0021664) 및 2012년 국립산림과학원의 지원을 받아 수행된 위탁연구(밤나무 신제품 및 품질관리 기술개발 위탁연구) 결과로 이에 감사드립니다. 김현규, 정지희, 조유나는 BK21 사업(교육부)의 대학원생 지원사업을 받았고 이에 감사드립니다.

References

- Son CH, Seok HD, Min KT. Trend and future of the domestic industry for chestnut. Korea Rural Economics Institute, Seoul, Korea. pp. 77-79 (2003)
- Kim JS, Jung BH, Joo RW, Choi SI. Marketing of chestnut and economic analysis of chestnut cultivation. Korean J. Forest Econ. 12: 12-21 (2004)

3. Seo IW, Nam HJ, Kim EH, Shin HS. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in processed chestnut products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 339-344 (2009)
4. Hwang TY, Kim JH, Kim JK, Moon KD. The effects of microwave heating of the texture of sugared chestnuts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 569-573 (1998)
5. Park IS, Kim SK, Kim CS. Physicochemical properties of chestnut starch. *J. Korean Agr. Chem. Soc.* 25: 218-223 (1982)
6. Kim SK, Jeon YJ, Kim YT, Lee BJ, Kang OJ. Physicochemical and textural properties of chestnut starches. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 594-600 (1995)
7. Ha BS, Bae MS, Jeong TM, Sung NJ, Son YO. Studies on constituent variation during storage after freeze-drying of chestnut. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14: 97-105 (1982)
8. Hwang JY. Changes in quality characteristics of peeled chestnuts with storage temperature. *Korean J. Food Nutr.* 24: 71-78 (2011)
9. Kim YD, Cho DB, Kim KJ, Kim KM, Hur CK, Cho IK. Antimicrobial activity of the solvent extracts from of chestnut. *Korean J. Food Preserv.* 12: 257-262 (2005)
10. Kim MJ. Characteristics and cultivation management about chestnut new varieties as daebo, daehan and mipung. National Forestry Cooperative Federation, Seoul, Korea. pp. 81-85 (2010)
11. Snow RE, Arnold SE. Psychosis in neurodegenerative disease. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 1: 282-293 (1996)
12. Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: Current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern. Med. Rev.* 13: 85-115 (2008)
13. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer's disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10: 122-126 (1981)
14. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190 (1983)
15. Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Choi SJ, Shin DH, Heo HJ. Antiamnesic effects of ethyl acetate fraction from chestnut (*Castanea crenata* var. *dulcis*) inner skin on A β ₂₅₋₃₅-induced cognitive deficits in mice. *J. Med. Food* 15: 1051-1056 (2012)
16. Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, Jun WJ, Cho HY, Kim YJ, Shin DH. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* 71: 1063-1068 (2007)
17. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95 (1961)
18. Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Kim JK, Jun WJ, Kim HK, Kim EK, Kim MO, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Shin DH. Ameliorative effect of 1,2-benzenedicarboxylic acid dinonyl ester against amyloid beta peptide-induced neurotoxicity. *Amyloid* 16: 15-24 (2009)
19. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carbolines. *Psychopharmacol.* 94: 491-495 (1988)
20. LeDoux JE. Emotional memory system in the brain. *Behav. Brain Res.* 20: 69-79 (1993)
21. Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong CH, Jeong HR, Lee U, Heo HJ. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem.* 132: 1019-1024 (2012)
22. Talesa VN. Acetylcholinesterase in alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.* 122: 1961-1969 (2001)
23. Earley B, Burke M, Leonard BE. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem. Int.* 21: 351-366 (1992)
24. Loullis CC, Dean RL, Lippa AS, Clody DE, Coupet J. Hippocampal muscarinic receptor loss following trimethyl tin administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 147-151 (1985)
25. Kim JK, Bae H, Kim MJ, Choi SJ, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Lim ST, Kim EK, Kim HK, Kim BY, Shin DH. Inhibitory effect of poncirus trifoliata on acetylcholinesterase and attenuating activity against trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci. Biotech. Bioch.* 73: 1105-1112 (2009)
26. Kim JK, Choi SJ, Bae H, Kim CR, Cho HY, Kim YJ, Lim ST, Kim CJ, Kim HK, Peterson S, Shin DH. Effects of methoxsalen from poncirus trifoliata on acetylcholinesterase and trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci. Biotech. Bioch.* 75: 1984-1989 (2011)
27. Chang NS, Ryu SM. Antioxidative effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain regions. *J. Nutr. Health* 34: 525-531 (2001)