

아밀로이드 베타로 유도된 신경세포 사멸에 대한 PineXol[®]의 보호효과

한경훈 · 이승희 · 박광성 · 송관영* · 김정희* · 박은국** · †한성희***

서울의료원 의학연구소, *서울의료원 신경외과, **아주대학교 의과대학 의학유전학과,
***고려대학교 보건과학대학 BK21Plus 보건과학사업단

Protective Effect of PineXol[®] against Amyloid- β -induced Cell Death

Kyung-Hoon Han, Seung-Hee Lee, Kwang-Sung Park, Kwan-Young Song*,
Jung-Hee Kim*, Eun-Kuk Park** and †Sung-Hee Han***

Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

*Dept. of Neurosurgery, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

**Dept. of Medical Genetics, Ajou University School of Medicine, Suwon 16499, Korea

***BK21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

Abstract

Amyloid- β protein ($A\beta$) is known to increase free radical production in neuronal cells, leading to cell death by oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate the protective effects of PineXol[®] on $A\beta_{25-35}$ induced neuronal cell death. Rat pheochromocytoma (PC-12) cells were pre-treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PineXol[®] for 2 h. The cells were exposed to single dose of 30 μM $A\beta_{25-35}$ for 24 h. Cell death was assessed by a cell count kit-8 (CCK-8) assay, lactate and dehydrogenase (LDH) release assay. An Apoptotic process was analyzed by a protein expression of the Bcl-2 family using western blotting. Cell viability increased in PC-12 cells treated with both $A\beta_{25-35}$ and PineXol[®], compared to the control group. PineXol[®] induced a decrease of the Bcl-2 protein expression ($p < 0.05$), while Bax and Sod1 increased ($p < 0.05$), indicating attenuation of $A\beta_{25-35}$ induced apoptosis. These results suggest that PineXol[®] may be a good candidate for the prevention of Alzheimer's disease(AD).

Key words: PineXol[®], Alzheimer's disease, amyloid- β , PC-12 cells, Bcl-2

서론

의학의 발달로 인하여 전 세계적으로 고령화 사회가 되어 가고 있으며, 한국도 2014년 노인인구 비율이 전체 인구의 약 12%를 차지하는 고령화 사회로 진입하게 되었다(Statistics Korea 2014). 노인인구의 증가로 인하여 노인질환의 대표적인 퇴행성 질환인 노인성 치매(Alzheimer's Disease: AD)의 발생이 급증하고 있다(Korean Neurological Association 2012). 알츠하이머병의 경우 85세 이상의 노인에게서 40~50%가 발병하며, 미국의 알츠하이머병 환자가 400만 명, 우리나라에서

는 약 30만 명에 이르고 있고, 현재 우리나라 단위발생 사망률에 있어서 악성종양과 심뇌혈관 질환 다음으로 알츠하이머병이 큰 비중을 차지하고 있어서 점차 큰 사회적 문제로 인식되고 있다(Geldmacher & Whitehouse 1996; Mayeux & Sano 1999).

이렇게 사회적 문제가 되고 있는 알츠하이머병은 신경세포 손상 및 사멸로 인하여 뇌조직의 부피와 뇌활동의 감소 등의 특징을 보이고, 증상으로는 기억력, 언어능력 및 행동능력의 지속적인 감퇴 현상을 나타낸다(Hofman 1997 등). 이는 노화와 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있으며(Han 2009), 전체

† Corresponding author: Sung-Hee Han, BK21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea. Tel: +82-2-940-2764, E-mail: sungheeh3@gmail.com

질환 중 65세 이상의 노인에서는 대부분이 sporadic type으로 알려져 있다(Corder 1993 등; Strittmatter 1993등). 알츠하이머 병 환자의 사후 뇌조직에서는 세포 밖에서 분비된 베타 아밀로이드($A\beta$)가 신경세포 바깥에서 응집되는 노인반(neuritic or senile plaques)과 tau 단백질의 과인산화에 의하여 형성되는 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)이 나타나는 것으로 확인되었다(Soto 1994 등; Forloni 1996 등; Selkoe 1996).

알츠하이머병 원인의 하나로는 $A\beta$ 의 생성, 세포 내 축적 및 독성을 유발하는 아밀로이드 전구 단백질(Amyloid Precursor Protein: APP)의 대사 이상으로 나타나는 것으로 알려져 있다. $A\beta$ 는 APP 아미노 말단을 절단하는 β -secretase와 카르복시 말단을 절단하는 γ -secretase에 의해서 분해되어 생성된다. 이렇게 생성된 $A\beta$ 는 38개에서 43개의 아미노산으로 이루어져 있고, 신경세포에 독성을 끼치는 것은 42개의 펩타이드로 알려져 있다(Lorenzo and Yankner 1996 등; Pike 1997 등). $A\beta$ 가 과잉 생성, 응집되면 불용성 아밀로이드 덩어리를 형성하게 되며, 주변 신경세포에 염증반응을 일으키게 된다. 이로 인하여 신경세포의 소실을 가져오게 되어 알츠하이머 병을 일으키게 된다(Vassar 1999 등; Kaye 2003 등; Heneka 2015 등). 이에 따라 많은 연구자들은 알츠하이머병의 지연 및 억제에 위한 치료법을 연구하고 있다. 미국 FDA 승인을 받아 사용 중인 치료제로는 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galanthamine), 도네페질(donepezil)이 있으며, 이는 모두 AChE 억제제로 알츠하이머병 치료제로서의 약물 효과를 인정받았으나(Cummings 2014 등), 병의 근본적인 진행을 막지 못하고, 소화계 계통의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이에 최근에는 알츠하이머병의 치료제를 천연물 소재로부터 개발하고자 하는 연구가 많이 이루어졌으며, 그 결과, 은행나무, 강황, 은행잎 추출물, 그리고 인삼 등이 신경세포 생존을 증가시키거나, 알츠하이머병의 진행을 늦출 수 있는 것으로 알려졌다(Oken 1998 등; Bastianetto 2000 등; Park and Kim 2002; Wang 2016 등).

프랑스 해송 추출물인 피크노제놀(pycnogenol[®])은 폴리페놀 성분을 많이 함유하고 있어서 항염, 항비만, 항산화 등에 효과적이라고 보고되었고(Rohdewald P 2002), 국내에서도 오래 전부터 소나무 수피는 민간요법으로 관절염, 화상, 지혈 등에 사용되었다(Kim 1999 등). 따라서 적송제재인 PineXol[®]에 대한 성분 분석과 신경세포에 과산화수소 처리 후 항산화 효과에 대한 연구보고가 있지만, 알츠하이머병과 같은 퇴행성 신경질환의 예방이나 억제에 대한 연구는 미비한 실정이다(Hong 2016 등; Hwang 2016 등).

따라서 본 연구에서는 국내 적송에서 추출한 PineXol[®]을 이용하여 $A\beta_{25-35}$ 에 노출된 PC-12 신경세포에서 세포독성과 단백질 발현을 확인함으로써 퇴행성 질환의 억제 활성을 구

명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 연구에 사용된 PC-12 신경세포는 백서의 부신피질 크롬친화성 세포종(pheochromocytoma)으로부터 유래한 세포주로서 한국세포주은행에서 구입하였으며, 콜라겐(collagen)을 코팅한 100mm dish와 96 well plate에 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY)에 10% FBS (Fetal bovine serum)와 1% penicillin과 streptomycin을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 본 연구에서는 아밀로이드 베타 단백질($A\beta_{25-35}$, 30 μ M)을 처리하기 2시간 전에 1% FBS가 들어있는 DMEM 배양액으로 교환하였다.

2. 실험재료

$A\beta_{25-35}$ 는 TOCRIS bioscience(Bristol, UK)에서 구입하였고, PBS에 용해시킨 후 0.2 μ m 실린지 필터를 이용하여 여과하였으며, $A\beta_{25-35}$ 를 세포실험에 사용하기 전 37°C에서 1주일간 aging 단계를 거친 후 사용하였다. PineXol[®]은 뉴트라팜(주)(NutraPharm Co., LTD, Gangneung, S. Korea)로부터 제공받아 사용하였으며, $A\beta_{25-35}$ 처리 2시간 전 각각의 농도에 따라서 3차 증류수에 희석한 후, 0.2 μ m 실린지 필터를 이용하여 여과 후 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

PineXol[®]의 총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Ciocalteu method(Maksimović 2005 등)의 방법을 변형하여 측정하였다. PineXol[®] 10 mg/mL의 농도로 제조한 시료 증류수 790 mL와 0.9 N Folin-Ciocalteu 시약 50 mL를 넣고 잘 혼합시킨 후, 20% sodium carbonate solution 150 mL를 첨가하여 암실에서 2시간 동안 반응시킨 후 흡광도(750 nm)를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. PineXol[®]의 총 플라보노이드 함량의 측정은 p-dimethylaminocinnamaldehyde(DMACA) 방법(Drosou 2015 등)을 변형하여 측정하였다. 즉, PineXol[®] 10 mg/mL의 농도로 제조한 시료 10 mL에 DMACA 시약 200 mL를 첨가하고, 잘 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응이 완료된 시료의 흡광도를 640 nm에서 측정하였고, 총 플라보노이드 함량 분석은 catechin(catechin)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

4. 세포 생존율 측정

$A\beta_{25-35}$ 처리에 따른 PC-12 신경세포의 세포 생존율을 측정

하기 위해서 96-well plate에 8×10^3 cells/well의 농도로 각각 세포를 분주한 후, A β_{25-35} 의 농도가 10, 20, 30, 40, 그리고 50 μ M인 배양액에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양된 후 CCK-8 assay kit 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader를 사용하여 흡광도(450 nm)를 측정하였으며, 측정된 값은 비처리군 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

PC-12 신경세포에 PineXol®을 2시간동안 전처리시킨 후 A β_{25-35} 를 30 μ M의 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, Cytotoxicity LDH assay kit(Dojindo Co., LTD, Japan)를 사용하여 흡광도(490 nm)를 측정한 후 세포막 손상을 확인하였다.

6. Western blot 분석

PC-12 신경세포에 PineXol®과 A β_{25-35} 를 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 건어내고 DPBS로 2회 세척을 하였으며, 단백질을 추출액을 첨가한 후, 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 이 후 추출된 단백질은 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였으며, PVDF membrane에 전이시켰다. 그 다음 5% fat-free milk로 전처리하고, 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-SOD-1)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, ECL western blotting detection reagent(iNtRON Biotechnology Co., Ltd, Korea)를 이용하여 목적 단백질을 검출하였다. Western blot의 밴드는 Bio-1D(VILBER Lourmat SAS, Mame-la-Vallée, France)를 이용하여 관찰하였다.

7. 통계처리

모든 실험 결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차로 표시하였다. 통계적 분석은 SPSS 20.0 K를 이용하여 one way ANOVA를 시행하였으며, $p < 0.05$ 의 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

본 연구에 사용된 PineXol®의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 각각 829.84 ± 5.36 GAE mg/g과 86.71 ± 0.44 CAT mg/g으로 확인되었다(Table 1). 이는 Lee 등(2013)이 발표한 PineXol®에서의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 결과 값인 717.40 ± 6.86 GAE mg/g과 54.44 ± 0.01 RE mg/g보다 높으며, Ku 등(2007)이 발표한 해송 껍질 추출물인 pycnogenol에서의 총 폴리페놀 값인 541 GAE mg/g보다 본 연구에 사용된 PineXol®의 총 폴리페놀 값이 높은 것을 확인하였다. 이에 PineXol®이 가진 페놀성 화합물로 인하여 A β_{25-35} 에 처리에 따른 세포 독

Table 1. Total polyphenolic and flavonoid contents of PineXol®

Sample	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents
PineXol®	829.84 ± 5.36 GAE ¹⁾ mg/g	86.71 ± 0.44 CAT ²⁾ mg/g

All values are mean±S.D. of triplicate determination.

¹⁾ Gallic acid equivalent.

²⁾ Catechin equivalent.

성에 보호효과가 있을 것으로 기대된다.

2. PineXol®이 PC-12 신경세포의 생존에 미치는 영향

PC-12 신경세포에서 A β_{25-35} 의 세포독성을 억제하는 PineXol®의 보호 효과를 측정하기 전 PineXol®의 PC-12 신경세포에서의 세포 독성을 알아보기 위해서 CCK-8 assay를 수행한 결과는 Fig. 1과 같다. PineXol® 농도 100~1,000 μ g/mL에서 세포 생존율을 확인해 본 결과, 200 μ g/mL에서부터 PC-12 신경세포의 생존율이 대조군과 비교 시 유의적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며($p < 0.05$), 1,000 μ g/mL의 농도에서는 세포 생존율이 42%까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 연구에서는 PC-12 신경세포의 생존에 영향을 끼치지 않는 100 μ g/mL의 농도에서 실험에 사용하였다.

3. A β_{25-35} 의 처리에 따른 PC-12 신경세포의 세포 사멸

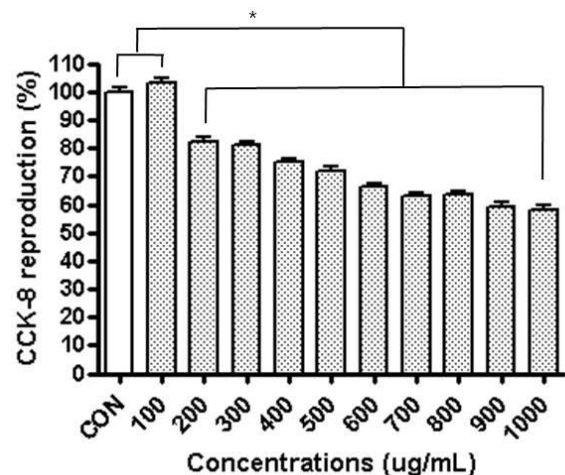


Fig. 1. Concentration dependent effects of PineXol® on PC-12 cell viability. Cells were treated with various concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1,000 μ g/mL) of PineXol® and cell viability were measured by CCK-8 assay. The data shown are means±S.D. * Statistical significant difference between groups ($p < 0.05$).

백서의 부신피질 크롬친화성 세포종(pheochromocytoma)인 PC-12 신경세포에서 알츠하이머병의 원인으로 알려진 신경독소 단백질인 Aβ에 의한 세포 독성을 알아보고자 하였다. 최근 연구 결과에 의하면 Aβ는 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 신경독성을 가지고 있는 것으로 확인되었으며(Yankner 1990 등; Behl 1994 등; Shearman 1994 등), 합성된 Aβ₁₋₄₀, Aβ₂₅₋₃₅ 또한 여러 신경세포에서 독성을 나타내는 것으로 보고되었다(Kowall 1991 등). 본 실험에서 사용한 Aβ₂₅₋₃₅를 PC-12 신경세포에 24시간 처리 후 CCK-8을 측정된 결과는 Fig. 2와 같으며, 본 연구에서는 Aβ₂₅₋₃₅ 30 μM의 농도로 PC-12 신경세포에 처리하였다.

4. Aβ 유도된 PC-12 신경세포 독성에 대한 PineXol®의 보호효과

Aβ₂₅₋₃₅ 처리에 따른 PineXol®의 보호효과를 확인하기 위하여, Aβ₂₅₋₃₅ 30 μM의 처리하기 2시간 전 PineXol® 100 μg/mL를 처리하였으며, 이 후 Aβ₂₅₋₃₅ 30 μM을 24시간 처리 후 CCK-8 assay을 이용하여 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과, PineXol® 전처리군의 경우, PC-12 세포사를 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군과 비교 시 27% 가량 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(*p*<0.05).

5. Aβ 유도된 PC-12 신경세포의 형태학적 관찰

Aβ₂₅₋₃₅ 처리에 의한 PC-12 신경 세포사의 양상을 규명하기 위해 광학 현미경을 통해 세포의 외형적 변화와 핵 형태의

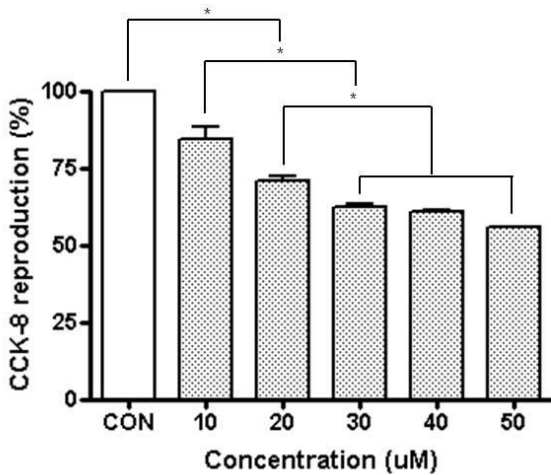


Fig. 2. Concentration dependent effects of Aβ₂₅₋₃₅ on PC-12 cell viability. Cells were treated with various concentrations (10, 20, 30, 40, and 50 μM) of Aβ₂₅₋₃₅ and cell viability was measured by CCK-8 assay. The data shown are means±S.D. * Statistical significant difference between groups (*p*<0.05).

변화를 관찰하였다(Fig. 4). 광학 현미경을 이용하여 세포의 형의 변화를 Aβ₂₅₋₃₅ 처리 24시간 후에 관찰한 결과, Aβ₂₅₋₃₅ 30 μM을 처리한 경우, 대조군(Fig. 4a)에 비해 세포체의 응축과 불절 및 신경돌기의 소실 등의 전형적인 세포자멸사

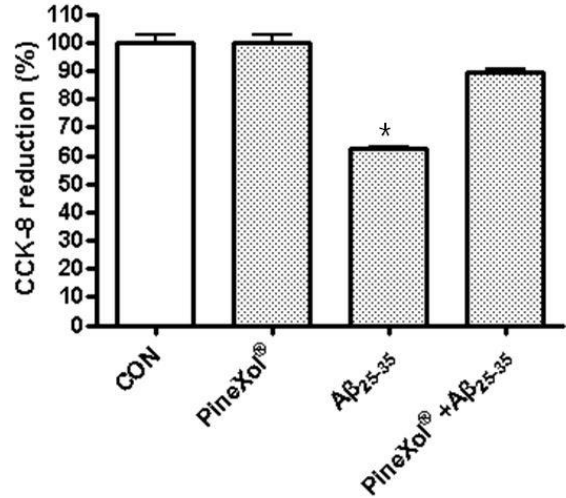


Fig. 3. Neuroprotective effects of PineXol®. PC-12 cell was pretreated for 2 h with various concentrations of PineXol®. The cells were then treated with 30 μM Aβ₂₅₋₃₅ for 24 h. The cell viability was measured by CCK-8 assay. The data shown are means±S.D. * Statistical significant difference between groups (*p*<0.05).

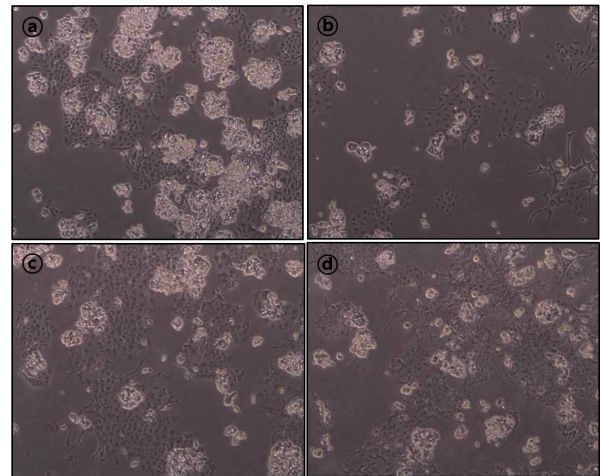


Fig. 4. Neuroprotective effects of PineXol® against Aβ₂₅₋₃₅ induced apoptosis of PC-12 cells. The cells were exposed to single dose of 30 μM Aβ₂₅₋₃₅ and morphological changes were monitored for 24 h (a: control×10, b: 100 μg/mL PineXol®×10, c: 30 μM Aβ₂₅₋₃₅×10, d: Aβ₂₅₋₃₅ 30 μM+PineXol® 100 μg/mL×10).

(apoptosis) 형태의 세포사를 나타내었다(Fig. 4©). 이는 A β_{25-35} 에 의한 PC-12 신경 세포의 세포사가 세포자멸사로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, PineXol® 전처리군의 경우(Fig. 4©), 대조군과 비교 시 세포의 형태학적 변화가 없는 확인할 수 있었다.

6. Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

PineXol® 전 처리에 따른 PC-12 신경세포에서 세포막 보호 효과를 확인하였다. 뇌는 세포 내 지질 함량이 높고, 체내에서 가장 많은 활성산소를 생성함으로써 산화 스트레스에 의해서 쉽게 파괴되는 구조를 가지고 있다(Lenaz 등 1998). 이에 본 연구에서 PC-12 신경세포의 신경세포질 성분인 Lactate dehydrogenase(LDH)의 방출량을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. A β_{25-35} 처리 시 대조군과 비교하여 LDH 방출량이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, PineXol® 100 mg/mL 전처리군의 경우, LDH의 방출량이 대조군보다 높게 측정되었지만, A β_{25-35} 처리군보다 낮은 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

7. Bcl family 단백질 분석

A β_{25-35} 의 세포독성으로 인하여 PC-12 세포 내 다양한 신호 전달이 활성화되는데, 세포자멸사에서 중요한 역할을 하는

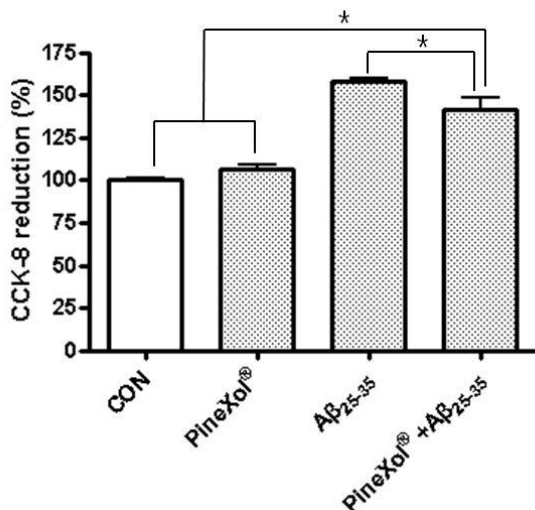


Fig. 5. Effects of PineXol® against A β_{25-35} induced cell membrane toxicity in PC-12 cells. The cells were pretreated for 2 h with 30 μ M of PineXol® and then treated with 30 μ M of A β_{25-35} for 24 h. The inhibition effect of LDH release on A β_{25-35} induced cell was measured by cell membrane toxicity assay kit. The data shown are means \pm S.D. * Statistical significant difference between groups ($p < 0.05$).

Bcl-2 family 단백질의 발현을 Western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 6©). 세포 자멸사를 억제하는 Bcl-2 단백질 발현은 대조군과 비교 시 A β_{25-35} 처리군에서 감소를 보였으며, PineXol® 전처리군에서는 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6©). 더욱이 세포자멸사를 촉진시키는 Bax 단백질의 경우, PineXol® 전처리군이 A β_{25-35} 처리군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 6©), 체내 활성 산소를 제거한다고 알려진 sod-1 단백질의 경우, PineXol® 전처리군이 A β_{25-35} 처리군보다 높은 단백질 발현 양상을 보였다(Fig. 6©). 이는 PineXol®이 가진 생리활성 물질들로 인하여 A β_{25-35} 유도된 세포자멸사를 억제하는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 PineXol®이 신경보호 효과가 있다는 선행 연구결과를 토대로, 백서의 부신피질 크롬친화성 세포종인 PC-12 신경세포에서 A β_{25-35} 로 유도된 세포자멸사를 통하여 PineXol®의 보호효과를 알아보고자 하였다. PC-12 신경세포에서 세포자멸사를 유도하기 위해 aging된 A β_{25-35} 30 μ M을 24시간 처리한 결과, 세포 생존율에서 대조군과 유의적인 감소가 나타나는 것을 CCK-8 assay를 통하여 확인하였으며,

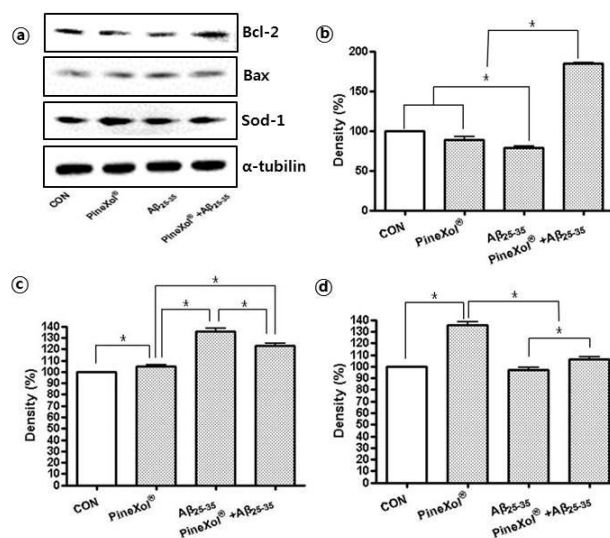


Fig. 6. Immunoreactivity of Bcl-2, Bax and Sod-1 in PC-12 cells. Cells were pre-incubated with PineXol® for 2 h and then exposed to A β_{25-35} (30 μ M) for additional 24 h. and protein samples were prepared for Western blot analysis (A). Protein expression of Anti-apoptotic Bcl-2 (B), Pro-apoptotic Bax (C), and Sod-1 (D) were compared by Western blot analysis. The data shown are means \pm S.D. * Statistical significant difference between groups ($p < 0.05$).

PineXol[®] 100 µg/mL 전처리군이 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군보다 세포 생존율에서 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 세포의 형태학적 관찰 결과, PineXol[®]을 전처리군에서는 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군에서 나타나는 세포의 모습인 신경돌기의 소실이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 또한, PineXol[®] 전처리군이 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군보다 LDH 방출량이 유의적으로 낮은 것으로 확인되었으며, 이는 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유발된 신경세포막 손상으로부터 PineXol[®]이 가지고 있는 생리활성 물질들로 인해서 세포막 보호효과를 가졌을 것으로 사료된다. 단백질 발현을 확인해본 결과, PineXol[®] 전처리군이 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군보다 Bcl2 단백질의 발현은 높았으며, Bax의 단백질 발현은 보다 낮게 나타났다. 특히 항산화와 관련 단백질인 Sod-1 단백질의 발현이 높은 것으로 확인됨으로써, PineXol[®]이 가진 활성물질들로 인하여 Aβ₂₅₋₃₅ 신경 독성 물질로부터 신경세포의 손상을 억제하고, 신경세포를 보호하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 신경질환의 약용 후보 물질로서 PineXol[®]의 유용한 가능성을 제시할 수 있다고 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 서울시 재원으로 보조금 지원을 받아 수행된 2017년 “아밀로이드베타로 유도된 신경세포 독성에 대한 파인엑솔의 보호효과”의 연구비로 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Bastianetto S, Ramassamy C, Doré S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. 2000. The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci* 12:1882-90
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid protein toxicity. *Cell* 77:817-827
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 13:921-923
- Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. 2014. Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther* 6:37
- Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D & Krokida M. 2015. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products* 75: 141-149
- Geldmacher DS, Whitehouse PJ. 1996. Evaluation of dementia. *N Engl J Med* 1:330-336
- Forloni G. 1996. Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides. *Curr Opin Neurol* 9:492-500
- Geldmacher DS, Whitehouse PJ. 1996. Evaluation of dementia. *N Engl J Med* 1:330-336
- Han SH. 2009. Novel pharmacotherapies for Alzheimer's disease. *Korean Med Assoc* 52:1059-1068
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slieter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet* 18:151-154
- Hong SO, Han KH, Lee SH, Kim DH, Song KY, Han SH. 2016. Protective effect of PineXol[®] on hydrogen peroxide-induced apoptosis on SK-N-MC cells and focal ischemia rodent models. *The Korean Journal of Food And Nutrition* 29:923-929
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. 2015. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 16:229-236
- Hwang YJ, Yin J, Tam LT, Youn SH, Ahn HS, Kwon SH, Min BK, Yun SH, An YE, Lee MW. 2016. Quantitative analysis of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1 from the preparation of *Pinus densiflora* (PineXol[®]). *Kor J Pharmacogn* 47:246-250
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 18:486-489
- Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. 1999. The Encyclopedia of Oriental Herbal Medicine. Jungdam publisher Co. PP. 3219
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. 1991. An *in vitro* model for the neurodegenerative effects of amyloid and protection by substance. *P Proc Natl Acad Sci USA* 88:7247-7251
- Korean Neurological Association. 2012. Textbook of Neurology. 2nd ed. Seoul: Panmun Education. 2012:256-267
- Ku CS, Jang JP, Mun SP. 2007. Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *J Wood Sci* 53: 524-528

- Lee YJ, Han OT, Choi HS, Lee BY, Chung HJ, Lee OH. 2013. Antioxidant and anti-adipogenic effects of PineXol®. *Korean J Food Sci Technol* 45:97-103
- Lenaz G, Cavazzoni M, Genova ML, D'Aurelio M, Merlo Pich M, Pallotti F, Formiggini G, Marchetti M, Parenti Castelli G, Bovina C. 1998 Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors* 8:195-204
- Lorenzo A, Yankner BA. 1996. Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 17:89-95
- Maksimović Z, Malenčić Đ, Kovačević, N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* 96:873-877
- Mayeux R, Sano M. 1999. Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 25:1670-1679
- Oken BS, Storzbach DM, Kaye JA. 1998. The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55:1409-1415
- Park SY, Kim DS. 2002. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod* 65:1227-1231
- Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW. 1997. Beta-amyloid neurotoxicity *in vitro*: Evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem* 69:1601-1611
- Rohdewald P. 2002. Review of the French maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharm Ther* 40:158-168
- Selkoe DJ. 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2:18295-18298
- Shearman MS, Ragan CI. 1994. Iversen L: Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of β -amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1470-1474
- Soto C, Brañes MC, Alvarez J, Inestrosa NC. 1994. Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 63:1191-1198
- Statistics Korea. 2014. <http://sgis.kostat.go.kr/publicsmodel/>
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1:1977-1981
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 22:735-741
- Wang Y, Yang G, Gong J, Lu F, Diao Q, Sun J, Zhang K, Tian J, Liu J. 2016. Ginseng for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Top Med Chem* 16:529-536
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid[®] - protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282

Received 15 September, 2017

Revised 02 November, 2017

Accepted 07 November, 2017