

베타아밀로이드로 유도된 신경소교세포 사멸에 대한 루테올린의 보호효과 연구

박규환^{1#}, 장정희^{2*}

1 : 경북대학교 약학대학 약학연구소, 2 : 계명대학교 의과대학 약리학교실

Protective Effect of Luteolin against β -Amyloid-induced Cell Death and Damage in BV-2 Microglial Cells

Gyu Hwan Park^{1#}, Jung-Hee Jang^{2*}

1 : Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyungpook National University,

2 : Department of Pharmacology, School of Medicine, Keimyung University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to investigate neuroprotective effects and molecular mechanisms of luteolin against β -amyloid ($A\beta_{25-35}$)-induced oxidative cell death in BV-2 cells.

Methods : The protective effects of luteolin against $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity and apoptotic cell death were determined by MTT dye reduction assay and TUNEL staining, respectively. The apoptotic cell death was further analyzed by measuring mitochondrial transmembrane potential and expression of pro- and/or anti-apoptotic proteins. To elucidate the molecular mechanisms underlying the protective effects of luteolin, intracellular accumulation of reactive oxygen species, oxidative damages, and expression of antioxidant enzymes were examined.

Results : Luteolin pretreatment effectively attenuated $A\beta_{25-35}$ -induced apoptotic cell death indices such as DNA fragmentation, dissipation of mitochondrial transmembrane potential, increased Bax/Bcl-2 ratio, and activation of c-Jun N-terminal kinase and caspase-3 in BV-2 cells. Furthermore, $A\beta_{25-35}$ -induced intracellular formation of reactive oxygen species and subsequent oxidative damages such as lipid peroxidation and depletion of endogenous antioxidant glutathione were suppressed by luteolin treatment. The neuroprotective effects of luteolin might be mediated by up-regulation of cellular antioxidant defense system via up-regulation of γ -glutamylcysteine ligase, a rate-limiting enzyme in the glutathione biosynthesis and superoxide dismutase, an enzyme involved in dismutation of superoxide anion into oxygen and hydrogen peroxide.

Conclusions : These findings suggest that luteolin has a potential to protect against $A\beta_{25-35}$ -induced neuronal cell death and damages thereby exhibiting therapeutic utilization for the prevention and/or treatment of Alzheimer's disease.

Key words : luteolin, neuroprotection, β -amyloid, microglia, oxidative damages, antioxidant defense, Alzheimer's disease

서론

치매는 세계보건기구(World Health Organization)가 정한 21세기 3대 질환의 하나로, 대표적인 만성 진행형 퇴행성 뇌 정신 질환이며, 이 중 유병률이 가장 높은 노인성 치매는

흔히 알츠하이머병으로도 불린다. 노인성 치매에서는 주로 해마(hippocampus), 전뇌(forebrain), 측두엽(temporal lobe) 등이 순차적으로 손상을 받게 되며, 이 과정에서 약 30-40% 정도의 신경이 손실된다. 노인성 치매의 대표적인 신경 병리학적 특징은 신경세포 외부(extraneuronal)의 노인반(senile

*교신저자 : 장정희, 대구광역시 달서구 달구벌대로 2800 계명대학교 의과대학 약리학교실
· Tel : 053-580-3866 · Fax : 053-580-3782 · E-mail : pamy202@kmu.ac.kr
#제1저자 : 박규환, 대구광역시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학 약학연구소
· Tel : 053-950-8576 · Fax : 053-950-8557 · E-mail : park014@knu.ac.kr
· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 09일 · 채택 : 2013년 11월 12일

plaque) 축적과 신경세포 내부(intraneuronal)의 신경원섬유 농축체(neurofibrillary tangle) 생성을 들 수 있다¹⁾. 이때 노인반의 주요 구성성분은 베타아밀로이드(β -amyloid, $A\beta$) 펩타이드이며, 베타아밀로이드의 신경세포에 대한 독성이 알츠하이머병의 주요 병인으로 여겨지고 있다²⁾.

베타아밀로이드에 의한 신경 독성은 신경교세포의 매개여부에 따라 직접 혹은 간접적인 기전으로 나눌 수 있다. 병적 상태에서 베타아밀로이드에 의해 활성화된 신경소교세포(microglia)는 염증성 싸이토카인(proinflammatory cytokines), 산화질소(nitric oxide, NO), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등을 생성, 유리하여 간접적인 신경독성을 매개한다^{3,4)}. 반면에 정상상태에서의 신경소교세포는 중추신경계의 주 면역세포로서 축적된 베타아밀로이드를 제거하는 이로운 역할을 하기도 한다⁵⁾. 노화에 따른 신경세포의 퇴행을 억제하고 신경세포를 건강하게 유지하기 위해서는 신경세포와 신경소교세포와의 긴밀한 상호작용이 필수적이며, 이를 위해서는 신경소교세포의 생존과 기능유지가 선행되어야 한다. 따라서 베타아밀로이드에 의해 유도되는 신경사멸과정에서 감소된 신경교세포의 세포생존율을 향상시키는 신경보호물질을 발굴하고 그 기전을 규명하는 것은 치매를 예방, 조절하는 치료 기술 개발에 있어 매우 중요한 사안이라 할 수 있다.

루테올린(luteolin, LUT)은 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone으로 임자엽(荳子葉)이라고 불리는 깻잎, 셀러리, 피망 등 녹색채소에 널리 존재하는 플라보노이드의 일종으로, 본초강목에 따르면 루테올린이 많이 함유된 임자엽은 '냄새나는 것을 없애주고 기침과 가래가 위로 올라오는 것을 치료하며, 벌레한테 물린 데 쫓아붙인다'고 기술되며 이는 루테올린의 항염증, 항알러지 효능을 반영한다. 항염증, 항알러지 효능⁶⁾ 이외에도, 항산화, 돌연변이 억제 및 항암 등 다양한 루테올린의 효능이 알려져 왔으며^{7,8)}, 최근에는 뇌질환의 예방과 치료, 특히 기억력 향상 작용에 대한 관심이 점차적으로 증가되고 있다. 스코폴라민(scopolamine)⁹⁾, 그 외 콜린 신경계 손상물질¹⁰⁾, 당뇨를 비롯한 대사성 질환¹¹⁾, 노화¹²⁾, 대뇌 저관류(cerebral hypoperfusion)¹³⁾ 및 베타아밀로이드^{14,15)}로 인한 기억 및 인지기능 손상 *in vivo* 동물모델에서 루테올린의 보호 효능에 대한 연구들이 보고되었으며, 작용기전으로 콜린 신경계 강화^{9,10,11,15)}, 항산화^{9,11,14,15)}, 항염증¹²⁾, 장기기억강화(long-term potentiation)¹³⁾, 뇌혈관 기능 개선¹⁵⁾, 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 활성화^{9,15)} 등이 제시되었다. 하지만, 신경소교세포에서 치매의 원인 물질인 베타아밀로이드로 유발된 손상에 대한 루테올린의 보호 효능 및 기전 규명에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 루테올린의 항치매 효능을 규명하고자, 베타아밀로이드로 신경소교세포 사멸을 유도한 후 루테올린에 의한 보호효과를 관찰하였고, 항산화기전을 중심으로 작용기전을 규명하고자 하였다. 노인성 치매의 병인에 있어 산화적 조직손상 및 신경소교세포의 활성화가 큰 부분을 차지하고 있으므로, 루테올린의 신경소교세포에 대한 보호효과를 정확히 규명하고 적절히 조절한다면 이는 노인성 치매의 예방 및 조절에 크게 기여할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 재료

베타아밀로이드(β -Amyloid₂₅₋₃₅, $A\beta_{25-35}$)는 American peptide (Sunnyvale, CA, USA)에서, 루테올린은 LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 항생제(penicillin/streptomycin)는 Gibco (Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 형광 염색시약 tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) 및 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)의 제품을 사용하였고, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 및 일반 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 일차 및 이차 항체는 모두 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스 신경소교세포주인 BV-2 세포는 10% FBS 및 penicillin (10,000 IU/ml)-streptomycin (10,000 g/ml) 항생제를 포함하는 DMEM 배양액에서, 5% CO₂와 37°C 조건으로 유지 배양하였다. 배지는 이틀에 한 번씩 갈아 주었으며, 각각의 실험 규모에 맞게 세포를 도포하여 실험에 사용하였다.

2) 세포 생존율 측정 : MTT dye reduction assay

베타아밀로이드로 인한 세포독성에 대한 루테올린의 보호효과를 관찰하고자 MTT 환원법을 이용하였다. BV-2 세포를 48-well plate에 8×10^4 개/well의 밀도로 칸 다음 24시간 동안 안정화 시켰다. 이후, 루테올린을 농도별로 BV-2 세포에 1시간 전 처리 한 다음 베타아밀로이드를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포의 형태학적 변화는 위상차 현미경(phase contrast microscope)을 이용해 관찰했으며, 베타아밀로이드 처리 22시간 후 MTT 염색물질을 가하여 2시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포에서 생성된 보라색의 난용성 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 완전히 용해시킨 후 microplate reader (Molecular devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DMSO vehicle만 처리한 대조군의 흡광도를 100% 기준으로 상대적인 세포생존율(%)을 계산하였다.

3) 세포사멸 형태 측정 : *in situ* nick-end labeling (TUNEL 염색법)

베타아밀로이드가 유도하는 세포사멸 형태를 측정하기 위해 apoptosis의 특징적인 지표인 DNA 절편화(fragmentation)를 TUNEL 염색 키트(Roche, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시약 처리가 끝난 세포에 100 μ l의 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich)을 가하여 1시간 동안 고정시킨 다음 인산완충용액(phosphate-buffered saline,

PBS)으로 3회 세척하였다. 고정된 세포에 0.3% H_2O_2 -메탄올 용액을 가하여 실온에서 30분간 내인성 peroxidase의 활성을 차단한 다음 PBS로 세척하고, 0.1% Triton X-100을 4℃에서 2분간 처리하였다. 이후 TUNEL 반응용액(terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT, digoxigenin-11-dUTP)으로 37℃에서 1시간동안 배양하여 표지시킨 다음, peroxidase-conjugated anti-goat antibody를 가하여 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 이후 diaminobenzidine (DAB) 용액으로 실온에서 10분간 반응시킨 다음 50% glycerol로 봉입하여 세포사멸 형태를 관찰하였다.

4) 단백질 발현 변동 측정 : Western blot analysis

시료 처리가 끝난 BV-2 세포에 protease 저해제(Roche)를 함유하는 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4 , Thermo, USA)를 첨가한 후 얼음 위에서 10분간 세포를 용해시킨 다음 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량했으며, 30-40 μ g의 단백질을 10-12% SDS-PAGE에서 전기영동한 다음, PVDF membrane (Roche)으로 transfer 하였다. membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 blocking 시킨 뒤, 3% fat-free dry milk-PBS에 일차항체를 희석하여 4℃에서 밤새 배양하였다. PBST용액으로 10분간 3회 세척한 후 membrane을 horseradish peroxidase가 중합된 이차항체 용액에서 1시간 동안 실온 배양하였다. PBST용액으로 10분간 3회 세척한 다음 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 반응시킨 뒤 영상을 LAS4000 image (Fujifilm, Japan) 장비를 이용하여 촬영하였다.

5) 미토콘드리아 막전압 측정 : TMRE staining

미토콘드리아 막전압($\Delta\psi$, mitochondrial transmembrane potential, MMP)은 TMRE 형광 염색시약을 사용하여 측정하였다. BV-2 세포를 5×10^4 개/well의 밀도로 4 well-chamber slide에 분주한 뒤, 베타아밀로이드와 루테올린을 24시간 동안 처리하였다. 배지를 걷어낸 후, 10 μ M TMRE를 가하여 37℃에서 15분간 반응 시킨 다음 형광의 변화를 excitation 파장 540 nm 및 emission 파장 590 nm에서 형광현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. 정량을 위하여, PBS로 2회 세척한 다음 DMSO로 세포를 용해시켰으며, 형광 강도를 microplate fluorescence reader (SpectraMax Gemini XS, Molecular Device, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

6) Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 colorimetric assay kit (Biovision Inc, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 상대적인 caspase-3의 활성을 측정 비교하였다. 시료처리가 끝난 BV-2 세포를 PBS로 1회 세척한 다음, lysis buffer를 넣고 ice에서 10분간 배양하였다. 이후 배양액을 원심분리 한 뒤 상등액을 취하여 L-aspartic-L-glutamic-L-valyl-L-aspartic acid (DEVD-pNA)

기질과 혼합한 다음 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 활성화된 caspase-3로 인해 생성된 물질인 *p*-nitroaniline (pNA)의 양을 405 nm에서 흡광도로 측정하였다. DMSO vehicle만 처리한 대조군의 흡광도를 100% 기준으로 상대적인 caspase-3 활성 (%)을 계산하였다.

7) 세포내 활성산소종 축적 정량 : DCF-DA staining

세포내에 축적된 활성산소종을 정량하기 위하여 DCF-DA 염색시약을 사용하였다. BV-2 세포를 5×10^4 개/well의 밀도로 4 well-chamber slide에 분주한 뒤, 베타아밀로이드와 루테올린을 6시간 동안 처리하였다. 배지를 걷어낸 후, 15 μ M DCF-DA를 가하여 37℃에서 15분간 반응 시킨 다음 형광의 변화를 excitation 파장 485 nm 및 emission 파장 530 nm에서 형광현미경으로 관찰하였다. 정량을 위하여, PBS로 2회 세척한 다음 DMSO로 세포를 용해시켰으며, 형광 강도를 microplate fluorescence reader를 사용하여 측정하였다.

8) 세포내 환원형 글루타치온 (glutathione, GSH) 정량

생체내 산화환원 평형의 지표가 되는 환원형 GSH의 농도를 BIOXYTECH GSH-400 colorimetric kit (Biovision, USA)을 사용하여 측정하였다. 시료처리가 끝난 BV-2 세포를 PBS로 1회 세척 후 ice-cold GSH reaction buffer 첨가하여 균질화한 다음 5% sulfosalicylic acid를 추가하였다. 이후, 원심분리 한 뒤(8,000 g, 10분) 상층액을 취하여 새로운 튜브로 옮긴 다음, 샘플 20 μ l에 NADPH solution을 포함하는 GSH 반응용액(glutathione reaction buffer) 160 μ l를 가하고 vortex하여 10분간 실온에서 반응시켰다. 이후 20 μ l 기질용액을 첨가하여 실온에서 5분 동안 배양시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 통계분석

모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 ANOVA로 검정한 후, 사후분석으로 Turkey's test를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 베타아밀로이드로 유도된 신경독성에 대한 루테올린의 보호효과

BV-2 세포에서 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 처리하여 신경독성을 유도하고 이에 대한 루테올린(LUT)의 보호효과를 규명하기 위하여 상대적 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다. 우선 다양한 농도(1, 3, 10, 30 μ M)의 루테올린을 단독으로 24시간 동안 처리했을 때, 10 μ M 이상의 농도에서는 루테올린 자체의 세포독성이 발현됨을 관찰하였다. 이를 근거로 이후의 실험에서는 루테올린의 농도를 세포독성이 나타나지 않는 1 μ M 및 3 μ M으로 고정하고 30분간 전처리한 다음 15 μ M의 $A\beta_{25-35}$ 를 가하여 베타아밀로이드로 인한

신경독성에 대한 루테올린의 보호효과를 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. $A\beta_{25-35}$ (15 μ M)를 단독으로 처리한 그룹에서는 대조군에 비해 세포생존율이 유의하게 감소되었으며, 이는 루테올린을 전처리 함으로써 농도 의존적(1 μ M 및 3 μ M)으로 유의하게 증가함을 확인 할 수 있었다(Fig. 1A).

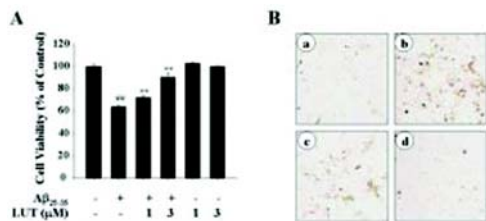


Fig. 1 Attenuation of $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity and apoptotic cell death by luteolin (LUT) A. Cell viability was measured by MTT dye reduction assay after treatment of BV-2 cells with $A\beta_{25-35}$ for 24 h in the presence or absence of LUT (1 μ M and 3 μ M). Data are represented as mean $\pm$ S.D. (n=3). $^{##}p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$ -treated alone groups, $^{**}p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + LUT groups. B. DNA fragmentation, an indicative marker for apoptotic cell death was determined by TUNEL staining as described in the 'Materials and Methods'. a : vehicle-treated control, b : $A\beta_{25-35}$ (15 μ M), c : $A\beta_{25-35}$ (15 μ M) + LUT (1 μ M), d : $A\beta_{25-35}$ (15 μ M) + LUT (3 μ M).

2. 베타아밀로이드로 유도된 apoptosis에 대한 루테올린의 보호효과

루테올린에 의해 억제되는 세포사멸의 형태를 규명하기 위하여 apoptosis를 측정하는 대표적인 지표중의 하나인 DNA fragmentation을 TUNEL 염색법을 통해 확인하였다. 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 24시간 처리한 결과 TUNEL-양성인 세포의 수가 유의적으로 증가했으며, 이는 $A\beta_{25-35}$ 에 의한 세포사멸의 형태가 apoptosis임을 시사한다. 한편, $A\beta_{25-35}$ 에 의한 BV-2 세포의 apoptosis 현상은 루테올린(LUT, 1 μ M 및 3 μ M)을 전처리함으로써 효과적으로 억제되었다(Fig. 1B). 한편, apoptosis가 진행되는 과정에서 일반적으로 미토콘드리아의 막전압(mitochondrial transmembrane potential, MMP)이 특징적으로 감소되며¹⁶⁾, 이는 이후 apoptosis를 매개하는 단백질들을 세포질로 유출하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서도 BV-2 세포에서 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 처리한 경우 MMP가 감소됨을 TMRE 형광 염색을 통해 확인했으며, 이는 루테올린 전처리에 의해 대조군과 같은 수준으로 회복되었다(Fig. 2). 루테올린에 영향을 받는 apoptosis 관련분자들을 파악하기 위해, 이후 실험에서는 apoptosis 조절단백질인 Bcl-2/Bax의 발현변동, 세포사멸관련 인산화 효소인 JNK와 실행 효소인 caspase-3의 활성변동을 측정하였다. 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 처리하면, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질의 발현이 감소되고 촉진시키는 Bax 단백질의 발현은 증가되는 반면, 루테올린을 전처리한 경우 베타아밀로이드에 의해 변동된 Bcl-2/Bax의 발현 양상이 정상상태로 회복되었다(Fig. 3A). JNK의 경우, 베타아밀로이드에 의해 인산화되어 활성이 증가 되었지만, 루테올린을 전처리하는 경우 JNK 인산화는 현저히 감소되었다(Fig. 3B). 베타아밀로이드에 의해 증가된 caspase-3의 상대적 활성 역시 루테올린 전처리에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 3C).

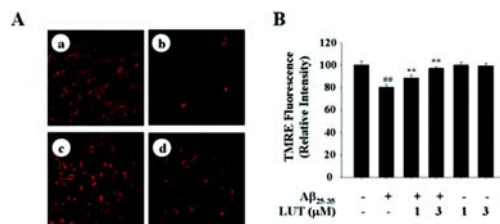


Fig. 2 Effect of LUT on $A\beta_{25-35}$ -induced dissipation of mitochondrial transmembrane potential (MMP) A. Cells were pretreated with LUT for 1 h and then exposed to $A\beta_{25-35}$ for 24 h. MMP was assessed by using fluorescence probe TMRE. B. Quantitative data of TMRE fluorescence intensity. Relative fluorescence intensity was calculated regarding control as 100%. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3). $^{##}p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$ -treated alone groups, $^{**}p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + LUT groups.

3. 베타아밀로이드로 유도된 활성산소 생성 및 산화적 손상 대한 루테올린의 항산화 보호효과

베타아밀로이드로 유도된 신경독성 및 사멸에 대한 루테올린의 보호기전을 규명하고자, 세포내 축적된 활성산소종의 양을 DCF-DA 형광염료를 사용해 측정하였다. 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 처리한 결과 녹색형광의 강도 즉, 세포내 활성산소종의 축적이 현저히 증가되었으며, 이는 루테올린(1 μ M 및 3 μ M)을 전처리함으로써 효과적으로 감소되었다(Fig. 4). 한편, 활성산소 생성으로 인한 산화적 손상에 대한 루테올린의 보호효과를 검토하기 위하여, 대표적인 산화적 손상 지표인 지질의 과산화 정도를 측정하였다. 베타아밀로이드를 처리한 경우 지질 과산화 과정의 산물인 4-hydroxynonenal (4-HNE)가 대조군에 비해 현저히 증가되었으며, 이는 루테올린을 전처리 함으로써 효과적으로 억제되었다(Fig. 5A). 따라서 베타아밀로이드로 유도된 신경독성 및 사멸에 대한 루테올린의 보호효과에는 신경세포 내 활성산소종의 생성 감소 및 지질과산화 억제가 관련됨을 알 수 있다.

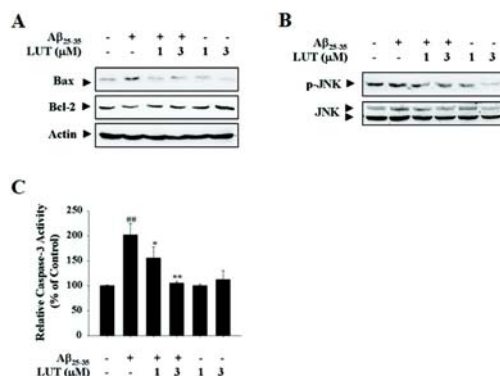


Fig. 3 Protective effect of LUT against $A\beta_{25-35}$ -induced apoptotic signaling cascades in BV-2 cells Cells were incubated with $A\beta_{25-35}$ with or without LUT pretreatment and protein samples were prepared for Western blot analysis. Protein expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 (A), phosphorylated and unphosphorylated forms of JNK (B) was compared. The protein levels of actin were monitored for the confirmation of equal amount of protein loading. The caspase-3 activity (C) was measured by colorimetric assay kit as described in the 'Materials and Methods'. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3). $^{##}p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$ -treated alone groups, $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + LUT groups.

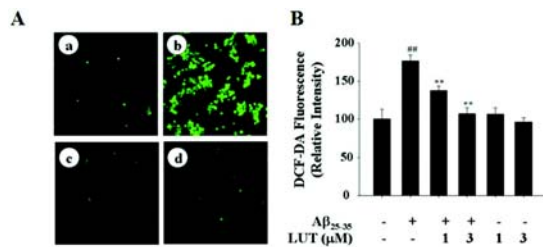


Fig. 4 Effect of LUT on the $A\beta_{25-35}$ -induced intracellular accumulation of ROS in BV-2 cells. A. Cells were pretreated with LUT for 1 h and $A\beta_{25-35}$ was added to the media for additional 6 h. Intracellular ROS levels were assessed by using DCF-DA dye. B. Quantitative data of DCF-DA fluorescence intensity. Relative fluorescence intensity was calculated regarding control as 100%. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3). ** $p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$ -treated alone groups, ** $p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + LUT groups.

4. 생체내 항산화 방어체계에 미치는 루테올린의 효과

생체내 항산화방어체계에 미치는 루테올린의 영향을 보다 세밀하게 규명하기 위하여, 항산화방어체계의 대표적인 분자 중의 하나인 세포내 글루타치온 (glutathione, GSH) 수준을 측정하였다. 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$, 15 μ M)를 처리한 결과 세포내 GSH 수준은 대조군에 비해 감소하였으며, 이는 루테올린을 1 μ M 및 3 μ M의 농도로 전처리함으로써 농도의존적으로 회복되었다(Fig. 5B). 더 나아가, GSH 생합성에 관여하는 효소인 γ -glutamylcysteine ligase (GCL)의 발현을 측정된 결과, 루테올린 전처리에 의해 단백질 발현이 시간 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 5C). 루테올린은 그 밖에도 대표적인 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)의 단백질 발현 또한 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5C).

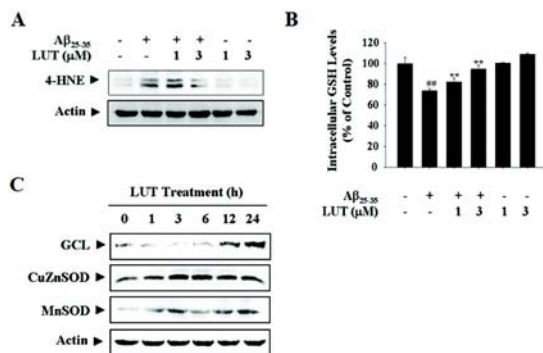


Fig. 5 Protective effect and molecular mechanism of LUT against $A\beta_{25-35}$ -induced oxidative damages. A. Lipid peroxidation was measured as a marker for the oxidative damage to lipid. The formation of 4-HNE was examined by Western blot analysis using anti-4-HNE specific antibody. B. Intracellular GSH levels were compared as an indicative endogenous antioxidant molecule. Data are represented as mean $\pm$ S.D. (n=3). ** $p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$ -treated alone groups, ** $p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + LUT groups. C. Cells were treated with indicated time with LUT and total proteins were isolated by RIPA buffer. Protein expression of antioxidant enzymes such as γ -glutamylcysteine ligase (GCL) and superoxide dismutase (SOD) was assessed by Western blot analysis. Actin levels were measured as a loading control.

고찰

치매의 원인과 증상에 대해 국내외에서 다각적인 연구가 진행되었음에도 불구하고, 현재 치매 치료제로 사용되고 있는 약물은 아세틸콜린 분해효소 억제제와 NMDA 수용체 길항제로 종류가 제한되어 있으며 이들마저도 일시적인 증상만을 경감시키고 병의 진행속도를 지연시킬 뿐, 근원적인 치료가 되지 못하고 있다. 특히, 발병기전이 복합적인 치매에 대해 단일 표적중심의 합성신약이 치료 효능상의 한계점을 드러내고 있기 때문에, 여러 경로의 표적을 동시에 제어하고 부작용을 경감시킬 수 있는 천연물 유래 항치매 활성물질에 대한 관심이 고조되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 천연물질인 임자엽(荳蔻葉)에 많이 함유된 루테올린의 신경세포 보호 효능과 작용 기전을 규명하고 치매의 예방 및 치료물질로서 가능성을 검토하기 위하여, 신경소교세포인 BV-2 세포를 대상으로 항산화 작용 및 신경세포 사멸 억제에 미치는 루테올린의 효과에 중점을 두고 일련의 연구를 수행하였다.

신경소교세포는 뇌에 특이적으로 존재하는 일종의 대식세포로서, 신경독성물질인 베타아밀로이드를 포식작용으로 제거하는 이로운 역할을 수행한다. 하지만, 비정상적으로 과도하게 활성화 될 경우 chemokine (C-C motif) ligand (CCL2), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등 염증성 신경 독성물질을 분비하여 신경세포에 손상을 유발한다. 그 밖에도 신경소교세포의 과도한 활성화는 보체(complement), 단백분해효소(proteases), 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 현저히 증가시켜 신경소교세포 및 신경세포의 사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

임자엽, 셀러리, 피망 등 녹색 채소에 많이 함유된 루테올린은 기존의 다양한 연구를 통해 우수한 항염증 효능을 갖는 것으로 다수 보고되었다. 루테올린은 BV-2 세포에서 대표적인 염증 유발물질인 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증반응을 억제하는데, 이 과정은 염증 매개 효소 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2의 발현 억제, NO 및 prostaglandin E₂의 생성억제, 염증성 사이토카인 interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성감소 등이 매개하였다¹⁸⁾. 일차배양된 신경소교세포와 N9 신경소교세포주에서는 interferon- γ (IFN- γ)로 유도된 signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)의 활성화와 이로 인한 CD-40, TNF- α 및 IL-6의 발현을 억제하였다¹⁹⁾. 더 나아가 BV-2 세포와 일차배양된 신경소교세포에서 LPS와 IFN- γ 를 함께 처리한 경우 유도된 iNOS의 발현 증가 및 NO, IL-1 β , TNF- α 의 생성 증가 또한 루테올린에 의해 효과적으로 감소되었으며, 이는 상위 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B), STAT1, interferon regulatory factor 1 (IRF-1)의 활성 억제에 의한 것으로 사료 된다²⁰⁾.

본 연구에서 베타아밀로이드를 BV-2 세포에 처리한 경우 세포독성 및 사멸이 유발되었으며, 이는 루테올린을 전처리함으로써 농도 의존적으로 효과적으로 보호되었다. 특히 루테올린은 BV-2 세포에서 베타아밀로이드로 인한 apoptosis 과정 즉, apoptosis 관련 상위 인산화 효소인 JNK의 활성화,

apoptosis 매개 단백질인 Bax의 발현 증가, apoptosis 억제 단백질인 Bcl-2의 발현 감소, 이후 미토콘드리아 막전압 손상, caspase-3 활성화 등 일련의 신호전달 과정을 억제함으로써 궁극적으로 DNA 절편화를 억제함으로써 세포를 보호하였다. 이상의 결과들을 종합하면, BV-2 세포에서 베타아밀로이드 유도된 신경독성 및 사멸에 대한 루테올린의 보호효과는 붕괴된 미토콘드리아의 막전압 회복, 변동된 Bcl-2/Bax 발현 정상화, JNK 및 caspase-3의 활성화 억제에 의해 매개되는 것으로 사료된다.

다른 연구에서도 루테올린은 혈청(serum) 결핍²¹⁾과 다양한 신경독성물질들(6-hydroxydopamine : 6-OHDA, N-methyl-4-phenyl-pyridium : MPP+)²²⁻²³⁾로 유도되는 직접적 신경독성과 세포사멸을 억제하는 것으로 보고되었다. 일차배양된 대뇌피질 신경세포에서 루테올린은 베타아밀로이드로 인한 세포독성과 세포사멸을 억제하였고, 이 과정에서 extracellular signal-regulated kinase (ERK), JNK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등의 상위 인산화 효소의 활성화와 하위 caspase-3의 활성화가 억제됨이 보고되었다²⁴⁾. 또한 루테올린은 PC12 세포에서 도파민성 신경독성 물질인 6-OHDA로 인한 신경세포 독성과 사멸을 억제하였으며, 이는 Bax의 발현 감소, Bcl-2의 발현 증가, p53의 활성화 감소에 의해 매개되었다²²⁾.

베타아밀로이드가 신경독성과 세포사멸을 유발하는 기전은 다양하게 제시되고 있지만, 활성산소종의 생성으로 인한 산화적 손상과 염증성 사이토카인의 생성을 통한 염증반응으로 대별된다. 실제 치매환자의 뇌에서 지질과산화, 단백질산화, DNA 산화적 손상 등 산화적 스트레스의 지표들이 축적되거나 증가되는 것으로 보고되었다. 뇌에서 과도하게 생성, 침착된 베타아밀로이드는 올리고머화(oligomerization), 응집(aggregation) 과정을 거쳐 과산화수소(hydrogen peroxide), 과산화물 음이온(superoxide anion), 히드록실라디칼(hydroxylradical) 등의 활성산소종을 형성하며, 이들은 반응성이 매우 높아 지질, 단백질, 유전자 등 생체내 거대분자에 영향을 미치고 궁극적으로 신경세포에서 apoptosis를 일으킨다. 이렇듯 치매의 발병과정에 있어 장기간에 걸친 산화적 손상이 중요한 역할을 하기 때문에, 최근에는 항산화 효과가 우수하다고 알려진 천연 후보물질들을 대상으로 다양한 산화-환원 관련 분자지표들을 활용해 항치매 효능을 검색하고 해당 유효성분 및 작용기전을 규명하는 것이 효과적인 치매 치료제 개발을 위한 핵심 연구 분야로 인식되고 있다.

본 연구에서 루테올린은 베타아밀로이드로 인한 세포내 활성산소종의 축적을 감소시켰으며, 이로 인한 지질 과산화의 증가 및 내인성 항산화 물질인 GSH 고갈을 효과적으로 억제하였다. 특히 뇌는 에너지 대사가 활발하고, 전이금속이 충분히 존재하며, 지질이 풍부하기 때문에 지질이 산화적 손상을 받기 쉬우며, 지질 과산화 연쇄반응을 통해 다량의 지질과산화물이 생성될 수 있다. GSH는 강한 환원력을 가진 내인성 항산화 물질로서, 외부로부터 유입된 독성물질을 무독화시키고, 단백질의 -SH기를 유지시켜 주며, 활성산소종을 직접적으로 소거하는 등 생체내 항산화 방어기작에서 중심적인 역할을 한다. 다른 연구자들의 실험결과에 따르면 루테올린은 일차배양 신경세포에서 과산화수소로 유도된 활성산소종의 생성 억제, 미토콘드리아 활성화 감소, 항산화 효소 catalase의 활성화

및 GSH 양을 증가시키고²⁵⁾, test tube 실험에서도 과산화수소로 인한 DNA의 산화적 손상을 효과적으로 억제하는 것으로 보고되었다²⁶⁾.

한편, 생체내에는 내인성 항산화 물질인 GSH 이외에도 활성산소종을 소거하는 다양한 항산화 효소들이 항산화방어체계의 구성요소로 존재하며, 이들은 상호보완적으로 산화적 손상을 방어하는 역할을 수행하게 된다. 특히, 본 연구에서 항산화 분자지표로 사용한 GCL은 GSH의 생합성 과정의 속도결정 단계에 작용하는 효소이며, 치매 환자에서 GCL의 발현이 현저히 감소된 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 루테올린은 GCL 효소의 단백질 발현을 시간 의존적으로 증가시켰으며, 더 나아가 대표적인 항산화 효소인 SOD의 발현을 높게 유지시켰다. SOD는 과산화물 음이온을 분해하는 과정을 촉매하는 효소로서, 세포질에 주로 존재하는 CuZnSOD와 미토콘드리아에 주로 존재하는 MnSOD로 구분된다. 본 연구결과 루테올린은 두 가지 형태의 SOD 효소의 단백질 발현을 모두 증가시켰다. 이상의 결과들은 루테올린이 내인성 항산화 물질인 GSH 및 이를 합성하는 항산화효소 GCL, SOD 등을 포함하는 세포내 항산화 방어체계의 기능 강화를 통해 베타아밀로이드로 유도된 산화적 신경사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는 저항성을 제공함을 시사한다.

최근에는 세포실험 결과들을 바탕으로 다양한 동물모델에서 루테올린의 신경세포 보호 및 기억력 개선 효능들이 검증되고 있다. 루테올린은 도파민성 신경독성물질인 6-OHDA와 세로토닌성 신경독성물질인 5,7-dihydroxytryptamine으로 유도된 기억력 손상을 회복시키지 못했지만, 흥미롭게도 무스카린성 아세틸콜린 수용체 길항제인 스코폴라민과 니코틴성 아세틸콜린 수용체 길항제인 mecamylamine으로 인한 기억력 감소를 효과적으로 억제하였다¹⁰⁾. 이는 루테올린에 의한 콜린성 신경계의 활성 증가 가능성을 시사한다. 루테올린은 특히 치상회(dentate gyrus)에서 세포의 증식, 신경 아세포종(neuroblastoma)의 분화를 촉진하고, 신경영양인자의 발현 및 아세틸콜린 양을 증가시키며, 지질과산화를 억제하여 스코폴라민으로 유도된 건망증을 회복시키는 것으로 보고되었다⁹⁾. 그 밖에도 루테올린은 노화로 인한 기억력 감퇴, 즉 22-24개월령의 노화 마우스에서 해마 의존적 기억력 손상을 억제하였으며 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현을 현저히 감소시켰다¹²⁾.

루테올린이 세포내 항산화 방어체계를 강화시키는 분자생물학적 작용 기전에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이와 관련해 다양한 신경세포 모델에서 항산화 보호효능을 연구한 결과들을 검토해보면 내인성 GSH, 항산화 효소 외에, NF-E2-related factor 2 (Nrf2)나 NF- κ B 같은 산화-환원 반응에 민감하게 작용하는 전사인자들도 루테올린의 신경보호작용을 매개할 것으로 예측된다^{21,23)}.

본 연구에서는 임자엽의 주요 활성성분 중의 하나인 루테올린을 소재로 신경교세포에서의 효능 및 기전을 일차적으로 제시하였지만, 향후 연구에서는 다양한 산지 및 추출법으로 얻어진 임자엽 조추출물과의 효능 비교 및 루테올린 함량과의 연관성 규명, 그 외 루테올린을 함유하고 있는 금은화(金銀花), 인동등(忍冬藤) 추출물과의 비교연구, 이들 약제를 포함한 방제와의 비교연구 등이 단계적으로 수행되어야 할 것이다.

임자엽에는 루테올린 이외 플라본 유도체(flavone derivatives)로 apigenin, scutellarein, 신남산 유도체(cinamic acid derivatives)로 rosmarinic acid, caffeic acid, 그 밖에 안토시아닌(anthocyanins)을 활성성분으로 함유하고 있으며, 상대적인 함량은 rosmarinic acid, 루테올린, caffeic acid, apigenin 순서이다^{27,28)}. 루테올린의 경우 rosmarinic acid 보다 임자엽에 다소 낮게 함유되어 있지만, 베타아밀로이드를 생성하는 효소 β -secretase (BACE1)의 억제 활성에 있어 rosmarinic acid (21 μ M)보다 저용량(0.5 μ M)에서 효능을 나타내었으며²⁹⁾, *in vivo* 동물실험에서 다른 활성성분과 비교하여 탁월한 항염 효능을 나타내었다⁶⁾. 즉, ICR 마우스 모델에서 OK-432로 인한 혈청내 TNF- α 생성 증가와 oxasoline 또는 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도된 귀부종의 경우 rosmarinic acid와 caffeic acid에 의해서는 변화가 없었지만 루테올린에 의해 현저히 감소되었다. 특히, 루테올린은 다른 활성물질들과 상승작용(synergistic effect)이 다수 보고되어 있으므로, 루테올린을 활성성분으로 함유하는 조추출물의 경우 더 높은 항치매 활성을 기대할 수 있을 것이다.

결론

베타아밀로이드로 유도된 신경소교세포 사멸에 대한 루테올린의 효과를 살펴본 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신경소교세포 모델인 BV-2 세포에서 루테올린은 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성 및 사멸을 효과적으로 보호하였으며, 이는 붕괴된 미토콘드리아 막전압 회복, 변동된 Bcl-2/Bax 발현 정상화, JNK 및 caspase-3 활성화 억제에 의해 매개되는 것으로 사료된다.
2. 더 나아가, 루테올린은 베타아밀로이드로 유도된 신경독성 및 사멸 과정에서 활성산소종의 생성을 감소시키고 지질 과산화 및 GSH 고갈로 대표되는 산화적 손상을 억제하였다.
3. 루테올린은 GCL 및 SOD를 비롯한 세포 내 항산화방어체계의 기능 강화를 통해 베타아밀로이드로 유도된 산화적 손상 및 사멸로부터 신경소교세포를 보호할 수 있는 저항성을 제공하였고, 이는 천연 치매 예방 및 치료 물질로서 루테올린의 활용 가능성을 시사한다.

감사의 글

이 연구는 2011년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌다.

References

1. Imbimbo BP, Lombard J, Pomara N. Pathophysiology

- of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am*, 2005 ; 15 : 727-53.
2. Behl C. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res*, 1997 ; 290 : 471-80.
3. Cotter RL, Burke WJ, Thomas VS, Potter JF, Zheng J, Gendelman HE. Insights into the neurodegenerative process of Alzheimer's disease: a role for mononuclear phagocyte-associated inflammation and neurotoxicity. *J Leukoc Biol*, 1999 ; 65 : 416-27.
4. Giulian D. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*, 1999 ; 65 : 13-8.
5. Morgan D. The role of microglia in antibody-mediated clearance of amyloid-beta from the brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009 ; 8 : 7-15.
6. Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull*, 2002 ; 25 : 1197-202.
7. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*, 2008 ; 62 : 590-7.
8. Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 2006 ; 534 : 12-8.
9. Yoo DY, Choi JH, Kim W, Nam SM, Jung HY, Kim JH, Won MH, Yoon YS, Hwang IK. Effects of luteolin on spatial memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation in the hippocampal dentate gyrus in a scopolamine-induced amnesia model. *Neurol Res*, 2013 ; 35 : 813-20.
10. Tsai FS, Peng WH, Wang WH, Wu CR, Hsieh CC, Lin YT, Feng IC, Hsieh MT. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci*, 2007 ; 80 : 1692-8.
11. Liu Y, Tian X, Gou L, Sun L, Ling X, Yin X. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Brain Res Bull*, 2013 ; 94 : 23-9.
12. Jang S, Dilger RN, Johnson RW. Luteolin inhibits microglia and alters hippocampal-dependent spatial working memory in aged mice. *J Nutr*, 2010 ; 140 : 1892-8.
13. Xu B, Li XX, He GR, Hu JJ, Mu X, Tian S, Du GH. Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats. *Eur J Pharmacol*, 2010 ; 627 : 99-105.

14. Tsai FS, Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, Lin YC, Peng WH. The ameliorating effects of luteolin on beta-amyloid-induced impairment of water maze performance and passive avoidance in rats. *Am J Chin Med*. 2010 ; 38 : 279–91.
15. Liu R, Gao M, Qiang GF, Zhang TT, Lan X, Ying J, Du GH. The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid beta(25–35) peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience*. 2009 ; 162 : 1232–43.
16. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*. 1995 ; 182 : 367–77.
17. Kaushik DK, Basu A. A Friend in Need May Not be a Friend Indeed: Role of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 ; 12 : 726–40.
18. Zhu LH, Bi W, Qi RB, Wang HD, Lu DX. Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int J Neurosci*. 2011 ; 121 : 329–36.
19. Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, Shytle RD. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation*. 2008 ; 5 : 41.
20. Kao TK, Ou YC, Lin SY, Pan HC, Song PJ, Raung SL, Lai CY, Liao SL, Lu HC, Chen CJ. Luteolin inhibits cytokine expression in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *J Nutr Biochem*. 2011 ; 22 : 612–24.
21. Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD, Yen JH. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58 : 4477–86.
22. Guo DJ, Li F, Yu PH, Chan SW. Neuroprotective effects of luteolin against apoptosis induced by 6-hydroxydopamine on rat pheochromocytoma PC12 cells. *Pharm Biol*. 2013 ; 51 : 190–6.
23. Wruck CJ, Claussen M, Fuhrmann G, Römer L, Schulz A, Pufe T, Waetzig V, Peipp M, Herdegen T, Götz ME. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl*. 2007 ; 72 : 57–67.
24. Cheng HY, Hsieh MT, Tsai FS, Wu CR, Chiu CS, Lee MM, Xu HX, Zhao ZZ, Peng WH. Neuroprotective effect of luteolin on amyloid beta protein (25–35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytother Res*. 2010 ; 24 : S102–8.
25. Zhao G, Yao-Yue C, Qin GW, Guo LH. Luteolin from Purple Perilla mitigates ROS insult particularly in primary neurons. *Neurobiol Aging*. 2012 ; 33 : 176–86.
26. Romanova D, Vachalkova A, Cipak L, Ovesna Z, Rauko P. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*. 2001 ; 48 : 104–7.
27. Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules*. 2008 ; 14 : 133–40.
28. Peng Y, Ye J, Kong J. Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Agric Food Chem*. 2005 ; 53 : 8141–7.
29. Choi SH, Hur JM, Yang EJ, Jun M, Park HJ, Lee KB, Moon E, Song KS. Beta-secretase (BACE1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Arch Pharm Res*. 2008 ; 31 : 183–7.