



박태기나무 씨 에탄올 추출물의 아세틸콜린에스테라제 억제 활성과 항아밀로이드 효과

김주은¹ · 임재윤^{2†}

Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Anti-amyloidogenic Effect of *Cercis chinensis* Bunge Seed Ethanolic Extract

Ju Eun Kim¹ and Jae Yoon Leem^{2†}

ABSTRACT

Received: 2021 July 7

1st Revised: 2021 August 18

2nd Revised: 2021 October 20

3rd Revised: 2021 October 26

Accepted: 2021 October 26

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: The root and bark of *Cercis chinensis* Bunge have been used as Chinese herbal medicines for stroke, hypertension, and gynecological diseases. The seed of *C. chinensis* is classified as a food ingredient in the Food Public Code. In this study, the inhibitory activities of *Cercis chinensis* Bunge seed against beta-amyloid (A β) secretion and acetylcholinesterase (AChE) were investigated.

Methods and Results: The effect of 50% ethanolic extract of *C. chinensis* Bunge seed (CCS) on A β secretion in APP_{swE} cells was analyzed by A β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CCS dose-dependently decreased A β ₁₋₄₂ secretion at 50 and 100 μ g/ml. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of CCS were 45.02 μ g/ml in A β ₁₋₄₀ and 43.48 μ g/ml in A β ₁₋₄₂. To analyze the metabolism of amyloid precursor protein (APP) via β -secretase, the beta-carboxyl-terminal fragment (β -CTF) level was measured via ELISA and was found to be dose-dependently increased upon CSS treatment. Additionally, western blot analysis was performed to check the protein expression level of APP, soluble alpha (sAPP α), and CTF. The APP protein level did not change upon CCS treatment but sAPP α secretion level increased, indicating a tendency to increase both α - and β -CTF. These results suggest that CCS reduces A β secretion by targeting γ -secretase. Additionally, CCS showed a strong AChE inhibitory activity at an IC₅₀ value of 8.37 μ g/ml.

Conclusions: CCS exhibited A β reduction via γ -secretase and AChE inhibition and may be used as a material to develop healthy functional foods and medicine for Alzheimer's disease treatment.

Key Words: *Cercis chinensis* Bunge, Acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, Amyloid Precursor Protein, β -amyloid

서 언

고령 인구가 증가함에 따라 치매 환자 수도 증가하고 있어 세계보건기구 (WHO)는 2020년 세계 치매 환자 수가 5,000만 명이며, 매년 1,000만 명씩 늘어날 것으로 보고하였다. 한국은 전체 인구 중 65세 이상 고령 인구가 차지하는 비율이 2020년 15.7%에서 2060년 43.9%로 늘어날 것으로 예상하며 치매 환자는 2020년 에 84만 명에서 2060년 332만 명으

로 추정하였다 (Ward *et al.*, 2020).

알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease; AD)은 가장 일반적인 치매의 형태이며 AD의 발병요인은 다양한데 그 중, 주요한 발병요인의 하나로서 베타아밀로이드 (β -amyloid; A β)에 의한 신경세포 사멸을 들 수 있다.

아밀로이드전구단백질 (Amyloid Precursor Protein; APP) 대사에 관여하는 효소는 α -, β -, γ -secretase이다. APP의 대사 과정은 아밀로이드 생성경로 (Amyloidogenic pathway)와 비

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-290-1575 (E-mail) jyleem@woosuk.ac.kr

¹우석대학교 약학과 연구교수; 스마트 융복합 라이프케어 연구소 연구교수 / Research Professor, Department of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 55338, Korea; Research Professor, Smart Convergence Life-care Research Center, Woosuk University, Wanju 55338, Korea.

²우석대학교 약학과 교수; 스마트 융복합 라이프케어 연구소 교수 / Professor, Department of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 55338, Korea; Professor, Smart Convergence Life-care Research Center, Woosuk University, Wanju 55338, Korea.

아밀로이드 생성경로 (non-amyloidogenic pathway)로 나눌 수 있으며, 아밀로이드 생성경로는 APP가 β -secretase에 의해 절단되어 soluble amyloid precursor protein β (sAPP β)와 β -carboxy-terminal fragment (β -CTF)로 나뉘며, β -CTF가 γ -secretase에 의해 절단되면 A β 와 APP intracellular domain (AICD)이 생성된다.

아밀로이드 생성경로의 비정상적인 증가는 A β 의 생산을 증가시킨다. 이때 비정상적으로 과도하게 생성된 A β 가 뇌에 응집·축적되어 신경독성 및 신경세포 사멸을 일으킨다. APP와 관련된 secretase는 AD와 그 병리를 이해하는데 중요한 인자이며 특히, A β 의 생산을 줄이기 위해 β -secretase 또는 γ -secretase를 타겟으로 하는 것이 중요하다 (Jiang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017).

다른 요인 중 하나인 tau 단백질의 과인산화와 아세틸콜린 에스테라제 (Acetylcholinesterase; AChE) 활성의 비정상적인 증가는 신경세포의 손실, 기억력의 감퇴로 인한 지적능력을 상실시킨다.

AD의 발병 원인이 다양하고 복잡함에 따라, 최근 AD예방 및 치료제 개발을 위해, multi-target 조절을 통한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Talesa, 2001; Kim, 2018; Kim *et al.*, 2020). 최근 A β 를 타겟으로 하는 AD의 항체치료제인 아두카누맙 (aducanumab)이 FDA의 승인을 받음으로써 A β 가설을 뒷받침하는 약물로서 인정을 받게 되었다 (Sevigny *et al.*, 2016).

아세틸콜린 (acetylcholine; ACh)은 AChE의 기질로서 cholineacetyl transferase에 의해 choline과 acetyl-CoA로부터 특정 뉴런에서 합성되며, 신경전달물질로서 뇌의 기능과 기억력에 중요한 역할을 한다 (Kása *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 2009).

정상인에서는 신호전달 물질로 아세틸콜린을 사용하여 신경 말단에서 시냅스로 신경 자극을 전달하지만, 치매 환자의 경우 ACh을 분해하는 효소인 AChE의 농도가 높아 ACh을 아세트산과 콜린으로 가수분해함으로써 신경 자극이 전달되지 못하여 치매와 같은 인지능력 장애를 일으키게 된다 (Wurtman *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 2013). 현재 임상에서는 도네페질 (donepezil), 갈란타민 (galantamine) 및 리바스티그민 (rivastigmine) 등 AChE 억제제가 사용되고 있다. 그러나 이들 AChE 억제제는 여러 부작용을 수반하며 효과적인 치료 효과를 기대하기는 어려운 실정이다 (Thompson *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010).

본 연구진은 A β 분비를 감소시키며 동시에 AChE 억제 활성을 나타내는 약물을 선별하기 위해 국내 약용작물을 대상으로 스크리닝을 수행하였다. 그 결과 박태기나무 씨 에탄올 추출물 (이하 *Cercis chinensis* Bunge seed; CCS로 약칭)에서 APPswe 과발현 세포주를 검색계로 하여 A β 생성에 미치는

영향을 확인할 수 있었다.

한편, 박태기나무 (*Cercis chinensis* Bunge)는 콩과 (Leguminosae)의 낙엽관목으로 밥알 모양 또는 구슬과 비슷한 꽃 모양 때문에 밥티나무 또는 구슬꽃나무라고 불린다. 중국이 원산지이며 국내 전국각지에서 관상용, 정원수로 흔하게 볼 수 있는 꽃나무이다. 한방에서는 뿌리와 껍질을 자형피 (紫荊皮)라고 하며 중풍, 고혈압, 부인병, 대하증 등에 효과가 있다고 알려져 있으며 (Li *et al.*, 2005) 종자는 식품공전에 식용할 수 있는 원료로 고지되어 있다 (MFDS, 2021).

박태기나무의 성분은 지상부에서 friedelin, kaempferol, myricitrin, quercetin, rutin 등과 같은 flavonoid가 보고되어 있으며, 산화스트레스 억제 활성, 혈액순환 촉진 효과, 해독작용 등이 보고 되어있다 (Hwang *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2020).

본 연구에서는 AD의 치료제 및 건강기능식품의 후보 소재를 발굴하기 위하여 국내에서 자생하며 식용이 가능한 식물 소재를 스크리닝 하는 과정에 A β 분비 및 AChE 억제 활성에 대한 CCS의 효능을 확인하였다. 이에 박태기나무 씨가 AD의 치료제 및 기억력 개선 건강기능식품의 후보 소재로 사용될 수 있을 것으로 사료되어 이에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포주

APP Swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주인 Neuro2a (APP^{swe})는 5% fetal bovine serum (FBS, Capricorn scientific, Ebsdorfergrund, Germany), penicillin streptomycin (P/S, Lonza, Walkersville, MD, USA), L-glutamine (GE healthcare Hycolone, Logan, UT, USA), hygromycin B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Walkersville, MD, USA) and Opti-MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA)의 혼합 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 사용하였다.

2. 실험 재료 및 시약

박태기나무 (*Cercis chinensis* Bunge) 씨앗은 (주)다농 (Namyangju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 시료는 증류수로 세척 하여 건조한 뒤 분쇄하였다. 분쇄한 시료 (400 g)의 10 배 (v/w)에 해당하는 50% ethanol을 이용하여 50°C에서 2 회 진탕 추출하였다. 추출액은 5 μ m 필터로 여과한 후 감압 농축 (rotary evaporator: R100+B100, Lab scitech, Corona, CA, USA) 하고 7 일간 동결 건조하여 추출물 약 31.9 g (수율: 8.0%)을 얻었다. 일정량의 dimethyl sulfoxide (DMSO,

Biolife solution Inc, Bothel, WA, USA)에 추출물을 용해하여 실험에 사용하였다.

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 (Immuno-Biological 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 (Sam *et al.*, 2020) human amyloid β (1-40), human amyloid β (1-42), human APP β -CTF ELISA kit (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan), cell viability EZ-cytox assay kit (CCK-8), acetylcholinesterase activity colormetric assay kit (Dogen bio Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였으며, 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

3. β -amyloid ($A\beta$)의 분비 억제 효과 검증

APP_{swe} 세포주로부터 분비되는 $A\beta$ 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA를 수행하였다. 6 well plate (SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 세포 농도가 1×10^6 cells/well이 되게 배양한 뒤 serum-free DMEM으로 희석한 CCS를 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 16 시간동안 처리한 후 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였으며 양성대조군으로 β -secretase inhibitor IV 10 μM 를 사용하였다.

$A\beta$ (35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 $A\beta$ (38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating된 plate에 100 μl 의 시료를 넣고 4°C에서 16 시간 동안 반응시키고 7 회 세척한 후, horseradish peroxidase (HRP) conjugation된 $A\beta$ (11-28) 특이적 monoclonal antibody를 4°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 9 회 세척한 후 tetramethyl benzidine (TMB) 기질액을 넣고 실온에서 30 분 동안 반응시킨 후 정지액 100 μl 를 첨가하여 450 nm에서 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4. 세포독성 분석

EZ-cytox kit를 사용하여 CCS의 APP_{swe} 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다. 96 well plate (SPL life science Inc., Pocheon, Korea)에 5×10^3 cells/well이 되게 배양한 뒤 CCS을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 16 시간 처리하였다. Water-soluble tetrazolium 용액 10 μl 를 첨가하여 1 시간 배

양한 후, 450 nm에서 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 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 CCS 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor IV 10 μM 을 16 시간 처리하였다. Protease inhibitor가 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.

Bicinchonic acid (BCA) protein assay reagent (Thermo Fisher Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 정량한 뒤, 단백질 50 μg 을 7%, 10% tris-glycine 또는 16.5% tris-tricine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, sAPP α , APP carboxy terminal fragment (CTF) 등의 단백질 양상을 Azure C-600 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA)을 이용하여 측정하였다 (Smith *et al.*, 1985).

3 회 반복 실험으로 얻어진 단백질 밴드를 Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)에 의해 정량하였으며 actin 밴드를 기준으로 보정하였다 (Leem *et al.*, 2002).

6. β -carboxy-terminal fragment (β -CTF) 정량

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 CCS를 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, β -secretase inhibitor IV 10 μM 을 양성대조군으로 16 시간 동안 처리하였다.

Protease inhibitor가 포함된 Tris-NaCl-EDTA (TNE) buffer [50 mM Tris-HCL (pH 7.5), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA], 0.5% NP-40를 넣은 후 1 분간 강하게 vortexing 하였으며 4 °C에서 10,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 뒤 상층액을 사용하였다. 상층액은 BCA protein assay reagent를 이용하여 정량한 뒤 human APP β -CTF ELISA kit를 사용하여 그 양을 정량하였다.

7. Acetylcholinesterase (AChE) 억제 활성 분석

AChE는 신경 반응과 기능에 관련하여 중요한 효소 중 하나로서 신경 전달 물질인 acetylcholine을 가수분해하는 serine protease이다. CCS의 AChE 억제 활성을 측정하기 위해 acetylcholinesterase activity colorimetric assay kit (Dogen bio Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

96 well plate에 DMSO 또는 CCS를 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하고, AChE (*Electrophorus electricus*)를 각각 30 μl 와 10 μl 씩 넣은 후 reaction mixture (1 assay 기준, AChE assay buffer; 45 μl , AChE enzyme mix; 2 μl , AChE probe; 2 μl , AChE substrate; 1 μl)를 50 μl 씩 넣고 차광하여 실온에서 20 분 반응 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조 약물로 galantamine 10 μM 을 사용하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 AChE의 활성 100%로 하여, 각 시료에 대한 억제 활성을 백분율로 3 회 반복하여 분석한 후 통계 처리하였다 (Kim *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2021).

8. 통계처리

모든 생리활성 실험은 3 회 반복 실험을 통해 mean \pm standard error 값으로 나타내었다. 통계분석은 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 유의 수준으로 검정하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

결과 및 고찰

1. APP_{swe} 세포주에 대한 박태기나무 씨 50% 에탄올 추출물의 세포독성

CCS의 활성을 평가하기 전 APP_{swe} 세포주에서 추출물이 갖는 세포독성을 확인하였다 (Fig. 1). 그 결과 CCS 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 16.9, 32.1%의 세포독성을 나타내었다.

식용 가능한 소재로 인정받기 위해서는 식품의약품안전처에 해당 원료가 인체에 위해가 없음을 확인할 수 있는 과학적 자료를 제출하여야 한다 (MFDS, 2016). 한편, CCS는 이미 식용 가능한 소재로 고시되어있다. APP_{swe} 세포주에서 농도가 증가함에 따라 세포독성이 있었으나 CCS를 천연물 의약품이나 건강기능식품 소재로 사용하는 데 있어, 제한이 되지 않을 것이라 사료된다. 더불어 CCS는 뒤에 언급되는 효능검정 단계에서 독성이 거의 보이지 않는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 유의적인 효능을 확인할 수 있었다. 또한, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 세포독성을 고려하여도 더 강한 활성을 나타내었다.

2. 박태기나무 씨 50% 에탄올 추출물의 β -amyloid ($A\beta$) 분비억제 활성

$A\beta$ 의 증가는 AD의 중요한 병리 현상 중 하나이다. APP 단백질의 대사에 관여하는 효소는 α -secretase, β -secretase, γ -secretase가 있으며 α -secretase와 β -secretase는 서로 경쟁적으로 작용한다. $A\beta$ 는 β -secretase 및 γ -secretase에 의해 생성되며, $A\beta$ 의 생성을 감소시키기 위해 β -secretase 또는 γ -

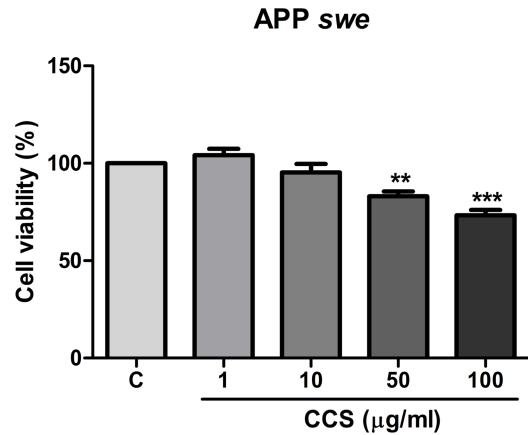


Fig. 1. Effects of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed on the APP_{swe} cell viability. APP_{swe} cells were cultured at confluency in a 96-well plate with various concentrations (1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed (CCS) for 16 h. 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 means \pm SE of three independent experiments. [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 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)].

secretase를 표적으로 하는 것이 바람직하다.

정상인의 경우 $A\beta$ 는 정상적으로 분해되거나 central nervous system (CNS) 밖으로 배설되어 체내 항상성을 유지하나, AD 환자의 뇌 조직 내 $A\beta$ 농도는 정상보다 100 배 또는 1,000 배 높아져 있다. 이는 생성이 비정상적으로 증가하거나, 배출 기능이 저하되어 있음을 시사하는 것이다 (Han, 2009). $A\beta$ 중에는 $A\beta_{1-40}$ 과 $A\beta_{1-42}$ 가 대부분이며 특히, $A\beta_{1-42}$ 의 경우 $A\beta_{1-40}$ 에 비해 뇌에 축적되기 쉽고 더 많은 독성을 나타낸다고 보고되어 있다 (Eum *et al.*, 2008; Cuppus *et al.*, 2012).

본 연구에서는 α -secretase, β -secretase, γ -secretase를 표적으로 하여 APP 대사 및 $A\beta$ 억제 활성에 대한 CCS의 효과를 확인하고자 하였다.

첫 번째로 $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ELISA를 수행하여 APP_{swe} 세포에서 $A\beta$ 분비에 대한 CCS의 효과를 확인하였다. 그 결과, CCS는 10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 분비를 감소시켰으며 특히, $A\beta_{1-42}$ 를 농도 의존적으로 감소시켰다. 양성대조군으로 사용한 B-SI (β -secretase inhibitor)와 CCS 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 $A\beta_{1-42}$ 억제 활성을 비교하였을 때 더 강한 활성을 나타내었다. 10 μM 양성대조군을 농도로 환산하면 5.97 $\mu\text{g/ml}$ 에 해당한다. 단일 성분인 양성대조군에 비하여 천연물인 CCS의 경우 더 높은 농도에서 동등한 활성을 나타내지만, 천연물의 경우 여러 성분의 상호작용으로 활성을 나타내며 천연물에

서 추출한 물질의 경우 화학 의약품보다 안전성과 유효성이 우수한 것이 입증되었다 (Kim, 2006).

50% 억제율을 나타내는 IC₅₀값은 Aβ₁₋₄₀에서 45.02 μg/ml, Aβ₁₋₄₂에서 43.48 μg/ml 을 나타내었으며, 이는 앞에서 기술한 세포독성을 고려하더라도 현저한 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

3. 박태기나무 씨 50% 에탄올 추출물이 amyloid precursor protein (APP) 대사에 미치는 영향

APP의 대사과정에서 아밀로이드 생성경로로서 β-secretase가 작용하면 APP는 sAPPβ와 β-CTF로 분해된다. β-CTF는 γ-secretase의 작용으로 Aβ와 ACID (P6)로 분해된다. 반면 비 아밀로이드 생성경로에서 α-secretase가 작용하면 sAPPα와 α-CTF로 분해되며, α-CTF는 γ-secretase의 작용으로 P3와 ACID (P6)로 분해된다 (Soriano *et al.*, 2001; Epis *et al.*, 2012). Fig. 2의 결과를 바탕으로 CCS가 Aβ의 분비를 억제하는 데 있어 어떠한 경로로 작용하는지 확인하기 위해 β-CTF를 ELISA 방법으로 정량하였다. 그 결과 CCS는 농도 의존적으로 β-CTF 대사량을 증가시켰다 (Fig. 3).

한편, CCS가 APP 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 APP, sAPPα, CTF 단백질 발현 수준을 western blot으로 확인하였다. CCS의 농도가 증가함에 따라 APP 단백질 발현이

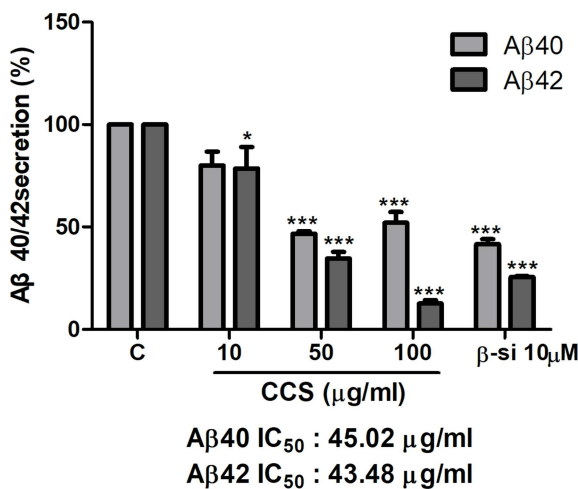


Fig. 2. Effects of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed on the secretion of β-amyloid. APPswe cells were treated with DMSO (control) or various concentrations (10, 50, 100 μg/ml) of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed (CCS) for 16 h. The supernatant was used for Aβ_{40/42} ELISA. Data are means ± SE of three independent experiments. (**p* < 0.05, ***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).

감소하는 경향을 보였으나, sAPPα 분비량은 증가시켰다 (Fig. 4A and B). 또한, tris-tricine gel로 CTF 발현 양상을 확인하였을 때, CCS는 α-CTF와 β-CTF를 모두 증가시키는 경향을 나타내었으며 양성대조군으로 사용한 γ-SI (γ-secretase inhibitor)와 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 4C). β-CTF가 감소하지 않고 증가하는 것은 CCS가 β-secretase를 억제하지 않는다는 것을 알 수 있다.

CCS가 β-secretase와 경쟁적으로 작용하는 α-secretase를 표적으로 하여 효소 활성의 증가로 Aβ의 생성을 줄인다면 β-CTF는 감소하고 sAPPα와 α-CTF만 증가하는 경향을 나타내야 하지만, CCS는 α-CTF와 β-CTF를 모두 증가시켰다. 위의 결과를 종합하면, CCS가 γ-secretase를 억제하여 Aβ를 감소시키는 것으로 제안한다. 이러한 결과는 Fig. 3에서 얻어진 β-

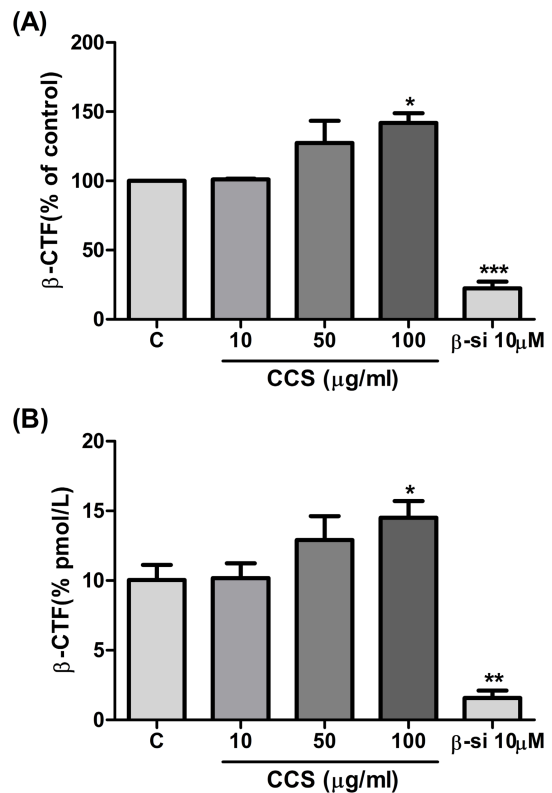


Fig. 3. Effects of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed on the β-carboxy-terminal fragment (β-CTF). APPswe cells were treated with DMSO (control) or 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed (CCS) for 16 h. The cells were lysed using TNF buffer, and the lysate was analyzed using ELISA. (A) β-CTF level after CCS treatment. (B) The concentration of β-CTF after CCS treatment. Data are means ± SE of three independent experiments. (**p* < 0.05, ***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).

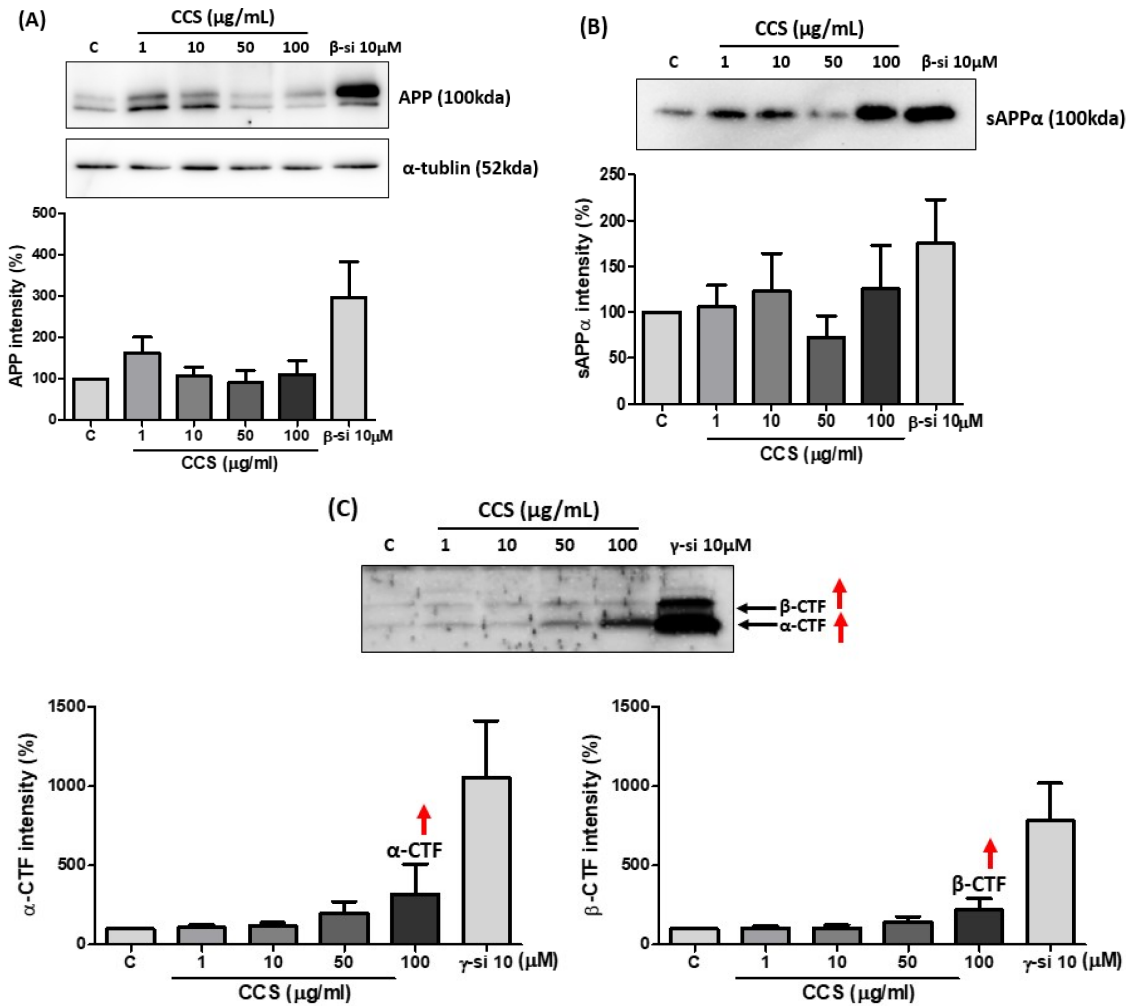


Fig. 4. Effects of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed on the metabolism of amyloid precursor protein. APPswe cells were treated with DMSO (control) or 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed (CCS) for 16 h and lysed with a cell lysis buffer. The cell lysate or condition media was loaded on 7% SDS-PAGE and 16.5% Tris-tricine gel analyzed by immunoblotting. (A) mouse anti-sAPP α (2B3) monoclonal antibody (1 : 400) (B) rabbit anti-APP polyclonal antibody (1 : 10,000) (C) rabbit APP369 polyclonal antibody (1 : 1,000). Protein levels were quantified by the relative expression to actin using ImageJ 1.37 software. Data are means \pm SE of three independent experiments.

CTF의 ELISA 정량 결과와 일치한다 (Chasseigneaux and Allinquant, 2012). 추후 각 secretase의 효소 활성을 측정하는 실험을 통해 CCS가 각 효소의 활성에 미치는 영향을 확인할 필요가 있다.

4. 박태기나무 씨 50% 에탄올 추출물의 acetylcholinesterase 억제 활성

AChE 억제제는 donepezil, galantamine, rivastigmine 등이 임상에서 AD 치료제로 사용되고 있으며 그 중, galantamine은 수선화과 구근과 꽃에서 분리된 알칼로이드이며 그 외에도 다양한 식물의 플라보노이드가 AChE의 활성을 억제하는 것으로 보고 되어있다 (Park, 2018).

본 연구에서 CCS의 AChE 억제 활성을 확인하기 위해 다양한 농도 (1, 10, 50 및 100 μ g/ml)에서 AChE 억제 활성을 평가하였다.

그 결과 CCS는 강한 AChE 억제 활성을 보였으며 양성 대조군으로 사용한 galantamine 10 μ M의 활성과 비교하였을 때 CCS의 농도 10 μ g/ml을 처리한 경우와 비슷한 수준의 억제 활성을 나타내었다. CCS의 IC₅₀값은 8.37 μ g/ml이었으며 양성대조군인 galantamine의 경우 IC₅₀값은 5.53 μ M (1.6 μ g/ml)이었다 (Fig. 5).

CCS는 추출물 수준에서 비교적 강한 AChE 억제 활성을 나타내었고 천연소재의 추출물에는 수많은 화학물질이 존재하고 이러한 물질의 상호작용 등을 통해서 활성을 나타낸다는

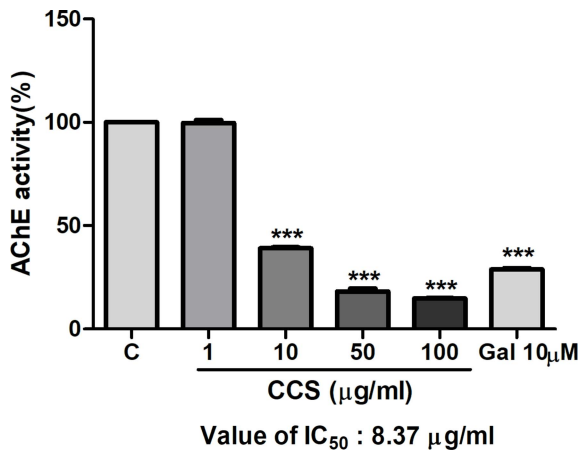


Fig. 5. Effects of 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed on acetylcholinesterase activity. 50% ethanol extract of *Cercis chinensis* Bunge seed (CCS) was prepared at final concentrations of 1, 10, 50, and 100 µg/ml with the acetylcholinesterase (AChE) assay buffer. Galantamine was used as a positive control. Data are means ± 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].

것을 고려할 때 (KFDA, 2008), 천연소재에 존재하는 특이적 활성을 나타내는 단일 성분을 동정하면 galantamine과 같은 천연물 의약품을 개발하는 것이 가능할 것이다.

본 연구결과, 박태기나무 (*Cercis chinensis* Bunge) 씨 추출물은 비교적 저농도에서 강한 AChE 억제 활성을 나타내었기 때문에 AChE를 억제할 수 있는 특이적 성분이 포함되어 있을 것으로 예측되며 유효성분을 동정하고 항염증, 항산화 메커니즘, *in vivo* 상태에서의 기억력 개선 효능 등을 검증함으로써 알츠하이머 질환의 치료제 및 건강기능 식품의 후보 소재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

천연물에서 AChE 저해제를 치료제로 개발하는 데 있어 특이적 유효성분을 동정한다면, 기존의 단일 성분의 AChE 저해제처럼 개발하는 것이 가능할 것이며, 추출물이나 분획물로서 천연물 의약품으로 개발할 수 있다. 더불어 건강기능식품 식용 소재로서 박태기 씨 기름을 식품첨가물이나, 식단에 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 우석대학교 및 2021년 이공분야 기초 연구사업(과제번호: 2021R1A6A3A01086388)의 지원에 의한 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Chasseigneaux S and Allinquant B. (2012). Functions of Aβ, sAPPα and sAPPβ: Similarities and differences. *Journal of Neurochemistry*. 120:99-108.

Cuppuss AMW, Schuur M, Vergeer J, Janssens ACJW, Oostra BA, Verbeek MM and van Duijn CM. (2012). Plasma β amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Neurobiology of Aging*. 33:1988-1994

Epis R, Marcello E, Gardoni F and Luca MD. (2012). Alpha, beta-and gamma-secretase in Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience*. 4:1126-1150.

Eum HS, Kang EB, Lim YH, Lee JR, Cho IH, Kim YS, Chae KR, Hwang DY, Kwak YS, Oh YS and Cho JY. (2008). The effect of exercise training on A-42, BDNF, GLUT-1 and HSP-70 protein in a NSE/APPsw-transgenic model for Alzheimer's disease. *Journal of Life Science*. 18:796-803.

Han SH. (2009). Novel pharmacotherapies for Alzheimer's disease. *Journal of the Korean Medical Association*. 52:1059-1068.

Hong Y, Liao XY and Chen ZL. (2020). Determination of bioactive components in the fruits of *Cercis chinensis* Bunge by HPLC-MS/MS and quality evaluation by principal components and hierarchical cluster analyses. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.07.010> (cited by 2021 June 23).

Hwang WK, Park HS, Ham IH, Oh MH, Hong NK, Kim HK, Hwang DW, Hur SY, Kim TE, Park YG, Kim JR and Kim JW. (2005). Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress. *Experiment and Molecular Medicine*. 37: 343-352.

Jiang S, Li Y, Zhang X, Bu G, Xu H and Zhang YW. (2014). Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 9:6. <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1326-9-6> (cited by 2021 June 23).

Kása P, Rakonczay Z and Gulya K. (1997). The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 52: 511-535.

Korea Food & Drug Administration(KFDA). Function ingredient standardization guide for health functional food developers (focused on examples). https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=987&srchFr-&srchTo=&srchWord=srchTp&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=82 (cited by 2021 June 23).

Kim JH, He MT, Kim MJ, Park CH, Lee JY, Shin YS and Cho EJ. (2020). Protective effects of combination of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Taraxacum coreanum* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 28:85-94.

Kim SM, Mun BR, Lee SJ, Joh YC, Lee HY, Ji KY, Choi HR, Lee EH, Kim EM, Jang JH, Song HW, Mook Jung IH, Choi WS and Kang HS. (2017). TREM2 Promotes Aβ phagocytosis by upregulating C/EBPα-dependent CD36 expression in microglia. *Scientific Reports*. 7:11118. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11634-x> (cited by 2021 June 23).

- Kim SY.** (2018). Past and future of drug treatments for Alzheimer's disease. *Journal of Korean Neuropsychiatric Association*. 57:30-42.
- Kim YJ.** (2006). Interesting 'natural new drug'. The science and technology. 11:65-67. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200658763876420.page> (cited by 2021 June 23).
- Kim YO, Lee SW, Yang SO, Na SW, Kim SK and Chung JH.** (2014). Neuroprotective effects of the extracts from the Aerial Parts of *Carthamus tinctorius* L. on transient cerebral global ischemia in rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:46-52.
- Lee EN, Song JH and Lee JS.** (2010). Screening of a potent antimentia acetylcholinesterase inhibitor-containing fruits and optimal extraction conditions. *Korean Journal of Food and Nutrition*. 23:318-323.
- Lee SE, Ye MS, Jung JH, Park SB, Lee JH, Kim HD, Jang GY, Seo KH, Kim DH and Shim IS.** (2021). Leaf extract of *Sedum kamtschaticum* Fisch. & Mey. ameliorates cognitive dysfunction in trimethyltin-treated rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 29:1-10.
- Leem JY, Saura CA, Pietrzik C, Christianson J, Whnamaker C, King LT, Veselits ML, Tomita T, Gasparini L, Iwatsubo T, Xu H, Green WN, Koo EH and Thinakaran G.** (2002). A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiology of Disease*. 11:64-82.
- Li Y, Zhang D and Yu S.** (2005). A new stilbene from *Cercis chinensis* Bunge. *Journal of Integrative Plant Biology*. 47:1021-1024.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2016). New food ingredient safety evaluation guidelines. https://mfds.go.kr/brd/m_74/view.do?seq=34701&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=73 (cited by 2021 June 23).
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2021). List of raw materials that can be used in food. <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/foodMaterial/foodMaterialDB.do> (cited by 2021 June 23).
- Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP and Cavallaro V.** (2013). Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*. 11:388-413.
- Niu K, Kuk M, Jung H, Chan KG and Kim SK.** (2017). Leaf extracts of selected gardening trees can attenuate quorum sensing and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Indian Journal of Microbiology*. 57:329-338.
- Seo DS, Jang JH, Kim NM and Lee JS.** (2009). Optimal extraction condition and characterization of antimentia acetylcholinesterase inhibitor from Job's tears(*Coix lachrymajobi* L.). *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:434-438.
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, HangY, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM and Sandrock A.** (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 537:50-56.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150:76-85.
- Soriano S, Lu DC, Chandra S, Pietrzik CU and Koo EH.** (2001). The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein(APP) is independent of its cleavage by caspases. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:29045-29050.
- Talesa VN.** (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 122:1961-1969.
- Thompson S, Lancôt KL and Herrmann N.** (2004). The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opinion Drug Safety*. 3:425-440.
- Ward MC, Milligan C, Rose E, Elliott M and Wainwright R.** (2020). The benefits of community-based participatory arts activities for people living with dementia: A thematic scoping review. *Arts and Health*. 32552336. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32552336/> (cited by 2021 June 23).
- Wurtman RJ, Blusztajn JK, Ulus IH, Coviella IL, Buyukutsal RL, Growdon JH and Slack BE.** (1990). Choline metabolism in cholinergic neurons: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Advances in Neurobiology*. 51:117-125.