大韓本草學會誌 제30권 제1호(2015년 1월)
Kor. J. Herbology 2015 ; 30(1) : 67-75

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2015.30.1.67.

베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸과 기억력 손상에 대한 밀기울추출물의 보호효과

이찬[1#], 박규환[2], 이종원[3], 장정희[1*]

1 : 계명대학교 의과대학 약리학교실, 2 : 경북대학교 약학대학 약학연구소,
3 : 대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실

Protective Effect of Wheat Bran Extract against β-Amyloid-induced Cell Death and Memory Impairment

Chan Lee[1#], Gyu-Hwan Park[2], Jong-Won Lee[3], Jung-Hee Jang[1*]

1 : Department of Pharmacology, School of Medicine, Keimyung University,
2 : Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyungpook National University,
3 : Department of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Daegu

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to examine the neuroprotective effect of wheat bran extract (WBE) against β-amyloid (Aβ)-induced apoptotic cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and memory impairment in triple transgenic animal model's of Alzheimer's disease (3xTg AD mice).

Methods : In SH-SY5Y cells, MTT assay and TUNEL staining were conducted to evaluate the protective effect of WBE against $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity and apoptosis. Alterations in mitochondrial transmembrane potential (MMP), expression of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2 proteins, cleavage of PARP, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels were analyzed to elucidate the neuroprotective mechanism of WBE. To further investigate the memory enhancing effect of WBE, Morris water maze test was performed in 3xTg AD mice.

Results : In SH-SY5Y cells, WBE protected against $A\beta_{25-35}$-caused cytotoxicity and apoptosis as shown by the restoration of cell viability in MTT assay and inhibition of DNA fragmentation in TUNEL staining. $A\beta_{25-35}$-induced apoptotic signals such as dissipation of MMP, decreased Bcl-2/Bax ratio, and cleavage of PARP were suppressed by WBE. Moreover, WBE up-regulated the protein levels of BDNF, which seemed to be mediated by activation of cAMP response element-binding protein (CREB). In 3xTg AD mice, oral administration of WBE attenuated learning and memory deficit as verified by reduced mean escape latency in water maze test.

Conclusions : WBE protects neuronal cells from $A\beta_{25-35}$-induced apoptotic cell death and restores learning and memory impairments in 3xTg AD mice. These findings suggest that WBE exhibit neuroprotective potential for the management of AD.

Key words : Alzheimer's Disease, β-amyloid, apoptosis, brain-derived neurotrophic factor, learning and memory, SH-SY5Y cells, 3xTg AD mice, wheat bran extract

서 론

치매(dementia)란 기억력, 주의력, 지각력, 언어능력, 시공

*Corresponding author : Jung-Hee Jang. Department of Pharmacology, School of Medicine, Keimyung University
· Tel : +82-53-580-3866 · FAX : +82-53-580-3866 · E-mail : pamy202@kmu.ac.kr
#First author : Chan Lee. Department of Pharmacology, School of Medicine, Keimyung University
· Tel : +82-53-580-3859 · FAX : +82-53-580-3866 · E-mail : chanlee777@naver.com
· Received : 31 December 2014 · Revised : 30 January 2015 · Accepted : 30 January 2015

간 판단력, 수행능력과 같은 인지기능이 저하되어 일상생활 및 사회생활에 장애가 있는 상태로 기질적인 뇌의 구조적 손상 및 신경전달물질의 결핍으로 발생하는 증후군을 지칭한다. 특히, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 노년층에서 가장 흔한 치매의 형태로 대뇌피질의 점진적인 손상으로 인해 기억력 장애가 발생하며, 지남력 장애, 주의력 결핍, 언어장애, 실행증, 실인증, 실행능력 장애, 정신병 증상, 기분변화, 우울, 배외, 불안, 초조, 공격성, 인격변화, 수면장애 등의 인지, 기능, 행동, 심리 변화로 결국 모든 일상생활 수행능력을 상실하게 된다[1].

최근 우리나라는 고령화 사회에 진입함에 따라 이러한 치매 환자의 수가 급증하고 있으며, 치매 유병율은 2008년에 40만 명을 넘어 2020년에는 77만명, 2050년에는 약 213만 명에 이를 것으로 추정되며 심각한 사회경제적 문제로 대두되고 있다[2]. 전 세계적으로 65세 이상 노인인구에서 알츠하이머병 유병률은 약 5~10% 정도이며, 65세 부터 나이가 5세 증가함에 따라 유병률은 약 2배씩 높아져 85세 이상의 노인 인구에서는 40~50%에 다다른다.

알츠하이머병의 경우 신경세포 손상 및 사멸로 인해 뇌조직 부피 감소 및 뇌활동 대사 감소 등의 특징을 보이는데, 이러한 원인으로는 신경병리학적으로 노인반(senile plaque)과 신경섬유매듭(neurofibrillary tangle)의 침착을 비롯하여 다양한 유전적 및 환경적 요소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 발병기전으로는 아밀로이드 전구단백(amyloid precursor protein, APP)의 비정상적인 분해 경로로 인해 과생성된 베타아밀로이드(β-amyloid, Aβ)가 신경세포 외부에 불용성 물질로 침착하게 된다는 아밀로이드증폭가설(amyloid cascade hypothesis)과 정상적으로 미세관을 안정화시키는 기능을 하는 타우단백(tau protein)이 과인산화되어 신경섬유매듭을 만든다는 타우가설(tau hypothesis)이 대표적이다[3]. 그 밖에도 미세아교세포(microglia), 별아교세포(astrocyte) 등 교세포 활성화에 따른 염증반응에 의해 신경세포가 사멸한다는 신경염증가설(neuroinflammation hypothesis)[4], 혈관관련 위험인자들에 의해 신경세포 퇴행이 유발된다는 혈관가설(vascular hypothesis)[5], 신경전달물질 아세틸콜린(acetylcholine, ACh) 양 및 콜린성 신경세포의 수 감소, 무스카린성 및 니코틴성 아세틸콜린 수용체 기능 저하에 의해 기억력 손상이 유발된다는 콜린성 가설(cholinergic hypothesis) 등이 있다[6].

지금까지 치매 치료제로는 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, ACh) 기능을 강화시키기 위하여 아세틸콜린분해효소(acetylcholinesterase, AChE)를 억제시켜 아세틸콜린 양을 증가시키는 AChE 억제제(AChE inhibitor, AChEI)가 대표적으로 사용되어져 왔다. 미국 FDA 승인을 받아 치료제로 사용중인 약물 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galantamine)이 모두 AChEI로 경증 및 중등도의 알츠하이머병에서 효과를 인정받고 있다[3,7]. 그러나, AChEI는 환자들의 증상을 일시적으로 호전시키고 병의 경과를 완화시키지만 병의 진행을 근원적으로 막지는 못하며, 말초신경계에도 작용함으로써 아세틸콜린 증가에 따른 위장장애(구역, 구토, 설사)를 비롯한 다양한 부작용이 따르는 단점이 있어, 최근에는 상대적으로 부작용이 적으며 오랜 임상적 경험이 입증 된 천연 소재로 부터 질환 조절 및 경과 변형 치료제들(disease modifying treatments)을 개발하고자 하는 연구가 주목을 받고 있다.

본 연구에 사용한 소재인 밀은 동의보감에 따르면 성질은 차고 맛이 달며 번열과 조갈을 없애고 소변을 잘 나가게 한다고 기록되어 있으며, 밀기울은 위장의 기능을 돕고 열독으로 인한 종창, 뜨거운 물 또는 불에 덴 화상으로 인한 상처를 낫게 하고 타박상과 골절로 인해 어혈이 생긴 것을 치료한다고 설명되고 있다[8]. 다양한 선행연구에서 밀싹(wheat grass) 주스는 궤양성 대장염과 직장출혈을 억제하며[9], 밀싹 추출물은 항암, 자가면역 억제[10], 항돌연변이[11] 효과가 있는 것으로 보고되었다. 하지만, 뇌 및 신경세포에 있어 밀의 약리효능 및 작용기전을 검토한 결과는 거의 보고된 바가 없었다. 본 연구자는 다년간의 단계별 연구를 거쳐 실험실 규모에서 분쇄통밀을 열수추출한 후 원심분리에 의해 얻어진 상등액을 건조한 분말(TALE)이 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성과 사멸, 기억력 손상을 억제함을 밝혔으며[12], 다른 연구진과의 공동연구에서도 TALE이 양총경동맥폐색(bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)에 의한 혈관성치매에 대해 보호효과를 가짐을 밝히고, 활성성분의 하나로 세포벽을 이루는 다당류의 하나인 아라비노자일란(arabinoxylan, AX)이 작용함을 확인하였다[13]. 오탄당인 자일로스(xylose)가 선형으로 연결된 근간 (backbone)에 또 다른 오탄당인 아라비노스(arabinose)가 곁사슬(side chain)로 연결되어 생성된 AX가 활성성분인 것은 스코폴라민을 이용한 건망증 모델에 대해서도 기억력 개선 효능을 나타내는 것으로 확인하였다[14]. 인지기능개선에 효능을 나타내는 TALE에 대해 인체적용시험을 실시하기 위해 대량생산을 시도하였지만, 호화된 전분을 제거하여 AX의 함량을 높이기 위해 필요한 연속원심분리 과정에서 호화된 전분을 제거하는 것이 어려웠다[15]. 이러한 문제점을 극복하기 위해 통밀보다 가격이 저렴하면서도 전분을 적게 포함하는 밀기울을 사용하였으며, 데칸터 원심분리기를 사용하여 전분을 호화시키기 전에 입자형태로 미리 제거하였다[15]. 이렇게 함으로써 최종산물인 밀기울추출물(wheat bran extract, WBE)을 약10%의 수율로 얻을 수 있었다. 또한, 선행연구를 통하여 WBE는 양총경동맥폐색에 의한 혈관성치매 모델에서 별아교세포와 미세아교세포의 활성을 억제하여 뇌백질(white matter) 손상에 대해 보호 효과를 가짐을 밝혔다[15].

따라서 본 연구의 목적은 상기 과정을 통해 생산된 WBE의 알츠하이머 치매에 대한 효능과 기전을 밝히고자 하는 것이며, 이를 위하여 SH-SY5Y neuroblastoma 세포 배양 모델에서 베타아밀로이드로 신경세포 독성과 사멸을 유도한 후 보호효과를 관찰하였고, 치매 형질전환 동물 모델을 이용하여 기억력 개선 효능을 검토하였으며, 신경영양인자 활성화 경로를 중심으로 작용 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

베타아밀로이드(β-Amyloid)는 American peptide ($Aβ_{25-35}$, sunnyvale, CA, USA) 제품을 사용하였다. 세포배양 배지로 사용된 Dulbecco's modified Eagel's medium (DMEM),

fetal bovine serum (FBS) 및 항생제(penicillin/streptomycin)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)사에서 구입하였다. Bax 및 Bcl-2, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cAMP response element-binding protein (CREB) 일차항체는 Santa cruz (Santa cruz, CA, USA)사에서, cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)과 phospho-CREB (p-CREB) 일차항체는 Cell Signaling (Boston, MA, USA)사에서 공급받았다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], actin 일차 항체 및 일반 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 밀기울추출물의 제조

밀기울추출물(wheat bran extract, WBE)는 혈관성 치매 모델에서 이미 기술한 바와 같이 제조되었다[15]. 우선, 구매한 밀기울을 체로 걸러 주로 전분으로 이루어진 작은 입자들을 미리 제거하였다. 이렇게 얻은 밀기울로부터 밀기울에 붙은 전분입자를 제거하기 위해 500 L 추출기(extractor, BestKorea, Daejon, Korea)에 넣고 5배의 냉수(w/w)를 가하여 저어준 다음 체로 거른 뒤 5배 이상의 냉수로 다시 세척하였다. 이로부터 전분질을 포함하는 냉수 여과액과 잔류된 밀기울을 포함하는 고형분(잔류밀기울)을 얻었다. 이 냉수 여과액을 데칸터 원심분리기(decanter, PTM300, Tomoe Engineering Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 원심분리하여 전분입자들이 제거된 상층액을 얻었으며, 이 상층액과 잔류밀기울을 혼합하여 95℃에서 1시간 동안 교반하여 열수 추출액을 얻었다. 이를 다시 체로 거른 다음 진공 건조기(vacuum dryer, HyoSung, Incheon, Korea)로 농축하고 분무건조기(spray dryer, YoonJin Tech, Pyeongtaek, Korea)로 건조하여 얻은 밀기울추출물(wheat bran extract, WBE)을 실험에 사용하였다. WBE의 수율은 약 10%였으며, 이 WBE에 포함된 AX의 양을 측정하기 위해 이를 반영할 수 있는 단당류인 아라비노스의 함량을 측정한 결과 2.4-2.5%를 차지하였다[15]. 본 실험에서 사용된 WBE는 동아원(Seoul, Korea)으로부터 제공되었다.

3. 세포배양

인간유래 SH-SY5Y neuroblastoma 세포는 10% FBS, penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)을 포함하는 DMEM 배지 조성으로, 5% CO_2 및 37℃ 온도 조건으로 유지 배양하였다. 세포배양 배지는 2일마다 새로운 배지로 갈아주었으며, 실험을 위하여 적절한 밀도로 세포를 plating한 다음 세포가 안정적으로 부착되면 시약을 처리하였다.

4. 세포 생존율 측정

세포 생존율(cell viability)를 측정하기 위하여 MTT 환원법을 이용하였다. SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 5×10^4 개/ 300 μl의 밀도로 plating한 다음 세포가 안정적으로 부착되면 밀기울 열수추출물(WBE)을 다양한 농도(0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1 mg/ml)로 30분간 전처리하며, 이후 베타아밀로이드(15 μM)를 첨가하였다. 22시간 배양 뒤 MTT 용액을 가하여 2시간 동안 반응시킨 다음 200 μl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 살아있는 세포에 생성된 formazan 결정을 용해시켰다. 보라색으로 발색된 용액을 540 nm에서 microplate reader (Molecular device, USA)를 사용하여 흡광도를 측정한 다음 상대적인 세포생존율(%)을 vehicle만 처리한 대조군의 흡광도를 100% 기준으로 하여 산출하였다.

5. 세포사멸 측정

능동적 세포사멸과정인 apoptosis에 미치는 WBE의 효능을 검토하기 위하여 apoptosis의 대표적인 지표 중 하나인 DNA fragmentation을 TUNEL 염색법(DNA fragmentation *in situ*, Roche, Germany)으로 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 4-well 슬라이드에 plating 한 다음, 24시간 뒤 세포가 안정적으로 부착되면 WBE를 30분간 전처리하고 Aβ_{25-35}를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 시약 처리가 끝난 세포를 10% neutral buffered formalin으로 고정시킨 다음 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)로 3회 세척하였다. 이후 내인성 peroxidase의 활성을 0.3% H_2O_2-메탄올 용액을 가하여 차단한 다음 PBS로 세척하고, 0.1% Triton X-100 용액(0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium acetate)에 담그어 세포를 permeable하게 하였다. PBS 용액으로 세척한 뒤 TUNEL 반응용액(terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT, digoxigenin-labeled nucleotides)에서 1시간 동안 배양하여 표지시킨 다음, peroxidase-conjugated anti-goat antibody와 diamino-benzidine (DAB) 용액으로 순차적으로 발색시키고 50% glycerol로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다(Leica, Wetzlar, Germany).

6. 미토콘드리아 막전압 측정

TMRE (tetramethyrhodamine ethyl ester perchlorate, Invitrogen) 형광 염색시약을 사용하여 미토콘드리아 막전압 변화를 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 4-well 슬라이드에 plating 한 다음, 24시간 뒤 세포가 안정적으로 부착되면 WBE를 30분간 전처리하고 Aβ_{25-35}를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 걷어낸 후, PBS로 2회 세척한 뒤 10 μM TMRE를 가하여 세포 배양기에서 15분간 반응 시켰다. 이후 PBS로 2회 세척한 다음 DMSO로 세포를 용해시켜 excitation 파장 545 nm 및 emission 파장 590 nm에서 형광 강도의 변화를 microplate fluorescence reader (SpectraMax Gemini XS, Molecular Device, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

7. 단백질 발현 측정

세포내 단백질 발현 변화를 측정하기 위하여 Western blot analysis를 수행하였다. 시약처리가 끝난 세포에 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, protease inhibitor cocktail)를 가하여 용해시킨 다음, 4 ℃, 14,000g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. BCA 용액으로 단백질을 정량 후 30 μg의 단백질을 10-12% SDS-PAGE로 전기영동하였

다. 이후 전기영동 된 단백질을 300 mA에서 3시간 동안 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Roche)으로 transfer 하였으며, membrane은 0.1% tween-20을 포함하는 5% nonfat dry milk를 사용하여 실온에서 1시간 동안 blocking 시켰다. 1차 항체들을 3% fat-free dry milk-PBS에서 4℃, overnight 조건으로 반응 시킨 다음 PBST로 10분간 3회 세척 후, horseradish peroxidase가 중합된 이차 항체 용액으로 실온에서 1시간 배양시켰다. PBST로 3회 세척 후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 사용하여 발색시켰으며 영상을 LAS4000 image (Fujifilm, 일본) 장비를 이용하여 촬영하였다.

8. 실험동물

3xTg 형질전환 치매 마우스 3xTg-AD [B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPSwe, tauP301L) 1Lfa/J]는 Jackson Laboratory (Maine, USA)에서 구입하여 6개월령 자성(female) 마우스를 실험에 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취시키면서 온도 23 ± 2℃, 습도 45 ± 5%, 12시간 (06:00~18:00)의 명암 주기로 일정하게 유지하였다. 모든 동물실험 과정은 계명대학교 의과대학 동물윤리위원회의 승인을 받아 동물실험윤리 규정을 준수하여 실시되었다. 실험그룹은 정상 대조군(B6129SF2/J 마우스, n=5), 3xTg 기억력 손상 유발군(n=6), 3xTg에 WBE (400 mg/kg, n=6)를 경구 투여한 시험군 총 3개로 나누어 실험을 진행하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취시키면서 WBE는 6개월령부터 시작하여 1달간 경구로 투여하였으며, 온도 23 ± 2℃, 습도 45 ± 5%, 12시간 (06:00~18:00)의 명암 주기로 사육 조건을 일정하게 유지하였다. 1개월 투여 후 기억력을 측정하는 행동실험으로 물미로(Morris water maze) 실험을 실시하였다.

9. 물미로 시험(Water-maze test)

학습 및 기억력 평가를 위하여 물미로 실험을 진행하였다. 직경 120 cm, 높이 45 cm의 원형 수조에 직경 10 cm, 높이 30 cm의 도피대를 수조의 사분면 중 한 곳에 위치시키고 물의 높이를 도피대보다 1 cm 높게 설정하였으며 물의 온도는 25 ± 2℃ 유지하며 흰색 물감을 혼합하여 수면 아래의 도피대가 보이지 않도록 하였다. 또한 원형 수조 주변에 4개의 지표(visual cue)를 두어 실험동물이 방향을 인지하여 도피대를 찾아갈 수 있도록 하였다. 실험은 마우스가 자유롭게 120초 동안 수영하며 스스로 도피대를 찾아갈 수 있도록 하였고, 120초 이내에 찾지 못 할 경우 손으로 도피대로 유도하여 10초간 머물며 기억할 수 있도록 하였다. 물미로 실험은 총 5일 동안 진행하였으며, 마우스의 움직임은 Ethovision 3.1 software (Noduls, Wageningen, Netherlands)를 사용하여 모니터링 하였다.

10. 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차 또는 평균 ± 표준오차로 표기하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 SPSS statistics 20 프로그램을 사용하여 ANOVA로 검정한 후, 사후분석으로 Turkey's test를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 밀기울추출물의 보호효과

WBE가 베타아밀로이드($A\beta_{25-35}$)로 유도된 신경세포 독성에 대해 보호효과를 가지는지 검토하기 위하여 MTT 염색법을 사용하여 세포 생존율을 측정 비교하였다. WBE를 0.1, 0.3, 1 mg/ml의 농도로 30분 동안 전처리 한 후 15 μM $A\beta_{25-35}$를 24 시간 동안 처리 한 결과, $A\beta_{25-35}$를 처리한 그룹에서 대조군에 비해 55.0 ± 0.7% ($p < 0.01$)로 세포 생존율이 감소한 반면 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1 mg/ml의 WBE를 전처리 한 그룹에서는 각각 58.0 ± 0.7% ($p < 0.05$), 60.9 ± 1.3% ($p < 0.01$), 77. ± 1.3% ($p < 0.01$)의 세포 생존율로 농도에 따른 증가를 보였다(Fig. 1A). 즉, WBE는 사용한 농도 범위에서 $A\beta_{25-35}$의 세포 독성을 통계적의로 유의하게 억제함을 관찰할 수 있었다. 또한 WBE를 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1 mg/ml의 농도로 단독 처리하여 자체독성을 평가한 결과 세포생존율은 모두 90% 이상으로 유지되어 세포 독성이 관찰되지 않았다(data not shown).

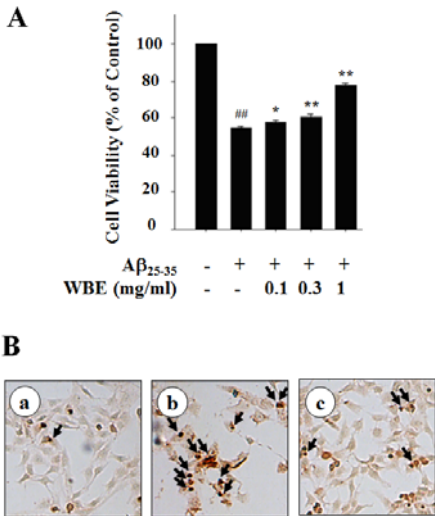

Fig. 1 Protective effect of WBE against $A\beta_{25-35}$-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in SH-SY5Y cells A. SH-SY5Y cells were incubated with $A\beta_{25-35}$ for 24 h in the presence or absence of WBE (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, and 1 mg/ml) and viable cells were detected by MTT dye reduction assay. Values represent mean ± S.D. (n=3). $^{\#\#}p < 0.01$: vehicle-treated control vs. $A\beta_{25-35}$-treated experimental groups, $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + WBE groups. B. Apoptotic cell death was monitored by TUNEL staining which detects DNA fragmentation in situ, a typical maker of apoptosis. a : vehicle-treated control, b : $A\beta_{25-35}$ (15 μM), c : $A\beta_{25-35}$ (15 μM) + WBE (1 mg/ml). TUNEL- positive cells were indicated by arrows.

2. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸에 대한 밀기울추출물의 보호효과

세포생존율 평가로 얻은 결과를 토대로 Aβ_{25-35} 처리로 유도된 세포 사멸에 대한 WBE의 보호효과를 검토하기 위하여 apoptosis의 대표적인 지표 중의 하나인 DNA fragmentation을 TUNEL 염색법을 사용하여 측정하였다. 대조군에 비해 Aβ_{25-35}를 처리한 그룹에서 TUNEL 염색이 강하게 발색된 것을 관찰 할 수 있었으며(Fig. 1B, 화살표로 표기), Aβ_{25-35}로 인해 증가된 신경세포 사멸은 WBE (1 mg/ml)를 전처리 한 그룹에서 감소되었으며 세포 형태학적으로도 대조군과 유사한 양상을 보였다(Fig. 1B).

3. 베타아밀로이드로 유도된 apoptosis 신호전달에 대한 밀기울추출물의 보호기전

한편, apoptosis 과정에서는 다양한 세포내 신호전달이 활성화 또는 불활성화 되는데, 일반적으로 미토콘드리아의 막전압(mitochondrial transmembrane potential, MMP)은 감소되며, 이는 이후 apoptosis를 매개하는 단백질들의 활성을 조절하는데 중요한 역할을 한다[16]. 미토콘드리아 막전압 측정을 위해 TMRE 형광 염색 시약을 사용하였으며, 이는 미토콘드리아내로 이동하여 막전압 의존적인 붉은색의 형광을 나타내게 된다. SH-SY5Y 세포에 Aβ_{25-35}를 처리시 미토콘드리아 막 전압이 71.4 ± 1.52% ($p < 0.01$)로 대조군에 비해 28.6%가 감소된 반면 WBE를 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml 및 1 mg/ml로 전처리 후 Aβ_{25-35}를 가한 경우 형광 강도가 각각 76.8 ± 2.1%, 79.5 ± 4.1% ($p < 0.05$)와 90.0 ± 0.8% ($p < 0.01$)으로 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 특히, 0.3 mg/ml 및 1 mg/ml의 농도에서 통계적 유의성을 나타냈으며, 1 mg/ml 처리시 가장 높은 회복율을 보여 WBE가 Aβ_{25-35}에 의한 미토콘드리아 막전압 소실을 유의적으로 억제함을 알 수 있었다.

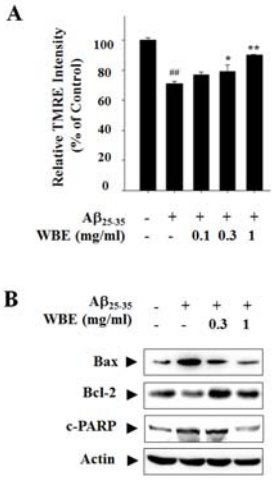

Fig. 2 Protective effect of WBE against Aβ_{25-35}-mediated apoptotic signals in SH-SY5Y cells A. Cells were treated with Aβ_{25-35} (15 μM) for 24 h with or without WBE and mitochondrial transmembrane potential was measured by using TMRE probe. Relative intensity of TMRE fluorescence was represented as mean ± S.D. (n=3). $^{\#\#}p < 0.01$: vehicle-treated control vs. Aβ_{25-35}-treated experimental groups, $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$: Aβ_{25-35} vs. Aβ_{25-35} + WBE groups. B. Cells were preincubated with WBE for 30 min and then exposed to Aβ_{25-35} (15 μM) for additional 24 h. Protein expression of pro-apoptotic Bax, anti-apoptotic Bcl-2, and cleaved form of PARP (c-PARP) was compared by Western blot analysis. Actin levels were monitored for the confirmation of equal amount of protein loading.

이후 apoptosis 신호전달 과정에 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family 단백질과 PARP 활성화를 Western blot을 통하여 측정하였다. 그 결과 Aβ_{25-35}를 처리함으로써 apoptosis를 매개하는 Bax의 발현이 대조군에 비해 현저히 증가되며, apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 반면 WBE를 1 mg/ml로 전처리 그룹에서는 Bax의 발현은 감소되며 Bcl-2 발현은 다시 증가되어 대조군과 유사한 양상을 나타내었다. 또 다른 apoptosis를 매개하는 단백질인 PARP의 경우, Aβ_{25-35}에 의해 잘려져 활성이 증가 되었지만, WBE를 전처리 한 경우 특히 1 mg/ml 농도에서 효과적으로 억제되었다(Fig. 2B).

4. 밀기울추출물의 신경영양인자 강화효과

다음으로, 밀기울추출물이 신경세포 보호 효능을 갖는 또 다른 기전을 규명하기 위하여 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현을 측정하였다. BDNF는 신경세포 생존, 장기 기억력 강화(long-term potentiation), 시냅스 가소성(synaptic plasticity), 신경발생(neurogenesis), 신경돌기 성장(neurite outgrowth) 등과 관련되어 기억력 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[17]. 실험결과 Aβ_{25-35}에 의해 BDNF의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며 이는 WBE (1 mg/ml)의 전처리에 의해 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다(Fig. 3A). 더 나아가 WBE (1 mg/ml)는 BDNF의 발현을 조절하는 상위 전사인자인 CREB의 활성 또한 유의적으로 증가시켰다. 즉, Aβ_{25-35}를 처리 시 CREB는 인산화 억제로 활성이 현저히 감소되었으며, 이는 WBE를 전처리함으로써 증가되었다.

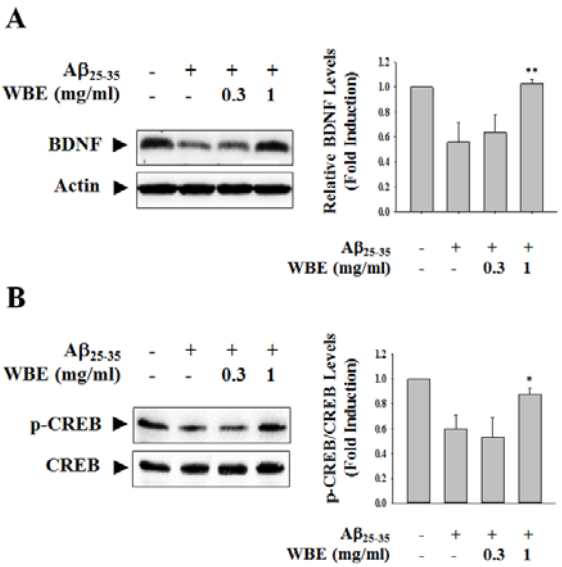

Fig. 3 WBE-mediated up-regulation of BDNF via activation of CREB in SH-SY5Y cells Cells were pretreated with WBE for 30 min and then Aβ_{25-35} (15 μM) was added to the media for 24 h. BDNF (A) and p-CREB/CREB (B) levels were examined by Western blot analysis using specific antibodies. Quantitative data for BDNF/Actin and p-CREB/CREB levels were shown in the right panels. Relative expression was calculated by regarding control as

1. Data are expressed as mean ± S.D. (n=3). $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$: $A\beta_{25-35}$ vs. $A\beta_{25-35}$ + WBE groups.

5. 치매 동물 모델에서 밀기울추출물의 기억력 증진 효과

WBE의 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과를 *in vitro* SH-SY5Y 세포 모델에서 확인하였으며, 이를 바탕으로 학습 및 기억력 향상에 미치는 영향을 검토하기 위하여 *in vivo* 3xTg 형질전환 치매 동물모델을 사용하였다. 6개월령의 3xTg AD 마우스에 WBE (400 mg/kg)를 한 달 동안 투여 후 기억력을 측정하는 행동실험으로 물미로 실험을 실시하였다. WBE 대신 생리식염수를 투여한 대조군은 훈련 첫째 날 109.0 ± 6.9초, 둘재 날 92.1 ± 14.3초, 셋째 날 38.5 ± 15.3초, 넷째 날 25 ± 7.5초, 다섯째 날 15.2 ± 2.6초로 도피대를 찾아가는 시간(평균 탈출 시간, mean escape latency)이 훈련 일수-의존적으로 감소되었으며, 이에 반해 3xTg 기억력 손상 그룹은 도피대를 찾아가는 시간이 훈련 마지막 날 108.8 ± 7.1초(5일째)로 측정되어 5일 동안 반복적인 물미로 실험을 수행했음에도 불구하고 평균 탈출 시간이 감소되지 않았다(Fig. 4). 반면 WBE 400 mg/kg를 투여한 그룹의 경우 도피대를 찾아가는 시간이 훈련 둘째 날부터 단축되어 4일째 55.2 ± 17.3초 ($p < 0.01$), 5일째 46.4 ± 14.5초 ($p < 0.01$)로 통계적으로 유의하게 3xTg 기억력 손상군과 비교하여 더 빨리 도피대를 찾아가는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

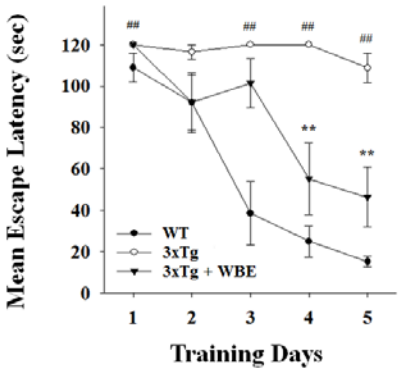

Fig. 4 Learning and memory enhancing effect of WBE in 3xTg AD mice. Learning and memory functions were evaluated by Morris water maze test. The mice were divided into three groups: wild type (WT), 3xTg AD mice, and 3xTg AD mice administered with WBE (400 mg/kg) for 1 month. Mean escape latency (sec) during 5 consecutive training days were represented as mean ± S.E. (n=5~6). $^{\#\#}p < 0.01$: WT vs. 3xTg AD mice, $^{**}p < 0.01$: 3xTg AD mice vs. 3xTg AD mice co-treated with WBE.

고 찰

밀기울추출물 WBE가 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성과 사멸, 학습과 기억력 손상을 억제하는지 검토하기 위하여 SH-SY5Y 세포를 이용하여 세포생존율, DNA fragmentation, apoptosis 매개 단백질 및 신경영양인자의 발현을 측정하였으며, 3xTg 형질전환 치매 동물 모델을 이용하여 기억력을 측정하는 물미로 실험을 수행하였다. 본 연구에 사용한 베타아밀로이드는 아밀로이드 전구단백질 APP로 부터 β-secratases 및 γ-secratases의 작용에 의해 잘려지는 경우 과량 생산되며 신경세포 외부에 침착되어 신경세포 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 독성을 일으키는 기전으로는 산화적 스트레스, 염증반응, 칼슘대사 이상, 신경전달물질 및 시냅스 기능 변화, 신경세포의 손상 및 사멸이 제시되고 있다[18,19].

우선, 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 WBE의 보호 효능을 검토하고 최적 활성 농도 범위를 설정하기 위하여 MTT assay를 수행하였으며, 베타아밀로이드로 인한 세포생존율 감소가 WBE를 전처리 함으로써 농도-의존적으로 (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1 mg/ml) 회복됨을 확인하였다. 한편, 이러한 치매 유발 과정에서는 다양한 신경세포들이 apoptosis를 통하여 사멸되므로, 신경세포의 사멸 보호는 치매의 예방, 조절 및 치료법 개발의 기반이 되는 핵심기술로, 국내외적으로 많은 연구진들이 이를 주요 표적으로 하고 있다[20]. 특히, 다른 세포와는 달리 뇌신경세포는 재생력이 없기 때문에 신경세포의 사멸을 억제할 수 있는 약물들의 개발이 중요하다고 할 수 있다.

일반적으로 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸은 apoptosis 과정을 거치게 되는데, 이 과정은 형태학적으로 세포의 비중 감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축, DNA fragmentation을 동반하게 된다. 이때 분절화된 DNA 말단의 3'-OH에 dUTP를 표지하여 TUNEL 염색법으로 세포사멸의 정도를 측정 할 수 있는데, 실제 SH-SY5Y 세포에 베타아밀로이드를 처리한 경우 TUNEL에 강하게 염색된 세포의 수가 증가된 것을 즉, DNA fragmentation이 유발되어 apoptosis를 통한 세포 사멸이 진행됨을 확인할 수 있었으며 이는 WBE를 전처리 함으로써 효과적으로 억제되었다.

한편, 이러한 apoptosis 과정에는 다양한 단백질과 신호전달 물질들이 관여 한다. 그 중 대표적인 것인 Bcl-2 family 단백질인데, 이는 apoptosis를 억제하는 antiapoptotic Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w 등의 단백질과 apoptosis를 촉진하는 proapoptotic Bax, Bad, Bak, Bik, Bid, BNIP3, Bim, Bcl-Xs 등의 단백질로 구성된다[16,22]. 특히, 미토콘드리아 의존적인 내인성 경로(intrinsic pathway)의 경우 이러한 proapoptotic/antiapoptotic Bcl-2 family 단백질의 상대적인 비가 증가하여 미토콘드리아에 permeability transition pore를 형성하게 되며 이후 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 방출된다[16,22]. 이후 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf1)과 apoptosome 복합체를 형성하며, procaspase-9을 caspase-9으로 전환시키고 이후 caspase-3의 활성화를 촉진하며, 활성화된 caspases는 DNA 수선(repair)에 중요한 역할을 하는 PARP의 절단을 유발하게 된다[16,22].

WBE는 특히 이러한 세포사멸 과정에서 베타아밀로이드로 인한 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화를 정상적으로 회복시켜, 즉 antiapoptotic한 Bcl-2의 발현을 증가시키고 반면 proapoptotic한 Bax의 발현은 감소시켰다. 특히, WBE는 미토콘드리아 막전압 감소를 농도-의존적으로 유의하게 억제하였으며, 이는 이후 미토콘드리아를 통한 cycochrome c 유출, caspase 활성화 저해를 통해, PARP cleavage를 억제한 것으로 사료된다.

다음으로, WBE가 신경세포 보호 작용을 갖는 기전을 규명하기 위하여 neurotrophin family에 속하는 내인성 단백질인 BDNF의 발현을 측정하였다. 최근 치매에 있어 이러한 신경세포 사멸 제어 및 재생 과정에서 BDNF의 역할이 주목을 받고 있다. BDNF는 다양한 신경독성 인자로부터 신경세포를 보호하고, 신경발달, 중추 및 말초 신경세포의 유지에 중요한 역할을 한다[22]. 특히, BDNF 발현이 감소된 형질전환 마우스의 경우 시냅스 기능, 장기 기억력 강화, 학습 및 기억에 손상을 보였으며[23], 알츠하이머 치매 환자 및 중증 인지능 손상 환자의 경우 BDNF의 전구체 및 성숙형 단백질의 발현이 낮게 관찰되어 기억 손상 정도와 BDNF 발현이 음의 상관관계를 보였다[24]. BDNF는 TkrB receptor를 통하여 신호를 전달하며, 이러한 과정이 손상되는 경우 아밀로이드 생성 경로(amyloidogenic pathway)가 활성화 되어 베타아밀로이드의 량이 더욱 증가되었으며[25], 반면 신경전달물질 아세틸콜린의 량은 감소되었다[26]. 따라서, BDNF를 선택적으로 증가시키는 소재의 개발은 치매 치료의 효율을 한 단계 높일 수 있는 방법으로 기대가 된다.

본 연구에서 WBE는 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성 및 사멸에 대해 최대 효능을 보인 농도(1 mg/ml)에서 BDNF의 발현을 통계적으로 유의하게 증가시킴을 확인 할 수 있었다. 더 나아가, 이는 상위 조절인자인 CREB 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료된다. CREB는 퇴행성 뇌질환과 관련되어 신경세포의 생존 및 보호, 시냅스 가소성, 기억력 증진에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[27], BDNF 이외에도 Bcl-2를 비롯한 anti-apoptotic 단백질과 항산화 효소들의 발현 조절에 관여 하는 것으로 보고되었다[28]. 일반적으로 CREB는 ser133 위치에 인산화 되어 핵내로 이동하여 활성화 되며, 이러한 인산화에는 protein kinase A (PKA), protein kinase B (PKB)/Akt, protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase activated protein kinases (MAPKAPK), calcium-calmodulin kinase IV (CAMKIV) 등의 상위 효소들이 작용 가능하다[29]. WBE를 처리한 경우 베타아밀로이르도 감소된 CREB의 활성이 다시 대조군과 유사한 수준으로 회복됨을 인산화된 형태의 CREB 발현을 측정함으로써 확인 할 수 있었으며, 상위 인산화 조절인자는 일련의 추가 연구를 통해 규명되어져야 할 것이다.

다른 연구 그룹에서도 SH-SY5Y 세포에 $A\beta_{25-35}$를 처리한 경우 BDNF의 발현이 감소되며, 반대로 BDNF를 외부에서 공급해 줌으로써 세포 독성과 사멸이 개선됨을 보고하였다[30]. 특히, 알츠하이머병과 관련된 두 개의 유전자에 돌연변이(APPswe/PS1Δ9)가 일어난 N2a 세포[31] 및 형질전환 치매 동물 모델(double Tg AD mice)을 이용한 일차 신경세포 배양[32]에서도 과량으로 생성된 $A\beta$로 인해 CREB활성과 BDNF의 발현이 현저히 감소되었으며, 이는 각각 은행잎 추출물[31] 및 은행잎 추출물에 함유된 플라보놀[32]을 처리 한 경우 WBE와 동일한 양상으로 유의적으로 회복되어 신경세포 보호효과를 나타내었다.

이상의 세포실험 결과를 바탕으로 이후 실험에서는 3xTg 치매 형질 전환 동물 모델을 이용하여 WBE의 기억력 증진 효능을 검토하고자 하였다. 3xTg AD 마우스는 AD와 관련된 세 유전자 Psen1, APPSwe, TauP301L가 변형 되어, 빠른 경우 3~4개월 정도에 베타아밀로이드 증가가 뇌의 일부분에 감지되어지고, 시냅스 전달 및 장기 기억 강화 손상은 6개월 이내 발병이 되며, 이후 해마부위에서 형태적인 변화 및 과인산화된 타우 단백질이 감지된다. 이 유전자 변형 마우스는 시냅스 기능이상과 함께 베타아밀로이드 축적으로 인한 노인반 형성, 타우 과인산화로 인한 신경섬유매듭의 침착 등 치매 환자에게서 관찰되어지는 증상과 비슷한 양상을 나타내어 치매 기전 연구 및 치료제 개발에 널리 활용되고 있다[33]. 본 연구에서 3xTg AD 마우스에 지속적으로 WBE를 경구 투여한 경우 기억력 손상이 개선되어 물미로 실험에서 5일간의 훈련기간 동안 평균 탈출 속도가 현저히 증가 되는 것을 확인 할 수 있었다. 다른 연구 그룹에서는 밀싹 분말의 경우 Wistar albino rat에서 알루미늄으로 유도된 기억력 손상을 억제하였으며, 특히 뇌내 지질과산화 등의 산화적 손상을 개선하고 항산화 효소인 sueproxide dismutase와 catalase의 발현을 증가시킴을 보고 한 바 있다[34]. 밀 잎 에탄올 추출물의 경우는 7일 동안 하루에 6분 씩 강제 수영을 시켜 유발된 만성피로에 대해 보호효과를 가졌으며, 운동활성(locomotor activity)과 불안 정도를 개선시키고 항산화 효소 catalase의 발현 증가를 통해 뇌내 지질과산화를 억제하였다[35].

이상을 요약하면, WBE는 SH-SY5Y 세포에서 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성 및 apoptosis를 통한 신경세포 사멸을 효과적으로 억제하였으며, 이는 Bcl-2/Bax의 증가, 미토콘드리아 막전압 회복, PARP 활성화 억제, 신경영양인자 BDNF의 발현 증가를 통해 매개되었다. 더 나아가, WBE는 3xTg 형질전환 치매 동물 모델에서 학습 및 기억력을 개선하여 물미로 실험에서 평균탈출시간을 유의적으로 단축시켰으며, 이상의 결과는 WBE가 천연 치매 예방 및 치료 소재로써 충분한 활용 가능성을 가짐을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업에 의해 이루어진 것임.

References

1. Korean Dementia Association. Dementia a clinical approach. 2nd ed. Academya. 2011 : 375-8.
2. Korean Neurological Association. Textbook of neurology. 2nd ed. Seoul : Panmun Education. 2012 : 256-7.
3. Han SH. Novel pharmacotherapies for Alzheimer' s disease. J Korean Med Assoc. 2009 ; 52(11) : 1059-68.
4. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Front Cell Neurosci. 2014 ; 8 : 112.
5. Humpel C. Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease? Exp Gerontol. 2011 ; 46(4) : 225-32.

6. Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. J Pharmacol Exp Ther. 2003 ; 306(3) : 821-7.
7. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. Alzheimers Res Ther. 2014 ; 6(4) : 37.
8. Heo J. Dongui Bogam. Tangaekpyeon, Gokbu.
9. Ben-Arye E, Goldin E, Wengrower D, Stamper A, Kohn R, Berry E. Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Scand J Gastroenterol. 2002 ; 37(4) : 444-9.
10. Boros LG, Nichelatti M, Shoenfeld Y. Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci. 2005 ; 1051 : 529-42.
11. Peryt B, Szymczyk T, Lesca P. Mechanism of antimutagenicity of wheat sprout extracts. Mutat Res. 1992 ; 269(2) : 201-15.
12. Jang JH, Kim CY, Lim SH, Yang CH, Song KS, Han HS, Lee HK, Lee J. Neuroprotective effects of Triticum aestivum L. against beta-amyloid-induced cell death and memory impairments. Phytother Res. 2010 ; 24(1) : 76-84.
13. Han HS, Jang JH, Jang JH, Choi JS, Kim YJ, Lee C, Lim SH, Lee HK, Lee J. Water extract of Triticum aestivum L. and its components demonstrate protective effect in a model of vascular dementia. J Med Food. 2010 ; 13(3) : 572-8.
14. Kim CY, Lee GY, Park GH, Lee J, Jang JH. Protective Effect of Arabinoxylan against Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment. Biomol Ther (Seoul). 2014 ; 22(5) : 467-73.
15. Lim SH, Lee J. Hot water extract of wheat bran attenuates white matter injury in a rat model of vascular dementia. Prev Nutr Food Sci. 2014 ; 19(3) : 145-55.
16. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci. 2003 ; 4(5) : 365-75.
17. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001 ; 63(1) : 71-124.
18. Bajda M, Guzior N, Ignasik M, Malawska B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment. Curr Med Chem. 2011 ; 18(32) : 4949-75.
19. Gatta V, Drago D, Fincati K, Valenti MT, Dalle Carbonare L, Sensi SL, Zatta P. Microarray analysis on human neuroblastoma cells exposed to aluminum, β_{1-42}-amyloid or the β_{1-42}-amyloid aluminum complex. PLoS One. 2011 27 ; 6(1) : e15965.
20. Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Auladell C, Pelegri C, Vilaplana J, Folch J, Canudas AM, Zarate CB, Pallès M, Camins A. Antiapoptotic drugs: a therapautic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. Curr Pharm Des. 2011 ; 17(3) : 230-45.
21. Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. Neurochem Res. 2014 ; 39(12) : 2301-12.
22. Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. Biochem Soc Trans. 2007 ; 35(Pt 2) : 424-7.
23. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. Life Sci. 2002 ; 70(7) : 735-44.
24. Peng S, Wuu J, Mufson EJ, Fahnestock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. J Neurochem. 2005 ; 93(6) : 1412-21.
25. Zhang F1, Kang Z, Li W, Xiao Z, Zhou X. Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer's disease. J Clin Neurosci. 2012 ; 19(7) : 946-9.
26. Ward NL, Hagg T. BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. Exp Neurol. 2000 ; 162(2) : 297-310.
27. Kida S. A Functional role for CREB as a positive regulator of memory formation and LTP. Exp Neurobiol. 2012 ; 21(4) : 136-40.
28. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. FEBS J. 2007 ; 274(13) : 3210-7.
29. Johannessen M, Moens U. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. Front Biosci. 2007 ; 12 : 1814-32.
30. Kim JH. Brain-derived neurotrophic factor exerts neuroprotective actions against amyloid β-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Exp Ther Med. 2014 ; 8(6) : 1891-5.
31. Xu Y, Cui C, Pang C, Christen Y, Luo Y. Restoration of impaired phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) by EGb 761 and its constituents in Aβ -expressing neuroblastoma cells. Eur J Neurosci. 2007 ; 26(10) : 2931-9.
32. Hou Y, Aboukhatwa MA, Lei DL, Manaye K, Khan

I, Luo Y. Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. Neuropharmacology. 2010 ; 58(6) : 911-20.
33. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. Front Genet. 2014 ; 5 : 88.
34. Bitra VR, Rapaka D, Mathala N, Akula A. Effect of wheat grass powder on aluminum induced Alzheimer's disease in Wistar rats. Asian Pac J Trop Med. 2014 ; 7S1 : S278-81.
35. Borah M, Sarma P, Das S. A study of the protective effect of Triticum aestivum L. in an experimental animal model of chronic fatigue syndrome. Pharmacognosy Res. 2014 ; 6(4) : 285-91.