(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월28일
(11) 등록번호 10-1802659
(24) 등록일자 2017년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/366 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01) *A61K 36/81* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/366 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0083944
(22) 출원일자 2016년07월04일
심사청구일자 2016년07월04일
(56) 선행기술조사문헌
Biosci. Rep., Vol. 36, pp. 1-10 (2016.04)*
Veterinary World, Vol. 8, No. 1, pp. 46-51 (2015)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7 대동아파트 102동 303호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

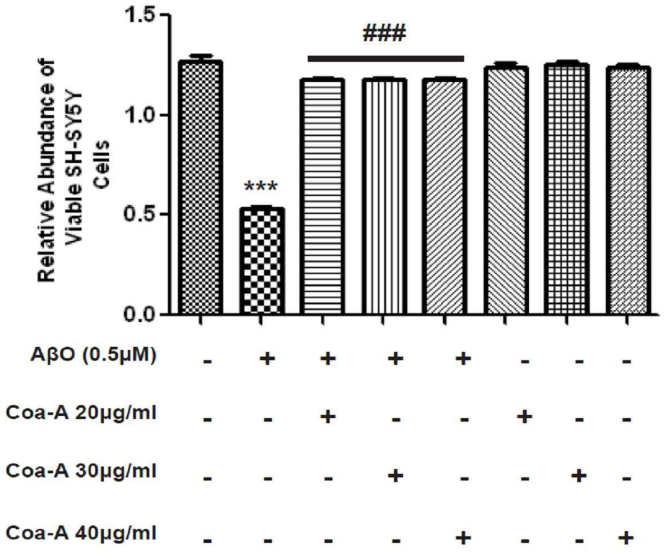
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 **비타니아 코아귤란스에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 코아귤란신 A를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 코아귤란신-A는 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제하여 Aβ의 생성 및 응집을 억제하는 효능이 있으므로 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/56 (2013.01)
A61K 36/81 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3C7A1904391
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 퇴행성 뇌질환 및 대사조절 신규 제어물질 개발 및 효과 검증; 에너지 대사 활성화 물질 개발을 통한 실용화 기반 확립
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

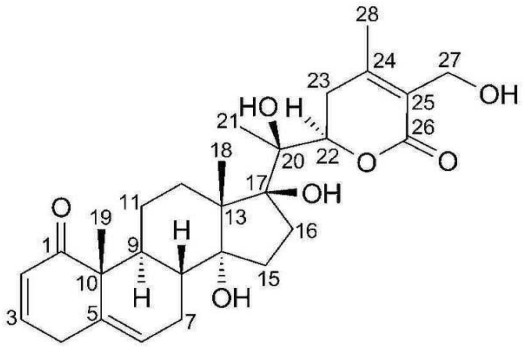
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 기억력 상실, 기억력 손상, 파킨슨병 및 알츠하이머 병으로 이루어진 군에서 선택되는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌세포 내 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 질환인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

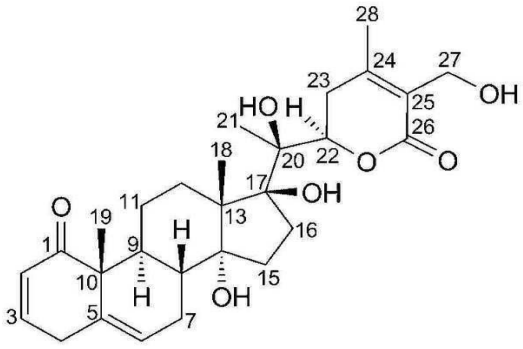
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포의 염증반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 기억력 상실, 기억력 손상, 파킨슨병 및 알츠하이머 병으로 이루어진 군에서 선택되는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비타니아 코아귤란스에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; 이하 AD로 표기함)은 나이가 들어감에 따라 뇌에서 선택적으로 신경세포의 사멸이 일어나는 퇴행성 신경질환이다. AD 환자의 뇌에서 나타나는 조직병리학적 특징으로는 뇌 조직 내에서 세포 외부에 침착되는 노인 반점(senile plaque) 및 신경세포 내부에 실타래처럼 뭉쳐서 축적되는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle; NFT)가 있다. 노인 반점의 주요 구성성분으로는 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; 이하 APP로 표기함)에서 단백질 분해효소들에 의해 잘려져 나온 아밀로이드 베타(amyloid β petide; 이하 Aβ로 표기함)가 있으며, 최근의 여러 가지 보고들에 의하여 Aβ가 AD의 여러 가지 병리학적 증상들을 일으키는 주요 병인으로 생각되고 있다.

[0004] Aβ는 APP의 N-말단 단편이 베타 세크리테아제(β-secretase)라는 단백질 분해효소에 의하여 잘려진 후에 남아있는 APP C-말단 단편이 다시 감마 세크리테아제(γ-secretase)라는 아스파트르산 단백질 분해효소에 의해 막을 관통하는 부분이 잘려서 만들어진다. 40개에서 42개 또는 43개의 아미노산을 가지는 형태로 나타나며, 이 중 $A\beta_{42}$가 노인 반점의 침착에 있어 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 열-충격 단백질(heat-shock proteins; 이하 HSP로 표기함)은 단백질이 입체적 구조를 가지도록 돕는 샤페론(chaperone)의 하나로, 스트레스 및 비정상적인 환경에서 단백질의 응집 또는 잘못 접힘(misfolding)을 방지하는 역할을 한다. 샤페론 분자 중에서 HSP70 패밀리는 신경보호에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, AD 및 다른 노화 관련 질병이 진행되는 경우 발현이 억제되기 때문에 적절한 기능을 수행하지 못하게 된다.

[0006] 비타놀리드(*Withanolides*)는 가지과(*Solanaceae*)에 속하는 식물에서 발견되는 스테로이드 락톤(steroidal lactones) 계열의 천연 화합물이다. 비타놀리드는 비타니아(*Withania*) 속에서 추출되며, 이 속의 식물로는 비타니아 솜니페라(*Withania somnifera*) 및 비타니아 코아귤란스(*Withania coagulans*) 종이 유명하다. 비타니아 코아귤란스는 파키스탄, 이란, 아프가니스탄 및 인도에 주로 자생하고 있으며, 코아귤란스라는 이름은 이 식물의 열매가 우유를 응집시키는 특성이 있어 치즈 제조에 이용한 것에서 유래하였다. 식물 전체, 뿌리, 열매, 씨앗, 잎 및 줄기 등이 전통 민간 의약으로 사용되어 왔으며, 열매는 진정 효과 및 이뇨 효과가 있고, 천식에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 본 발명자들은 비타니아 코아귤란스에서 추출한 코아귤란신-A(Coagulansin-A; 이하 Coa-A로 표기함) 화합물이 HSP70 단백질의 발현을 상승시키고, BACE1의 발현을 억제하여 아밀로이드 생성 경로를 억제하는 효능이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

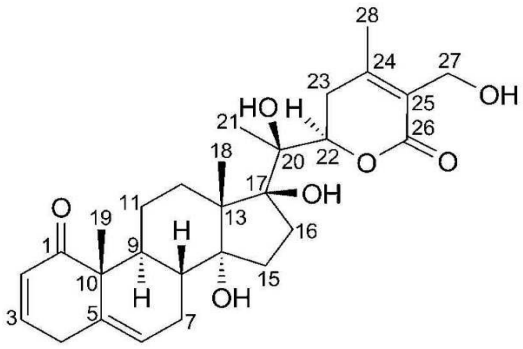
[0009] (비특허문헌 0001) International journal of ayurvedic&herbal medicine 3:5(2013) 1330-1336 WITHANIA COAGULANS DUNAL. (PANEER DODA): A REVIEW

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

화학식 1

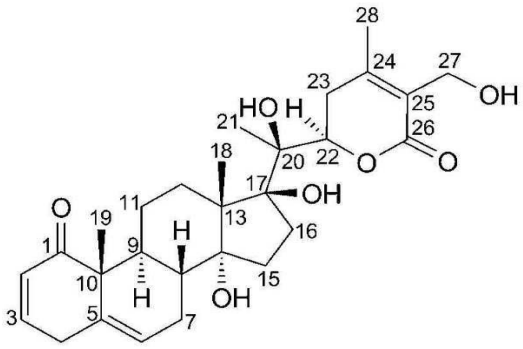
[0011] 

[0012] 본 발명의 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] [화학식 1]

[0016] 

[0017] 본 발명의 용어, "퇴행성 신경질환"이란 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미하는 것을 의미한다. 대표적인 퇴행성 신경질환에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system strophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy: OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome), 선조체-흑질 퇴행증(Striatonigral degeneration), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위

축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis;ALS), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganlionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease), 파킨스-ALS-치매 복합증(Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 및 픽병(Pick's disease)등이 있다.

[0018] 알츠하이머병은 치매를 일으키는 많은 질환들 중에 가장 흔한 것으로, 노인 반점과 신경세포 안에서 신경원 섬유들이 비정상적으로 꼬여 있는 모습을 보인다. 이외에도 기억 및 다른 지적 능력을 유지하는데 중요한 뇌신경세포가 많이 없어지고, 이러한 뇌신경세포 사이에서 오가는 특정 화학물질의 양이 많이 떨어져 있는 모습을 보인다.

[0019] 일 구체예에 따르면 상기 퇴행성 신경질환은 뇌세포 내에 아밀로이드 베타 단백질이 축적되어 유도되는 알츠하이머병 또는 치매일 수 있으나, 이에 본 발명의 화학식 1의 화합물의 치료 및 예방 효과가 있는 질병이 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 용어, "아밀로이드 베타"는 아밀로이드 전구 단백질로부터 단백질 분해효소 작용에 의해 생성된 단백질로, 뇌 조직에 침착되면서 뇌세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대뇌의 신경세포가 변성하여 대량으로 사멸하는 경우 Aβ가 축적된 '노인 반점', '신경 원섬유 매듭'이라고 하는 섬유 모양의 구조가 신경 세포 내에서 보이며, 신경 세포는 세포사멸 기작에 의해 사멸하는 것으로 알려져 있다.

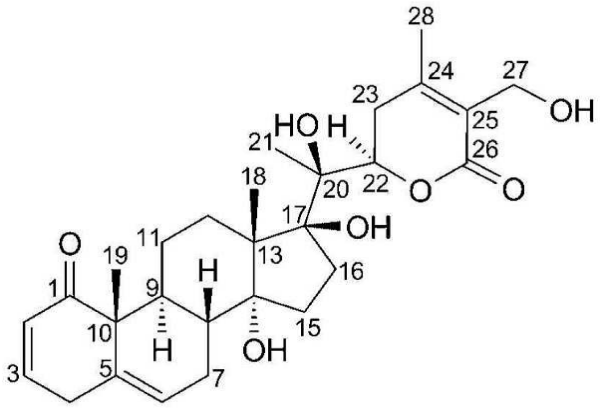
[0021] 일 구체예에 따르면 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 신경세포에서 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제할 수 있으며, 신경세포의 염증반응을 억제할 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르 브산과 같은 항산화제가있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0023] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으며, 일 구체예에 따르면 비경구 투여의 형태일 때 1 내지 100 mg/kg/day의 유효량으로 투여할 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0026] [화학식 1]

[0027] 

[0028] 본 발명의 건강식품은 상기 화학식 1의 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0029] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스켓, 떡, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0030] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화학식 1의 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화학식 1의 화합물을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0032] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0033] 일 구체예에 따르면 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 신경세포에서 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 HSP70의 발현을 촉진하고, BACE1의 발현을 억제하여 Aβ의 생성 및 응집을 억제하는 효능이 있으므로 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 코아귤란신 A(Coagulansin-A, Coa-A) 및 아밀로이드 베타 올리고머(AβO) 처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율을 나타낸 도이다.

도 2는 Coa-A 및 AβO 처리에 따른 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.

도 3은 Coa-A 및 AβO 처리에 따른 HSP70 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.

도 4는 APP/PS1 마우스에서 Coa-A 투여에 따른 HSP70 및 BACE1 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.

도 5는 APP/PS1 마우스의 피질 및 해마에서 Coa-A 투여에 따른 HSP70 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.

도 6은 APP/PS1 마우스에서 Coa-A 투여에 따른 아밀로이드 생성 경로의 작용 상태를 확인한 도이다.

도 7은 APP/PS1 마우스에서 Coa-A 투여에 따른 비-아밀로이드 생성 경로의 작용 상태를 확인한 도이다.

도 8은 APP/PS1 마우스에서 Coa-A 투여에 따른 수용성 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$의 수준을 확인한 도이다.

도 9는 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 Aβ 반점의 크기 및 반복 정도 변화를 확인한 도이다.

도 10은 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 Aβ 반점의 크기 및 반복 정도 변화를 확인한 도이다.

도 11은 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 Aβ 반점의 크기 및 반복 정도 변화를 확인한 도이다.

도 12는 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 HSP70 및 Aβ 변화를 확인한 도이다.

도 13은 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 미세아교세포의 활성 여부를 확인한 도이다.

도 14는 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 성상교세포의 활성 여부를 확인한 도이다.

도 15는 APP/PS1 마우스의 뇌에서 Coa-A 투여에 따른 염증 반응 관련 분자들의 발현을 확인한 도이다.

도 16은 APP/PS1 마우스의 뇌에서 전시냅스 단백질 및 후시냅스 단백질의 발현을 확인한 도이다.

도 17 APP/PS1 마우스의 뇌에서 전시냅스 단백질 및 후시냅스 단백질의 발현을 확인한 도이다.

도 18은 모리스 수중 미로 실험에서 Coa-A 투여 전의 훈련 기간 동안 탈출 시간을 확인한 도이다.

도 19는 모리스 수중 미로 실험에서 Coa-A 투여 전의 훈련 기간 동안 탈출 시간을 확인한 도이다.

도 20은 모리스 수중 미로 훈련 종료 후 프로브 테스트 결과를 확인한 도이다.

도 21은 Y-미로 실험에서 *Coa-A* 투여에 따른 행동 변경율을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실험방법**

[0041] **1. 코아귤란신 A(Coagulansin-A, Coa-A) 및 아밀로이드 베타 올리고머**

[0042] Coa-A는 퀘이드-아이-아잠 대학교(이슬라마바드, 파키스탄)의 Bushra Mirza 교수로부터 제공받았으며, 추출방법은 "*J. Nat. Prod.* 76, 22.28 (2013)"에 개시되어 있다.

[0043] 아밀로이드 베타 올리고머(Aβ oligomer, 이하 AβO로 표기함)는 Aβ 펩티드(Sigma, 미국)를 헥사플루오로 프로판올(hexafluoro propanol, HFIP)에 용해시키고, 초음파 분해(sonication) 및 필터레이션을 거친 후에 분주하여 -80℃에 보관하였다.

[0045] **2. 세포 실험**

[0046] **2-1. SH-SY5Y 세포 배양**

[0047] 인간 신경모세포종(neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포는 높은 농도의 D-글루코스, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, 이하 FBS로 표기함) 및 1% 항생제(penicillin-streptomycin)를 함유하고 있는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 이용하여 37℃ 및 5% CO_2를 포함하는 가습 조건에서 배양하였다. AβO는 0.5 ㎛, Coa-A는 20 ㎍/㎖ 농도로 처리하였다.

[0049] **2-2. MTT assay**

[0050] 세포의 생존율을 측정하기 위하여 3-[4, 5-dimethylthiazol- 2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide를 이용하여 MTT 실험을 수행하였다.

[0051] 구체적으로, SH-SY5Y 세포를 96-웰 플레이트에 200 ㎕ DMEM 배지와 함께$1X10^5$/웰 농도로 분주하여 배양하였다. 48시간 후에 AβO(0.5 ㎛) 단독, Coa-A 단독(10, 20 및 30 ㎍/㎖), 또는 $Aβ_{1-42}$ 및 Coa-A가 같이 포함되어 있는 배지로 각각 교체하여 추가로 배양하였다. 24시간 후에 5 ㎖/㎖ 농도로 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)에 용해시킨 MTT 용액을 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 4시간 동안 추가로 배양하였다. 이후, 포르마존을 용해시키기 위하여 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 10 내지 20분 동안 혼합시킨 후, ApoTox-Glo™(Promega, 미국)을 이용하여 흡광도(570 내지 630 ㎚)를 측정하였다.

[0053] **3. 실험 동물 및 약물 처리**

[0054] APP/PS1 이중 형질전환 마우스는 인간의 돌연변이 APP 유전자 및 돌연변이 PS1(preselin) 유전자가 삽입된 형질전환 동물로서, 노인 반점 및 아밀로이드 베타 축적이 유의하게 발생하여 AD의 신경병리학적 특성을 나타내는 동물이다.

[0055] 8 주령의 수컷 APP/PS1 이중 형질전환 마우스는 Jackson Laboratory(메인, 미국)에서, C57BL/6J 야생형 마우스는 샘타코 코리아(SAMTAKO Korea, 대한민국)에서 구입하여 25℃에서 12시간 명암주기 및 임의 섭식 조건으로 사육하였다. 동물의 희생 및 고통을 최소화하기 위하여 모든 노력을 하였으며, 실험 과정은 경상대학교 동물 윤리 위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[0056] 마우스의 연령이 12개월이 되었을 때 무작위로 네 그룹(n=10)으로 나누어 실험에 이용하였다: vehicle을 투여한 야생형 마우스, Coa-A를 투여한 야생형 마우스, vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스 및 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스. vehicle(0.9% 식염수) 또는 Coa-A(50 mg/kg)는 2주 동안 날마다 복강 내(inintraperiton, i.p.)에 투여하였다.

[0058] **4. 단백질 분석**

[0059] **4-1. 웨스턴 블롯팅**

[0060] BioRad protein assay kit(BioRad Laboratories, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 단백질 농도를 측정한 후, 20 ㎍의 단백질을 4 내지 12% Bolt™ mini gel(Novex, Life Technologies, 키리야트 시모나, 이스라엘)을 이용하여 전기영동하여 PVDF 막으로 트랜스퍼하였다. 이후 비특이적 결합을 줄이기 위하여 막을 5%(w/v) 스킴 밀크로 블록킹하고, 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 막을 세척하고, 2차 항체와 반응시킨 후 ECL 탐지 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 웁살라, 스웨덴)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 단백질 밴드를 확인하였다. 모든 엑스-레이 필름은 스캔한 후 시그마 젤 프로그램 버전 1.0(Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, 일리노이주, 미국)을 이용하여 밴드의 강도를 분석하였다.

[0061] 사용한 1차 항체는 항-HSP70, 항-p-IKK(Cell Signaling, 매사추세츠, 미국), 항-β-actin, 항-PSD95, 항-Iba-1, 항-GFAP, 항-amyloid C-terminus, 항-BACE-1, 항-phospho-tau(Ser413), 항-Synaptophysin, 항-ADAM10, 항-p-NF-κB, 항-COX2, 항-iNOS, 항-IL-1β, 항-IDE(Santa Cruz Biotechnology, 캘리포니아, 미국), 항-APP, 항-ADAM17(Abcam technologies, 영국) 및 항-amyloid 6E10(BioLegends, 캘리포니아, 미국)이다.

[0063] **4-2. 효소면역(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석**

[0064] 마우스 뇌 분쇄액(homogenate) 내의 수용성 $Aβ_{1-42}$ 및 $Aβ_{1-40}$ 농도는 Human $Aβ_{1-42}$ 및 $Aβ_{1-40}$ EILSA kits(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0066] **5. 뇌 조직 분석**

[0067] **5-1. 뇌 단면 슬라이드 제작**

[0068] 조직 분석을 위하여 얼음으로 냉각시킨 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 마우스에 경심관류로 관류시키고, 뇌를 4% 파라포름알데하이드로 72시간 동안 후고정(post-fix)시킨 후 20% 수크로오스에 72시간 동안 보관하였다. 뇌를 O.C.T compound(A.O, 미국)로 얼리고, CM 3050C 크라이오스탯(Leica, 독일)을 이용하여 14-㎛ 두께로 관상면(coronal sections)을 잘랐다. 자른 관상면은 probe-on plus charged slide(Fisher, 일리노이주, 미국)에 녹이면서 붙였다.

[0070] **5-2. 면역형광 분석**

[0071] 뇌 조직 내의 단백질 발현을 확인하기 위하여 형광염색을 실시하였으며, 이중염색을 위하여 염색 과정은 병행하여 진행하였다.

[0072] 구체적으로, 슬라이드를 0.01 M PBS로 15분씩 두 번 세척하고, 프로테이나아제-k 용액을 첨가하여 37℃에서 5분 동안 반응시켰다. 이후 5% 정상 염소 혈청, 0.3% 트리톤 X-100 및 PBS로 이루어진 블록킹 용액과 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 1:100으로 희석한 1차 항체를 처리하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 TRITC- 또는 FICT가 결합된 2차 항체(Santa Cruz)를 PBS로 1:50으로 희석하여 90분 동안 반응시킨 후 슬라이드를 Prolong Antifade Reagent(Molecular Probe, 유진, 미국)로 마운팅하여 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Flouview FV 1000, Olympus, 일본)으로 관찰하였다.

[0074] **5-3. 티오플라빈 S 염색(thioflavin S staining)**

[0075] 뇌에 있는 아밀로이드 플라크(amyloid plaques)를 확인하기 위하여 티오플라빈 S 염색을 실시하였다.

[0076] 구체적으로, 슬라이드를 0.01 M PBS로 10분씩 두 번 세척하고, 1% 티오플라빈 S 용액에 담근 후 실온에서 20분 동안 방치하였다. 이후 70% 에탄올에 5분 동안 담근 후 물로 2번 세척하고, 요오드화 프로피디움(propidium iodide, PI)으로 대조염색(counterstaining)한 후 커버슬립을 덮어 관찰하였다.

[0078] **6. 모리스 수중 미로 실험 및 Y-미로 실험**

[0079] **6-1. 모리스 수중 미로 실험**

[0080] 해마-의존적(hippocampus-dependent) 학습 및 기억 능력을 평가하기 위하여, 모리스 수중 미로 실험을 실시하였다.

[0081] 마우스(n=10/그룹)는 연속 3일 동안 하루에 2번씩 훈련받았으며, 모리스 수중 미로에서 60초 이상의 시간 동안 마우스가 숨겨진 도피대를 찾는 탈출 시간을 계산하였다. 마우스가 60초 동안 도피대를 발견하지 못할 경우, 도피대로 안내하여 도피대에서 30초 동안 머무르도록 하였다. 2주 동안 Coa-A 또는 vehicle을 투여한 후에, 연속 5일 동안 훈련을 계속하였고, 탈출 시간을 평가하였다. 마우스는 3일 동안 휴식을 취하게 한 후 숨겨진 도피대 없이 프로브 테스트를 수행하여 도피대가 있던 사분면에서 소비하는 시간을 기록하였다.

[0083] **6-2. Y-미로 실험**

[0084] 해마-의존적 공간 기억 능력을 평가하기 위하여 Y-미로 실험을 실시하였다. 훈련 기간 후에, 마우스를 Y 미로의 중앙에 놓아 8분 동안 무작위로 자유롭게 이동하도록 허용하였으며, 가지에 들어간 총 횟수 및 성공적인 트리플을 행동 소프트웨어 시스템으로 기록하였다. 변경 행동율(alteration behavior percentage, %)은 [성공적인 트리플 세트(/가지에 들어간 전체 횟수-2]*100으로 계산하였다. 변경 행동율의 비율은 공간 작업 기억 능력과 양의 상관관계가 있다.

[0086] **7. 통계 분석**

[0087] 단백질 밴드의 밀도는 임의 단위(arbitrary units)로 평균±표준 평균 오차(standard error mean, SEM) 수치를 표기하였다. 통계적 분석은 모든 실험에서 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 수행하였고, Prism 5(graph Pad Software, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 Student's t-test를 추가로 실시하였다. 형태 분석 결과 및 아밀로이드 반점에 대한 결과는 Image J software(미국의 국립보건원에서 제공하는 공개 소프트웨어)를 이용하여 분석하였으며, Integral Optical Densities(IODs)로 표시하였다. 결과값이 $p<0.05$, 0.01 및 0.001일 경우 유의한 것으로 판단하였다.

[0089] **실험결과**

[0090] **1. Coa-A 처리에 의한 신경세포의 생존율 분석 결과**

[0091] Coa-A 처리에 의한 세포 생존율 변화를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, AβO(0.5 ㎛)를 처리한 실험군은 대조군과 비교하여 SH-SY5Y 세포 생존율이 현저히 감소하고, Coa-A를 처리한 실험군은 세 농도 모두(10, 20 및 30 ㎍/㎖)에서 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 반면에 AβO 및 Coa-A를 같이 처리한 실험군은 AβO만 처리한 실험군과 비교하여 세포 생존율이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 1).

[0093] **2. Coa-A 처리에 의한 단백질 발현 변화 분석**

[0094] SH-SY5Y 세포에서 AβO(0.5 ㎛) 처리에 의한 HSP70 및 BACE1 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

[0095] 그 결과, AβO를 처리한 실험군의 경우 시간 의존적으로 6, 12 및 24 시간(각각 $p<0.05$, 0.01 및 0.001) 모두에서 HSP70 단백질의 발현은 현저하게 감소하고, BACE1 단백질의 발현은 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 반면, Coa-A를 처리한 실험군은 세 농도 모두(10, 20 및 30 ㎍/㎖)에서 AβO 처리에 의한 HSP70 단백질의 발현 억제를 역전하여 HSP70 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(24 시간에서 가장 유의한 증가를 보임; $p<0.001$)(도 3).

[0097] **3. Coa-A 투여에 의한 뇌 조직 내 단백질 발현 변화 분석**

[0098] 알츠하이머 동물 모델인 APP/PS1 마우스에서 HSP70의 발현에 Coa-A가 미치는 영향을 확인하였다.

[0099] 웨스턴 블롯 결과, 야생형 마우스와 비교하여 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스에서 HSP70 단백질의 발현이 감소하였으며, 대조적으로 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스에서는 HSP70 단백질의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 또한, Coa-A를 투여시 APP/PS1 마우스의 뇌에서 BACE1 단백질의 발현이 현저하게 억제된 것을 확인하였다(도 4).

[0100] 또한, 면역형광 염색 결과를 통하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스의 해마 및 피질(cortex)에서 HSP70의 발현이 증가하고, vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스에는 감소하는 것을 확인하였다(도 5).

[0102] **4. Coa-A 투여에 의한 뇌 조직 내 Aβ의 생산 및 응집 개선 효과 분석**

[0103] HSP70 단백질은 단백질의 응집을 억제하고, 뉴런을 보호하는 것으로 알려져 있다. 따라서, APP/PS1 마우스에서 Aβ의 생산 및 응집에 Coa-A가 미치는 영향을 조사하였다.

[0104] 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 야생형 마우스와 비교하여 APP/PS1 마우스에서 아밀로이드 생성 경로(amyloidogenic pathway)의 활성이 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 구체적으로, 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP), Aβ 올리고머, 섬유성 Aβ(fibrillar Aβ) 및 인산화된 타우(phosphor tau) 단백질의 양이 유의하게 증가하였다. 반면, Coa-A를 2주 동안 투여한 APP/PS1 마우스에서는 상기 단백질들의 발현이 감소하였으며, 아밀로이드 생성 반응이 억제되는 것을 확인하였다(도 6).

[0105] 또한, Coa-A를 투여한 경우 ADAM10(A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) 및 ADAM17과 같은 α-세크레타아제(s-APP α) 유전자 발현이 증가하여 비-아밀로이드 생성 경로(non-amyloidogenic pathway)가 작용하는 것을 확인하였다(도 7).

[0106] 아울러 마우스의 뇌 분쇄액에서 수용성 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$의 수준을 측정한 결과, vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스에서 수용성 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$이 감소한 것을 확인하였다(도 8).

[0107] 또한, 뇌 조직의 티오플라빈 S 및 Aβ(C-말단 및 6E10) 염색을 비교한 결과, 야생형 마우스와 비교하여 APP/PS1 마우스의 해마 및 피질에서는 Aβ 반점 및 Aβ의 양이 증가하고, Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스에서는 Aβ의 양이 감소할 뿐만 아니라 Aβ 반점의 크기 및 반복 정도가 감소하는 것을 확인하였다(도 9 내지 도 11).

[0108] 또한, 뇌 조직에서 HSP70 및 Aβ를 이중 염색한 결과, Coa-A 투여에 의하여 뇌의 해마 및 피질에서 HSP70 단백질 발현이 현저하게 증가하고, Aβ의 응집이 감소하는 것을 확인하였다(도 12).

[0110] **5. Coa-A 투여에 의한 뇌 조직 내 신경염증(neuroinflammation) 억제효과 분석**

[0111] 미세아교세포(microglia) 및 성상교세포(astrocyte)를 포함한 활성화된 교세포(glial cell) 및 연관된 신경염증은 AD 뇌의 중요한 특징 중의 하나이다. 따라서, Coa-A 투여가 교세포의 활성 및 신경염증에 미치는 영향을 확인하였다.

[0112] 미세아교세포 마커인 Iba1(ionized calcium-binding adapter molecule 1) 및 성상교세포 마커인 아교섬유산성 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)의 발현을 면역형광 염색으로 확인한 결과, vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스의 뇌에는 현저하게 많은 수의 활성화된 교세포가 있는 것을 확인하였다. 반면에 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스의 뇌에서는 교세포의 활성이 억제된 것을 확인할 수 있었다(도 13 및 도 14).

[0113] 또한 NF-κB 활성화 경로는 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, Coa-A 투여에 의한 영향을 확인하였다.

[0114] 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 야생형 마우스와 비교하여 vehicle을 투여한APP/PS1 마우스에서 인산화된 NF-κ

B, 인산화된 IκB kinase(IKK), 고리형 산화효소2(cyclooxygenase2, COX2), 유도형 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthetase), 인터루킨-1 베타(IL-1β)의 수준이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(p<0.001). 반면 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스에서는 상기 분자들의 발현이 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(p<0.001)(도 15).

[0116] **6. Coa-A 투여에 의한 전- 및 후시냅스 기능 장애(pre- and postsynaptic dysfunction) 개선 효과 분석**

[0117] Coa-A가 전- 및 후시냅스 단백질(pre- and postsynaptic protein) 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0118] 뇌 분쇄액에서 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 야생형 마우스와 비교하여 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스에서 시냅토파이신(synaptophysin, SYP) 및 PSD95(postsynaptic density protein 95)의 발현이 감소하고, Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스에서는 발현이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 16).

[0119] 또한, 뇌의 피질 및 해마의 치아 이랑(dentate gyrus, DG)에서 SYP 및 PSD95를 염색한 결과 상기와 유사한 결과를 확인하였다(도 17).

[0121] **7. Coa-A 투여에 의한 학습 및 기억력 개선 효과 분석**

[0122] 학습 및 공간 기억 능력을 평가하기 위하여 미로 실험을 수행하였다.

[0123] Vehicle 또는 Coa-A 투여 전의 훈련에서 1일 차에 야생형 마우스 및 APP/PS1 마우스가 숨겨진 도피대를 찾는 탈출 시간을 비교한 결과, APP/PS1 마우스가 약간 높은 것을 확인하였다. 2일 및 3일 차에는 두 마우스 모두 탈출 시간이 감소한 양상을 나타내었으나, APP/PS1 마우스와 비교하여 야생형 마우스가 현저하게 감소한 탈출 시간을 나타내었다(도 18).

[0124] Coa-A를 2주 동안 투여한 이후 탈출 시간을 측정한 결과, 1일 차에서는 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스의 탈출 시간이 현저한 비율로 감소한 것을 확인하여, 학습 능력이 향상된 것을 알 수 있었다. 또한, 훈련 2일에서 5일 차까지 비교한 결과 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스의 탈출 시간이 유의하게 낮은 것을 확인하였다(도 19).

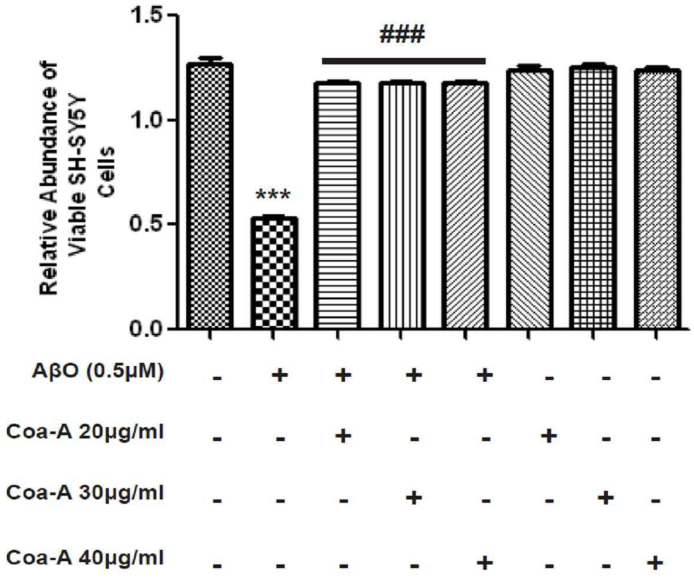
[0125] 공간 기억 유지 능력을 확인하기 위하여, 프로브 테스트를 실시하여 도피대를 제거하고, 도피대가 있던 표적 사분면에서 체류하는 시간을 측정하였다. 그 결과 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스가 표적 사분면에서 더 긴 시간을 체류하는 것을 확인하였다(도 20).

[0126] 또한, 단기 기억에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Y-미로 실험을 실시한 결과, 야생형 마우스와 비교하여 vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스의 변경 행동율이 더 낮았으며, vehicle을 투여한 APP/PS1 마우스와 비교하여 Coa-A를 투여한 APP/PS1 마우스의 변경 행동율이 더 높은 것을 확인하였다(도 21).

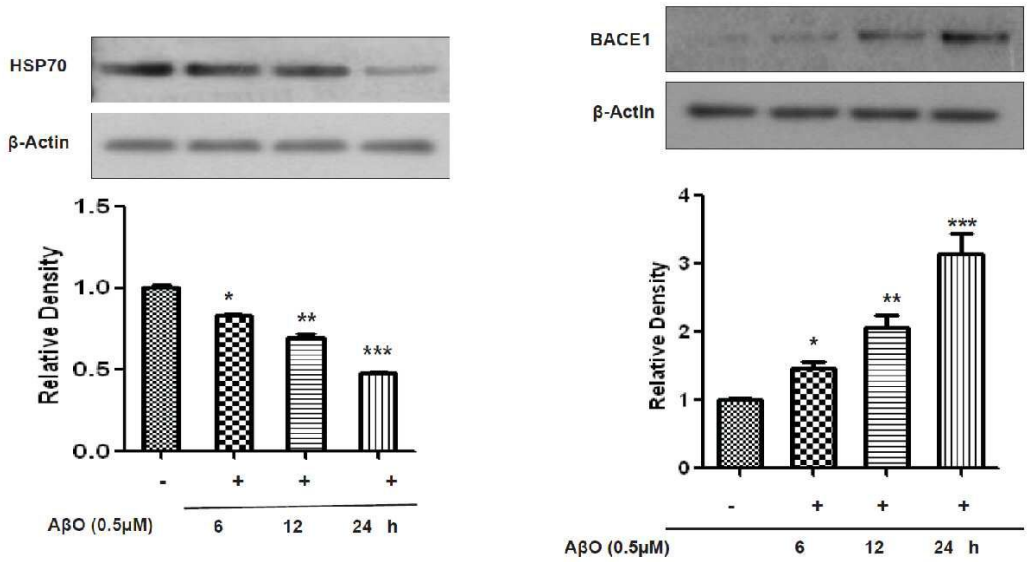
[0128] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

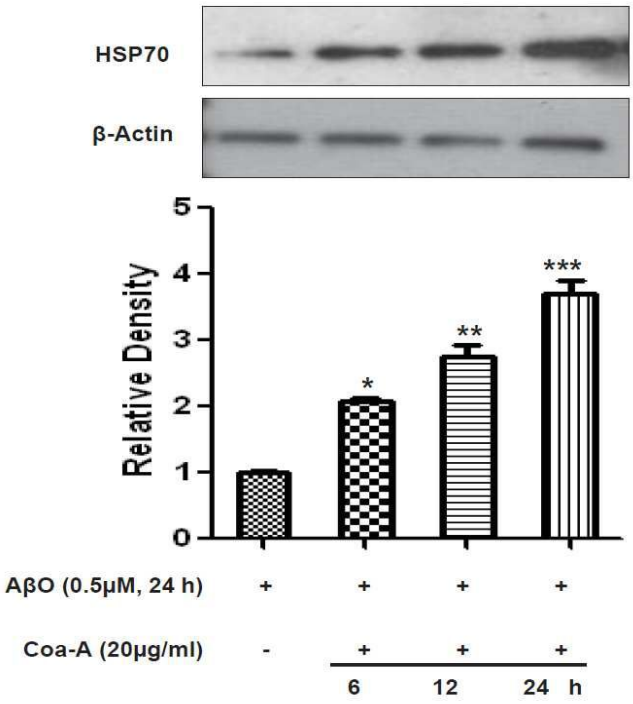
도면1


Relative Abundance of Viable SH-SY5Y Cells
1.5
1.0
0.5
0.0
###
***
AβO (0.5μM) - + + + + - - -
Coa-A 20μg/ml - - + - - + - -
Coa-A 30μg/ml - - - + - - + -
Coa-A 40μg/ml - - - - + - - +

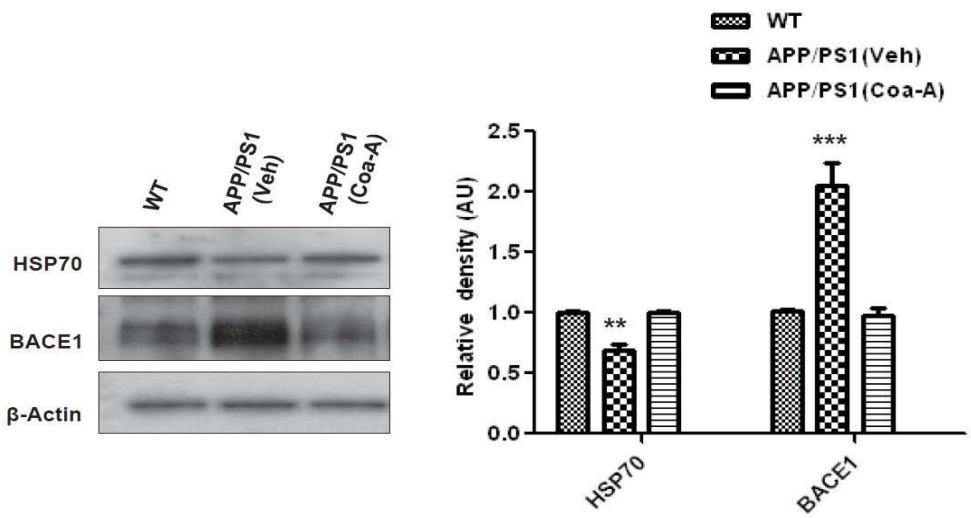
도면2


HSP70
β-Actin
Relative Density
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
***
- + + +
AβO (0.5μM) 6 12 24 h
BACE1
β-Actin
Relative Density
4
3
2
1
0
*
**
***
- + + +
AβO (0.5μM) 6 12 24 h

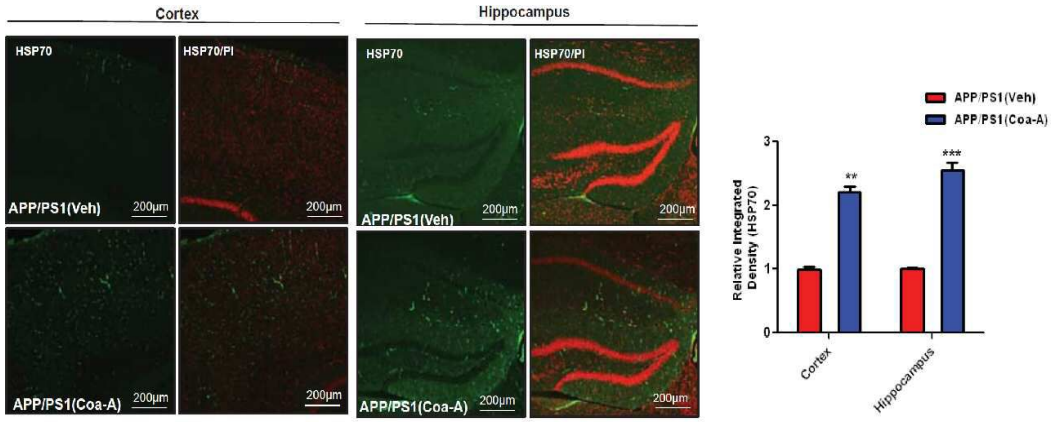
도면3


HSP70
β-Actin
Relative Density
0
1
2
3
4
5
*
**
***
AβO (0.5μM, 24 h) + + + +
Coa-A (20μg/ml) - + + +
6 12 24 h

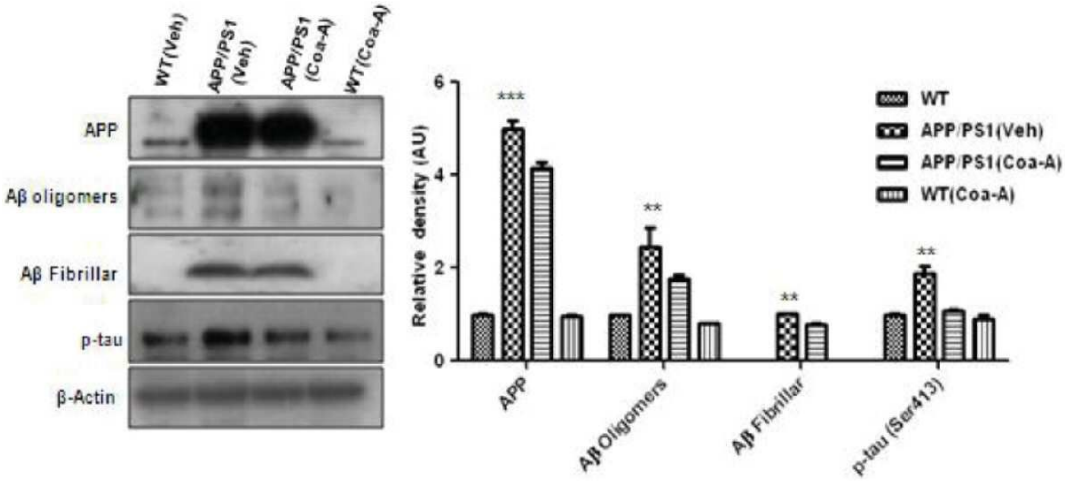
도면4


WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
HSP70
BACE1
β-Actin
Relative density (AU)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
**
***
HSP70
BACE1

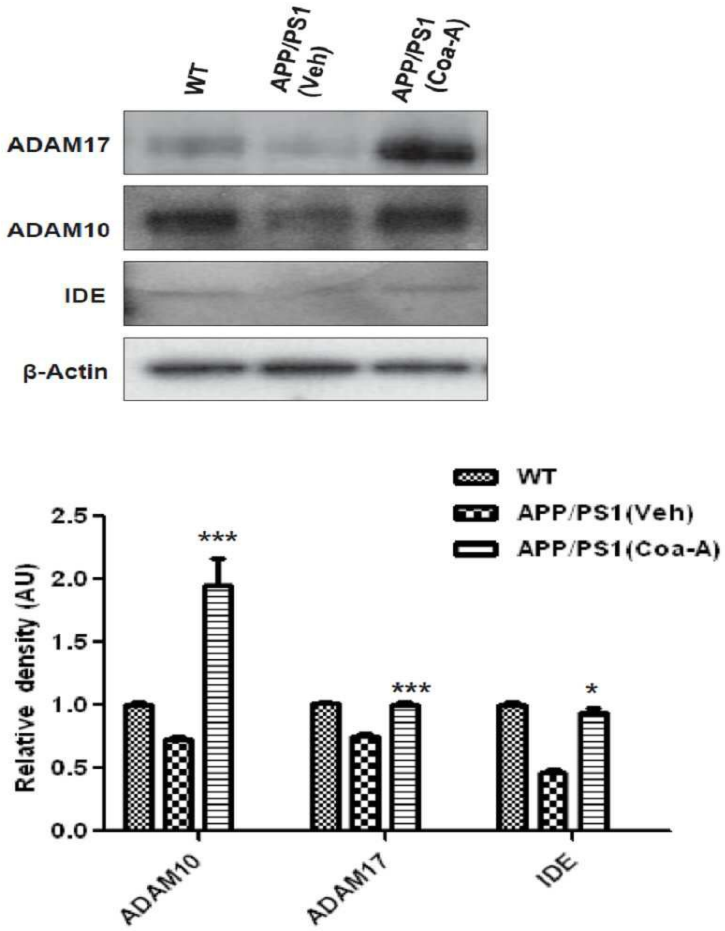
도면5


Cortex
Hippocampus
HSP70
HSP70/PI
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
200μm
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (HSP70)
Cortex
Hippocampus

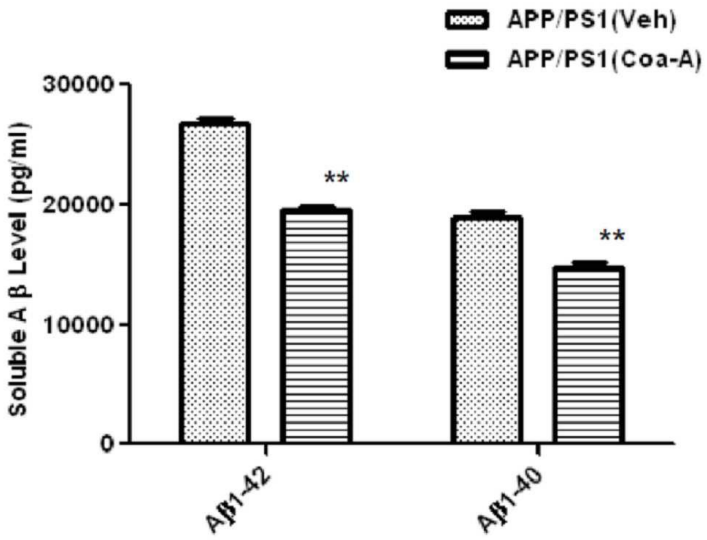
도면6


WT(Veh)
APP/PS1 (Veh)
APP/PS1 (Coa-A)
WT(Coa-A)
APP
Aβ oligomers
Aβ Fibrillar
p-tau
β-Actin
Relative density (AU)
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
WT(Coa-A)
APP
Aβ Oligomers
Aβ Fibrillar
p-tau (Ser413)

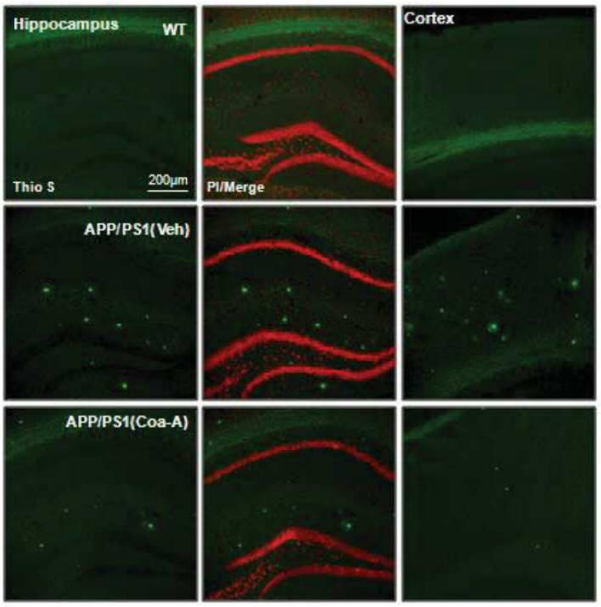
도면7

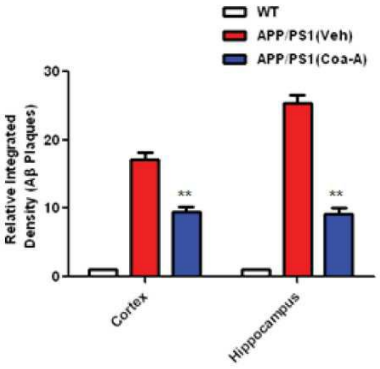

WT
APP/PS1 (Veh)
APP/PS1 (Coa-A)
ADAM17
ADAM10
IDE
β-Actin
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative density (AU)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
*
ADAM10
ADAM17
IDE

도면8

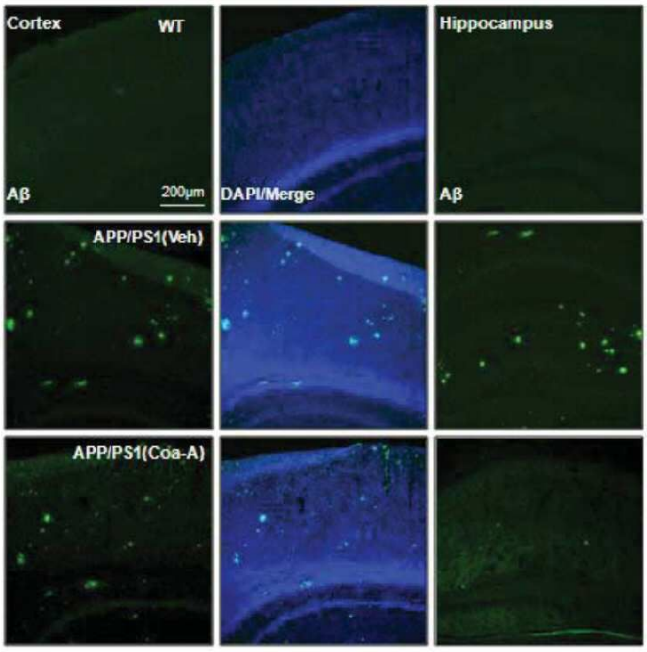

APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Soluble A β Level (pg/ml)
30000
20000
10000
0
**
**
Aβ1-42
Aβ1-40

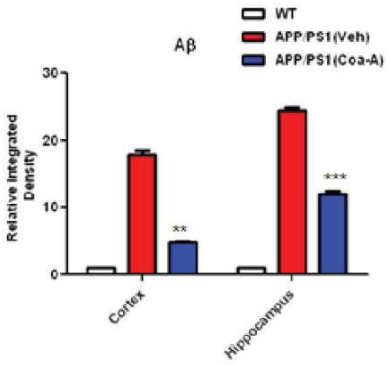
도면9


Hippocampus
WT
Thio S
200μm
PI/Merge
Cortex
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)

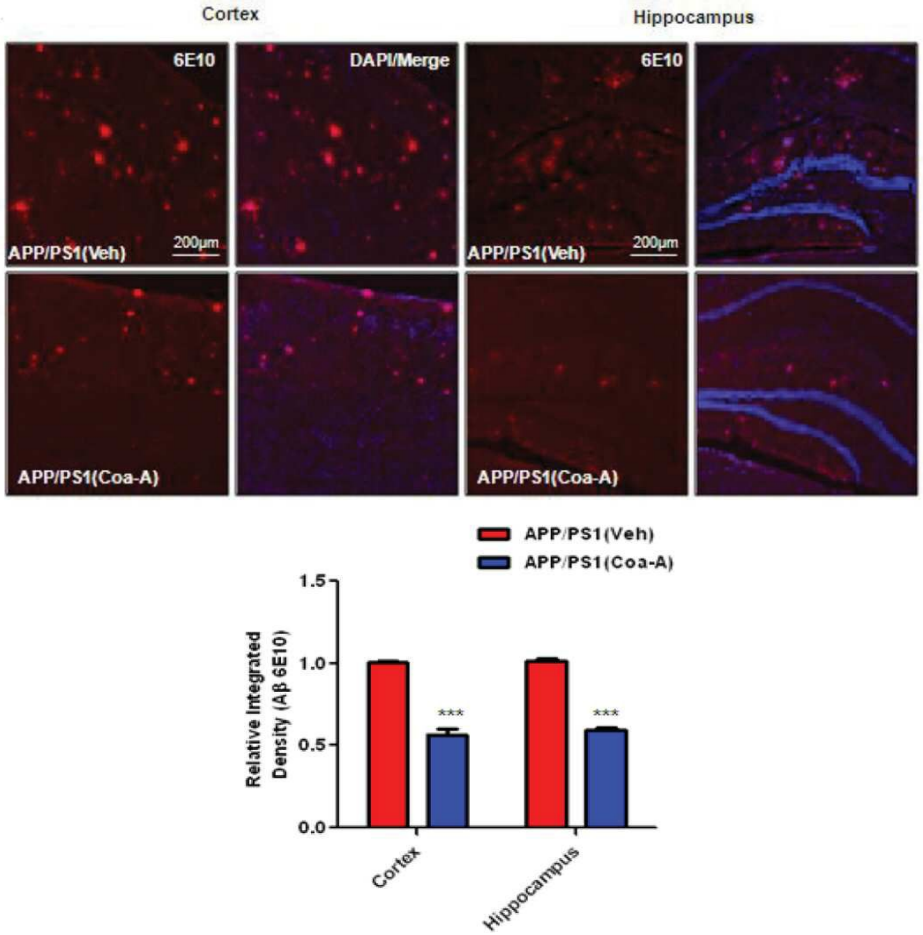

WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (Aβ Plaques)
30
20
10
0
**
**
Cortex
Hippocampus

도면10

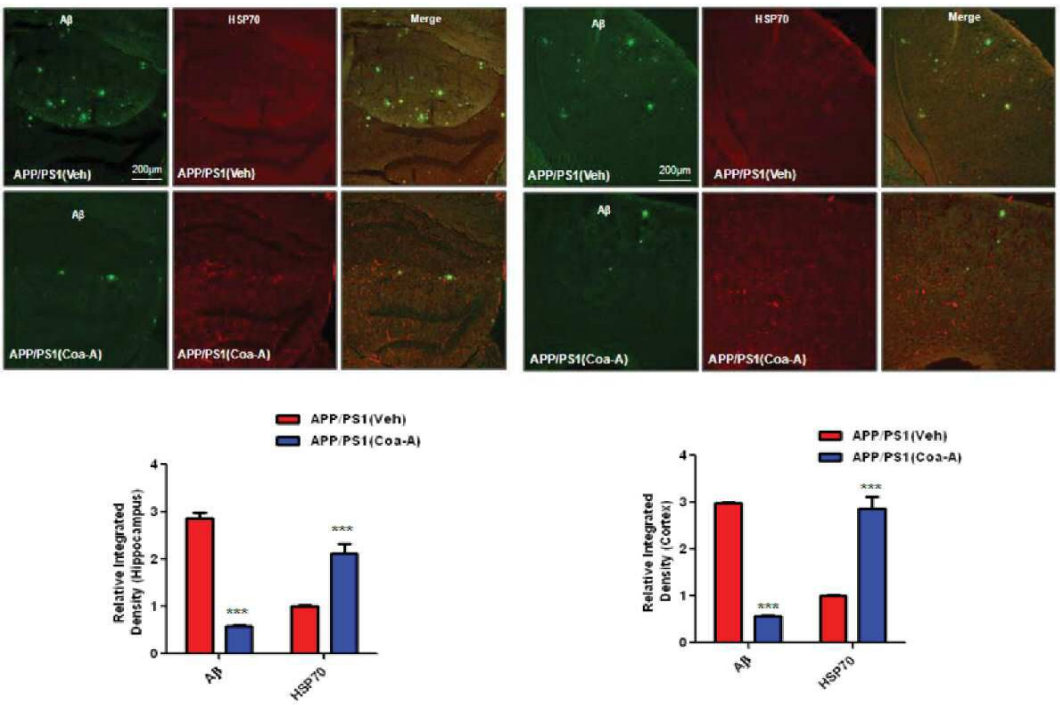

Cortex
WT
Aβ
200μm
DAPI/Merge
Hippocampus
Aβ
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)


Aβ
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density
30
20
10
0
**
***
Cortex
Hippocampus

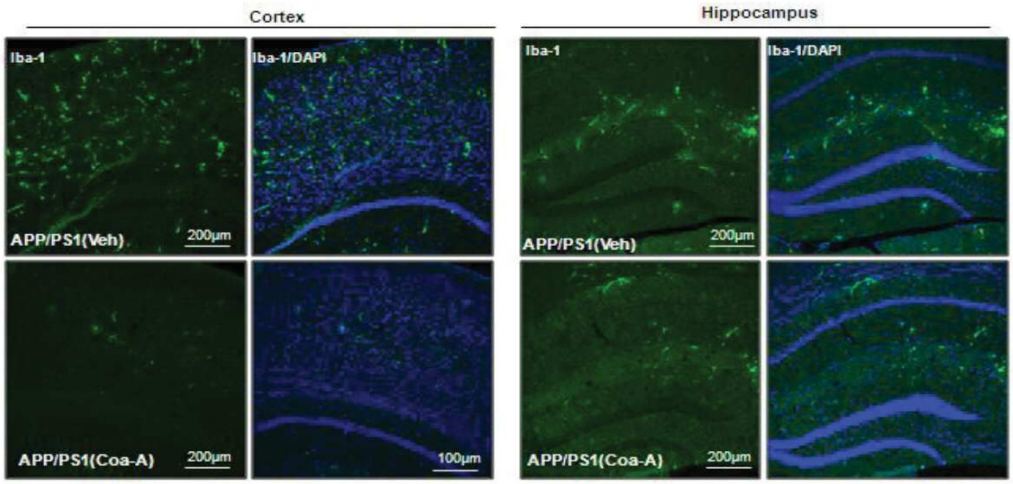
도면11

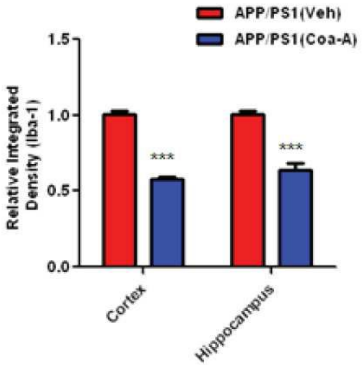

Cortex
Hippocampus
6E10
DAPI/Merge
6E10
APP/PS1(Veh)
200μm
APP/PS1(Veh)
200μm
APP/PS1(Coa-A)
APP/PS1(Coa-A)
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (Aβ 6E10)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
Cortex
Hippocampus

도면12

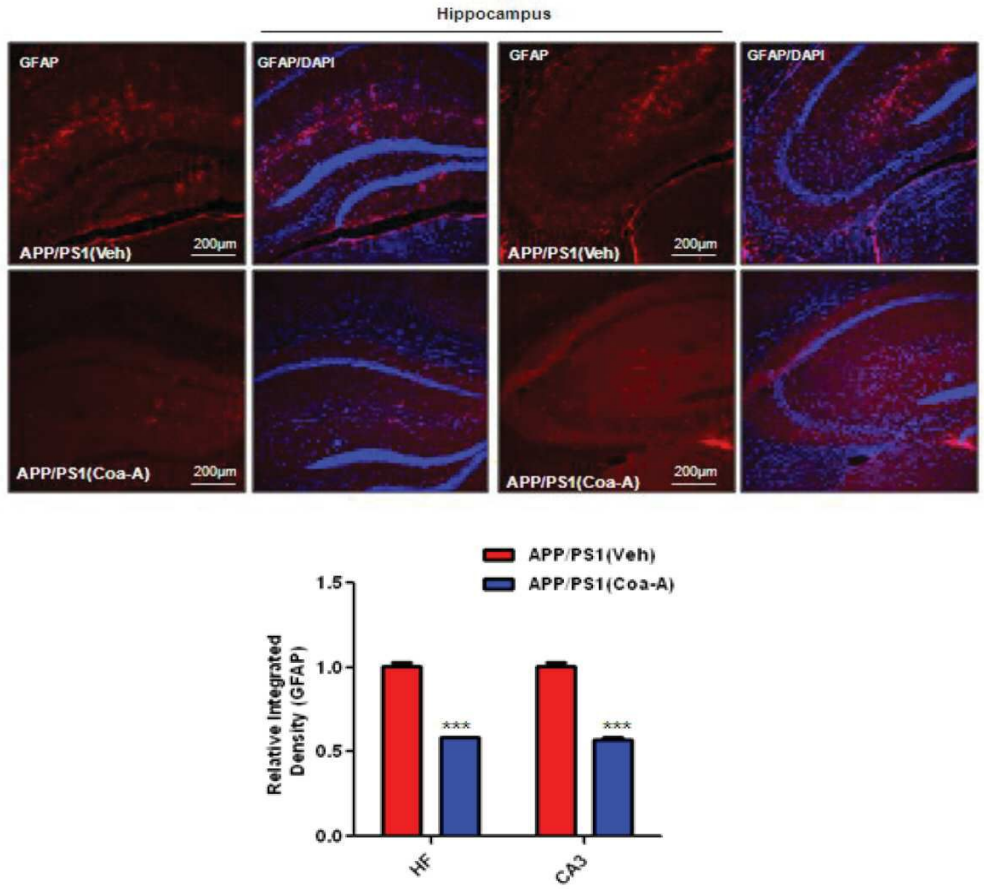

Aβ
HSP70
Merge
APP/PS1(Veh)
200μm
APP/PS1(Coa-A)
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (Hippocampus)
Relative Integrated Density (Cortex)
***
Aβ
HSP70

도면13

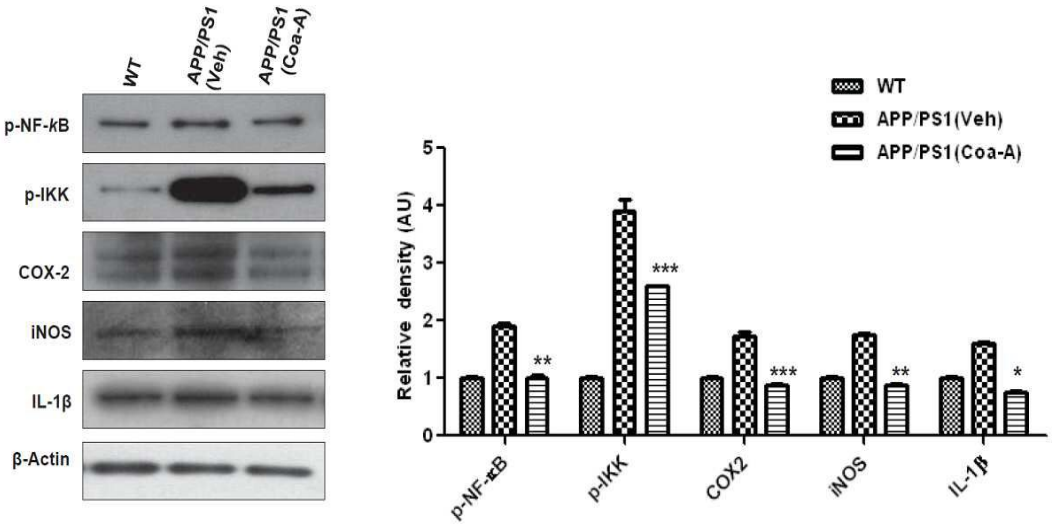

Cortex
Hippocampus
Iba-1
Iba-1/DAPI
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
200μm
100μm


APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (Iba-1)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
Cortex
Hippocampus

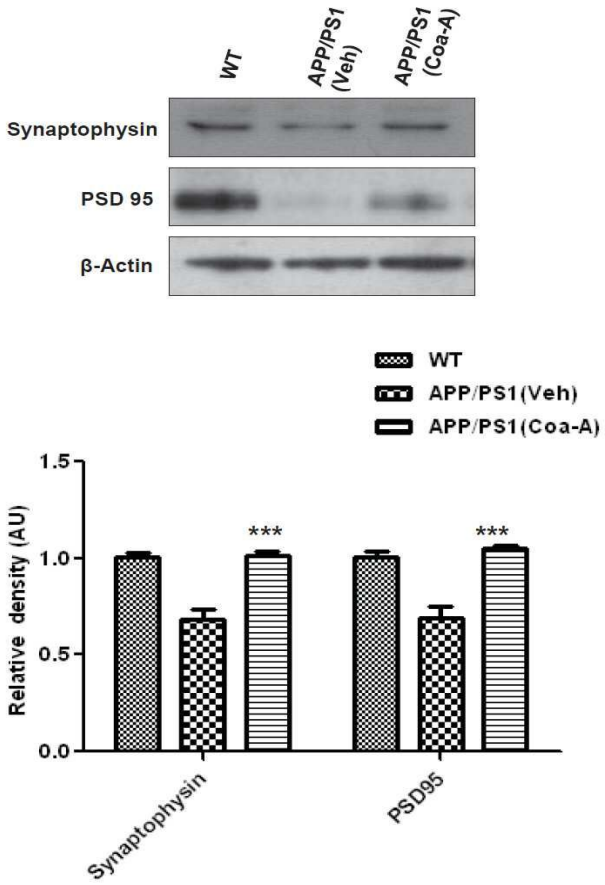
도면14


Hippocampus
GFAP
GFAP/DAPI
APP/PS1(Veh)
200μm
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density (GFAP)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
HF
CA3

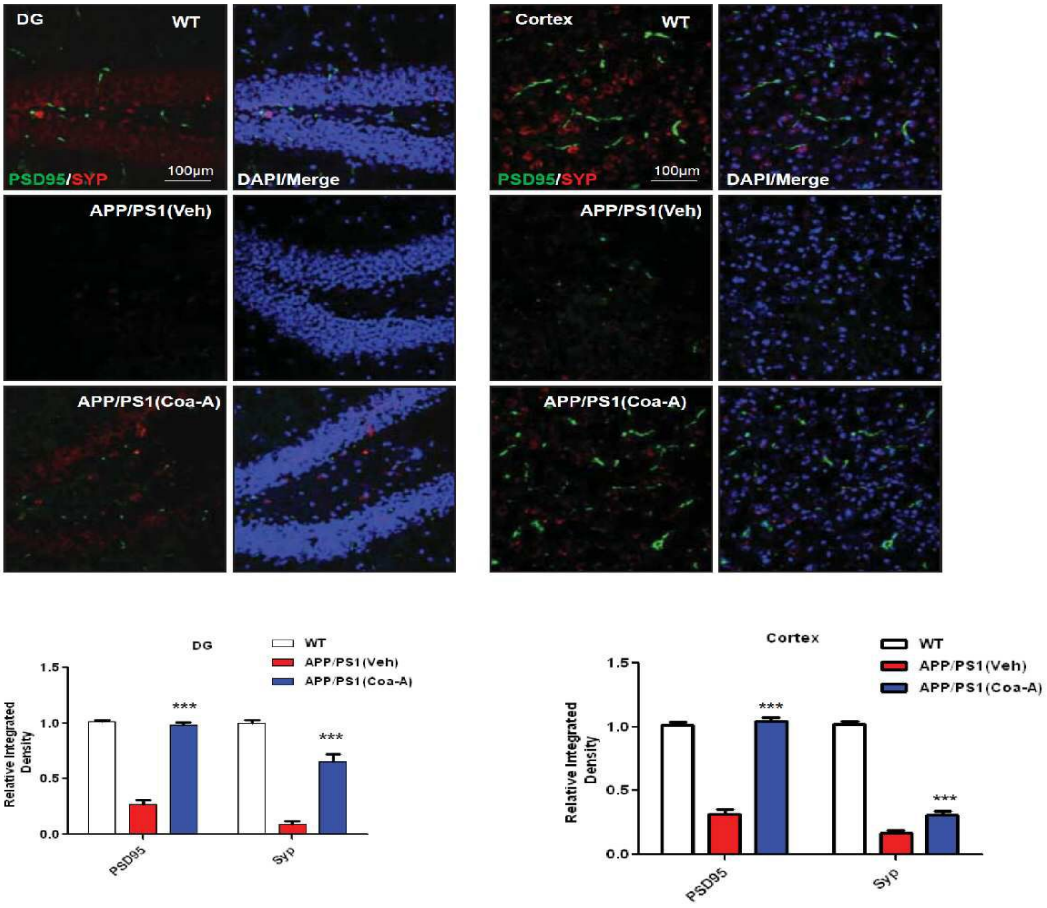
도면15


WT
APP/PS1 (Veh)
APP/PS1 (Coa-A)
p-NF-κB
p-IKK
COX-2
iNOS
IL-1β
β-Actin
Relative density (AU)
5
4
3
2
1
0
**
***
p-NF-κB
p-IKK
COX2
iNOS
IL-1β
*

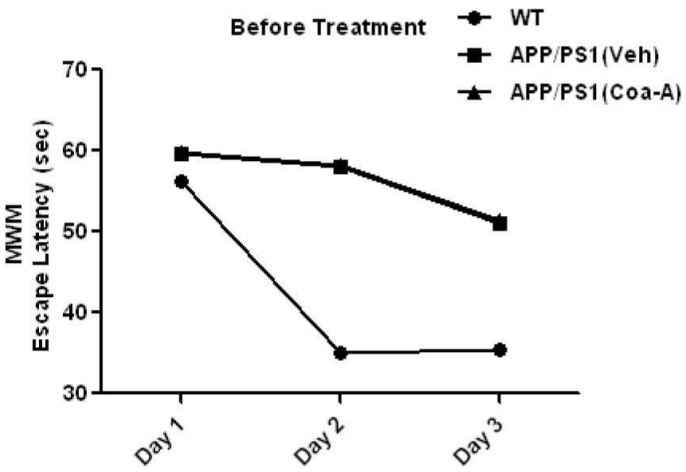
도면16


WT
APP/PS1 (Veh)
APP/PS1 (Coa-A)
Synaptophysin
PSD 95
β-Actin
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative density (AU)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
Synaptophysin
PSD95

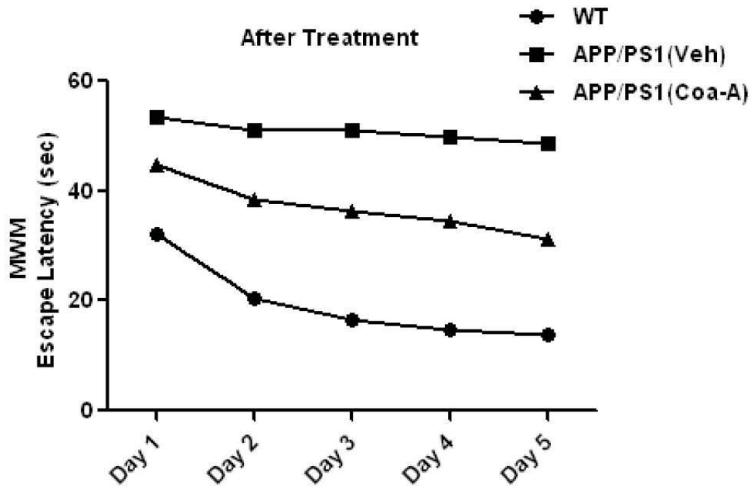
도면17


DG
WT
PSD95/SYP
100μm
DAPI/Merge
Cortex
WT
PSD95/SYP
100μm
DAPI/Merge
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
DG
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
PSD95
Syp
Cortex
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
Relative Integrated Density
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
PSD95
Syp

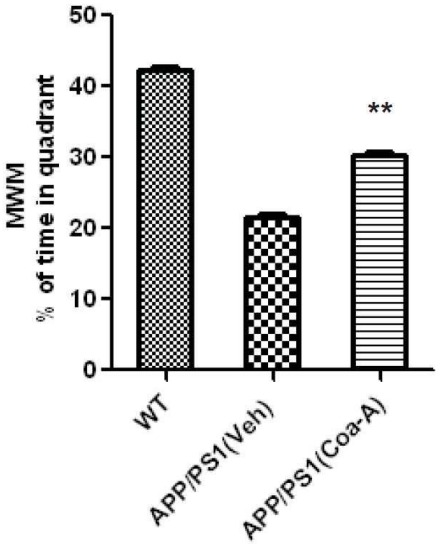
도면18


Before Treatment
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
MWM
Escape Latency (sec)
70
60
50
40
30
Day 1
Day 2
Day 3

도면19


After Treatment
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)
MWM
Escape Latency (sec)
60
40
20
0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5

도면20


MWM
% of time in quadrant
50
40
30
20
10
0
**
WT
APP/PS1(Veh)
APP/PS1(Coa-A)

도면21

