

Epigallocatechine gallate에 의한 amyloid β peptide 유도성 신경세포독성의 억제

김민석, 정지연, 김은철, 김현진, 김원재, 이은주, 김선현
전남대학교 치의학전문대학원 치의학연구소

간추림 : 본 연구는 PC12 세포에서 amyloid β peptide ($A\beta$)에 의한 신경독성의 신호전달과정을 구명하며, 녹차의 주요성분으로 강력한 항산화 효과를 나타내는 epigallocatechin gallate (EGCG)에 의한 신경손상 억제효과를 구명하기 위해 시행되었다.

흰쥐 갈색세포종에서 유래한 세포주인 PC12 세포를 사용하였으며, MTT 환원능을 이용하여 $A\beta$ 의 세포독성을 조사하였고, Diff-Quick 염색법을 이용하여 형태적 변화를 관찰하였다. $A\beta$ 에 의한 PC12 세포의 죽음과 이를 억제하는 EGCG의 작용기전도 신호전달과정을 알기 위해 활성산소종(ROS) 측정, western blot, RT-PCR 등의 방법을 사용하였다.

$A\beta$ 에 의한 세포독성은 농도 의존적으로 나타났으며 이는 배양 세포의 핵분열화를 비롯한 세포자멸사와 유사한 형태적 변화에 의해 확인되었다. $A\beta$ 에 의한 세포독성은 EGCG의 전처치에 의해 효과적으로 억제되었다. 또한 EGCG는 $A\beta$ 투여 후 발생하는 활성산소종을 ROS 제거제인 NAC(N-acetyl cystein)의 처치 수준으로 감소시켰다. 세포죽음의 신호전달과정 중 사립체 의존 경로에 관련된 단백질인 세포질 내 cytochrome c의 발현양은 $A\beta$ 투여 후 12시간부터 증가하였으며, EGCG에 의해 현저히 감소하였다. 세포질 내 cytochrome c의 유리를 조절하는 Bax/Bcl-2의 발현양상을 RT-PCR을 통해 확인하였다. $A\beta$ 는 Bax의 발현을 증가시켰으나, Bcl-2의 발현에는 영향을 주지 않았으며, EGCG는 $A\beta$ 에 의한 Bax의 증가를 억제하였다.

이상의 결과로 $A\beta$ 에 의한 신경세포 독성은 ROS 및 세포죽음의 사립체 의존 경로에 의한 것으로 보이며, EGCG는 항산화효과 외에도 세포죽음의 사립체 의존 경로와 관련한 단백질의 발현 억제를 통해 효과적으로 신경세포를 보호하는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : amyloid β peptide, PC12 세포, epigallocatechine gallate, 세포독성

서 론

Amyloid β peptide ($A\beta$)의 침적으로 생기는 노인반(senile plaque)의 독성에 의한 신경세포죽음과 과인산화 tau 단백질(hyperphosphorylation tau protein)의 침적에 의한 신경섬유다발(neurofibrillary tangle)의

작용으로 신경퇴행을 일으키는 것이 Alzheimer 병의 대표적 병인으로 제시되고 있다(Drouet 등 2000, Harkany 등 2000, Neve 등 2000). $A\beta$ 는 40~42개의 아미노산으로 이루어진 peptide로서 amyloid 전구체로부터 유래하며, 일차배양세포와 세포주를 대상으로 한 많은 실험결과 $A\beta$ 응집체가 신경세포독성을 나타냄이 알려졌다(Giovanelli 등 1998, Fukuda 등 1999). $A\beta$ 가 신경독성을 나타내는 자세한 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 유리기(free radical) 가설이 주목을 받고 있다. 즉 신경세포를 $A\beta$ 에 노출시키면

*이 논문은 2002년도 한국 학술진흥재단 신진교수연구과제 지원(과제번호: 2002-003-E00147)에 의하여 연구되었음.
교신저자: 김선현(전남대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실)
전자우편: ksh@chonnam.ac.kr

세포내 활성산소의 농도가 증가하며, 이러한 활성산소를 소거할 수 있는 항산화제나 항산화 효소를 첨가하면 A β 의 독성이 완화된다는 것이다 (Behl과 Sagara 1997, Pappolla 등 1998).

신경세포의 죽음은 허혈상태, nitric oxide, CoCl₂, 6-hydroxydopamine 등의 다양한 조건에서 유발되는 것으로 보고되고 있다 (Nie 등 2002, Zou 등 2002, Zhu 등 2003). 그러나 각각의 자극에 따라 다양한 신호전달과정을 거치고 있는 것으로 알려져 있다. 최근의 보고들은 신경세포의 죽음과 관련하여 활성산소종 이외에도 사립체가 중요한 역할을 하고, 이곳으로부터 cytochrome c가 다양한 신호에 반응하여 세포질 내로 유리되어 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)과 복합체를 형성함으로써 caspase cascade를 활성화시킨 후 세포죽음을 야기한다 (Zou 등 1999, Shimizu 등 2000, Soeda 등 2001). 따라서 cytochrome c는 사립체의 기능 이상을 동반하는 Alzheimer 병에서 신경세포죽음을 일으키는데 참여하는 중요한 물질로 생각되고 있다.

한편, EGCG는 녹차의 주성분으로 superoxide radical, hydroxyl radical, peroxy radical 같은 free radical을 소거할 수 있을 뿐만 아니라 구리나 철 같은 전이금속과 결합함으로써 강한 항산화제로 작용하는 flavonoid 화합물이다 (Hanasaki 등 1994, Hodnick 등 1994, Morel 등 1994). 또한 이들은 cyclooxygenase와 lipooxygenase 등의 효소활성을 변화시키고 수용체 및 생체막에 작용함으로써 다양한 약리작용을 나타내기도 하며 (Saija 등 1995, Ji 등 1996), 대장암, 위암 등 여러 종양의 발병과 혈관내피 성장인자 발현의 감소를 통한 전이를 억제하는 등의 다양한 생물학적 작용을 나타낸다 (Chan 등 1997, Okabe 등 1997). 반면 최근 flavonoid 화합물이 Parkinson 병 같은 신경 변성 질환 (neurodegenerative disorder)에서 중양세포와는 달리 독특하게 신경보호 효과가 있음이 보고되었다 (Nie 등 2002).

따라서 본 연구는 PC12 세포에서 A β 에 의한 신경손상의 신호전달과정을 밝히며, EGCG에 의한 신경손상의 억제효과를 구명하여 Alzheimer 병의 치료를 위한 기초 자료를 제공하기 위해 시행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

세포는 신경세포 손상을 조사하기 위한 *in vitro* model로 가장 널리 사용되는 흰쥐 갈색세포종에서 유래한 세포주인 PC12 세포를 사용하였다. PC12 세포는 5% 소 태아 혈청, 10% 말 혈청, 100 μ g/mL streptomycin, 100 μ g/mL penicillin과 250 μ g/mL amphotericin B가 포함된 RPMI 1640 배양액 중에서 37 °C, 5% CO₂-95% O₂ 조건에서 배양하였다.

2. 세포독성 측정

A β 의 신경세포 독성은 PC12 세포를 대상으로 세포 호흡량의 지표인 세포의 MTT 환원능을 억제하는 정도로써 측정하였다. PC12 세포를 배양한 후 배양 용기에서 떼어내어 원침하고 0.9% NaCl에 투석한 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 96-well plate에 well당 5×10^3 개의 세포를 배양하였다. 24시간 후에 $10^{-10} \sim 10^{-4}$ mol/L A β 및 0~100 μ mol/L EGCG 등의 첨가물을 가하고 24시간 배양 후 MTT (5 mg/mL)를 첨가하여 4시간 동안 반응하고 dimethyl sulfoxide를 가한 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 배양세포의 형태적 관찰

Diff-Quick 염색법을 이용하여 A β 처리 전후 PC12 세포의 형태적 변화를 관찰하였다. PC12 세포를 배양한 후 배양 용기에서 떼어내어 원침하고 0.9% NaCl에 투석한 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 60 mm dish에 1×10^6 개의 세포를 배양하였다. 24시간 후에 50 μ mol/L A β 및 100 μ mol/L EGCG 등의 첨가물을 가하고 24시간 배양 후 PBS로 씻은 다음 아세트산과 메탄올의 1:1 혼합용액으로 고정하였다. -20°C에서 20분간 배양한 다음 Diff-Quick 용액 (Kuk Jae)으로 5분간 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 세포내 ROS 측정

PC12 세포내 ROS의 양은 형광 probe인 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 측정하였다. 배양액에 DCF-DA를 well 당 25 μ M로 처리하여 15분간 배양한 후 100 μ mol/L EGCG와 50 μ mol/L A β 를 처리하였다. 반응 후 형성된 세포내 과산화물은 excitation 파장 485 nm, emission 파장 530 nm에서 fluorescence를 측정하였다.

5. Western Blot analysis

PC12세포를 ice-cold phosphate-buffered saline으로 두세 번 씻은 후 protein lysis buffer [20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% aprotinin, 1 mg/mL leupeptin, and 500 μ M Na₃VO₄]를 사용하여 세포를 파괴하였다. 단백질 양은 BCA법을 사용하여 측정하였고, 100 μ g의 단백질을 10% polyacrylamide gels을 사용하여 전기영동 하였다. 이를 PVDF membrane으로 이동시킨 후 5% milk가 들어있는 0.5% Tween 20를 사용하여 blocking 하였다. 1차 항체 (1 : 1000 anti-cytochrome c)를 부착 후 horseradish peroxidase가 포함된 2차 항체 (1 : 2000)를 부착하였다. 단백질의 발현 정도는 chemiluminescence kit (ECL system)를 사용하였다. 전체 단백질은 PVDF membrane을 stripping buffer [100 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate, and 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7)]로 50°C에서 30분 씻은 후 actin 항체를 사용하여 측정하였다.

6. RT-PCR

전체 mRNA를 TRI reagent (GIBCO)로 추출하고 RT premix kit (Bioneer)로 역전사하여 cDNA를 만든 후 PCR을 통해 증폭시켰다. 사용한 primer로는 Bax의 경우 5'-GTTCATCCAGGATCGAGCAG-3' (sense primer)와 5'-CATCTTCTCCAGATGGTGA-3' (antisense primer)를 사용하였고, Bcl-2의 경우 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3' (sense pri-

mer)와 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCA-3' (antisense primer)를 사용하였다. 증폭된 cDNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 UV 하에서 확인하였다.

결 과

A β 의 세포독성을 MTT 환원능으로 확인하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 PC12 세포를 10⁻¹⁰~10⁻⁴ mol/L의 A β 와 함께 37°C에서 24시간 배양함에 따

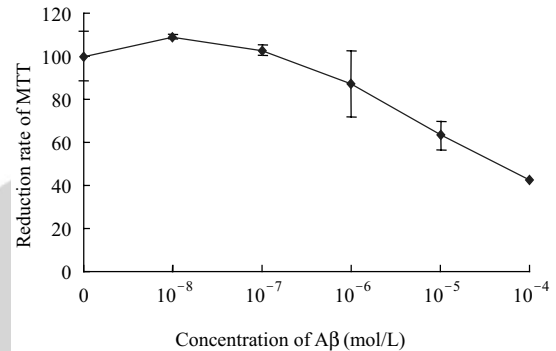


Fig. 1. Dose-dependent effects of amyloid β peptide on MTT reduction in PC12 cells. Data represent the means \pm SD from triplicate experiments.

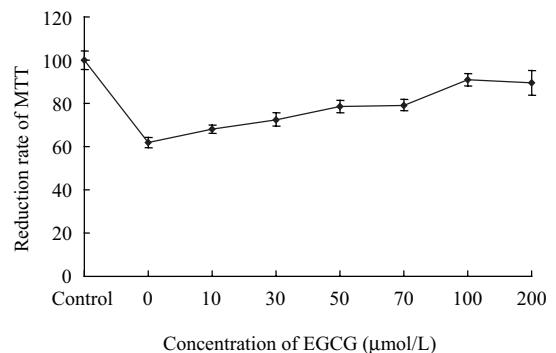


Fig. 2. Effects of EGCG on amyloid β peptide toxicity in PC12 cells. Data represent the means \pm SD from triplicate experiments.

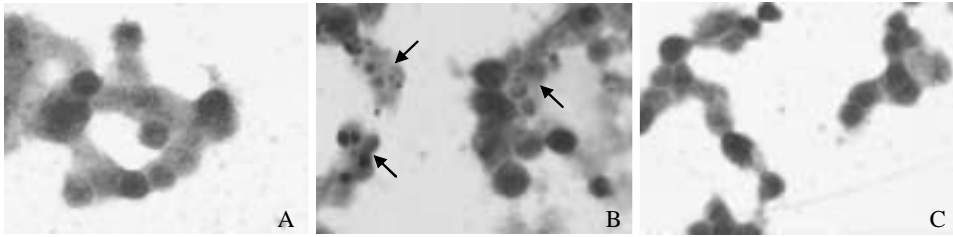


Fig. 3. Effect of EGCG on Aβ-induced morphological changes in PC 12 cells. PC12 cells were incubated in the absence (A) or presence (B) of Aβ peptide (50 μmol/L, 24 h) or the pretreatment of EGCG (100 μmol/L, 1 h) (C). The cells were stained with Diff-Quick method and nuclear morphology was detected by light microscopy (×400). Arrows indicate the nuclear fragmentation and apoptotic body-like changes in Aβ-treated cells.

라 세포 호흡량의 지표인 MTT 환원능이 대체로 Aβ 농도 의존적으로 감소하였다. 즉 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ mol/L 로 낮은 농도의 Aβ에 의해서 MTT 환원능이 영향을 받지 않았으나 10^{-8} mol/L보다 높은 농도의 Aβ에 의해서는 MTT 환원능이 억제되었으며, Aβ의 농도가 증가함에 따라 그 억제작용이 점차 강하게 나타났다. Aβ 농도가 10^{-4} mol/L(100 μmol/L)일 때는 MTT 환원능이 약 40%까지 감소하였다(Fig. 1).

0~200 μmol/L의 EGCG에서 농도에 따라 Aβ 세포독성에 미치는 영향을 측정하였다. EGCG가 Aβ 세포독성에 억제작용을 미치는가를 관찰하기 위하여 배양액에 첨가하는 Aβ의 농도를 비교적 높은 농도인 100 μmol/L로 하였다. EGCG은 농도 의존적으로 Aβ에 의한 세포독성을 유의하게 감소시켰으며 100 μmol/L 이상의 농도에서는 Aβ에 의한 세포독성이 거의 차단되었다(Fig. 2).

Aβ에 의한 세포독성과 EGCG에 의한 억제작용을 형태적으로 확인하기 위하여 Diff-Quick 염색법을 사용한 실험에서 50 μmol/L 농도의 Aβ와 24시간 배양한 PC12 세포들은 정상 배양세포들(Fig. 3A)과 달리 세포막의 수축 및 핵 분절화 등의 세포자멸사와 유사한 형태적인 변화를 보였다(Fig. 3B). 그러나 100 μmol/L의 EGCG로 1시간 전처리한 경우 형태적 변화를 보이는 세포들을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 3C).

Aβ에 의해 유발되는 PC12 세포의 죽음을 억제하는 EGCG의 작용기전을 알아보기 위하여 세포내 ROS를 측정하였다. 50 μmol/L Aβ에 의해 ROS 생산

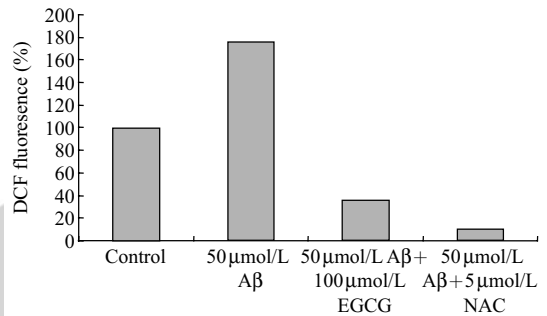


Fig. 4. Effect of EGCG on Aβ-induced ROS production in PC12 cells.

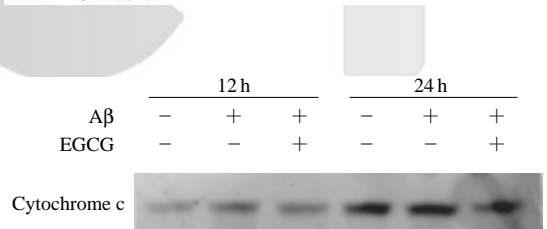


Fig. 5. Inhibition of Aβ-induced intracytoplasmic cytochrome c by EGCG in PC12 cells.

이 증가하였으며, 100 μmol/L EGCG를 전처리한 경우 Aβ를 처리한 세포에 비해 ROS 양이 현저하게 줄어들었다. 이는 ROS 제거제인 NAC을 전처리한 경우와 유사한 수준을 보였다(Fig. 4).

Aβ에 의한 세포죽음을 일으키는 세포 내 신호전달 과정과 EGCG의 억제작용기전을 밝히기 위해 western blot을 통해 세포질 내 cytoplasmic cyto-

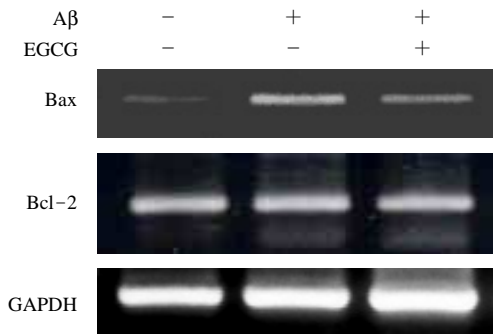


Fig. 6. Effect of EGCG on Bax and Bcl-2 expression in Aβ-treated PC12 cells.

chrome c 수준을 확인하였다. 50 μmol/L Aβ를 처리한 12시간부터 세포질 내 cytochrome c 수준이 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 그러나 100 μmol/L EGCG를 전처리한 경우 이와 같은 증가는 현저히 억제되었다(Fig. 5).

사립체 내 cytochrome c의 세포질 내 유리를 조절하는 것으로 생각되는 단백질인 Bax와 Bcl-2의 발현양을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 일반적으로 Bax/Bcl-2의 비율이 높을 경우 cytochrome c의 세포질 내 유리가 증가하고 비율이 낮을 경우는 유리가 감소하는 방향으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 50 μmol/L Aβ를 투여하고 8시간 동안 배양한 PC12 세포에서 Bax의 양이 증가하였으며, 이는 100 μmol/L EGCG의 전처리에 의해 감소하였다. Bcl-2의 경우 두 조건 모두에서 변화가 없었다(Fig. 6).

고 찰

Aβ를 주성분으로 하는 노인반의 축적은 Alzheimer 병에서 발견되는 가장 주된 증상이며, 질환의 개시와 진행에 있어 Aβ가 기여함을 보여주는 많은 증거가 제시되어 왔다(Bayer 등 2001). 따라서 Aβ에 의한 신경세포 손상과 세포독성의 본질을 이해하는 것이 Alzheimer 병의 예방과 치료를 위해 매우 중요하다. Aβ의 세포독성의 기전에 관한 많은 연구들이 진행되어 왔으며 그 중 Aβ에 의한 ROS 생성

이 증가됨을 보이는 많은 보고들이 있고(Hensley 등 1996, Behl 등 1997), 증가된 ROS 생성으로 유발되는 산화적 스트레스 상황에서 사립체의 기능이 나타나는 것이 확실해 보인다(Benzi와 Moretti 1995). 본 연구에서 Aβ 처리는 PC12 세포에 농도 의존적인 세포독성을 나타내었고, ROS 생성 증가와 세포죽음의 사립체 의존 경로와 관련한 단백질인 세포질내 cytochrome c의 증가가 나타나는 것으로 보아 이들을 통한 신호전달이 중요한 기전 중 하나로 생각된다.

최근 연구결과 Bcl-2 family가 cytochrome c의 세포질 내 유리를 조절하는 유력한 물질로 생각되고 있다(Gottlieb 등 2000). Bcl-2 family는 세포자멸사와 같은 형태의 세포죽음을 조절하는 물질로 알려져 있으며, 기능에 따라 cytochrome c의 세포질 내 유리를 감소시켜 세포죽음을 일으키지 않는 군(Bcl-2와 Bcl-XL)과, cytochrome c의 세포질 내 유리를 증가시켜 세포죽음을 유발하는 군(Bax, Bak, Bid)으로 분류할 수 있다. 본 연구 결과 Aβ에 의해 Bcl-2 mRNA 발현은 변화가 없었으나, Bax mRNA 양은 Aβ 처리 8시간 후에 뚜렷이 증가하였다. 따라서 Aβ에 의한 신경세포죽음은 Bax의 과발현을 통한 cytochrome c의 유리가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나 Aβ에 의한 신경세포죽음에 대한 Bcl-2 family의 기능은 아직 명확하지 않다. 그 이유는 Bcl-2 family가 ROS의 생성을 조절한다는 보고와(Starkov 등 2002), 반대로 ROS가 Bcl-2 family의 발현을 조절할 수 있다고 보고되고 있기 때문이다(Herrera 등 2001). 또한 cytochrome c의 세포질 내 유리와와의 전후관계 역시 명확치 않다(Cai와 Jones 1999).

본 연구에서 녹차에 포함된 대표적인 catechin 화합물의 일종인 EGCG는 Aβ에 의한 PC12 세포독성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 관찰하였다. EGCG가 Aβ에 의한 세포독성을 억제하는 기전 중 하나가 세포내외에서 형성된 ROS를 제거하는 항산화제로써의 기능이다. EGCG는 superoxide anion, hydroxy radical, singlet oxygen과 lipid free radical 등으로 다른 종류의 ROS를 효과적으로 제거할 수 있음이 보고되었다(Guo 등 1996, 1999). Catechin 화합

물과 free radical과의 반응성은 catechin 화합물의 hydroxyl기의 해리상태에 따라 크게 달라지는데 (Bors and Michel 1999) EGCG는 epigallocatechin (EGC), epicatechine (EC)등의 다른 catechin 화합물에 비해 강한 환원능을 갖고 있으며, 이것이 A β 의 세포독성을 억제하는데 기여하는 것으로 보인다.

본 연구에서 EGCG는 ROS의 제거를 통한 항산화 효과 외에도 Bax의 발현 억제를 통해 cytochrome c의 세포질 내 유리를 효과적으로 감소시켰다. 이는 A β 에 의한 신경 세포 손상에서 항상 나타나는 사립체의 기능 이상을 EGCG가 효과적으로 억제할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 녹차추출물 이외에도 마늘, 은행 추출물 (Yao 등 2001, Peng 등 2002) 등의 천연물이 Alzheimer 병의 예방과 증상 완화에 좋은 효과를 보이는 것으로 알려져 있고 estrogen, acetaminophen (Hosoda 등 2001, Bisaglia 등 2002)등의 치료 효과에 관하여도 활발히 연구되고 있다.

본 연구 결과 A β 에 의한 신경세포 독성은 ROS 및 세포죽음의 사립체 의존 경로가 중요한 작용 기전으로 생각된다. 또한 EGCG는 항산화효과 외에도 세포죽음의 사립체 의존 경로와 관련한 단백질 발현 억제를 통해 효과적으로 신경세포를 보호하는 것으로 생각된다. 그러나 Alzheimer 병에 의한 세포죽음에 c-Jun N-terminal kinase나 p42/p44 mitogen-activated protein kinases 같은 MAPkinase family (Troy 등 2001, Cheng 등 2002)나 phosphatidylinositol-3-kinase (Cheng 등 2002) 등의 세포의 생존과 죽음에 관련된 다른 중요한 신호 전달 경로 역시 영향을 나타내는 것으로 생각되고 있다. 따라서 Alzheimer병의 예방과 치료제 개발을 위해서는 이들 모두를 고려한 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고 문헌

Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K, Czech C : Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, meta-

bolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 11 : 1-11, 2001.

Behl C, Sagara Y : Mechanism of amyloid beta protein induced neuronal cell death: current concepts and future perspectives. *J Neural Transm Suppl* 49 : 125-134, 1997.

Benzi G, Moretti A : Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16 : 661-674, 1995.

Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, Stanzione S, Porcile C, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G : Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochem Int* 41 : 43-54, 2002.

Bors W, Michel C : Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med* : 1413-1426, 1999.

Cai J, Jones DP : Mitochondrial redox signaling during apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 31 : 327-334, 1999.

Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI : Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 54 : 1281-1286, 1997.

Cheng G, Yu Z, Zhou D, Mattson MP : Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol* 175 : 407-414, 2002.

Drouet B, Pincon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T : Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 57 : 705-715, 2000.

Fukuda H, Shimizu T, Nakajima M, Mori H, Shirasawa T : Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta1-42 amyloid peptide and its isoaspartyl isomers. *Bioorg Med Chem Lett* 9 : 953-956, 1999.

Giovannelli L, Scali C, Fausson-Pellegrini MS, Pepeu G, Casamenti F : Long-term changes in the aggregation state and toxic effects of beta-amyloid injected into the rat brain. *Neuroscience* 87 : 349-357, 1998.

Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB : Bcl-x (L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20 : 5680-5689, 2000.

- Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W : Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 1304 : 210-222, 1996.
- Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W : ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* 1427 : 13-23, 1999.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S : The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Bio Med* 16 : 845-850, 1994.
- Harkany T, Abraham I, Konya C, Nyakas C, Zarandi M, Penke B, Luiten PG : Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neurosci* 11 : 329-382, 2000.
- Hensley K, Butterfield DA, Hall N, Cole P, Subramaniam R, Mark R, Mattson MP, Markesbery WR, Harris ME, Aksenov M : Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann N Y Acad Sci* 786 : 120-134, 1996.
- Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A, Fernandez M, Roncero C, Benito M, Fabregat I : Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 15 : 741-751, 2001.
- Hodnick WF, Duval DL, Pardini RS : Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem Pharmacol* 47 : 573-580, 1994.
- Hosoda T, Nakajima H, Honjo H : Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptotic cell death. *Neuroreport* 12 : 1965-1970, 2001.
- Ji XD, Melman N, Jacobson KA : Interactions of flavonoids and other phytochemicals with adenosine receptors. *J Med Chem* 39 : 781-788, 1996.
- Morel I, Lescoat G, Cillard P, Cillard J : Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol* 234 : 437-443, 1994.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y : Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein (1). *Brain Res* 886 : 54-66, 2000.
- Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B : Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 397 : 84-90, 2002.
- Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, Sueoka E, Komori A, Fujiki H : Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols. *Jpn J Cancer Res* 88 : 639-643, 1997.
- Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P : Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol* 152 : 871-877, 1998.
- Peng Q, Buz'Zard AR, Lau BH : Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* 8 : BR328-337, 2002.
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F : Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Biol Med* 19 : 481-486, 1995.
- Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y : Electrophysiological study of a novel large pore formed by bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *Journal of biochem* 275 : 12321-12325, 2000.
- Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S : Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 : G1115-G1123, 2001.
- Starkov AA, Polster BM, Fiskum G : Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* 83 : 220-228, 2002.
- Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, Greene LA : beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem* 77 : 157-164, 2001.
- Yao Z, Drieu K, Papadopoulos V : The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res* 889 : 181-190, 2001.
- Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K : Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86 : 306-317, 2003.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X : An APAF-1. cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 : 11549-11556, 1999.

Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu X : Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 67 : 837-843, 2002.

K C I

Abstract

Inhibition of Amyloid β Peptide-induced Neuronal Cytotoxicity by EGCG

**Min-Seok Kim, Ji-Yeon Jung, Eun-Cheol Kim, Hyun-Jin Kim,
Won-Jae Kim, Eun-Ju Lee, Sun-Hun Kim**

Dental Science Research Institute, School of Dentistry, Chonnam National University

This study is aimed to investigate the signal transduction pathway of amyloid β peptide ($A\beta$)-induced neuronal toxicity and the inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG), one of the major constituents of green-tea and the potent anti-oxidant, on the nerve cell damage in PC12 cells.

Cellular toxicity was estimated by MTT assay and observation of morphological changes in PC12 cells. By using the methods such as measurement of Reactive Oxygen Species (ROS), western blot and RT-PCR, the underlying mechanisms and signal transduction pathway of $A\beta$ -induced neurotoxicity and the inhibitory effects of EGCG were examined.

$A\beta$ -induced cellular toxicity was found in a dose dependent manner. This is confirmed by morphological observations of cultured cells such as findings of cell death similar to apoptosis. $A\beta$ -induced neurotoxicity was effectively inhibited by EGCG pretreatment. Moreover, EGCG reduced ROS as same potent as the NAC (N-acetyl cystein), the ROS scavenger. Among the several process of signal transduction for cell death, a intracytoplasmic cytochrome c, the protein associated with the mitochondria-dependent pathway, was increased from 12 hours after $A\beta$ treatment and the increased cytochrome c by $A\beta$ was blocked by EGCG. Expression levels of Bax/Bcl-2 in relation to intracytoplasmic release of cytochrome c were examined by RT-PCR. $A\beta$ up-regulated Bax expression but did not affect Bcl-2 expression. EGCG was found to block the effect of $A\beta$ -induced Bax increase.

From these results, it is speculated that $A\beta$ -induced neuronal toxicity may be assumed to be affected by ROS and the mitochondria-dependent pathway of cell death as well. EGCG, besides having the role of anti-oxidant, is found to have a protective effect against $A\beta$ -induced neurotoxicity through the inhibition of the expression of the protein associated with the mitochondria-dependent cell death pathway.

Key words : Amyloid β peptide, PC12 cells, Epigallocatechine gallate, Cytotoxicity