

아밀로이드 베타 1-42에 의한 in vitro 및 in vivo 속후각결질 신경로 신경세포의 사멸형태에 관한 연구

변경희, 맹영희*, 이봉희**

제주대학교 의과대학 해부학교실, 병리학교실*

A study on changes of the CNS pathway to the entorhinal cortex by amyloid beta 1-42

Kyunghee Byun, Younghee Maeng*, Bonghee Lee**

Department of Anatomy and Neurobiology, Department of Pathology*, College of Medicine, Institute for Medical Science, Cheju National University, Ara 1 Dong, Jeju, Jeju do 690 756, Korea

Abstract

Deposition of amyloid beta protein as amyloid fibrils or non fibrillar aggregations in senile plaques characterizes the Alzheimer disease brain. Microtubule associated protein tau is abnormally phosphorylated in AD and aggregates as paired helical filaments (PHFs) in neurofibrillary tangles. The purpose of this study were 1) to identify the entorhinal cortex pathway in the normal rat brain after PRV injection, 2) whether amyloid beta 1-42 injection caused the hyperphosphorylation of tau along the entorhinal cortex CNS pathway.

For analysis, rats were sacrificed at 48 hours after PRV injection or cut, at 7 days after amyloid beta 1-42 injection. Brains were processed for immunohistochemistry against PRV, tau-P, or 6E10.

PRV positive neurons were observed in several CNS nuclei including hippocampus, and tau-p neurons area appeared in several nuclei including TM.

These data suggest that the hyperphosphorylated tau has been increased in the CNS nuclei along entorhinal cortex pathway, and this may cause memory disturbance in Alzheimer's disease patients.

Key Words : amyloid beta, pseudorabies virus, entorhinal pathway, plaque

** Corresponding author : bhlee1@cheju.ac.kr

*** 본 논문은 한국학술진흥재단의 지역대학육성사업의 지원에 의하여 이루어졌음.

서론

속후각결질(entorhinal cortex)은 편도체 표면에 있으며, 측해마이랑의 앞쪽에 위치하고 있다. 속후각결질은 해마의 연결로와 밀접한 관계를 가지고 있으며 (Haus-Wegrzyniak 등, 2002), 해마는 기억의 주 저장소라고 알려져 있다(Golomb 등, 1993; Henke 등, 1999). 해마 연결로 중 구심성 섬유는 주로 속후각결질에서 유래하고 관통로를 따라서 지각을 횡단하여 치아이랑의 과립신경세포와 연결을 형성한다 (Chow와 Leiman, 1970). 알츠하이머병에서는 속후각결질중 II, IV층에서 조직 병리학적인 병변이 관찰되어지며 (Giannakopoulos 등, 2000), 속후각결질의 전기적 손상을 가했을 경우 쥐와 사람에게 있어서 역방향성 기억 손상을 준다고 보고 되었다 (Nagahara 등, 1995; Gutierrez 등, 1997). 따라서 기억과 관련된 대부분의 연구는 속후각결질을 대상으로 하였으며 속후각결질에 A β 1-42를 투여하여 치매와 관련된 연구는 매우 중요하다.

tau는 세포내 미세관에 결합되어 있는 정상 축삭 단백질이며 미세관의 결합을 안정화시켜주는 기능을 가지고 있다 (Jellinger와 Bancher, 1998). 이런 정상 tau가 과인산화된 tau의 형태로 전환되는 것은 세포내 인산화와 탈인산화의 균형 붕괴로 인해 발생되어지며, 알츠하이머병의 조직병리학적 병변인 신경섬유 덩어리들 역시 과인산화된 tau가 침착되는 것으로 알려져 있다(Mandelkow와 Mandelkow, 1998) 과인산화된 tau는 알츠하이머병의 지시물질로 여겨지고 있으며 과인산화된 tau를 함유한 신경세포는 신경세포 사멸과정중에 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 실험적으로 아밀로이드 베타 단백질을 해마(hippocampus)와 편도체(amygdala)에 주입한 결과 과인산화된 tau가 증가된다고 보고되었다 (Sigurdsson 등, 1997; Rapoport 등, 2002; Ramirez 등, 2002).

위의 내용을 종합한 결과 속후각결질내에 아밀로이드 베타 1-42를 주입할 경우 아밀로이드 베타 1-42가

속후각결질의 신경세포에 사멸과정을 유도하여 세포내 미세관에 결합하고 있는 인산 단백질인 tau를 과인산화 시킬 것으로 추측된다. 그러나 치매와 같은 기억의 상실은 기억과 관련된 뇌속의 전체 신경회로의 손상을 야기 시킬 수 있으나 이들의 보고는 뇌속의 특정지역의 아밀로이드의 침착과 세포수준에서 사멸을 보고하고 있을 뿐 신경회로에 대한 연구는 없었다.

기억과 관계된 해마나 속후각결질의 신경기능의 결여는 알츠하이머형 치매나 노화를 포함하는 여러 퇴행성 뇌질환에서 보고되고 있으며, 흰쥐나 사람에게서 장기간의 ethanol 투여시에 생기는 기억력손상은 기저전뇌부분의 신경세포들의 수의 감소를 동반한다고 보고하여(Kuhl 등, 1999; Arendt, 1994) 기억력 손상은 뇌의 형태학적 변화가 동반된다는 것을 시사하여 형태학 연구의 중요성을 강조하였다.

근간에 이용되기 시작한 신경친화성 바이러스인 pseudorabies 바이러스는 축삭을 따라 이동하면서 바이러스가 증식되어 그 수가 증가될 뿐 아니라 연결을 쉽게 통과할 수 있는 특징이 있어 1회의 주입으로 전체 신경로를 조사할 수 있다는 장점이 있다 (Card 등, 1990; 1993). 최근에도 pseudorabies 바이러스는 말초에서 중추신경으로 이어진 전체 신경로를 구축한 보고나(Streefland 등, 1998; Motawei 등, 1999), 뇌속에서 이어진 전체 신경로 구축에도 사용되고 있어(Larson 등, 1998; Teclerian-Mesbah, 1999) 그 우수성이 입증되었으며 본 연구에서도 신경로 추적자로 활용하여 체계적으로 속후각결질의 신경로를 구축하고자 한다. 즉 이는 속후각결질과 이어져 있는 전체 신경로 및 신경로 내의 신경전달 물질을 밝히는 일은 뇌(속후각결질)의 손상 및 치료기전을 전체 신경로를 대상으로 하여 형태학적으로 이해하는데 필수적이라고 생각 된다. 나아가 A β 1-42의 투여 후 과인산화된 tau의 증가가 이들 신경로의 신경세포들에서 일어나는지를 조사하는 일은 A β 1-42가 직접세포사멸을 유도하지만 나아가 기능과 관련지어진 신경회로로 결과를 분석할 수 있다는 강점이 있다.

따라서 본 연구에서는 A β 1-42에 의한 속후각결질

신경세포 사멸 및 그 기전을 분석하고, pseudorabies 바이러스를 신경추적자로 이용하여 A β 1-42가 속후각결질 및 속후각결질의 신경로에 미치는 영향을 형태학적으로 조사하고자 하였다. 이는 Alzheimer 병에서 보이는 독성 물질인 A β 1-42에 의한 속후각결질신경세포의 사멸 및 신경로의 변화 및 신경전달 물질의 변화를 밝히는 기전 연구 결과는 인간 뇌질환 (특히 Alzheimer 병)에서 관찰되는 신경세포 사멸의 정확한 기전을 밝히는데 크게 공헌할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250 gm 내외의 성숙한 Sprague Dawley 랫드 50마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 실험동물은 외부와 격리된 20-25 °C의 온도를 유지한 동물사육장에서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육하였다.

2. A β 1-42 투여

아밀로이드 베타 1-42(Peptide institute. inc.)는 PBS로 200 uM로 녹여 사용직전까지 냉동(-70 °C)에 보관하고, 주입직전에 녹여 사용하였다. 뇌정위수술기구(stereotaxic instrument)에 쥐머리를 고정시킨 후 Swanson (1988)의 brain map:structure of rat map (No. 46)을 참고로 하여 속후각결질내에 아밀로이드 베타 1-42를 주입하였다.

아밀로이드 베타 1-42의 주입 위치는 Bregma를 기준으로 하여 뒤쪽으로 8.3 mm(AP -8.3 mm), 우측으로 5.4 mm(ML -5.4 mm), 그리고 뇌의 표면에서 아래로 4.5 mm으로 속후각결질을 목표지점으로 하였다.

대조군과 실험군은 각각 PBS 5 μ l와 아밀로이드 베타 1-42 200 uM 5 μ l를 주입하였다. 주입은 electrical injector를 사용하고 주입속도는 0.04 μ l/min 로 한다. 주입 후 생존기간은 3~7일로 하였다.

3. 바이러스

Pseudorabies 바이러스중 Bartha strain (PRV-Ba 라 합)은 본 실험실에서 증식 시켜 사용하였다. 이 strain은 porcine kidney fibroblast (PK15-cell)에서 키운 것을 냉동(-70 °C)보관하며 주사직전에 녹여 신선한 것을 사용하였다. 1차 항체는 이 virus strain을 acetone-inactivation된 것을 토끼에 주사하여 얻은 rabbit anti- PRV-Ba를 제작하여 사용하였다. 아직 사람에서 이 virus의 감염보고는 없었으나 만일의 경우를 생각하여 실험 과정중 모든 실험기와 실험동물은 외부와 분리하여 접촉을 피하고 실험 연구자는 반드시 1회용 가운과 모자, 마스크 및 장갑을 사용하여 사용 후는 모두 소각 처리하였다. 또한 모든 수술도구는 clorax로 소독하여 보관하는 등 만일의 사고에 대비하여 최대의 감염방지 노력을 하였다.

4. 바이러스주입

실험동물들은 실험 직전에 복강내주사로 Ketamine hydrochloride(케타라 50 mg/ml)와 Xylazine(롬폰, 20 mg/ml)을 각각 체중 100 g당 0.15 ml, 및 0.05 ml씩 섞은 용액을 주사하여 뇌정위수술기구에 머리를 고정시켰다. 그 후 피부를 양눈사이에서 양귀사이에 이르게 절개하고 두개골을 노출시킨 후 치과용 드릴을 이용하여 두개골에 구멍을 뚫고 Hamilton syringe를 속후각결질에 도착시킨 뒤 전동 주입장치를 이용하여 3 μ l의 PRV-Ba를 주입하였다. 그 후 서서히 주사바늘을 후퇴하며 제거한 후 생리식염수로 수술부위를 약 5-10회 세척해 낸 다음 피부를 봉합하고 주의 깊게 관찰하였다.

5. Cresyl violet 염색

속후각결질로 PRV-Ba의 주입 위치를 확인하기 위해서 cresyl violet 염색을 실시하였다. 30 μ m로 잘린 뇌조직을 gelatin coating된 슬라이드 글라스에 mounting

하여 xylene I, II, alcohol 100% I, II, 95%, 70%로 차례대로 각 5분씩 거친 다음 0.5% cresyl violet (pH 3.9)으로 15분간 염색하였다. 흐르는 물로 세척하고, 염색정도를 관찰하고 alcohol 70%, 95%, 100% I, II, xylene I, II 과정을 5분씩 거친 후 polymount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰한 후 사진 촬영하였다.

6. 조직처리

PRV-Ba 주입후 약 3~5일의 생존시간을 준 다음 각 흰쥐들은 다시 동일 마취액으로 마취시키고 심장을 통하여 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1 M sodium phosphate buffer(이하 PB라 함)에 heparin(1000 IU/1000 ml)을 섞은 용액을 10분간 관류시키고 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 30분간 관류 시켰다. 관류고정이 끝난 후 대뇌, 소뇌 및 뇌줄기 등을 적출한 다음 동일 고정액에 4 °C에서 4시간 동안 담가 후고정을 시행하였다. 그 후 다시 0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 내지 48시간 동안 담가 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기를 (Cryotome, AO) 이용하여 약 30 µm 두께의 관상연속절편을 만들어 6-well plate에 순서대로 보관하며 총 약 300장 정도의 조직절편을 free floating method로 면역조직화학염색을 시행하였다.

7. PRV-Ba에 대한 면역조직화학염색

염색은 1:10,000으로 희석한 1차 항체에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc. 제)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하여 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc. 제)에 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1

M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4 °C에서 12시간 이상 건조 시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8. tau-P, NeuN에 대한 면역조직화학염색

6well plate의 조직 중 일부의 조직에 tau-P와 NeuN에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 염색은 1:500 ~ 1:1,000으로 희석한 1차 항체에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc. 제)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하여 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc. 제)에 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4 °C에서 12시간 이상 건조 시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. TUNEL 염색법

TUNEL kit (Intergen)을 사용하여 실험을 수행하였다. Equilibrium buffer 10초, TdT를 포함하는 nick end-labeling solution(Reaction buffer)에 sample 을 1시간 동안 37 °C에서 방치하였다. 실온에서 Stop solution에 10분 동안 방치하였다. FITC로 염색된 TUNEL positive cell을 counting 하였다.

10. 결과조사

염색이 끝난 조직들은 공초점현미경(confocal microscope)을 이용하여 이중염색부위를 조사하여 지도 화하고 부위별로 세포수를 계산하여 지배영역별로 차별화를 하였다.

결 과

1. 해마의 신경로

흰쥐의 해마에 pseudorabies 바이러스를 주입한 후 면역조직화학 염색을 시행한 결과 배쪽뒤관핵 (ventral tegmental area), 뇌궁아래기관 (subfornical organ), 상측중심술기핵 (superior central nucleus raphe, medial part)등 뇌의 특정 핵에서 양성반응이 나타났으며, 핵 종류에 따라 양성반응은 차이를 보였다(fig. 1, 2, Table 1.2).

2. 베타아밀로이드 1-42 투여 후 뇌의 변화

베타아밀로이드 1-42 투여 후 3일과 7일 후에 흰쥐의

Table 1. Immunohistochemical intensity after pseudo rabies virus injection into the injection side and non injection side of the brain

Post injection	1 week	1 week	2 week	2 week	3 week	3 week
Side	Injection	Non injection	Injection	Non injection	Injection	Non injection
Area(positivity)	EC(++)	EC(-)	HP(-)	HP(+)	EC(+++)	EC(+)
	LHA(++)	LHA(++)	EC(+)	EC(-)	LHA(+++)	LHA(+++)
	CC(++++)	CC(-)			Brainstem(+)	Brainstem(+)

Abbreviation : CC, Cerebral cortexEC, Entorhinal cortexLHA, Lateral hypothalamic areaHP, Hippocampus

Table 2. Density of the GFAP positive cells after A beta injection

Rat no.	Cell No.	area	density	Cell No.	area	density
	0-500	mm2	Cell No/mm2	500-1000	mm2	Cell No/mm2
1	621	3.5	177	208	4.5	46
2	651	3.5	186	249	4.5	55
3	633	3.5	181	238	4.5	53
4	442	3.5	126	269	4.5	60
5	535	3.5	153	302	4.5	67
6	274	1.5	183	120	2.5	48
7	385	1.5	257	236	2.5	94
8	597	3.5	171	322	4.5	72
9	522	3.5	149	201	4.5	45
average			175.89			60
stdev			36.26			15.76

뇌를 적출하여 뇌의 각 부분에서 아밀로이드 플라크를 관찰한 결과 대뇌 피질 등의 부위에서 양성반응이 나타났다(fig. 1).

3. 베타아밀로이드 1-42 투여 후 해마의 중추신경로

베타아밀로이드 1-42 투여 후 3일과 7일 후에 흰쥐의 해마에 pseudorabies 바이러스를 주입한 결과 내측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, medial part), 배측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, ventral part), 및 시상(thalamus) 등의 신경핵에서 양성반응이 감소하였다. 그러나 청색반점에서는 양성반응이 증가하게 관찰되었으며, 남은 양성 반응 신경핵들은 변화를 보이지 않았다.

고 찰

치매는 크게 혈관성과 알츠하이머형으로 분류된다 (Fahlander 등, 2002; Herrmann, 2002; Posner 등, 2002; Yuspeh 등, 2002). 그 중 알츠하이머형은 전체 치매환자의 반 이상을 차지하고 있으며 (Jellinger 등, 1998), 특히 뇌 신경세포들의 퇴행성 병변으로 인해 대뇌 피질의 콜린성 신경계 활성을 감소시킨다고 알려졌다 (Langlais 등, 1993; Lehericy 등, 1993; Gonzalo-Ruiz, 1999). 알츠하이머환자에 있어서 뇌의 사후 조직병리학적 병변은 노인반 (senile plaque), 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangles), 아밀로이드 혈관 (vascular amyloid) 등이 관찰되어지며 (Pappolla 등, 1992; Defigueiredo 등, 1995; Hauw 등, 1996; Dai 등, 2002), 특히 측두엽, 전두엽, 두정엽의 일차적 연상역과 해마 및 편도핵에 심하게 나타난다 (Masters 등, 1995; Sturchler-Pierrat과 Staufenbiel, 2000; Rockenstein 등, 2001). 또한 최근 연구 결과에 따르면, 아밀로이드 베타 단백질이 세포와 혈관에 침착되어 신경세포에 독성작용을 함으로써 뇌기능 장애를 초래한다고 보고되었다 (Kennedy 등, 1993; Shimizu 등, 2000; Sjogren 등,

2001; Tan 등, 2002).

아밀로이드 베타 단백질은 세포막내에 1/3, 세포막 바깥 부분에 2/3가 위치하고 있으며, 정상상태에서는 아밀로이드 베타 단백질의 중간 부분인 N단 15-16번째 아미노산 부위에서 잘라짐으로써 세포외로 유리되어 어지지만 알츠하이머 환자의 뇌에서는 정상과 달리 베타 단백질 부분이 잘라져서 침착 되어진다 (Anderson 등, 1991; Busciglio 등, 1993). 이 전구단백질은 여러 조직에서 발현되지만 (Sisodia 등, 1993), 베타 단백질은 뇌에서만 침착된다고 보고 되었다 (Whitehouse, 1997). 또한 in vitro 연구 결과 여러 종류 중아밀로이드 베타 단백질 중 1-42(A β 1-42)가 특히 강한 신경독성 작용을 한다고 보고되었다 (Yankner 등, 1990; Morelli 등, 1999).

본 실험 결과 A β 1-42를 속후각결절에 주입하고 일정기간이 경과 한 뒤 광학현미경으로 조사한 결과 속후각결절의 신경세포와 대뇌 피질의 일부 영역에서 신경세포의 사멸을 확인하였다. 따라서 A β 1-42가 속후각결절의 신경세포의 사멸을 유도함은 물론 속후각결절과 이어진 신경로에도 영향을 미쳐 대뇌 와 이어진 피질에도 신경 사멸이 야기 될 것으로 생각된다. 따라서 A β 1-42에 의한 속후각결절신경세포 사멸 및 그 기전을 분석하고, pseudorabies 바이러스를 신경추적자로 이용하여 A β 1-42가 속후각결절 및 속후각결절의 신경로에 미치는 영향을 형태학적으로 조사하고자 하였다. 이는 Alzheimer 병에서 보이는 독성 물질인 A β 1-42에 의한 속후각결절신경세포의 사멸 및 신경로의 변화 및 신경전달 물질의 변화를 밝히는 기전 연구 결과는 인간 뇌질환 (특히 Alzheimer 병)에서 관찰되는 신경세포 사멸의 정확한 기전을 밝히는데 크게 공헌할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, et al. Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12

cells. *Neurosci Lett* 1991;128(1):126-8.

Arendt T. Impairment in memory function and neurodegenerative changes in the cholinergic basal forebrain system induced by chronic intake of ethanol. *J. Neural. Transp. Suppl.* 1994;44:173-187.

Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, et al. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(5):2092-6.

Card JP, Rinaman L, Schwaber JS, et al, Whealy ME, Robbins AK, and Enquist LW. Neurotropic properties of pseudorabies virus: Uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 1990;10(6):1976-1994.

Card JP, Rinaman LM, Lynn RB, et al. Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: Ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J. Neurosci.* 1993;13(6):2515-2539.

Chow KL, Leiman AL. Aspects of the structural and functional organization of the neocortex. *Neurosci Res Program Bull* 1970;8(2):157-220.

Dai J, Buijs RM, Kamphorst W, et al. axonal transport of cortical neurons in Alzheimer's disease is associated with neuropathological changes. *Brain Res* 2002;948(1-2):138-44.

Defigueiredo RJ, Cummings BJ, Mundkur PY, et al. Color image analysis in neuroanatomical research: application to senile plaque subtype quantification in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1995;16(2):211-23.

Fahlander K, Wahlin A, Almkvist O, et al. Cognitive Functioning in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: Further Evidence for Similar Patterns of Deficits. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002;24(6):734-744.

Giannakopoulos P, Hof PR, Kovari E, et al. Distinct patterns of neuronal loss and Alzheimer's disease lesion distribution in elderly individuals older than 90 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(12):1210-20.

Golomb J, de Leon MJ, Kluger A, et al. Hippocampal atrophy in normal aging. An association with recent memory impairment. *Arch Neurol* 1993;50(9):967-73.

Gonzalo-Ruiz A. Changes in neurotransmission systems after the injection of beta-amyloid protein beta (12-28) in the hypothalamus and anterior thalamus of the rat. *Rev Neurol.* 1999;28(10):931-41.

Gutierrez-Figueroa G P, Dalmaz C, Izquierdo I. Effects of entorhinal cortex lesion on memory in different tasks. *Brazilian J. of Medical and Biological Research* 1997;30:769-774.

Haus-Wegrzyniak B, Lynch M, Vraniak P, et al. Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. *Exp Neurol.* 2002;176(2):336.

Hauw JJ, Selkhean D, Piette F, et al. Alzheimer's disease lesions: from morphology to cell biology. *Bull Acad Natl Med* 1996;180(7):1687-700.

Herrmann N. Cognitive pharmacotherapy of Alzheimer's

- disease and other dementias. *Can J Psychiatry* 2002; 47(8):715-22.
- Henke K, Weber B, Kneifel S, et al. Human hippocampus associates information in memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 11:96(10):5884-9.
- Jellinger KA, Bancher C. Neuropathology of Alzheimer's disease : a critical update. *J Neural Transm Suppl* 1998;54:77-95.
- Kennedy AM, Newman S, McCaddon A, et al. Familial Alzheimer's disease: a pedigree with a missense mutation in amyloid precursor protein gene. *Brain* 1993;116:309-24.
- Ko MH, Oh MY, Noh HS, et al. CNS cholinergic innervation to the hippocampus in the rat using Pseudorabies virus as a neurotracer. *J. of Korean Medical Science* 2001;16(2):209-213.
- Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, et al. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52(4):691-699.
- Langlais PJ, Thal L, Hansen L, et al. Neurotransmitters in basal ganglia and cortex of Alzheimer's disease with and without Lewy bodies. *Neurology* 1993;43(10): 1927-34.
- Larsen PJ, Enquist LW, Card JP. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur. J. Neurosci.* 1998;10(1):128-145.
- Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, et al. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 1993; 330(1):15-31.
- Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998;8(11):425-7.
- Masters CL, Simms G, Weinman N. A, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;82: 4245-4249.
- Morelli L, Giambartolomei GH, Prat MI, et al. Internalization and resistance to degradation of Alzheimer's A beta 1-42 at nanomolar concentrations in THP-1 human monocytic cell line. *Neurosci Lett* 1999;262(1):5-8.
- Motawei K, Pyner S, Ranson RN, et al. Terminals of paraventricular spinal neurones are closely associated with adrenal medullary sympathetic preganglionic neurones: Immunocytochemical evidence for vasopressin as a possible neurotransmitter in this pathway. *Exp Brain Res.* 1999;126(1):68-76.
- Nagahara AH, Otto T, Gallagher M. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1995;109(1):3-9.
- Pappolla MA, Omar RA, Sambamurti K, et al. The genesis of the senile plaque. Further evidence in support of its neuronal origin. *Am J Pathol* 1992; 141(5):1151-9.
- Posner HB, Tang MX, Luchsinger J, et al. The

relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. *Neurology* 2002;58(8):1175-81.

Ramirez MJ, Heslop KE, Francis PT, et al. Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Res* 2001;907(1-2):222-32.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, et al. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(9):6364-9.

Rockenstein E, Mallory M, Mante M, et al. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). *J Neurosci Res* 2001;66(4):573-82.

Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, et al. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 2000;381(2):225-34.

Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, et al. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 1993;13(7):3136-42.

Sigurdsson EM, Lee JM, Dong XW, et al. Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects. *Neurobiol Aging* 1997;18(6):591-608.

Sjogren M, Davidsson P, Gottfries J, et al. The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common

pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12(4):257-64.

Streefland C, Maes FW, Bohus B. Autonomic brainstem projections to the pancreas: A retrograde transneuronal viral tracing study in the rat. *J Auton. Nerv. Syst.* 1998;74(2-3):71-81.

Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci* 2000;920:134-9.

Tan J, Town T, Crawford F, et al. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 2002.

Teclerian-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, et al. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J. Comp. Neurol.* 1999;406(2):171-182.

Whitehouse PJ. Genesis of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997;48(5):S2-7.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990;250(4978):279-82

Yuspeh R, Vanderploeg R, Crowell T, et al. Differences in executive functioning between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002;24(6):745-54.

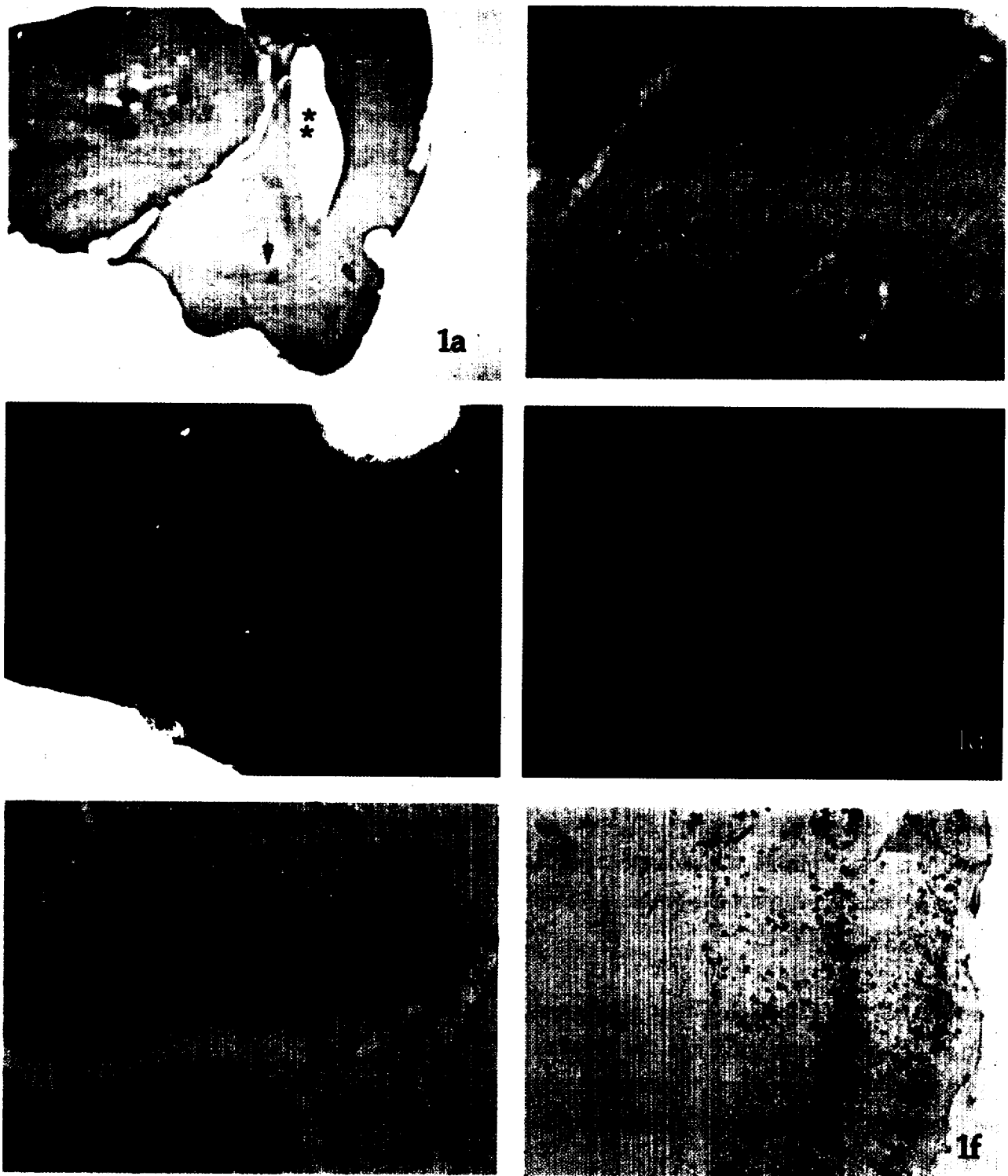


Fig. 1. The senile plaque(sa-d, arrows) and pseudorabies virus(PRV) immunoreactivity(ef) in the different brain areas after amyloid beta injection into the entorhinal cortex of the rat. a: lateral brain area, b: cerebral cortex, c: lateral hypothalamic area d: cerebral cortex, dark field microscopy, e: hippocampus, f: entorhinal cortex

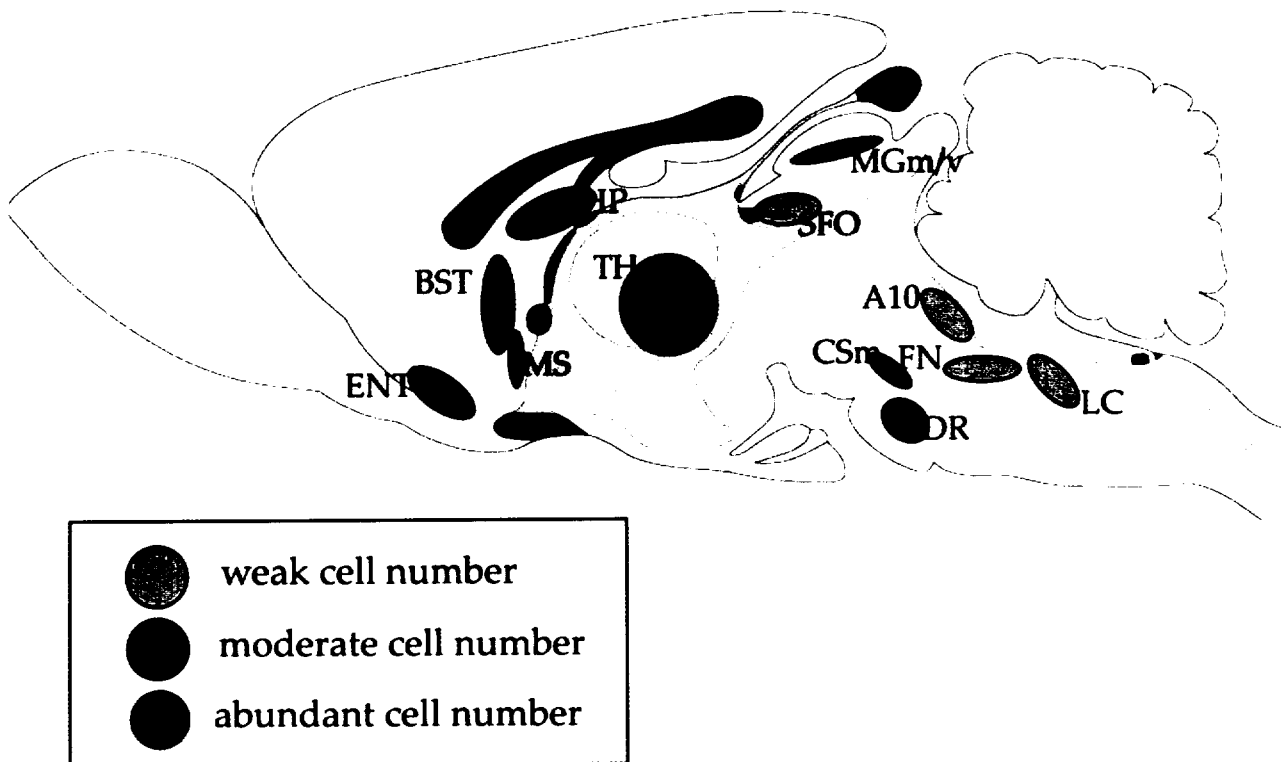


Fig. 2. The schematic drawing illustrating the CNS pathways to the entorhinal cortex by pseudorabies virus injection.

Abbreviation : BST, Bed nucleus of stria terminalis; DR, Dorsal raphe nucleus; ENT, Entorhinal cortex; FN, Fastigial nucleus; HP, Hippocampus; LM, Lateral mammillary nucleus; LC, Locus ceruleus; MGv, Medial geniculate complex, ventral part; MS, Medial septal nucleus; SFO, Subformal organ; CSm, Superior central nucleus raphe, medial part); TH, thalamus