

원 저

MPP⁺와 6-OHDA에 대한 한약탕제의 보호효과 연구

강봉주, 홍성길, 조동욱
한국한의학연구원 의료연구팀

Abstract

The Protective Effect of Herbal Medicine on PC12 Cell Induced by MPP⁺ and 6-OHDA Neurotoxicity

Bong-Joo Kang · Seoung-Gil Hong and Dong-Wuk Cho

Medical Research team, KIOM

The effect of herbal medicine on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) mediated neurotoxicity was studied in the rat pheochromocytoma cell line PC12. The present study was designed to test the hypothesis that herbal medicine can protect cells from neurotoxicity caused by MPP⁺ and 6-OHDA. Exposure of PC12 cells to 0.2 mM MPP⁺ and 50 μM 6-OHDA for 24h resulted in a 50% cell death with respect to the control cells. MPP⁺ induced cell death was reduced by Yollyounggobondan (延齡固本丹), Sagunjatang (四君子湯), Palmihwan (八味丸), and Palmultang (八物湯) (p<0.05). However, herbal medicines did not protect cells from degeneration caused by the 6-OHDA. Yollyounggobondan, Yungmijihwangwon (六味地黃元), Palmihwan, and Samultang (四物湯) were effective in protecting against MPP⁺-induced ATP loss in PC12 cells (p<0.05). Yollyounggobondan and Palmultang were effect in neurite protection against 6-OHDA treatment in differentiated PC12 cells with NGF.

Keywords : MPP⁺, 6-OHDA, PC12, Parkinson's disease, SRB, ATP

I. 서 론

인구의 고령화에 동반된 Alzheimer병 및 Parkinson 병 같은 중추신경계의 퇴행성 신경질환의 증가는 사회적으로 큰 영향을 미쳐 최근 세계적으로 그 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중에서 미국의 경우 60세 이상의 노년층에서 높은 유병률을 보이는 파킨슨병은 여러 가지 유발요인에 의해 가속화된 세포

노화 현상으로 발병되며, 특히 흑질부위에 선택적으로 도파민성 신경세포의 변성 및 세포소실로 인한 운동장애뿐만 아니라 노인성 치매를 동반하여 노인층에서는 치명적인 질환이다.¹⁾

파킨슨질환은 전 세계적으로 인구 1,000명당 약 1~2명 정도의 환자가 있는 것으로 알려져 있으며,

우리나라에도 약 5~10 만명 정도의 환자가 있으며 매년 약 5,000 ~ 10,000명 정도의 새로운 환자가 발생할 것으로 추정되고 있다. 더욱이 이 질환은 대표적인 노인성 질환으로 노년층에서 호발하는 경향을 보여, 노인인구가 증가되는 최근의 추세를 고려할 때 앞으로 환자가 점차 늘어날 전망이다.²⁾

원발성 파킨슨병은 감수성이 있는 개체가 여러가지 유발요인에 의해 가속화된 세포노화를 일으키는 경우에 초래되고,³⁾ 이들 유발요인은 카테콜라민 생성 신경세포 내에서 대사율을 증가시켜 신경세포 내에 산소대사물을 축적시키며 세포막과 세포내 기관에 손상을 주고, 기타 환경에서 오는 내·외부의 독성물질,⁴⁾ 그리고 mitochondria의 이상등으로 결국 세포소실이 온다고 생각되어 지며, 특히 흑질부위 도파민성 신경세포의 변성 및 세포소실을 보이는 질환으로 알려져 있다.

파킨슨병은 중추신경 내에서 도파민의 부족으로 인해 여러가지 증상을 나타내는 것으로, 이제까지의 치료는 주로 부족한 도파민의 작용을 약물로써 보충하여 주는 것들이었다. 이러한 약물들로는 도파민의 전구물질인 levodopa, 도파민의 수용체를 활성화시켜 도파민과 유사한 작용을 하는 여러 가지 도파민 agonist들과 도파민과 상반되는 작용을 하는 것으로 알려진 아세틸콜린의 기능을 억제하는 항콜린성 약제 (anticholinergics)들이 사용되고 있다. 이러한 약제들 중 가장 효과가 뛰어난 것은 levodopa이며, 그 외의 약물들은 대개 발병초기에 증상이 경미한 환자들에게 사용하거나, levodopa의 효과를 향상시키기 위한 첨가약제로 주로 사용된다. 따라서 어느 정도 병이 진행하게 되면 거의 모든 환자에게 levodopa제제 사용이 불가피하게 되며, 많은 환자들이 치료효과를 보고 있으나 치료를 위해 장기복용시 부작용이 많이 나타나게 되어 일시적인 임상증상 완화만을 가져오고 신경세포의 손상을 방지할 수 있는 근본적인 예방과 치료는 아직 이루어지지 않고 있다.

파킨슨병 치료의 새로운 경향으로 도파민 대사효

소의 하나인 MAO-B (monoamine oxidase B)라는 효소의 길항제인 deprenyl이라는 약제가 이러한 MPTP의 독성을 차단한다는 사실들이 알려지게 되었고,⁵⁾ 이후 deprenyl이 파킨슨병의 진행을 막을 수 있을 것이라는 주장들이 등장하게 되었으며, 대대적인 연구들을 통해 비록 미약하기는 하나 이러한 약제의 투여가 병의 진행을 일부 늦추는 효과가 있음이 알려지게 되어 파킨슨병에 있어 보호효과 (protective therapy)라는 새로운 전기를 마련하게 되었고, NMDA receptor antagonist로서 MPTP독성을 억제한다고 알려진⁶⁾ MK-801은 그 독성이 강해서 인체에 사용할 수 없었고, 최근연구에서 효과가 없다고 보고되었다.^{7,8)}

현재 파킨슨병의 새로운 치료법으로 연구가 진행 중인 분야를 나누어 보면, 첫째 현재 사용 중인 levodopa제제의 효과를 증가시키거나 부작용을 감소시키기 위한 방법들, 둘째 deprenyl이외의 새로운 보호 치료제들, 셋째 neurotrophic factor를 이용한 치료법, 넷째 여러 가지 수술적 치료 방법들의 개발 (신경세포 이식등), 그리고 마지막으로 유전공학적 기술을 도입한 새로운 이식술의 개발등을 들 수 있다.

최근에는 파킨슨병 모델의 연구가 활발히 진행되고 있는데, meperine계 마약인 4-propyloxy-4-phenyl-N-methylpiperidine (PPMP)의 합성과정에서 생기는 하나의 부산물인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)을 C57BL/6 마우스에게 투여한 후 대뇌흑질과 선조체에 대한 생화학 및 병리학적인 연구가 이루어지고 있다.^{9,10)} 여러종류의 마우스들을 가지고 MPTP에 대한 감수성 실험을 하여 적당한 동물모델을 결정하는 연구에서 C57BL계열 마우스가 가장 유의적으로 도파민의 양이 줄어드는 결과를 보여주어 가장 적당한 실험동물이라 발표했다.¹¹⁾ MPTP는 영장류 등에서 원발성 파킨슨병과 유사한 임상증상인 경직 (rigidity), 진전 (tremor)과 흑질의 도파민성 신경세포 손실을 보이는 병리학적인 변화를 유발시켜 파킨슨모델로 널리 사용되고 있다.¹²⁾ MPTP는 뇌조직의 교세포와 세로토닌성 세포

에 주로 분포하는 monoamine oxidase B에 의해 1-methyl-4-phenyl pyridium ion (MPP⁺)으로 변환되어 도파민 reuptake체계를 통해 도파민성 신경세포에 축적되고 mitochondria로 이동되어 높은 농도로 존재하게 된다.¹³⁾ Mitochondria내에서 MPP⁺는 respiratory chain의 NADH CoQ₁ reductase(complex I)을 방해하여 ATP 생성을 억제함으로써 세포의 소실을 초래하는 것으로 생각되나 그 정확한 작용 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 보기(補氣), 보혈(補血), 보양(補陽) 및 보음(補陰)의 7가지 한약탕제 처방인 四君子湯, 四物湯, 十全大補湯, 六味地黃元, 延齡固本丹, 八味丸, 八物湯을 이용하여 파킨슨병의 대표적인 in vitro 모델인 PC12 세포에 MPP⁺와 6-OHDA (6-hydroxydopamine)를 투여하여 세포독성 억제효과, ATP 함량변화, neurite의 형태적 관찰등으로 한약탕제에 의한 보호효과 검증하고자 했다.

Table 1. Components of prescriptions.

Prescriptions	Component	Weight(g)	Source
Sagunjatang (SG) 四君子湯	Ginseng radix	4.68	금산
	Hoelen	4.68	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	4.68	중국
	Glycyrrhizae radix	4.68	중국
Samultang (SM) 四物湯	Rehmanniae Preparata rhizoma	4.68	군위
	Paeoniae radix	4.68	의성
	Cnidii rhizoma	4.68	영양
	Angelicae Gigantis radix	4.68	진부
Yungmijihwangwon (YJ) 六味地黃元	Rehmanniae Preparata rhizoma	30	군위
	Comi fructus	15	구례
	Dioscorea tuber	15	온양
	Alismatis rhizoma	11.25	순천
	Paeoniae cortex	11.25	의성
	Hoelen	11.25	인제
Palmihwan (PM) 八味丸	Rehmanniae Preparata rhizoma	30	군위
	Comi fructus	15	구례
	Dioscorea tuber	15	온양
	Alismatis rhizoma	11.25	순천
	Paeoniae cortex	11.25	의성
	Hoelen	11.25	인제
	Spissus Cinnamomi cortex	3.75	중국
	Aconiti tuber	3.75	중국
Palmultang (PL) 八物湯	Ginseng radix	4.68	금산
	Hoelen	4.68	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	4.68	중국
	Glycyrrhizae radix	4.68	중국
	Rehmanniae Preparata rhizoma	4.68	군위
	Paeoniae radix	4.68	의성
	Cnidii rhizoma	4.68	영양
	Angelicae Gigantis radix	4.68	진부

Table 1. (Continued)

Prescriptions	Component	Weight(g)	Source
Shipchondaebotang (SD) 十全大補湯	Ginseng radix	3.75	금산
	Hoelen	3.75	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	3.75	중국
	Glycyrrhizae radix	3.75	중국
	Rehmanniae rhizoma preparata	3.75	군위
	Paeoniae radix	3.75	의성
	Cnidii rhizoma	3.75	양양
	Angelicae Gigantis radix	3.75	진부
	Astragali radix	3.75	제천
	Spissus Cinnamomi cortex	3.75	중국
Yollyounggobondan (YG) 延齡固本丹	Cuscutae semen	15	중국
	Cistanchis herba	15	중국
	Asparagi radix	7.5	중국
	Liriopsis tuber	7.5	공주
	Rehmanniae rhizoma preparata	7.5	군위
	Dioscorea tuber	7.5	온양
	Achyranthis radix	7.5	중국
	Eucommiae cortex	7.5	영주
	Morindae radix	7.5	중국
	Lycii fructus	7.5	청양
	Corni fructus	7.5	구례
	Hoelen	7.5	인제
	Schisandrae fructus	7.5	정선
	Ginseng radix	7.5	금산
	Saussureae radix	7.5	중국
	Thujae semen	7.5	중국
	Rubi fructus	7.5	영천
	Plantaginis semen	7.5	중국
	Radici Lycii cortex	7.5	청양
	Acori Graminei rhizoma	7.5	중국
	Zanthoxyli pericarpium	7.5	영천
	Polygalae radix	7.5	중국
	Glycyrrhizae radix	.5	중국
	Alismatis rhizoma	7.5	순천

II. 연구방법

1. 세포주

본 실험에 사용된 세포주는 한국 세포주 은행으로

부터 분양받은 PC12 세포주 (rat pheochromocytoma cell line, ATCC CRL-1721)를 사용하였고, PC12 cell의 세포배양액은 RPMI-1640 (GibcoBRL)에 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL), 0.2% sodium bicarbonate (Sigma)와 1ml 당 50 μ g의 gentamicin

(GibcoBRL)을 첨가하여 사용하였다.

2. 한약재 시료제조

Table 1의 각 약재를 경동시장에서 구입하여 상온에 보관하였고, 400g의 약재를 약재부피 3배의 증류수에 18시간동안 수침한 후, 전자약탕기 (DWP-1800T, 대웅약탕기, 대웅전기산업)에서 30분간 열수추출 했고 다시 재탕으로 2시간동안 열수추출 했다. Mesh (#100, ϕ 150 μ m)로 걸러낸 후, 회전농축기 (R-124, Buchi)에서 농축한 후, 3,000xg로 원심분리하여 상층액을 수거했다. 이 상층액을 filter paper (ϕ 90mm, Toyo, Japan)로 filtering후 동결건조시켜 분말상태로 -20°C에서 보관했다. 이 추출물의 활성 검색을 위해 각 분말을 PBS (phosphate buffered saline, pH7.4)에 100mg/ml의 농도로 용해하여 사용하였다.

3. 세포배양

PC12 세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크 (25cm², Nunc)에 0.2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum과 gentamicin (50g/ml)을 첨가한 RPMI-1640을 넣어 37°C, 5% CO₂ 항온기 (Fisher scientific, U.S.A.)에서 세포단층 (monolayer)이 될 때까지 배양하였다. PC12 세포를 계대배양 하기 위해서는 조직배양용 플라스크 (75cm², Nunc)에 배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되게 trypsin-EDTA (GibcoBRL)을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크 (75cm²)에 1:3 으로 분주하여 10% RPMI-1640 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에 배양하였다.

4. SRB 검색법 (Sulforhodamine B assay)

SBR검색법은 생존세포의 표면 단백질을 sulforhodamine B dye로 염색하여 흡광도를 측정함으로써 생존세포수를 추산하는 방법이다.¹⁴⁾

PC12 세포를 3분간 0.05% trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 배지 (RPMI 1640, 10% FBS)를 가해 trypsin활성을 없앤 후, 피펫의 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻었다. 이 부유액을 혈구계산판 (hemocytometer)으로 세포밀도 (세포수/ml)를 측정했다.

적정수의 세포를 96 well plate의 각 well에 100 μ l 씩 동일하게 접종했다. Plate를 37°C, 5 % CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 다음 검사대상 한약추출물을 적정농도로 먼저 투여한 후, 신경세포 독성물질인 MPP⁺ (1-methyl-4-phenyl pyridium ion, Research biochemicals international)와 6-OHDA (6-hydroxydopamine, Research biochemicals international)를 각각 0.2mM, 50 μ M 넣어 주었다. 그리고 배지만 채워주는 blank군과 시료대신 PBS만 넣어주어 100 % 생존군 (음성대조군)으로 삼았다. 시료와 MPP⁺, 6-OHDA 투여가 끝난 plate는 37°C, 5% CO₂ 하에서 3일간 배양했다.

4일간 배양한 후, 도립위상차현미경 (Axiovert 100, Zeiss, Germany)으로 관찰하여 각 well에서의 세포상태를 관찰한 다음, 50 μ l의 50% trichloroacetic acid (Sigma) 용액을 가해주고 4°C에서 1시간동안 정지시켜 고정한다. 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회이상 세척하고 건조시켰다.

건조된 plate에 0.1% SRB (sulforhodamine B, Sigma)용액 100 μ l를 가한 후 상온에서 30분 이상 두어 충분히 염색시킨 다음 1% acetic acid로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조된 후 100 μ l의 100mM unbuffered Tris (pH 10.5) 용액을 각 well에 가해 SRB dye를 용해시킨 후 precision microplate reader (Emax, Molecular devices, U.S.A.)로 흡광도 (test wavelength 564nm, reference wavelength 690nm)를 측정하였다.

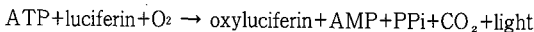
이 실험에서 최종적으로 얻어지는 OD₅₆₄ 값은 TCA 고정후 각 well에 남아있는 총 단백질의 양을 나타낸다. 따라서 이는 그 well에 남아있는 생존세포들의 수와 비례한다. 그러므로 시험군에서 평균 OD₅₆₄ 값

을 구해 음성대조군 (100% 생존군)의 평균 OD₅₆₄ 값에 대한 백분율 값을 산출하여 세포 생존율을 산출했다. 50% 억제농도 (IC₅₀)는 이 생존율이 50%가 되도록 하는 시료의 농도로 정의했다.

5. 세포내 ATP 측정

PC12세포를 모아서 PBS로 2번 세척해주고 1ml의 Tris-Ac buffer (0.1 M Tris acetate buffer, 2mM EDTA, pH7.75)에 부유시킨 후 얼음위에서 ultrasonicator (sonoplus GM70, Bandelin)로 10초간 sonication 후 10초간 정치하는 방법으로 총 30초간 실행하여 세포를 파쇄하여 세포내 ATP를 buffer에 유리 시켰다. 세포파쇄액을 4°C에서 10,000xg에서 10분간 원심분리하여 상층액의 일부는 Bradford법으로 단백질 정량하고 나머지 100µl의 상층액은 측정 cuvette에 넣고, Tris-Ac buffer를 800µl 넣어준 후 luciferin이 포함된 200µl의 ATP monitoring reagent (Bio-orbit, Finland)를 dispenser를 통해서 투여하고, luminometer (1251, Bio-orbit, Finland)에서 10초간의 발광량을 누적계산 (integration)했다. 그리고 ATP정량은 standard ATP의 농도와 비교하여 정량했다.^{15,16)}

luciferase



6. Neurite 변화관찰

배양된 PC12 세포에 배지의 FBS의 농도를 1%로 낮추고, 50ng/ml의 NGF (nerve growth factor, Sigma)를 3일에 한번씩 배지를 갈아주면서 5일간 처리해 주었다. 시료를 처리하고 24시간 지난 후에 관찰했다.¹⁷⁾

III. 결 과

1. PC12 세포의 적정점중세포수 결정

단일 세포부유액을 배지로 2배씩 희석해서 SRB

assay를 실시했다. 2.0 × 10⁴ cells/well이하의 세포수와 OD₅₆₄값 사이의 상관관계수가 매우 높게 나타나서 SRB 검색법으로 PC12 세포의 생존율을 측정하기로 결정했다. 적정점중세포수 결정에서 2.0 × 10⁴ cells/well이상에서는 상관관계수가 갑자기 떨어져서, 자체적으로 정한 적정 상관관계수 값보다 (r² > 0.9) 낮아지기 때문에 SRB 검색에서는 세포수와 OD₅₆₄값 사이의 96 plate well당 2.0 × 10⁴ 개의 세포수로 점중해서 사용하기로 했다 (Figure 1).

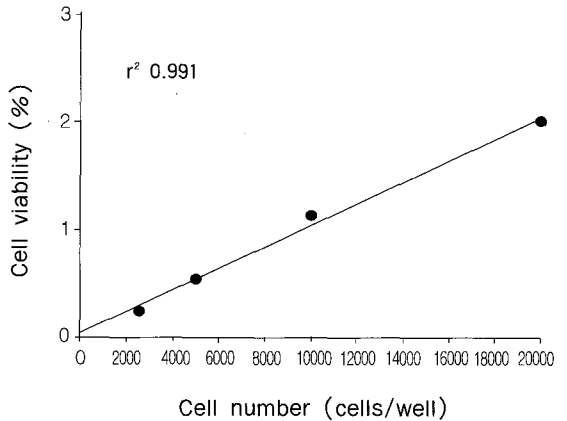


Figure 1. The correlation between cell number and OD₅₆₄ using SRB assay.

2. MPP⁺에 대한 세포독성 실험

MPP⁺는 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)가 체내에서 교세포와 세로토닌성 세포에 주로 분포하는 monoamine oxidase B (MAO-B)에 의해 MPP⁺ (1-methyl-4-phenyl pyridinium ion)으로 변환되어 생성된다. 그리고 MPP⁺는 세포내 mitochondria의 호흡사슬에 영향을 주어 세포사를 일으키는 것으로 알려져서 파킨스병의 antagonist *in vitro* 와 *in vivo* 검색에 널리 사용되고 있어, 한약제제가 MPP⁺의 독성에 대한 억제효과 정도를 검증하기 위한 *in vitro* 검색 모델로 선택했다.

본 실험에 들어가기에 앞서 MPP⁺에 대한 PC12 세포독성실험을 실시하여 실험에 사용할 적정 MPP⁺ 농도를 결정하고자 했다. 결과에서 MPP⁺ 농도가

0.2mM이상에서 유의적으로 ($p < 0.01$) 세포독성 나타났으므로 본 실험에서 0.2mM에서 실험을 하였다 (Figure 2).

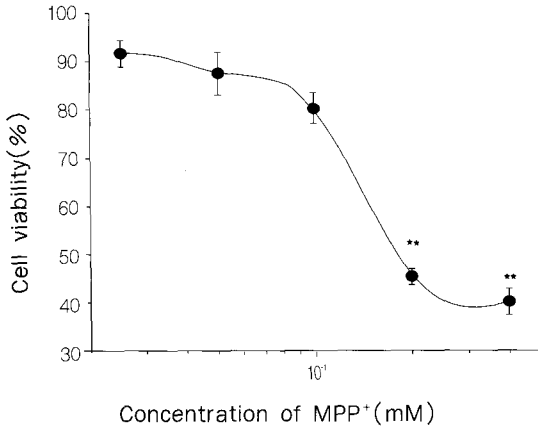


Figure 2. Dose-response of the cytotoxicity of MPP⁺ on cultures of PC12 cells. PC12 cells were incubated with varying concentrations of MPP⁺ for 48hrs prior to determination of cell viability by SRB assay. ** P<0.01 vs control

3. 6-OHDA에 대한 세포독성 실험

MPTP와 더불어 파킨슨병의 동물모델에서 많이 쓰이는 6-OHDA의 신경독성에 대한 생화학적 기작은 아직 확실히 밝혀진 것이 없고 단지 6-OHDA 자체의 독성에 의해 mitochondria의 NADH dehydrogenase와 cytochrome c oxidase를 직접 방해한다고 알려졌다.²³⁾

결과에서 6-OHDA농도가 50μM이상에서 유의적으로 ($p < 0.001$) 세포독성 나타났기 때문에 50μM의 농도에서 본 실험을 실시하였다 (Figure 3).

4. MPP⁺와 6-OHDA에 대한 한약탕제의 PC12 세포의 보호효과

MPP⁺에 대한 세포독성에 대해 한약탕제들의 PC12 세포에 대한 보호효과를 관찰했다. 세포생존

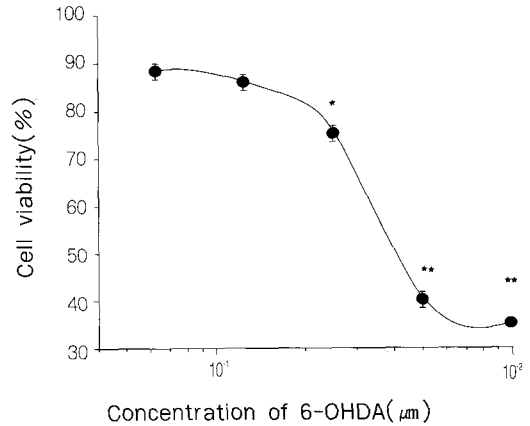
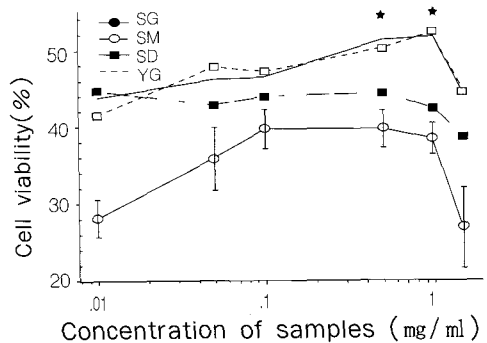


Figure 3. Dose-response of the cytotoxicity of 6-OHDA on cultures of PC12 cells. PC12 cells were incubated with varying concentrations of 6-OHDA for 24hrs prior to determination of cell viability by SRB assay. *P<0.05, ** P<0.01 vs control

율이 50% 넘는 것은 사군자탕, 연령고본단, 팔미환이고, 한약탕제를 처리하지 않은 대조군보다 유의한 효과 ($P < 0.05$)를 보인 한약탕제는 사군자탕, 연령고본단, 팔미환, 팔물탕, 팔미환이다. 사군자탕과 연령고본단은 0.5~1mg/ml의 농도에서 한약탕제처리를 하지않은 대조군보다 유의한 효과 ($P < 0.05$)가 나타났다. 팔물탕과 팔미환에서는 0.05mg/ml에서 급격히 효과가 나타났고 0.05~1mg/ml의 넓은 범위에서 유의적인 효과 ($P < 0.05$)를 보였으며, 특히 팔미환에서는 0.5~1mg/ml범위에서 세포생존율이 50%가 넘었다(Figure 4).



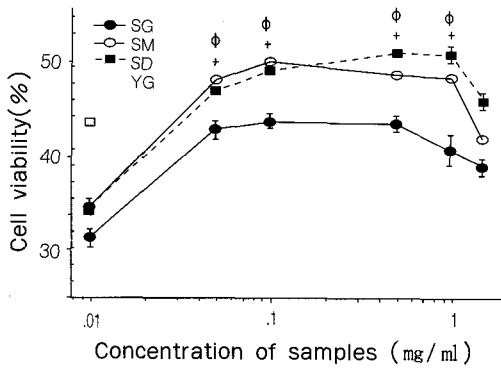


Figure 4. Protective effects of Korean traditional prescriptions against MPP⁺-induced PC12 cell death. *Statically different from control values ($p < 0.05$) for SG, using Student's t test. #Statically different from controls for YG. + Statically different from controls for PM. φ Statically different from controls for PL.

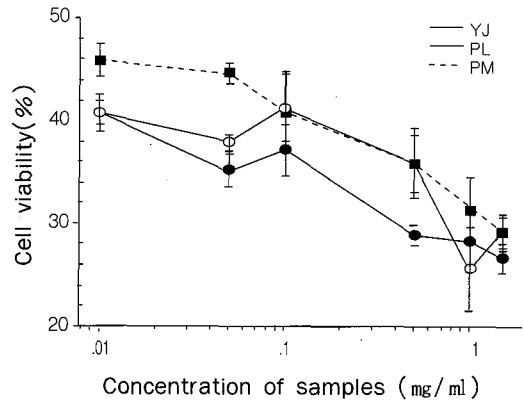
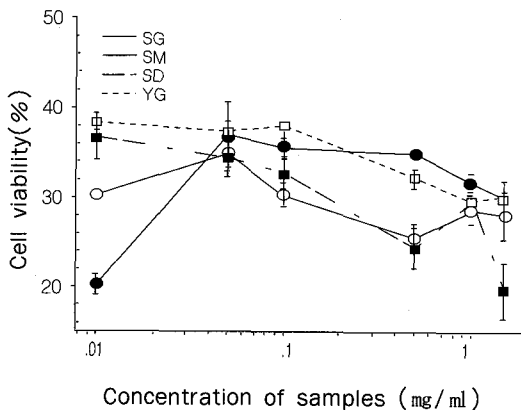


Figure 5. Protective effects of Korean traditional prescriptions against 6-OHDA-induced PC12 cell death.

6-OHDA에 대한 세포독성에 대해 한약탕제들의 PC12 세포에 대한 보호효과를 관찰했는데, 모든 한약탕제에서 세포생존율 50 % 넘지 않았고 유의적 효과가 관찰되지 않았다 (Figure 5).



5. ATP 측정

에너지 대사는 신경계 세포를 비롯한 모든 세포에서 생리 기능의 유지를 위해 절대 필요한 과정이다. 파킨슨병을 일으키는 신경계 세포의 퇴행성 병변에 있어서 에너지 대사의 감소와 ATP감소는 잘 알려져 있다.¹⁸⁾ Mitochondria내로 들어간 MPP⁺는 respiratory chain의 NADH CoQ₁ reductase (complex I)을 방해하여 ATP 생성을 억제함으로써 세포의 소실을 초래하는 것으로 알려졌다.¹⁹⁾

한약탕제가 에너지 대사에 미치는 영향을 조사하고 MPP⁺에 대한 보호효과를 증명하기 위하여 PC12 세포내 ATP 함량을 측정했다. 먼저 Figure 6에서 볼 수 있는 것과 같이 PC12 세포내의 ATP 함량은 대조군이 55.0 ± 1.5 nM인데 비해 MPP⁺ 처리군에서는 23.3 ± 0.8 nM로 유의적으로 낮게 ($p < 0.01$) 측정되었으나 6-OHDA에서는 50.6 ± 1.2 nM로 차이가 없게 측정되었다.

본 실험에서는 MPP⁺에 대한 한약탕제의 세포내 ATP 함량저하 억제효과를 보았는데 대체적으로 7개 한약탕제중 6종에서 억제효과가 관찰되었고, 이 중에서 연령고본단에서 유의적으로 가장 큰 억제효과를 ($p < 0.01$) 보였고, 나머지 사물탕, 팔미환, 육

미지황탕에서도 유의적인 억제효과를 보였다 ($p<0.05$). 이 결과는 MPP⁺ 세포독성에 대한 억제효과로서 볼 수도 있고, 다른 한편으로는 세포 에너지 대사의 개선에 따른 ATP 증진으로도 볼 수 있다. 그러나 음성대조군과 비교하면 ATP 함량의 개선효과는 매우 적었다 (Figure 7).

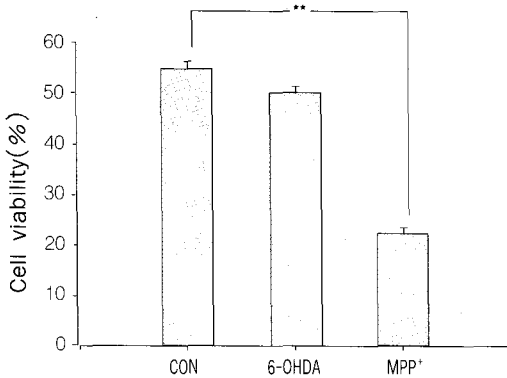


Figure 6. ATP concentration in PC12 cells. PC12 cells were treated with 6-OHDA(50 μ M) and MPP⁺ (0.2 mM) for 48h at 37 $^{\circ}$ C. All columns represent means \pm SEM (n = 3). Statistical analysis was done by using Student's t-test. ** $p<0.01$ vs control. CON; negative control

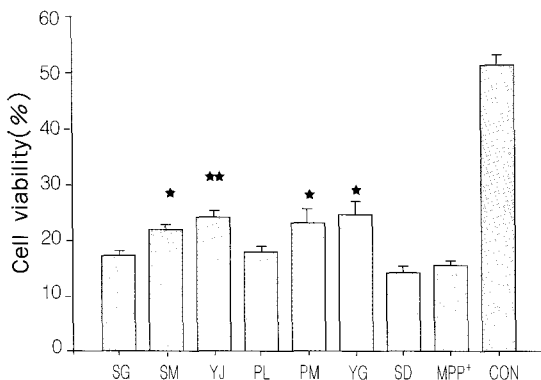


Figure 7. Effect of Korean traditional prescriptions on ATP concentration in PC12 cells. PC12 cells were treated with Korean traditional prescriptions and MPP⁺ (0.2 mM) for 48h at 37 $^{\circ}$ C. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs control

6. Neurite에 대한 효과

PC12 세포를 NGF처리하여 5일이상 배양하면 세포에서 neurite가 뻗어서 정상세포에서 network을 이룰 정도로 확장되게 된다. 여기에 신경독성을 지닌 물질을 넣어 주면 neurite가 줄어드는 현상을 관찰할 수 있다.¹⁷⁾ Neurite는 외부환경에 매우 민감하게 반응하고 활발히 움직여서 이웃 세포와 network을 이루는 신경세포의 일부분으로 6-OHDA를 배지에 첨가하고 neurite의 변이에 대해 형태학적 관찰을 했다. Figure 8에서 분화된 PC12 세포에 6-OHDA를 처리하고 24시간후에 같은 세포의 형태학적 변이를 관찰했는데, 분화된 상태에서 neurite들은 매우 심하게 손상을 입었다. 6-OHDA만 처리한 세포는 neurite가 거의 사라지고 세포체도 심한 손상을 입었다. 팔물탕과 연령고분단을 처리한 세포에서 약간의 보호효과가 관찰되었다 (Figure 8).

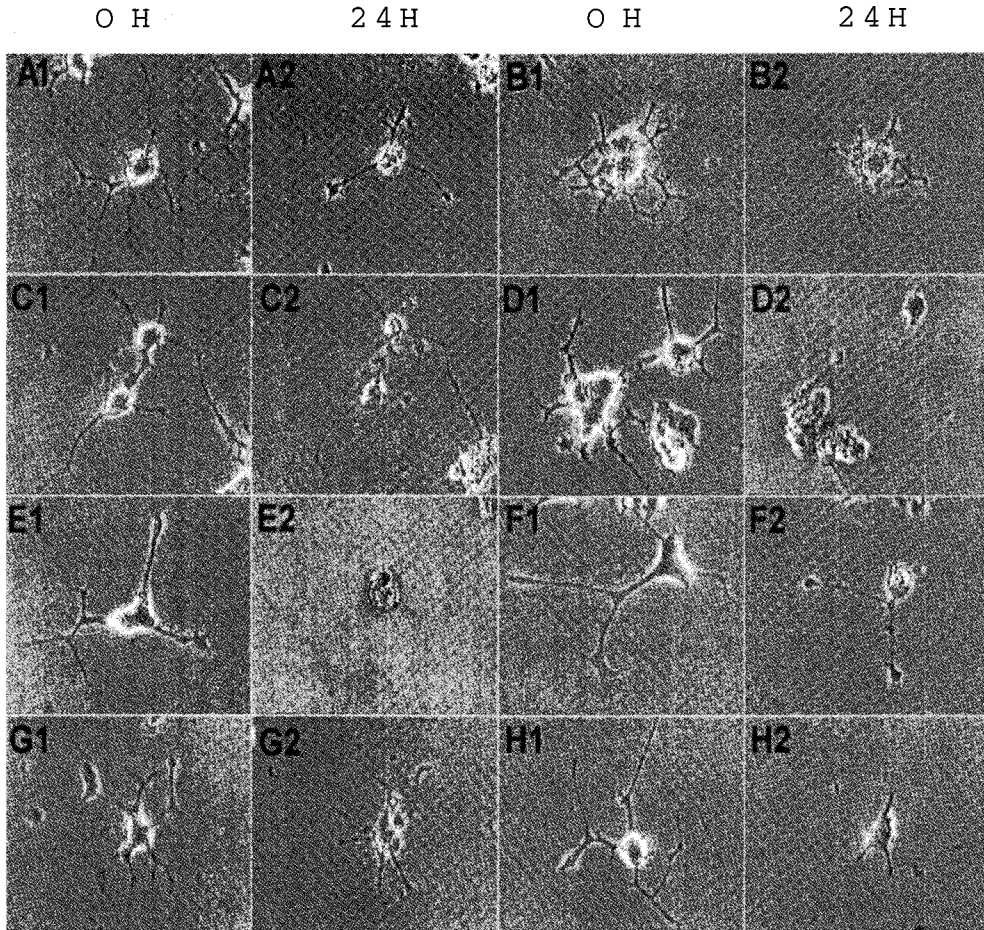


Figure 8. Effect of 6-OHDA treatment on morphology of differentiated PC12 cells with NGF. PC12 cells were cultured on Primaria® coated 35 × 10 mm tissue culture dish with regular culture medium in the presence of NGF (50 ng/ml) for 5-7 days at 37°C. Then, cells were treated with Korean traditional prescriptions and 6-OHDA. Original magnification was 400× (Reproduced at 60%) A; SM, B; SG, C; PL, D; PM, E; SD F; YJ, G; YG H; 6-OHDA.

IV. 고 찰

파킨슨병은 신경과 질환으로는 매우 흔한 신경계 퇴행성 질환이다. 증상으로는 행동이 느려지고 손발이 떨리는 진전증과 관절 경직, 그리고 몸의 균형을 잡지 못하는 등의 운동 장애가 나타나며, 대개 50세에서 70세 사이의 노인들에게 많이 발생한다. 그러나 드물게는 젊은 나이에도 생길 수 있으며, 다른

퇴행성 질환처럼 서서히 증상이 악화된다. 가장 흔히 알려진 파킨슨병 환자로는 권투선수 무하머드 알리를 들 수 있으며, 실제로 우리 주위에도 엄청나게 많은 환자들이 있는 게 현실이지만, 아직 우리나라에서의 정확한 역학 조사는 이루어지지 않고 있으며 미국의 통계로는 약 80만 명의 환자가 있는 것으로 조사되었고, 이는 전체 인구의 약 0.4%, 50세 이상된 성인의 1%, 노인 인구의 약 1.5%에 해당

한다. 발병 연령은 평균 57세로 조사되었으며, 연령이 증가할 수록 발병율은 증가하고, 평균적으로 발병 후 약 13년 정도를 생존한 것으로 조사되었다.

파킨슨씨의 정확한 발병 원인은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 카테콜아민 생성 신경세포 내에서 대사율을 증가시켜 신경세포 내에 산소대사물을 축적시키며 세포막과 세포내 기관에 손상을 주고, 기타 환경에서 오는 내·외부의 독성물질,⁴⁾ 그리고 mitochondria의 이상등으로 결국 세포소실이 온다고 생각되어 지며, 특히 흑질부위 도파민성 신경세포의 변성 및 세포소실을 보이는 질환으로 알려져 있고, 유전성 파킨슨병은 α -synuclein 유전자에 돌연변이가 생겨 발병하는 것으로 보고됐다.²⁰⁾

이와같이 파킨슨병은 유전성인 경우를 제외하면 앞서 밝힌바와 같이 흑질부위의 도파민성 신경세포의 퇴행원인은 ROS(reactive oxygen species)에 의한 것과 환경의 독성물질, 그리고 mitochondria이상, apoptosis등에 의한 것으로 볼 수 있다. 여기서 먼저 mitochondria를 살펴보면 mitochondria는 세포의 에너지공장으로써 glucose와 같은 에너지원으로부터 ATP를 생산해낸다. 그런데 여기에 어떤 내·외부적 원인에 의해 호흡사슬(respiration chain)에 이상이 생기면 ROS의 양이 증가되어 mitochondria는 ROS의 처리능력을 상실하게 되어 상처를 입게 된다. 그러면 ATP의 생산이 줄게 되고 자연 세포도 서서히 죽게 된다. 그러나 세포가 죽기전에 mitochondria의 cytochrome c가 세포질로 퍼지면서 caspase 9을 활성화시켜 apoptosis를 진행하게 된다. 최근 연구에서 caspase 9 (Casp9)을 불활성화시킨 "knockout" 쥐를 이용하여 신경세포 사멸을 유발시키는 apoptosis 경로에 있어서 효소 Casp9의 차단이 치매질환, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 노화와 관련된 급, 만성 신경질환을 치료할 수 있는 새로운 방법이 될 수 있음을 제시하고 있다. 이 연구에서 mitochondria가 손상될 경우 Casp9이 활성화되어 apoptosis가 유도되지만 Casp9이 결핍된 세포에서는 이러한 손상이 apoptosis를 유발시키지 않는다고 밝히고 있다. 또

한 Casp9의 차단은 다른 비-신경 조직의 초기 발생을 방해하지 않기 때문에 Casp9에 의해 유도되는 apoptosis 경로를 방해하는 치료 접근방법은 각종 신경질환과 연계된 원치않는 세포들의 사멸을 차단시킬 수 있을 것이다.²¹⁾ 여기서 MPP⁺의 양이 세포죽음의 중요한 요소로 작용해서 농도에 따라 작용기작이 틀려진다. 즉, MPP⁺가 저농도일때는 호흡사슬의 기능에 약영향을 미쳐 ATP생산이 줄지만 세포를 죽일정도는 아니고 apoptosis를 유발시키며 고농도에서는 ATP의 고갈로 necrosis에 이르게 된다.²²⁾

한약탕제를 이용한 MPP⁺와 6-OHDA에 대한 보호효과 실험에서 이용한 MPP⁺와 6-OHDA는 저농도에서 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다.²³⁾ Apoptosis는 파킨슨병의 주요한 원인의 하나일 것이라고 추측되고 있어 특정 신경세포의 apoptosis를 억제하는 물질을 찾는 것도 파킨슨병 예방 및 치료에 중요하다.

파킨슨병 환자의 흑질(substantia nigra)에서 호흡사슬(respiratory chain)의 손상과²⁴⁾ 지질과산화의 증가가 보고되었는데^{25,26)} 이것은 MPP⁺를 사용한 모델의 현상과 매우 유사하므로 MPP⁺의 독성에 대한 ATP고갈을 억제하는 작용을 본 실험에서 실시하여 연령고분단에서 가장 유의적인 효과를 보았고, 육미지황탕, 팔물탕, 사물탕에서 유의적 효과를 보았는데, 이중 연령고분단은 본 연구에서 사용한 MPP⁺ 세포독성억제효과, ATP고갈억제 효과, neurite의 유지, 이중염색법에 의한 형태적 관찰에서 모두 효과가 있는 것으로 관찰된 것이 매우 고무적이고 동물실험에서도 유의성 있는 좋은 결과를 얻는다면 파킨슨병의 치료 및 예방에 새로운 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

색인어 MPP⁺, 6-OHDA, PC12, 파킨슨 질환, SRB, ATP

참고문헌

1. Saitoh T, Nijima K, Mizuno Y. 「Long-term effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on strial dopamine content in young and mature mice.」 『J Neurol Sci』1987; 77: 229-35.
2. 손영호 「파킨슨질환의 새로운 경향들」 『대한의사협회지』1995; 39: 459-466.
3. Fearnley JM, Lees AJ. 「Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.」 『Brain』1991; 2282-2301.
4. Martilla RJ. 「Epidemiology of Parkinson's disease. In Kollwer WC, Ed. Handbook of Parkinson's disease.」1987 New York: Marcel Deker.
5. Heikkila RE, Manzino L, Cabbat SF, Duvoisin RC. 「Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors.」 『Nature』1984; 311: 467-469.
6. Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loschmann PA, Wachtel H. 「Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists.」 『Science』1991; 349: 414-418.
7. Sonsalla PK, Zeevalk GD, Manzino L, Giovanni A, Nicklas WJ. 「MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intestinal 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats.」 『J Neurochem』1992; 58: 1979-1995.
8. Chan P, Monte DAD, Langston JW, Janson AM. 「(+)-MK-801 does not prevent MPTP-induced loss of nigral neurons in mice.」 『J Pharmacol Exp Therap』1997; 280: 439-446.
9. Gupta M, Gupta BK, Thomas R, Bruemmer V, Sladek JR Jr, Felten DL. 「Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults.」 『Neurosci Lett』1986; 70: 326-331.
10. Irwin I, Wu EY, Delaney LE, Trevor A, Langston W. 「The effect of diethyldithiocarbamate on the biodisposition of MPTP: an explanation for enhanced neurotoxicity.」 『Eur J Pharmacol』1987; 141: 209-217.
11. Ricaurte GA, Irwin I, Forno LS, DeLaney LE, Langston E, Langston JW. 「Aging and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra.」 『Brain Research』1987; 403: 43-51.
12. Davis GC, Williams AC, Markey SP, et al. 「Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues.」 『Psychiatry Research』1979; 1: 249-255.
13. Ramsay RR, Dadger J, Trevor A, et al. 「Energy driven uptake of MPP+ by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP.」 『Life Science』1986; 39: 581-588.
14. Skehan P, Storeng R, Scudero D, et al. 「New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening.」 『Nat'l Cancer Inst』1990; 82: 1107-1112.
15. Leach FR. 「ATP determination with firefly luciferase.」 『J Appl Biochem』1981; 3: 473-517.
16. Gottlieb C. et al. 「Adenosine triphosphate in human semen: A study on conditions for a bioluminescence assay.」 『Fertil. Steril』1987; 47: 992-999.
17. Muto T, Tokuda A, Marini AM, Fujiki N. 「1-Methyl-4-phenylpyridinium kills differentiated PC12 cells with a concomitant change in protein phosphorylation」 『Brain Research』1994; 661: 51-55.
18. Seaton TA, Cooper JM, Schapira AHV. 「Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors.」 『Brain research』1997; 777: 110-118.
19. Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, et al. 「Inhibition of mitochondrial respiration by MPTP in mouse brain in vivo.」 『Neurosci Lett』1984; 91: 349-353.
20. Polymeropoulos MH, Lavedan C, et al. 「Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.」 『Science』1997; 276: 2045-2046.
21. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. 「Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo.」 『Cell』1998; 94(3): 339-52.
22. Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AHV. 「Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease.」 『J Neurochem』1994; 63: 1987-1990.
23. Wu Y, Blum D, Nissou MF, Benabid AL, Verna JM. 「Unlike

- MPP⁺, apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells is independent of mitochondrial inhibition.」『Neuroscience Lett』 1996; 221: 69-71.
24. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. 「Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.」『J Neurochem』 1990; 54(3): 823-827.
25. Dexter D, Carter C, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. 「Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease.」『Lancet』 1986; 2: 639-640.
26. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease.」『J Neurochem』 1989; 52(2): 381-389.