

MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델을 이용한 蘇合香元의 신경보호 효과 및 그 작용 기전 연구

김인자, 이지현, 송규주, 구병수, 김근우

동국대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

Neuroprotective effects of Sohaphwangwon essential oil in a Parkinson's disease mouse model

In-Ja Kim, Jihyun Lee, KyooJu Song, Byung-Soo Koo, Geun-Woo Kim

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :

To evaluate the neuroprotective effects of the essential oil from Sohaphwangwon (SH), a Chinese traditional medicinal prescription in a Parkinson's disease mouse model.

Methods :

1. The neuroprotective effect of SH on primary neuronal cells was examined by using 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+).
2. The neuroprotective effect of SH was examined in a Parkinson's disease mouse model. C57BL/6 mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 30 mg/kg/day), intraperitoneal (i.p.) for 5 days. SH inhalation was applied before MPTP treatment for 7 days and continued until 12 days after the first MPTP treatment.
3. To find out the intracellular target signal molecule(s) regarding the neuroprotective effect of SH essential oil, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptic protein SNAP25 were examined by Western blot analysis.

Results :

1. MPP+ induced a concentration-dependent decrease in cell viability. However, in the presence of 3 and 5 ug/ml of SH, MPP+-induced cell death was significantly reduced.
2. SH inhalation in MPTP mice led to the restoration of behavioral impairment and rescued tyrosine hydroxylase (TH)-positive dopaminergic neurodegeneration.
3. In SH / MPTP mice, BDNF and SNAP25 increased.

Conclusions :

This experiment suggests that the neuroprotective effect of SH essential oil is mediated by the expression of BDNF. Furthermore, SH essential oil may serve as a potential preventive or therapeutic agent regarding Parkinson's disease.

Key words :

Sohaphwangwon, Parkinson's disease, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)

투고일 : 2012.03.05 수정일 : 2012.03.12 채택일 : 2012.03.15

교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산구 석사동 814번지 동국대학교 일산한방병원 한방신경정신과

Tel : 031-961-9140, Fax : 031-961-9009, E-mail : koobs@dongguk.ac.kr

*이 논문은 2009년 7월 동국대학교 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

I. 서론

Parkinson's disease는 도파민 신경원의 변성 때문에 생긴 만성 진행성 신경장애로 뇌 조직 추체외로 계의 질환 중 가장 흔하게 나타나는 질환이다.¹⁾ 60세 이상 인구의 약 1%가 이 질환을 앓고 있으며 안정 시 진전, 근육경직, 서동증 등을 주 증상으로 한다.²⁻⁴⁾ 최근 25년 동안 Parkinson's disease의 생리, 병리와 약물요법의 진전을 통해 발병률이 감소하기는 하였지만 발병 원인은 아직도 불확실한 상태이며 흑질에 존재하는 dopamine 생성 신경세포가 파괴되어 선조체의 dopamine 함량이 현저히 감소되는 것이 그 특징이다.⁵⁻⁷⁾

역학조사에 의하면 Parkinson's disease는 환경적 요인과 관련이 있으며 이중 하나인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)에 노출될 경우 Parkinson's disease의 임상증상과 비슷하게 나타난다. 따라서 Parkinson's disease 유발모델을 만들 때 MPTP를 많이 사용하고 있다.⁸⁻¹¹⁾

Parkinson's disease의 양방 치료는 대증요법, 신경 방어적 요법, 복원요법 등으로 나눌 수 있으며 현재 도파민 전구물질인 levodopa를 기본으로 하는 레보도파 요법이 대증요법 중 최적의 방법이다.¹⁾

Parkinson's disease는 한의학적으로 顛證의 범주에 속하는 난치병의 하나다.¹²⁾ 한의학에서 顛證에 대한 최초 언급은 〈素問·至眞要大論〉¹³⁾에서 “諸風掉眩皆屬于肝”이라고 하여 顛證이 肝과 관련 있음을 나타내었다. 후에 明代 王肯堂은 〈證治準繩〉¹⁴⁾에서 顛振이라는 병명으로 顛證을 명확히 밝혔으며, 病因病機, 證治方藥을 기술하였다. 顛證은 병리학적으로 痰熱, 氣滯, 瘀血 등으로 인해 風이 생성되며 시간이 지남에 따라 肝腎虧虛, 氣血不足으로 인한 虛風증상이 나타난다¹⁵⁾.

蘇合香元은 〈太平惠民和劑局方〉¹⁶⁾에 처음 수록된 처방으로 蘇合香丸이라고 기재되어 있다. 溫通開竅의 대표방으로¹⁷⁾ 처방 약재 중 특이한 방향성 약재들이 대부분을 차지하고 있는 것이 특징이

다.¹⁸⁻¹⁹⁾ 따라서 許²⁰⁻²⁶⁾ 등은 中氣, 上氣, 氣逆, 中風, 小兒 急慢驚風 痰厥, 中惡, 胸痛, 腹痛 등의 氣機失調로 인한 急證에 救急方으로 사용한다고 하였다. 그리고 기존의 蘇合香元에 대한 실험적 연구로는 金²⁷⁻³⁰⁾ 등의 항 스트레스 효과 규명을 위한 것들과, 전³¹⁾ 등의 중추신경의 진통, 해열, 혈관 평활근 이완에 의한 혈압강하작용 규명 등 다수 있다.

본 실험에 사용된 蘇合香元은 〈東醫寶鑑〉²⁰⁾의 蘇合香元에서 희귀성 약재인 麝香과 광물성약재는 去하고 青木香, 香附子, 白檀香, 安息香, 沈香, 丁香, 龍腦, 蘇合香油, 乳香 등 9종 방향성 약재만으로 구성하였다.

蘇合香元 香氣液에 관한 기존 연구로 辛 등³²⁻³⁷⁾은 蘇合香元 香氣液이 중추신경 억제효과, 진통 및 항 경련 효과, 뇌신경계 세포 보호 효과, 알츠하이머병의 치료 및 발생 억제 등에 대한 것들이 있다. 그리고 MPTP를 처리하여 유도된 Parkinson's disease에 대한 예방이나 치료효과에 대한 한의학적 연구로는 金 등³⁸⁻⁴⁰⁾의 양릉천 자침 등 침 치료를 이용한 신경보호효과 기전 연구 등이 있다.

이에 본 저자는 蘇合香元이 Parkinson's disease에 신경보호 효과가 있는지 알아보고자 먼저 소합향원 향기액을 mouse에 투여한 뒤 MPTP를 처리하여 Parkinson's disease와 같은 신경독성을 유도하였다. 그리고 소합향원의 신경 보호 작용을 관찰한 바, Parkinson's disease발병 억제에 효과가 있음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 실험약재

① 약재의 구성

본 실험의 약재는 동국대학교 일산한방병원에서

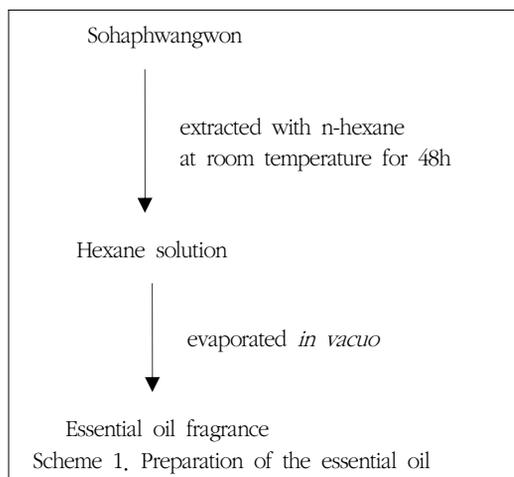
구입하여 정선한 것을 사용하였고, 蘇合香元의 처방구성은 〈東醫寶鑑〉²⁰⁾에 準하여 향성분이 많이 추출될 수 있는 약재⁴¹⁾ 위주로 加減하였다.

Table 1. The Amount and Composition of Sohaphwangwon

Medicinal herb name	Scientific name	Amount
龍腦	(<i>Borneolum</i>)	22.86g
蘇合香	(<i>Styrax Liquidus</i>)	22.86g
安息香	(<i>Benzoinum</i>)	22.86g
木香	(<i>Helenii Radix</i>)	22.86g
乳香	(<i>Olibanum</i>)	22.86g
沈香	(<i>Aquillariae Lignum</i>)	17.14g
丁香	(<i>Caryophylli Flos</i>)	22.86g
檀香	(<i>Santali Ligum album</i>)	22.86g
香附子	(<i>Cyper Rhizoma</i>)	22.86g
Total		200.02g

② 蘇合香元 香氣液의 제조

蘇合香元 200.2g을 분말로 만든 다음, *n*-hexane 2 l 를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다 (Scheme 1). 방치하는 동안 12시간 마다 1번씩 저어주면서 가능한 많은 정유 香氣液이 추출되도록 하였고, 추출액을 여과한 다음, 여액인 *n*-hexane을 증류하여 암록색의 맑은 정유 香氣液 29.7g을 얻었다.



세포주 실험을 위해 精油 香氣液을 에탄올 또는 Dimethyl superoxide (DMSO) 에 50mg/ml이 되도록 희석한 후 최종적으로 clean bench에서 pore size 0.2 um인 syringe filter (Nalgene, USA) 로 여과하였다. 그런 다음 에탄올 또는 DMSO에 희석하여 -20℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 오리엔트 바이오(주)에서 구입한 외관상 건강한 웅성 10주령, 체중 25~30 g, C57BL/6 mice를 사용하였다. 온도 22±1℃, 습도 55±1%, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실 (동국대 일산병원 동물실) 에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응 사육시킨 후 실험에 사용하였다.

① 실험군 구성 및 실험설계

실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무게별로 균등하게 6마리씩 3 group으로 나누고, 각 group 별로 다음과 같이 처치하였다.

- MPTP group : Mice received intraperitoneal (i.p.) injections of MPTP-HCL (30mg/kg of free base; Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in saline at 24h intervals for 5 days.
- Control group : mice received saline only.
- 소합향원 + MPTP group (SH/MPTP) : 1주일간 소합향원 향기액 흡입 후 MPTP를 투여하는 과정을 지속적으로 처리.

2. 방법

1) 행동실험 (pole test)

Parkinson's disease의 대표적인 반응인 무운동성과 경직반응⁴²⁾을 측정하기 위해 행동실험(pole test)을 Abe et al.⁴³⁾이 고안한 방법으로 실시하였다. 높이 50cm, 직경 10mm가 되는 막대기 위에 실험동물을 앉힌 후 바닥에 도착하는 데 소요되는

시간을 측정하였다. 동물 실험 군을 무계별로 균등하게 3마리씩 나눈 후 각 group별로 saline (normal), MPTP, MPTP와 소합향원 병용 (SH/MPTP) 등 3group으로 나눠 Pole test를 시행하였다.

2) 형태학적 변화의 영상분석

TH 양성 세포 소실 정도⁴⁴⁾를 카메라 (Leica DFC 480) 및 image analysis program (Leica Q Win V3)을 이용하여 100배의 배율로 관찰하였다.

3) 일차 신경세포 배양 (primary neuronal cells, PNC)

수정 후 16-17일된 마우스 태아의 대뇌를 적출하여 meninges 와 blood vessels을 제거한 후 분리배지 (120.9 mM NaCl, 4.83 mM KCl, 1.22 mM KH₂PO₄, 25.5 mM NaHCO₃, 13.0 mM glucose, 10.0 mM HEPES, 0.3% bovine serum albumin, BSA)에서 세포를 분리하여 0.02% trypsin 과 0.04 mg/ml DNase를 10 분 동안 37 °C에서 처리했다. 그 후 0.075% SBTI (trypsin inhibitor, Sigma)를 넣어 세포를 1000 rpm 에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포를 Neurobasal medium (Invitrogen)에 2% B27 supplement, 0.2 mM glutamine, 0.1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin 등이 들어간 배지로 부유 후 hematocytometer 로 세포를 개수한 후 5x10⁵/ml로 poly-L-lysine이 코팅된 24 well plate로 옮겨준 후 일주일 간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 키웠다. 배지 교환은 2-3일에 한번 씩 해왔다.⁴⁵⁾

4) 세포 생존율 측정 (MTT assay)

MTT (tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay는 Sladowski⁴⁶⁾의 방법을 따라 행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolum을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 세포의 능력을

이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 580nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다.

MTT assay는 우선 24 well plate에 primary neuronal 세포를 일주일 배양한 후, 여러 농도로 향기액을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 MTT (Sigma) 2mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 580nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

세포 독성을 유발하기 위해 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) (Sigma) 를 DMSO에 녹여 사용하였다. 소합향원의 신경보호효과를 관찰하기 위해 소합향원을 1, 3, 5 ug/ml의 농도로 30분 먼저 처리한 후 50uM MPP+를 처리하였고 그 후 24시간 후에 MTT를 통해 세포생존율을 계산하였다.

세포생존율(Cell Viability, %)은 다음과 같이 정의 하였다. 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100% 라고 정의 하고, 나머지 군의 측정된 O.D. 값을 상대치로 환산하여 값을 얻었다.

즉, Cell Viability = (실험치 / control 군)의 값이다.

5) Western blot analysis⁴⁷⁾

뇌를 적출한 후 substantia nigra (SN)와 Striatum을 분리하여 완충액 (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail) 을 넣고 균질기를 이용하여 균질화하였다. 균질액을 12000 rpm에서 15분간 4°C에서 원심분리 후 상층액 만을 얻었다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 상층액은 4X Lammlie의 완충액 (62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20%

glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)을 넣고 95°C에서 boiling 하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug을 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법 (SDS-PAGE)으로 분리하였고, nitrocellulose paper (Amersham)로 옮겼다. 단백질이 옮겨졌음을 Ponceau-S로 염색하여 확인하고 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)으로 씻은 후 5% 탈지 분유액으로 30분 이상 blocking하였다. 항 TH (tyrosine hydroxylase), actin, BDNF (brain derived neurotropic factor), SNAP 25 (synaptosome-associated protein of 25,000 daltons) (Cell signaling tech, USA)와 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 동안 반응시켰다.⁴⁸⁾ 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

6) 자료 분석 및 통계 처리

모든 측정값은 평균값±표준편차(mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후 검증은 Tukey test를 통해 검증하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결과

1. 행동실험 (Pole test)

Pole test 결과 MPTP를 주입한 mouse의 바닥 도착시간은 Normal group에 비해 배 이상의 시간이 걸려 운동능력이 현저히 저하됨을 관찰할 수

있었다 (Fig. 1). 그러나 MPTP와 소합향원을 병용 주입한 SH/MPTP group의 도착 시간은 MPTP group에 비해 도착시간이 유의성있게 단축되었다 ($p < 0.05$).

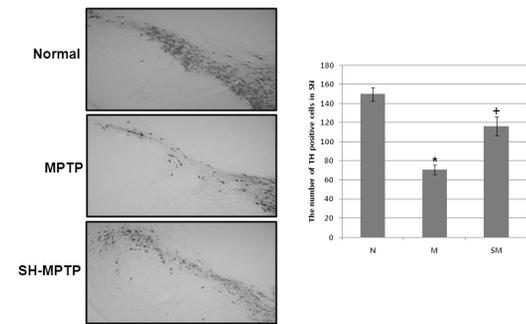


Fig. 1. Results of pole test

The time elapsed for mice to arrive on the ground from the 50 cm high pole was measured. Data are shown as means ± SEM. * $p < 0.05$ vs normal and + $p < 0.05$ vs MPTP group.

Abbreviation : SH : Sohaphwangwon

MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

2. 형태학적 변화의 영상분석

실험동물군은 MPTP 혹은 saline을 마지막으로 투여한 후 7일에 chloral hydrate overdose (300mg/kg)로 마취한 후 심장천자를 하였다. 4% paraformaldehyde in 0.05 M phosphate buffer (PB) 로 고정하여 뇌를 적출하고 24시간 동안 후 고정을 시행하였다. 이후 결빙시 조직손상을 방지하기 위하여 30% sucrose 수용액에 24시간 동안 둔 후 조직을 절편하였다. 면역 염색은 free-floating 방법으로 조직을 cryomicrotome을 이용해 40 μm의 두께로 잘라 흑질 substantia nigra (SN) 부분이 포함된 부위를 사용하였다. 0.05 M PBS 용액에 3% H₂O₂가 들어간 용액으로 10분간 부유 후 tyrosine hydroxylase (1:1000;

SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 항체를 상온에서 16시간 이상 결합시킨 후

Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 발색하였다.

흑질의 변성 정도를 측정하기 위해 흑질에 있는 TH positive cell을 100배로 확대된 카메라로 찍은 결과 아래 Fig. 2와 같이 형태학적 변화가 나타났다. MPTP로 처리한 흑질 조직은 TH positive 세포의 수가 현저하게 감소되었으나 SH/MPTP의 흑질 조직은 MPTP 처리 조직에 비해 TH positive 세포의 수가 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$).

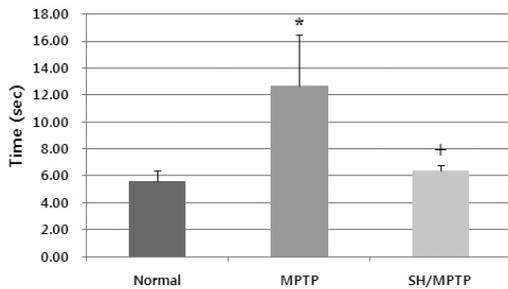


Fig. 2. TH-specific immunohistochemical staining in the SN.

The neuroprotective effects of SH, examined by TH-positive neurons in the SN in the MPTP-induced PD model. Data are presented as means \pm SEM, * $p < 0.05$ vs normal and + $p < 0.05$ vs MPTP group.

Abbreviation : TH : Tyrosine Hydroxylase.
SN : substantia nigra.

3. 세포 생존율 측정 (MTT Assay)

1) 蘇合香元 향기액 투여 시 세포 생존율 측정

우선 24 well plate에 primary neuronal 세포를 일주일 배양한 후, 0.1ug/ml, 1ug/ml, 3ug/ml, 5ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml 농도로 각각 소합향원 향기액을 첨가하고 24시간 동안 배양하여 세포 생존율을 계산하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 蘇合香元 향기액의 농도별 세포 생존율 차이는 특별한 유의성이 없었다.

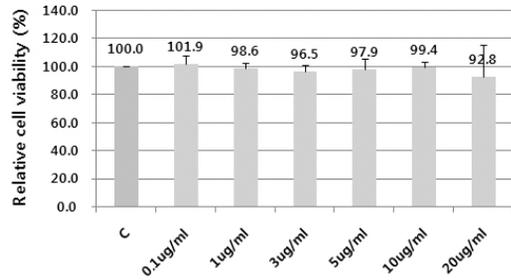


Fig. 3. Dose dependent cytotoxicity effect of SH essential oil in primary neuronal cells (PNC).

PNC were exposed to different concentration (0.1-20 ug/ml) of SH essential oil in EtOH. Cell viability was measured by MTT assay 24 h after SH essential oil addition. Data, expressed as percentage of control (Con), are the mean \pm SEM of three separate experiments.

2) MPP+ 투여 시 세포 생존율 측정

세포 독성을 유발하기 위해 DMSO에 녹인 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) (Sigma)를 50 um, 100um, 200um, 300um, 400um, 500um별로 각각 처리한 후 세포생존율을 측정하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다.

MPP+ 투여 시 세포 생존율은 감소하였고 ($p < 0.05$), MPP+ 투여량의 증가에 비례하여 세포 생존율은 감소되었다. 그러나 400uM 이상의 MPP+를 투여한 경우 더 이상의 세포 생존율 저하는 나타나지 않았다.

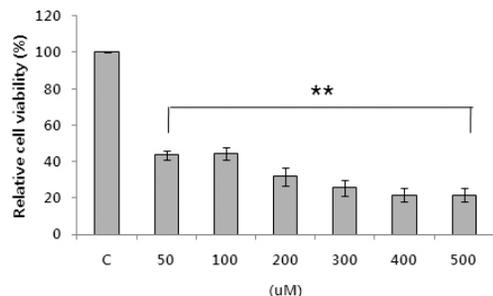


Fig. 4. MPP+-induced cell viability in PNC. PNC were exposed to different concentrations (50-500 uM) of MPP+. Cell viability was measured by MTT assay at 24 h. Data, expressed as percentage of

control(Con), are the mean \pm SEM of three separate experiments. $**p < 0.05$ vs MPP+ treated cells

Abbreviation : PNC : primary neuronal cells

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

MPP+ : 1-methyl-4-phenylpyridinium ion

3) 소합향원/MPP+ 투여 시 세포 생존을 측정

소합향원의 신경보호효과를 관찰하기 위해 1ug/ml, 3ug/ml, 5ug/ml 농도로 각각 소합향원 향기액을 첨가하고 30분 후 50uM MPP+를 처리하였다. 그 후 24시간이 지나 MTT Assay를 통해 세포생존율을 계산, Fig. 5와 같은 결과가 나왔다. 그 결과 소합향원 사전 투여량에 따라 세포 생존율이 유의성이 있을 정도로 차이를 보였으며 ($p < 0.05$) 소합향원 투여 농도가 많을수록 세포생존율은 증가하였다.

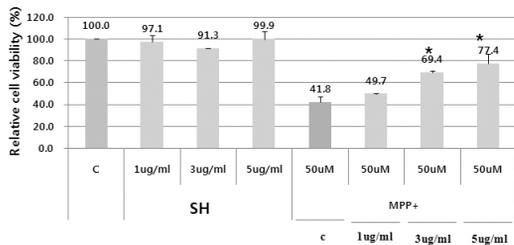


Fig. 5, the effect of SH on the MPP+—induced cell death.

To examine the effect of SH on the MPP+—induced cell death, SH was pre-treated for 30 min as indicated, then 50 uM of MPP+ was treated in PNC. Cell viability was measured by MTT assay at 24h. Data, expressed as percentage of control (Con), are the mean \pm SEM of three separate experiments. $*p < 0.05$ vs MPP+ treated cells.

4. Western blot analysis

1) Substantia nigra에서의 TH 양성 도파민성 신경세포의 변화

Substantia nigra (SN)에 있는 Tyrosine Hydroxynase

(TH)는 SH/MPTP group의 경우 MPTP group에 비해 유의하게 ($+p < 0.05$) 단백질발현의 증가가 나타났다 (Fig. 6).

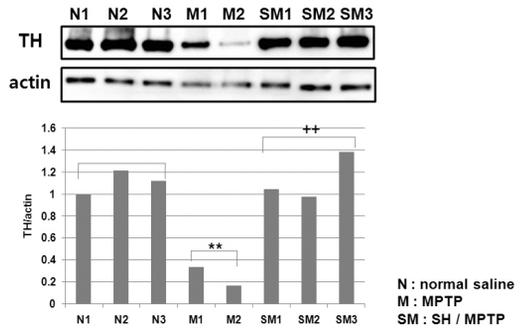


Fig. 6. TH expression levels in SN by normal saline, MPTP or SH/MPTP treated mice.

The intensity of the protein bands was quantitated by densitometry and the amounts of TH were normalized versus actin. Data are shown as means \pm SEM. $**p < 0.01$ vs normal and $+p < 0.05$ vs MPTP group.

2) Striatum에서의 TH 발현 측정

Striatum에서 TH의 발현을 면역블롯으로 확인한 결과 SH/MPTP group이 MPTP group에 비해 TH의 발현이 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$).

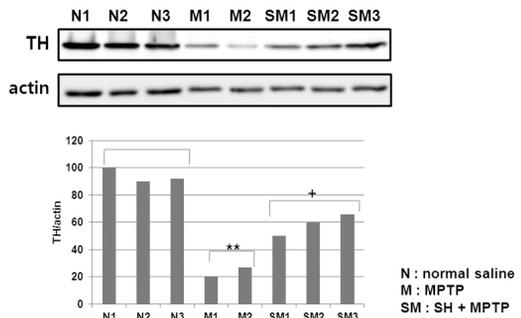


Fig. 7. TH expression levels in striatum by normal saline, MPTP or SH/MPTP treated mice.

The intensity of the protein bands was quantitated by densitometry and the amounts of TH were normalized versus actin. Data are shown as means \pm SEM. $**p < 0.01$ vs normal and $+p < 0.05$ vs MPTP group.

3) Substantia nigra에서의 BDNF와 SNAP25 발현 측정

SN에서 측정된 BDNF와 SNAP25의 발현은 SH/MPTP group이 MPTP group에 비해 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 특히 SNAP25의 경우 normal group 보다도 더 높게 발현되었다 (Fig. 8).

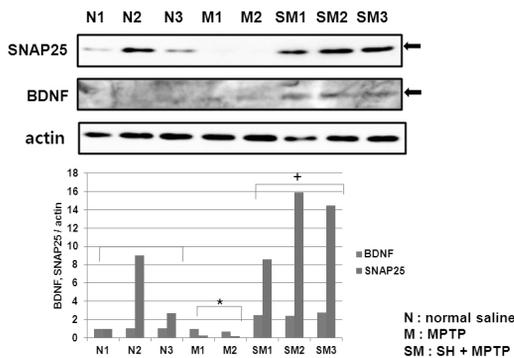


Fig. 8. BDNF and SNAP25 expression levels in SN by normal saline, MPTP or SH/MPTP treated mouse. The intensity of the protein bands was quantitated by densitometry and the amounts of BDNF and SNAP25 were normalized versus actin. Data are shown as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs normal and + $p < 0.05$ vs MPTP group.

Abbreviation : BDNF : Brain-derived neurotrophic factor.
SNAP25 : synaptosome-associated protein of 25,000 daltons.

IV. 고찰

Parkinson's disease는 1817년 James Parkinson 이 처음 보고한 질환으로 도파민성 흑질 신경원의 광범위한 변성과 연관되어 있다. 즉, 흑질의 신경 세포들은 dopamine을 생성하고 이를 신경섬유를 통해 선조체에 있는 신경세포로 전달하게 되는데 흑질에 있는 신경세포가 점차 퇴화하면서 선조체로 분비되는 도파민 양이 점점 감소하게 되는 것이다. 따라서 흑질에 있는 뇌신경세포의 60-80%가 없어지게 되면 파킨슨병의 증상이 나타나게 된다.¹⁾

안정 시 진전, 근육강직, 서동증이 Parkinson's

disease의 3대 대표증상이며 이러한 운동장애는 대개 왼쪽사지 말단에서 시작돼 반대쪽으로 진행되며 점차 전신의 수의운동이 불가능해진다. 이 때문에 자세가 앞으로 굽으면서 보폭이 좁아지는 보행 장애가 일어나고 점차 눈을 깜빡이거나 대화하는 것이 어려워진다. 비운동장애로는 사고의 흐름이 느려지고 수행능력 장애, 공간 지각 능력 장애, 주의전환능력 장애 등이 있으며 환자의 30-60% 정도에서 우울증이 나타난다.⁴²⁾

Parkinson's disease는 meperidine의 제조 시 불순물질로 나타나는 MPTP가 최초의 확정된 발병 원인으로 밝혀졌다⁴⁹⁾. 그러나 Rosati⁵⁰⁾ 등에 따르면 이 질병의 발생은 MPTP 단독으로 이루어지는 경우 보다는 일산화탄소중독과 만성중금속 중독 등 여러 복합적 요인에 의하여 발생할 가능성이 많다고 하였다.

MPTP는 영양류 등에서 원발성 파킨슨병과 유사한 임상증상인 경직, 진전과 흑질의 도파민성 신경세포 손실을 보이는 병리학적 변화를 유발시켜 파킨슨병 모델로 널리 사용되고 있다.⁵¹⁾ MPTP 자체는 뇌에 치명적이지 않으나 뇌조직의 교세포와 세로토닌성 세포에 주로 분포하는 monoamine oxidase B에 의해 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+)로 변환한 후 도파민 reuptake체계를 통해 도파민성 신경세포 미토콘드리아에 높은 농도로 축적된다.¹⁾ 미토콘드리아 내에서 MPP+는 respiratory chain 의 NADH CoQ I reductase (complex I)을 방해하여 ATP생성을 억제함으로써 세포의 소실을 초래하는 것으로 생각되나 그 정확한 기전은 아직까지 확실히 밝혀지지 않았다.⁵²⁻⁵³⁾

Parkinson's disease는 한의학적으로 顛證의 범주에 속하며¹²⁾ 〈素問.至眞要大論〉¹³⁾에서 “諸風掉眩皆屬于肝”이라고 顛證에 대해 최초로 언급하였다. 후에 明代 王肯堂은 〈證治準繩〉¹⁴⁾에서 顛證을 顛振이라는 병명으로 명확히 밝혔으며, 病因 病機, 證治 方藥을 기술하였다.¹⁵⁾

顛證은 병리학적으로 痰熱, 氣滯, 瘀血 等으로 인해 생성된 肝風이라는 實證이며 이러한 實證을 적기에 치료하지 못하면 虛風증상이 도래하게 된다.¹²⁾

蘇合香元은 〈太平惠民和劑局方〉¹⁶⁾에 처음 수록된 처방으로 〈外臺秘要〉⁵⁶⁾의 “吃力伽丸” 또는 “白朮丸”과 약물 구성, 효능, 적응증과 완전히 동일하다. 처방 약재 중 특이한 방향성 약재들이 대부분을 차지하고 있는 것이 특징인 蘇合香元은 이러한 芳香性 약재들이 脾胃의 運化機能을 활성화 시키고 병리적 산물인 濕邪 제거에 효능을 발휘하여¹⁷⁾ 溫通開竅의 대표방이다. 그 중 방향성 약재는 芳香開竅, 行氣解鬱, 散寒化濁 작용이 있어 장부의 氣血鬱滯 증상을 풀어 주고, 華撥은 芳香性 藥材의 散寒, 止痛, 開鬱의 작용을 증강시켜주고, 犀角은 解毒, 朱砂는 鎮心安神, 白朮은 健脾和中, 燥濕化濁, 訶子是 溫攝斂氣 작용이 있으며, 이 약재들이 방향성 약재와 함께 補氣收斂 작용을 함으로써 방향성 약재의 지나친 正氣耗散작용을 방지한다.¹⁸⁾ 또한 君藥인 蘇合香은 開竅醒神 효능이 있으며 다른 방향성 약재를 한 곳으로 모아 “解穢宣竅, 醒豁神經” 작용을 강화시키고 있다. 이에 따라 腦萎縮으로 인한 癲癇치료 등에 응용되고 있다¹⁹⁾.

본 실험에 사용된 蘇合香元은 〈東醫寶鑑〉²⁰⁾의 蘇合香元에서 희귀성 약재인 麝香과 광물성약재는 去하여 青木香, 香附子, 白檀香, 安息香, 沈香, 丁香, 龍腦, 蘇合香油, 乳香 등 9종 방향성 약재만으로 구성하였다. 麝香과 朱砂, 犀角 등이 빠져서 開竅作用을 위해 일시적으로 사용하는 應急藥으로서의 蘇合香元 보다는 芳香化濕, 行氣開鬱 작용에 의한 뇌신경 퇴화예방을 위해 常用할 수 있는 蘇合香元에 초점을 맞췄다.

이상 9종의 蘇合香元 구성 약재를 동시에 넣어 향기액을 추출한 주요성분을 보면 Table II와 같다.

이상에 기술한 약물의 기본 성분을 기초로 본 실험에 사용한 蘇合香元 香氣液과 동일하게 사용

Table II. Composition of the Fragrance oil Analyzed by GC-MS³³⁾

Retention Time(Min)	Compound ^{a)}	Content(%)
11.86	Fenchol	0.50
12.76	Camphor	1.11
13.10	Borneol	21.30
13.38	Endo-Borneol	33.30
14.71	Octyl acetatelibanum)	0.54
18.60	Eugenol	5.93
20.19	b-caryophyllene	0.72
22.83	Euenyl acatate	2.19
26.33	Benzyl benzoate	5.38
28.98	Benzyl cinnamate	1.95

a) Compounds having over 0.5% contene are listed

한 기존 연구로는 이미 辛³²⁻³⁷⁾ 등의 보고가 있다.

辛³²⁾은 蘇合香元 香氣液 흡입시 최초 경련 발현 시간이 길어지고 경련지속시간은 짧아졌으며, in vivo에서 뇌중 GABA함량의 증가, 뇌중 glutamate 억제효과가 있음을 보였다.

千³⁴⁾은 加減蘇合香元의 香氣液 흡입에 의한 항 경련작용의 기전을 해명하였는데 picorotoxin-유도 경련 억제효과, strychnine-유도 경련억제효과, pentylenetetrazole-유도 경련억제효과 모두 대조군에 비해 경련 발현 시간은 증가하였으며 경련지속 시간은 단축된 것으로 나타났다. 이에 대한 加減蘇合香元 香氣의 항 경련 기전은 중추신경계의 접합전이나 접합 후 억제기능을 저해하기 보다는 chloride ion의 전도에 영향을 미쳐 GABA 수용체를 활성화시킴으로써 경련을 억제시키는 것으로 분석하였다.

金³⁵⁾은 蘇合香元 香氣液의 Phenylquinone-유도 통증에 대한 진통효과에 경구 투여, 향기흡입, 피부도찰 모두에서 香氣液 흡입 시 진통효과를 보였는데, 피부도찰이 향기흡입이나 경구투여보다 효과적이었고, 金³⁶⁾은 香氣液이 Glioma cell에 미치는 효과에 대한 실적 연구에서 신경교종 세포의 사멸을 유도할 때 Akt와 ERM단백질의 인산화가 저하

되었으며, MAPK와 p38 단백질의 인산화는 증가됨을 밝혀 加減蘇合香元 香氣液이 신경계 암세포의 항암효과 및 정상 신경계 세포를 보호하는 효과에 대한 가능성을 밝혔다.

李³⁷⁾는 加減蘇合香元 香氣液이 알츠하이머병의 치료 및 발생 억제에 미치는 영향을 조사한 결과 기억 결손이 회복되었으며, JNK, p38, MAPK, tau의 인산화가 증가되었으며, GFAP의 증가가 저해되었음을 밝혀 加減蘇合香元 香氣液이 알츠하이머병의 치료 및 발생 억제효과가 있음을 보여주었다.

본 연구에서는 蘇合香元 香氣液이 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환에 예방효과를 보인 점을 감안하여 Parkinson's disease에도 똑같은 예방 가능성이 있는지, 있다면 그 기전은 무엇인지 알아보고자 하였다. 따라서 먼저 소합향원 香氣液을 mouse에 투여한 뒤 MPTP를 처리하여 Parkinson's disease와 같은 신경독성을 유도함으로써 소합향원이 신경 보호 작용이 있는 지를 관찰하였다.

먼저 무운동성과 경직반응에 대한 영향을 알아보기 위해 운동실험인 pole test를 시행하였다. 그 결과 MPTP를 처리한 group은 운동능력이 현저히 저하되었으나, 소합향원 투여 후 MPTP를 처리한 SH/MPTP group은 운동능력이 향상되었으며 거의 Normal group과 비슷하였다 (Fig. 1). 이는 소합향원이 MPTP의 신경독성에 의한 운동능력 저하에 대해 보호효과를 있음을 시사하는 것이다.

Parkinson's disease에서 흑질 변성은 이들 신경 세포들이 도파민성이며 도파민성 신경섬유들은 미상핵과 피각을 통해 치밀한 신경망을 형성하고 있는 신전조체에 주로 투사된다. 신조체 도파민의 소실은 흑질 내의 신경세포 소실의 정도에 비례하며 사후 검사 상 Parkinson's disease에서 흑질 변성은 정상적인 검은 색소의 소실에 근거한다.⁴⁴⁾ 따라서 흑질 조직의 변성 정도를 알기 위하여 Saline, MPTP, 그리고 SH/MPTP로 처리된 흑질에 있는 TH positive cell을 염색하여 흑질내의 도파민성 신경세포 소실 정도를 관찰하였다. MPTP로

처리한 흑질 조직은 Normal 조직에 비해 TH positive 세포가 현저히 감소되었다 (Fig. 2). 그러나 SH/MPTP의 흑질 조직은 MPTP 처리 조직에 비해 TH positive 세포의 손실이 유의성 있게 감소하였고, Normal 조직에 근접하고 있다.

다음은 소합향원이 MPTP의 신경독성에 의한 신경보호효과를 규명하기 위해 MTT assay를 이용하여 primary neuronal cell (PNC)의 생존율을 측정하였다. PNC에 소합향원 香氣液을 농도별로 주입한 후 세포 생존율을 측정한 결과 Normal group과 비슷한 결과를 얻어 통계적 유의성이 나타나지 않았다 (Fig. 3). MPP+를 투여했을 경우 세포 생존율은 현저히 저하되었고, 특히 MPP+ 투여량이 많을수록 그 정도가 심하였다 (Fig. 4). 그러나 MPP+ 투여량이 많을수록 세포 생존율 감소 속도는 체감되었으며, 일정량 이상의 MPP+를 투여했을 경우 더 이상의 세포 생존율 저하는 나타나지 않았다. 소합향원 香氣液을 농도별로 주입한 후 일정량의 MPP+를 투여했을 경우 소합향원 香氣液의 주입 농도에 따라 세포 생존율이 증가하였다 (Fig. 5). 이는 정상적인 상황에서 소합향원을 지속적으로 투여할 경우 MPTP와 같은 세포독성물질이 주입될지라도 세포 생존율은 높아질 수 있으며 특히 소합향원 사전 투여량이 많을수록 세포 생존율은 더 높게 나타날 수 있음을 나타낸다.

그리고 흑질 선조체 경로 퇴행 정도를 측정하기 위해 뇌를 적출한 후 SN과 Striatum을 분리하고 Western blot법을 이용하여 Tyrosine hydroxylase(TH), BDNF, SNAP25 등의 단백질을 정량화하여 각 단백질의 발현정도를 측정하였다.

Tyrosine hydroxylase는 도파민 생합성 관련 신경에 포함되어 있는 tyrosine으로부터 dopamine과 epinephrine을 합성하는 과정의 전반적인 속도조절을 담당하는 것으로 알려져 있다.⁵⁷⁾ 이러한 TH는 포유동물의 중추신경계에서 hypothalamus, midbrain, brainstem, olfactory bulb 등의 특정부위에서만 제한적으로 발현되기 때문에 높은 조직

특이성을 나타낸다. 특히 도파민 신경세포의 분화가 적절히 일어나지 못하거나 여러 원인으로 인한 중뇌 도파민 신경세포의 사멸 후 재생과정에서의 적절한 TH 유전자의 발현 조절이 일어나지 않는 것이 파킨슨병의 병리적 원인으로 밝혀졌다. 이에 따라 이러한 유전자의 유도 발현이 파킨슨병의 예방 또는 치료에 있어서 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.⁵⁸⁾

SN에서 도파민 생성 효소인 TH의 단백질 발현은 MPTP 투여 시 현저히 감소되었으나 SH/MPTP의 경우 MPTP group에 비해 유의성이 있을 정도로 증가된 결과를 보였다 (Fig. 6). 그리고 Striatum에서의 TH 단백질 발현은 MPTP 투여 시 SN의 결과와 비슷한 정도를 나타내었으나 SH/MPTP의 경우 거의 Normal group과 같은 정도의 TH 활성도를 보였다 (Fig. 7). 즉, SN과 striatum에서의 TH 발현은 Normal group의 경우 striatum에서의 TH가 비교적 높게 나타났으며, MPTP group의 경우 SN과 striatum에서의 TH 발현이 저조하였으며 SH/MPTP group의 경우 striatum과 SN에서 TH의 발현이 증가하였다.

신경영양인자는 신경세포의 성장과 분화에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다고 보고되고 있다. 특히 파킨슨병과 관련하여 BDNF, GDNF 등이 도파민 생합성 신경에 관련되어 있다.⁵⁹⁾ BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) 는 다양한 뇌 영역에서 발현되는 단백질로서 신경세포의 성장, 발달, 그리고 신경 가소성에 중요한 물질이면서 신경손상에 대한 저항을 높여 신경의 생존을 향상시킨다.⁵⁹⁻⁶¹⁾ 따라서 본 연구에서는 immunohistochemistry를 이용하여 흑질에서의 단백질 발현을 분석하였다. 흑질에서 BDNF 단백질 발현은 MPTP group이 가장 낮게 나타나 MPTP가 신경손상을 야기하는 물질임을 증명하고 있다 (Fig. 8). SH/MPTP group의 경우 Normal group보다도 BDNF 발현이 높게 나타났으며 이것은 소합향원이 흑질 조직에서 BDNF 발현을 정상적인 상황보다 더 높

여주는 것으로 판단할 수 있다.

SNAP25는 신경전달물질 방출에 관여하고 있는 신경계 특이 단백질이다. 신경세포의 synaptic terminal에서는 외부 자극에 의해 축삭에 전달된 활동전위가 presynaptic terminal 부위에 도달하면 전위 의존성의 Ca^{++} 농도의 상승에 의해 신경전달 물질이 방출된다.⁶²⁻⁶⁵⁾ 이런 신경전달물질의 방출에는 SNAP25, VAMP등이 함께 결합하여 형성된 복합체를 통하여 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다.⁶⁶⁾ 흑질에서 SNAP25 발현 역시 MPTP group이 가장 낮게 나타났고, SH/MPTP group의 경우 MPTP group은 물론 Normal group 보다도 SNAP25의 발현이 높게 나타났다 (Fig. 8).

이상의 연구결과는 소합향원이 MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델에 대해 신경보호 효과가 있음을 나타내고 있고, 또한 그 기전을 밝히고 있다. 이는 평소 蘇合香元을 상시 투여할 경우 Parkinson's disease와 같은 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 예방에 효과가 있음을 나타내는 것이다. 따라서 앞으로 향후 Parkinson's disease의 치료에 대한 소합향원의 추가연구가 이뤄진다면 더욱 의미 있는 일이 될 것이라고 생각한다.

V. 결론

본 연구에서는 蘇合香元을 사전 투여하고 그 후 MPTP를 처리하여 나타난 C57BL/6 mouse에 pole test를 시행하였고, 흑질 조직의 형태학적 변화를 관찰하였다. MTT Assay를 통해 세포 생존을 측정하였고, 흑질과 선조체에서 TH, BDNF, SNAP25 등의 단백질을 정량화하여 발현정도를 측정함으로써 蘇合香元의 신경보호 효과와 그 기전을 연구, 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. Pole test 결과 소합향원 투여에 의한 운동능력이 대조군에 비해 유의성 있게 향상되었다

($p < 0.05$).

2. 흑질 조직의 형태학적 변화는 MPTP 투여로 인한 감소된 TH positive 세포의 수가 소합향원 투여로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$).
3. MTT Assay 결과 蘇合香元 香氣液 농도별 주입 후 일정량의 MPP+ 투여 시 농도 의존적으로 대조군에 비해 세포 생존율이 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$).
4. Western blot analysis로 TH, BDNF, SNAP25 등의 단백질을 정량화한 결과 모든 군에서 대조군에 비해 유의성 있게 단백질 활성도가 증가하였다 ($p < 0.05$). 특히 SN에서 BDNF와 SNAP25의 발현은 Normal group 보다 더 높게 나타났다 ($p < 0.05$).

이상의 결과는 소합향원이 MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델에 대해 신경보호 효과가 있고, 따라서 Parkinson's disease에 대한 예방효과가 있음을 나타내고 있다.

References

1. Dae Hee Lee. What is parkinsonism? 4th ed. prb Pommunsa. p.2-4. 2005.
2. Javoy-Agid, F. and Agid, Y. : Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson's disease?, *Neurology* 30, p.1326-1330, 1980.
3. Sourkes, T. : Disorders of basal ganglia. In *Basic Neurochemistry*, 4th. New york, Eds, Ravan Press. p.811, 1989.
4. Snyder, S. H. and D'Amato, R. J. : MPTP. A neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology* 36, p.250-258. 1986.
5. Kojima, S., Matsuki, O. T., Nomura, T., Yamaoka, M. T. and Niki, E. : Elevation of oxidant potency in the brain of mice by low dose v-ray irradiation and its effect on 1-meyhyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) induced brain damage. *Free radical Biology & Medicine* 26, p.388-395. 1999.
6. Sriram, K., Pai, K. s., Boyd, M. R. and Ravindranath, V. : Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Research* 749, p.44-52. 1997.
7. Wong, s. s., Li, R. H. Y., and Stadlin, A. : Oxidative stress induced by MPTP and MPP⁺ : selective nulherability of cultured astrocytes. *Brain Research* 836, p.237-244. 1999.
8. Song-gil Min. *Modern psychiatry*. 5th ed. Seoul: Ilchogak; 2008. p. 240.
9. Korean NeuroPsychiatric Association. *Textbook of Neuropsychiatry*. 2nd ed. Seoul: Chungang Munhwasa; 2005. p. 313.
10. Hyung Chul Lee, Dae Geun Kim, Won Jun Jo, Seok Yeon Hwang, Young Gu Lee, Myung Dong Kim, et al. Protective Effect of R, palmatum on 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced Neurotoxicity in Mice. *Yakhak Hoeji* 2002; 46:433-440.
11. Sam June Lee. Effect of exercise on the expression of GDNF and 5-HT cells in the MPTP-induced Parkinson's disease for aging C57BL/6 mice. *Sports science* 2008; 17(3): 373-381.
12. Ho Gun Hwa Kongjaksil Pyonjo. Ho Gun Hwa Haksul Kyonghom Hilyoung. Sanghae: Sanghae Chunguiyak Taehak Chulpansa; 2005. p. 31.
13. Sandong Chunguihakwon Habuk Uihakwon Kyosuk. Hwangjenaegyong Somun, Kyosuk. Pukkyong: Inmin Wisaeng Chulpansa; 1982.
14. Wang Geungdang. Sago Uihak Chongseo Zhungchi zhunseung. Sanghae: Sanghae Gojuk Chulpansa; 1991. p. 767-273.
15. Zhu Munchun. Zhungui Nonyunbyung. Pukkyong: Pukkyong Chulpansa; 1995. p. 746-754
16. Zhin Samun. Sago Uihak Chongseo, Taepyeong Hyemin Hwaje Gukbang. 3th. vol. Sanghae: Sanghae Gojuk Chulpansa; 1991. p. 741-521.
17. Zhinwi, Bangchehak. Sanghae: Sanghae Chunguihakwon Chulpansa; 1990. p. 283.
18. Seobhyunchi. Chunguihak. Sanghae: Sanghae Chunguihakwon Chulpansa; 1988. p. 285.
19. Byung Soo Koo, Keun Woo Kim, Seung Kyoon Ju, Jeon-gan Chiryo Yeongheombang. Seoul:

- Chongdam; 2003. p. 136-138.
20. Chun Ho, Tongui pogam. Seoul: Namsandang; 1987. p. 93.
 21. Won Hee Kim, Gwang Joong Kim, Formation and System of Korean Medicine. Daegu: Chungmun Chulpansa; 1990. p. 78-84, 183-192.
 22. Tae Hwan Yeom, Dongui Chobang Daejeon, Seoul: Haengnimsowon; 1975. p. 73.
 23. Myong Shin Joo. Uimun pogam. Seoul: Haengnimsowon; 1975. p. 332.
 24. Do Yeon Hwang. Pangyak Happyon, Seoul: Namsandang; 1980. p. 204-205.
 25. Jae Gyom Shin, Pangyak Happyon Haesol, Seoul: Chontong Uihak Yonguso; 1988. p. 146-147.
 26. Gong Junghyun, Manbyong huichun, Pukkyong: Inmin Wisaeng Chulpansa; 1988. p. 67.
 27. Gidae Kim, Dae Kyoo Chung. An Experimental Study on the Change of Stress-related hormone Contents by Prescription of Kyogamdan and Sohaphyangwon. J. of Oriental Neuropsychiatry 1993;4(1):121-133.
 28. Soon Ju Kwen, Dae Kyoo Chung, Yun Sub Kim, A Study on Effect of Soeuminsohabhyangwon on the Brain Serotonin contents of Stressed Mice. J. of Oriental Neuropsychiatry 1998;9(2):87-95.
 29. Sang Gyung Nam, Kyung Sup Lee. Experimental studies on the effect of Woohwangchungsimwon and Sohaphyangwon. K,H,M. 1990;6(2):220-237.
 30. Ji Hyouck Kim, Wei Wan Whang. An Experimental Study on the Anti-Psychological Stress Effect by Sohaphyangwon. K,H,M. 1990;6(4):470-479.
 31. Jin Sang Jeon, Il Byung Song. Experimental Studies on the Effects of Soeuminoaphangwon. The journal of K,O,M,S. 1986;7(1):44-56.
 32. Yong hyun Shin. Effects of the Gagamsohaphyangwon Fragrance and Ganbodan on Central Nerve Depression and Receptor Activation in Mice. College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University. 2000.
 33. Koo BS, Lee SI, Ha JH, Lee DU, Inhibitory effects of the essential oil from SuHeXiangWan on the central nervous system after inhalation, Bio.Pharm. Bull 27(4) p.515-519. 2004.
 34. Su-Young Chon. Study on the Mechanism of Anticonvulsant Effect of *Gagamsohaphangwon* Fragrance upon Inhalation. College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University. 2001.
 35. Seong-Soo Kim, Analgesic Effect upon Inhalation and Sedative Effect after Oral Administration of the Fragrance Oil of *GagamSohaphyangwon*, College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University. 2002.
 36. Sung-Wook Kim, Effects of *GagamSohaphwangwon* essential oil on Glioma cells and Primary glial cell. College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University. 2006.
 37. Ihn, Lee. Study on protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with inhalation of the essential oil extracted from *GagamSohaphwangwon* (GGSH). College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University. 2007.
 38. Kim Seung-Tae, The neuroprotective effect of acupuncture at GB34 in a MPTP-induced Parkinson's disease mouse model, College of Oriental Medicine Graduate School of KyungHee University. 2009.
 39. Jin Hoon Lee. Neuroprotective effects of the acupoints Houxi(SI3) and Shenmai(BL62) on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage. College of Oriental Medicine Graduate School of KyungHee University. 2008.
 40. Seong-In Bae. Protective effects of acupuncture on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage. College of Oriental Medicine Graduate School of KyungHee University. 2006.
 41. Kyong-ok Chu, Hyang, hyangsu, hyanggi. Seoul: Sechang Chulpansa; 1995. p. 168-171.
 42. Hyun Taek Kim, Joon Sik Choi, Eun Hue Park, Kang Hee Lee, Eun Joo Kim, Yeon Kyung Lee: Animal behavior test studying brain illness for neurologist. Seoul: Siguma Puresu; 2006. p. 112.
 43. Abe, K., Taguchi, K., Wasai, T., Ren, J. *et al.* : Biochemical and pathological study of endogenous 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-induced parkinsonism in the mouse. *Brain Res*, 907. p.134-138, 2001.
 44. The CIBA collection of medical illustrations, CIBA collection. Volume 1, PART II NERVOUS SYSTEM, Seoul: Chongdam; 2000. p. 155.
 45. Teresa Cunha-Oliveira, A. Cristina Rego, Sandra M. Cardoso, Fernanda Borges, Russell H,

- Swerdlow, Tice Macedo, Catarina R. : de Oliveira Brain Research, Volume 1089, Issue 1, p.44-54, 2006.
46. Sladowski, D, Steer. S. L, Clothier. R. H, and Balls, M : An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods*, 157. p.203-207, 1993.
 47. Jeong H, Koo H, Oh E, Chae H, Kim C, Cho K, et al : Nitric oxide production by high molecular weight water soluble chitosan via nuclear factor-kappa B activation. *Int J Immunopharmacol*, 22. p.923-33, 2000.
 48. Feng, L, Wang, C. Y., Jiang, H, Oho, C, Mizuno, K, Dugich-Djordjevic, M, Lu, B. : Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. Mar 20;66(1-2) p.62-70. 1999.
 49. Davis, G. C., Williams, A. C., and Markey, S. P. : Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*. 1. p.249-255. 1979.
 50. Rosati, G., Granieri, E., and Pinna, L., : The risk of Parkinson's disease in Mediterranean people. *Neurology*, 30. p.250-255. 1980.
 51. Ramsay RR, Dadger J, Trevor A, et al : Energy driven uptake of mpp+ by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life sci* 39. o.581-588. 1986.
 52. Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, et al : Inhibition of mitochondrial respiration by MPTP in mouse brain in vivo. *Neurosci lett* 91. p.349-353. 1984.
 53. Dong-Wuk Cho, Yoosik Yoon, Bong-Joo Kang, Mi-Young Lee, Seong-Gil Hong, Protective effects of traditional oriental drugs against H₂O₂ induced neuronal cell death. *Korea Institute of Oriental Medicine* 1998;139.
 54. Seck-Hwan Kim, Joo-Yeon Lee, Y대-Jeong Kim, Hye-Ok Kang, Hang-Woo Lee, Jong-Won Choi, Effect of Selenium Yeast on MPTP(1-methyl-4-phenyl-propion-oxypiperidine)-Induced Neurotoxicity in Mice. *Journal of Life Science* 2006;16(2):266-273.
 55. Jong Bae Lee, Jeong Hee Park, Yong Sung Lee, Jai Kyung Koh, Effect of Reserpine Pretreatment on Neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) in Mice. *J. Hanyang Med, Coll*. 1990;10(1):129-140.
 56. Wang Do, Sago Uihak Chongseo Oedae biyobang il, Sanghae: Sanghae Gojuk Chulpansa; 1991. p. 736-439.
 57. Messripour, M, and Clark, J. B. : Tyrosine hydroxylase activity in rat brain synaptosomes : Direct mesurment using high performance liquid chromatography. *J. Neurochem*, 38. p.1139-1143, 1982.
 58. Sung Joon Kim, Jin Chul Yoo, Hong Sung Jeon, Jae Seong Kim, Seung Kim, Myong Hwa Sim, et al. Development and application of tyrosine hydroxylase gene and neurotrophic factor inducible material screening from medicinal herbs for prevent of neuronal cell degradation. Chosun University. 2007.
 59. Kyung Hwan Kim, Woo Joo Lee's Lecture for pharmacology. 4th ed. Seoul: Uihak Munwhasa; 1997. p. 179.
 60. Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., and Nabeshima, T. : Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze tese in rats. *J. Neurosci*. 20, p.7116-7121, 2000.
 61. H.H. Lee, J.H. Yoon, I.G. Jeong, J.O. Kim, B.K. Kim, J.H. Seo, et al. Effects of treadmill exercise on cell proliferation and BDNF expression in the rat hippocampus after traumatic brain injury. *Sports science* 2008; 17(3): 363-372.
 62. Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V. and Hofmann, F. : Structure and functional expression of a new member of the tetrotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO* 14, p.1084-1090. 1995.
 63. Matos, M. F., Mukherjee, K., Chen, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C. : Evidence for SNARE zippering during Ca⁺⁺-triggered exocytosis in PC12 cells. *Neuropharmacol* 45. p.777-786. 2003.
 64. Tuz, K. and Pasantes-Morales, H. : Hyposmolarity evokes norepinephrine efflux from synaptosomes by a depolarization and Ca⁺⁺-dependnet exocytotic mechanism. *EUR. J. Neurosci*, 22, p.1636-1642. 2005.
 65. Yun-Sik Lee, Dong-Seob Kim, Effect of FS11052, an Inhibitor of Exocytosis, on Neurite Extension in Rat Hippocampal Neurons and PC12 Cells,

Journal of Life Science 2006; 16(2): 315-322.
66. O'Conner, V. M., O. Shmotienko, E. Grishin and
H. Bet. : On the structure of the `synpto-secre-

tosome'-Evidence for a rerexin/synaptotagmin/
syntaxin/Ca⁺⁺ channel complex, FEBS 326,
p.255-26, 1993.