

MPTP에 의해 유도된 생쥐의 신경독성에 대한 산국 추출물의 항산화 작용

김성훈 · 최종원^{1*}

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 경성대학교 약학대학

Antioxidant Activity of Water Extract of *Chrysanthemum boreale* against MPTP-induced Mice Models

Sung Hoon Kim, Jongwon Choi^{1*}

Department of Korean Pathology, College of Korean Medicine, 1: College of Pharmacy, Kyungsung University

Chrysanthemum boreale(CB) is an oriental medicinal herb which has been used traditionally for the treatment of various brain disease including headache, dizziness and sedation. In order to examine the mechanism of anti-parkinsonism effect, water extract of CB(100 mg and 200 mg/kg of b.w.) were administered orally during 28 days in MPTP-induced parkinsonism mice model. Water extract of CB increased the motor activities. CB did not affect total MAO and MAO-B activity in the brain of MPTP-induced mice. CB significantly increased the concentration of lipid peroxidation in the mid brain. Also, CB significantly increased antioxidant enzyme including were SOD, catalase and glutathione peroxidase in the mid brain activity. CB significantly increased the concentration of dopamine and homovanillic acid in the brain. These results suggest that the anti-parkinsonism effect of CB is possibly due to the antioxidative effects at mid brain in MPTP-induced animal model.

Key words : *Chrysanthemum boreale*, MPTP, parkinsonism, antioxidant

서 론

세계인구의 고령화는 의학 기술의 발달과 함께 최근 그 속도가 매우 빨라지고 있는 추세이다. 이에 따라 노인복지와 질환에 대한 관심이 높아지고 있으며 대표적인 노인성 질환 중 신경계 질환으로 치매가 많이 알려져 있다. 또 다른 신경계 질환의 하나인 파킨슨병은 현재 발병률이 높아지고 있으며 이에 따라 관심이 높아지고 있다. 파킨슨병은 퇴행성 뇌질환의 하나로 중추신경계의 뇌의 흑질에 있는 도파민성 뉴런의 변성이나 파괴와 관련 있다고 알려져 있으며, 이의 원인으로는 아직도 불확실한 상태이나 최근에 와서 흑질에 존재하는 도파민 생성 신경세포가 파괴되어 선조체의 도파민 함량이 현저히 감소되는 것으로 보고^{1,2)}되고 있다. 역학조사에 의하면 파킨슨병은 환경적인 요인과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 생활환경 호르몬의 하

나인 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 항정신성 의약품인 meperidine 유도체로서 이에 노출될 경우 평형감각 상실, 손 떨림, 경직이나 자세의 불안정 등 파킨슨병과 유사한 증상이 나타나며 파킨슨병 모델이 필요할 때 많이 사용되고 있다³⁻⁵⁾. 산국(*Chrysanthemum boreale*)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년성 초본으로 한국, 일본, 중국 북부산지에 널리 야생하고 있다. 생육환경은 햇볕이 드는 반그늘의 부엽질이 많은 토양에서 자라며 키는 1~1.5 m이고, 잎은 계란형으로 감국(*Chrysanthemum indicum*)의 잎보다 깊이 갈라져 날카로운 톱니가 있으며 길이는 5~7 cm이다. 꽃은 줄기 끝에서 노란색으로 달리고 지름이 약 1.5 cm 정도로서 가지와 줄기 끝에 달린다⁶⁾. 한방에서 산국의 꽃잎은 진정작용, 혈압강하작용, 두통, 어지럼증, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과 등으로 사용한다고 알려져 있으며^{7,8)} 산국의 주요 성분으로는 camphor, flavonoid 배당체 및 lactone류 등이 보고되고 있으며 최근까지의 연구로서는 인체 암세포주에 대한 세포독성, 항암 및 항균효과, 항염활성 등이 보고되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

* 교신저자 : 최종원, 부산시 남구 수영로 309 경성대학교 약학대학

· E-mail : jwchoi@ks.ac.kr, · Tel : 051-663-4883

· 접수 : 2012/08/11 · 수정 : 2012/12/17 · 채택 : 2013/01/10

이에 본 연구에서는 산국이 파킨슨병의 치료에 활용 가능성이 있는지를 검토하기 위하여 MPTP에 의해 신경독성이 유도된 실험동물을 이용하여 이의 열수 추출물을 투여함으로써 항 파킨슨의 작용기전을 항산화작용과 관련시켜 검토하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 재료

본 실험에 사용한 ICR계 30-35 g의 생쥐는 효창 사이언스(대구)로부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건 (온도 : 22±0.5℃, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1 주 동안 검역과 순화, 사육을 거친 후 건강한 동물만 사용하였다. 사료는 실험동물용 고형 사료(천하제일사료, 대전시 대화동), 음수는 상수도물을 자유 섭취시켰다. 이때 효소 활성의 일종의 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다. 산국은 부산진 시장에서 구입하여 먼지 등의 부착물을 제거할 목적으로 세척한 후 건조하여 사용하였다. 건조된 산국을 분말로 하여 1 kg을 열수로 3회 추출하여 감압농축 및 동결 건조하여 26 g을 얻었다. 원 시료는 (주) IK science의 표본실에 보관되어있다. 실험동물을 총 5군으로 나누어서 식수와 사료만 먹이는 정상군, MPTP(30 mg/kg)을 5일간 복강 내로 투여하여 신경독성을 유발시킨 대조군, 산국 추출물(CB 100, 200 mg/kg)을 28일간 전처리하고 MPTP를 투여한 군 및 대조약물인 selegiline(10 mg/kg)을 28일간 전처리하고 MPTP를 투여한 군으로 나누었다. 산국 추출물은 체중을 고려하여 매일 열수에 용해한 후 상온에서 esophagus needle을 사용하여 경구로 투여 하였다. 운동기능의 시험에 사용한 동물은 본 실험 전 동물을 아래의 방법에서 현수법, 경사판법 및 회전봉법을 통과한 동물을 사용하였다. 동물은 실험(희생)하기 전 12시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취하도록 하였다.

2. 운동기능에 미치는 영향¹²⁾

1) 현수법(holding reflex)

수평의 직경 3 mm의 금속봉에 5초 이상 매달릴 수 있는 수컷 생쥐를 선별하여 10 마리씩 5군의 실험군으로 하여 각 군에 대하여 각각 1 마리씩 금속봉에 매달리게 해서 5초 이상 매달릴 수 있는 생쥐를 합격(작용 없음) 이라고 판정하였다.

2) 경사판법(platform test)

40도 경사진 유리판위에 5초 이상 정지해 있을 수 있는 생쥐를 선별하여 10 마리씩 5군의 실험군으로 하여 각 군에 대하여 각각 1 마리씩 유리판에 놓아 5초 이상 정지할 수 있는 생쥐를 합격(작용 없음) 이라고 판정하였다.

3) 회전봉법(rota-rod test)

Rota-Rod(UGO BASILE 7650, Italy)를 사용하여 전봉(직경 3 cm, 매분 8회전) 위에 올려놓고 2분 이상 떨어지지 않는 생쥐를 선별하여 10마리를 5군으로 하여 각 군에 대하여 각각 1마리씩 회전봉 위에 올려놓고 낙하할 때까지의 시간을 측정하였다. 3분 이상 떨어지지 않는 생쥐를 합격(작용 없음) 이라고 판정하였다.

3. 효소원의 조제

시료의 투입이 끝난 실험동물에 CO₂로 가볍게 마취시키고 뇌 조직을 적출하여 -70℃에 보관 후 현미경하에서 Wayne의 방법¹³⁾에 준하여 대뇌피질, 중뇌 및 소뇌로 분리하여 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer를 사용하여 10% 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 초원심 분리하여 mitochondria 및 cytosol 분획을 얻어 아래의 효소원으로 사용하였으며, monoamine oxidase(MAO)활성 측정용 효소원은 Minami등의 방법¹⁴⁾에 준하여 부분 정제하였다. Mouse를 단두하고 뇌를 분리하여 세절한 후(8.8 g), 10 mM potassium phosphate 완충액을 함유한 0.25 M sucrose 용액(pH 7.4)을 가하여 균질화시켰다. Homogenate를 1,200×g로 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 16,000×g로 20분간 원심분리 한 다음 침전의 pellet에 대하여 농도가 100-300 mg/ml가 되도록 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.4)을 넣고 현탁시킨 다음 MAO 효소원으로 하였다. MAO 효소원은 -70℃에 보관하여 아래의 실험에 사용하였다.

4. 효소활성 측정

1) 총 MAO의 활성도 측정

Welyer의 방법¹⁵⁾에 준하여 측정하였다. 즉 반응용기에 0.2M potassium phosphate 완충액(pH 7.4) 720 μL, 효소원 30 μL을 넣고 37℃에서 5분간 방치하였다. Kynuramine(500 μM, 200 μL)을 가하여 효소반응을 진행시키고 30분 후 10% ZnSO₄ 250 μL 와 1N NaOH 50 μL를 가하여 종결하였다. 반응액을 3000×g로 5분간 원심분리하고 상등액 700 μL에 1N NaOH 1.4 mL를 가한 다음 반응생성물 4-hydroxyquinoline의 농도를 형광광도계(Model F-3000, Hitachi, Tokyo, 일본) (λex/λem : 315 nm/380 nm)로 측정하고, 이를 표준곡선을 사용, 정량하여 MAO 활성을 측정하였다.

2) MAO-B의 활성도 측정

Youdim등의 방법¹⁶⁾에 따라 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 435 μL, 0.03 M sodium azide 70 μL, 뇌의 미토콘드리아 분획 100 μL, 0.01M benzylamine 70 μL 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1.8 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) 500 μL와 peroxidase 5 units를 넣어 15초간 반응시킨 후 5% sodium dodecyl sulfate가 포함된 0.75M hydrochloric acid 250 μL를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 뇌 조직 중 항산화 효소활성의 측정

(1) Superoxide dismutase 활성의 측정

Marklund와 Marklund의 방법¹⁷⁾에 준하여 0.2 M potassium phosphate buffer (200μM cytochrome C, 100 μM EDTA 함유 pH 8.6) 1.0 mL에 효소액 0.2 mL를 가하여 ice bath상에서 20분간 방치하고 test에는 alkaline dimethyl sulfoxide(DMSO)용액 0.5 mL, blank 에는 non-alkaline DMSO 용액 0.5 mL를 각각 가하고 37℃에서 30분간 반응시키고 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하고 alkaline DMSO-mediated cytochrome C reduction을 50% 억제하는 enzyme량을 1unit로

산정하여 활성도를 표시하였다.

(2) Catalase 활성의 측정

Aebi의 방법¹⁸⁾에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원이 되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 nM⁻¹ cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein 이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

(3) Glutathione peroxidase 활성의 측정

Paglia 와 Valentine의 방법¹⁹⁾에 준하여 hydrogen peroxide 및 glutathione이 함유된 0.1 mM tris buffer(pH 7.2) 중에서 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein 에 의해 소모되는 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

5. 지질과산화물 함량의 측정

뇌 조직 중 Lipid peroxide 함량의 측정은 Ohkawa등의 방법²⁰⁾을 변경하여 뇌 조직 1 g당 10배량의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가해 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후 n-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준 곡선에서 그 함량을 신장 조직 1 g당 malondialdehyde(MDA) nmole 로 표시하였다.

6. Catecholamine 함량 측정²¹⁾

생쥐의 귀 뒷부분을 단두한 뒤 뇌 전체를 적출하여 5°C 이하의 생리식염수에 담가 혈액을 제거하였다. 얼음 위에서 brain slicer로 뇌를 1 mm 두께로 자른 후 선조체(striatum)를 얻어 무게를 측정하고 dry ice상에서 순차적으로 동결시켜 -70°C에 보관하였다. 분석 직전에 조직을 얼음 위에서 녹이고 조직이 담긴 tube에 이동상 365 μ L, 내부표준액 (isoproterenol ISP, 1 μ g/mL) 35 μ L를 넣는다. 초음파 homogenizer로 2~3 초씩 조직이 완전히 분해될 때까지 수 회 반복 처리하고 4°C에서 1500 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상정액 20 μ L를 HPLC(2690, Waters Corp. USA)에 주입하였다. 즉, HPLC의 조건으로는 column은 ZORBAX Rx/SB-C8 (4.6 x 75mm, 3.5 μ m), 이동상은 증류수에 0.14 M sodium phosphate, 20mM EDTA, 0.75 mM octyl sulfonate, 9% methanol pH3.5, flow rate: 1.5 mL/min, 주사량: 20 μ L, column의 온도: 26°C로 detector로 0.75 V vs Ag/AgCL with electrochemical detection에서 측정하였다. 이 결과 각각의 유지 시간은 dopamine(DA)은 29분, homovanilic acid(HVA)은 4분 및 norepinephrine(NE)은 21분과 비교확인 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정 하였다. 각각의 함량은 조직 단백질 1 mg당 nmole로 나타내었다. 한편, 표준액 조제 및 검량선 작성은 표준품(DA, HVA, NE) 및 내부표준품(ISP)을 정밀히 달아 0.1N HClO₄에 녹여 1 mg/mL의 농도로 stock solution을 만들어 냉동

보관하였다. Working solution 은 stock solution을 0.1N HClO₄로 희석하여 1 μ L/mL의 농도로 매일 새로 만들어 사용하였다. 내부표준액을 제외한 각 working solution을 여기에 일정량의 내부표준액을 가해 혼합표준액을 조제하였다. 6개 이상의 서로 다른 농도(12.5~87.5 ng/mL)의 혼합표준액으로부터 검량선을 작성하고 상관계수가 0.99 이상일 때 시료를 분석하였다.

7. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry등의 방법²²⁾에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, Fr.V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

1. 중추신경계에 미치는 영향

산국 추출물을 전처리 하고서 MPTP로 유도한 신경독성에서 파킨슨양 운동기능에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위하여 현수법, 경사판법 및 회전봉법 시험을 한 결과가 Table 1이다. 실험동물 10마리를 한 군으로 하여 생리식염수를 투여한 정상군에서는 현수법 시험에서 다 통과하였으나 MPTP(30 mg/kg)을 5일간 투여한 군에서는 10마리 중 1마리만 통과하였으며, 산국 추출물(100, 200 mg/kg)을 28일간 투여하고 MPTP를 투여한 군에서는 각각 10마리 중 2마리와 5마리가 통과하여 정상군보다 80% 및 50%의 실패율을 보였다. 한편 대조약물인 selegiline(10 mg/kg)을 28일간 투여하고 MPTP를 투여한 군에서는 10마리 중 8마리가 통과하여 20%의 실패율을 보였다. 이러한 결과는 경사판법 및 회전봉법 시험에서도 유사한 결과를 나타내었다.

Table 1. Effect of Chrysanthemum boreale on the motor ability test in MPTP-induced mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Holding Test	Platform Test	Rotarod Test
		Failure animal/Total animal(% of normal)		
Normal		0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)
Control		9/10(90)	10/10(100)	9/10(90)
MPTP	CB 100	8/10(80)	8/10(80)	7/10(70)
	CB 200	5/10(50)	4/10(40)	4/10(40)
	Selegiline 10	2/10(20)	2/10(20)	1/10(10)

Mice were administered with CB(100, 200 mg/kg) or selegiline(10 mg/kg) orally for 28 days followed by MPTP(30 mg/kg, i.p.) for the last 5 days. The assay procedure was described in the experimental methods.

2. 뇌중 monoamine oxidase(MAO) 활성에 미치는 영향

1) 총 MAO 활성에 미치는 영향

산국 추출물을 전처리 하고서 신경독성 물질인 MPTP의 대사에 관여하는 효소인 총 MAO의 활성을 대뇌, 중뇌 및 소뇌에서 관찰한 성적이 Fig. 1이다. 생리식염수를 투여한 정상군에서는 총 MAO의 활성이 대뇌, 중뇌 및 소뇌에서 각각 0.21 \pm 0.05, 0.32 \pm 0.02 및 0.11 \pm 0.03 nmol/mg protein/min인데 비하여 MPTP를 투여한 군에서는 각각 0.25 \pm 0.06, 0.43 \pm 0.08 및 0.17 \pm 0.05 nmol/mg protein/min로 증가되었다. 한편 산국 추출물

100 mg/kg 투여한 경우에는 MPTP를 단독으로 투여한 군과 비교할 때 총 MAO 활성에는 영향이 없었으나 200 mg/kg을 투여할 경우 감소하는 경향을 보였으며, 대뇌와 소뇌에서 MPTP 단독 투여군과 비교할 때 통계적으로 유의성 있게 억제되는 것을 관찰할 수 없었으나 중뇌에서는 감소되는 경향이 뚜렷하였다. 한편, 대조약물인 selegiline을 투여하고 MPTP를 투여한 군보다 중뇌에서 현저하게 감소되었다.

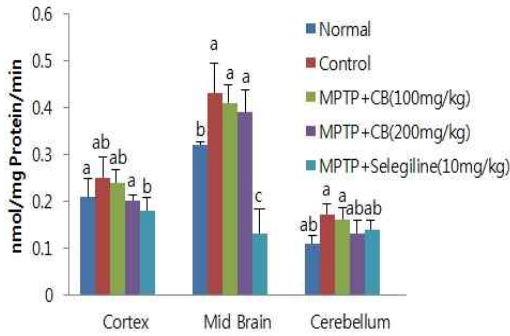


Fig. 1. Effect of *Chrysanthemum boreale* on total monoamine oxidase activity in MPTP-induced mice. Water extract of *Chrysanthemum boreale*(CB, 100, 200 mg/kg) or selegiline(10 mg/kg) was administered once a day for 28 days orally to mice and MPTP(30 mg/kg, i.p.) was administered thereafter for the last 5 days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D.(n=10) and values followed by the same superscript are not significant(p<0.05) each other by new multiple square test.

2) MAO-B 활성에 미치는 영향

Fig. 1에서 총 MAO의 활성 변동이 중뇌에서만 산국 추출물을 전처리하고 MPTP를 투여한 군에서 효과가 있음을 토대로 하여 중뇌에서 뇌중 MAO-B의 활성을 관찰한 성적이 Fig. 2이다. 정상군에서는 MAO-B의 활성이 0.15 \pm 0.04 nmol/mg protein/min인데 비하여 MPTP를 투여한 군에서는 0.31 \pm 0.06 nmol/mg protein/min로 증가되었다. 한편 산국 추출물 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 투여한 경우에는 각각 0.28 \pm 0.07 nmol/mg protein/min 와 0.3 \pm 0.05 nmol/mg protein/min로 나타나 MPTP를 단독으로 투여군과 별다른 차이점이 없었다. 한편, 대조약물인 selegiline을 전처리하고 MPTP를 투여한 군에서는 0.07 \pm 0.03 nmol/mg protein/min으로 현저히 억제되었다.

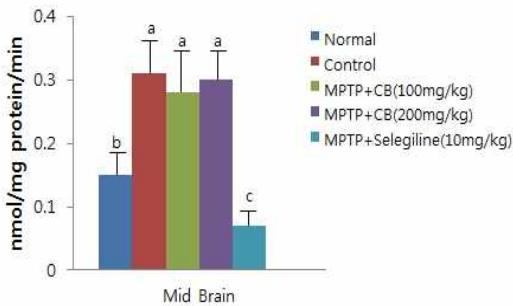


Fig. 2. Effect of *Chrysanthemum boreale* on monoamine oxidase B activity in MPTP-induced mice. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D.(n=10) and values followed by the same superscript are not significant(p<0.05) each other by new multiple square test.

3. 지질과산화물 함량에 미치는 영향

산국 추출물을 전처리 하고서 뇌조직중 지질과산화의 함량을 관찰한 성적이 Fig. 3이다. 생리식염수를 투여한 정상군에서는 지질과산화의 함량이 대뇌, 중뇌 및 소뇌에서 각각 2.13 \pm 0.04, 1.13 \pm 0.05 및 1.14 \pm 0.05 MDA nmol/mg protein인데 비하여 MPTP를 투여한 군에서는 각각 2.31 \pm 0.05, 2.97 \pm 0.06 및 1.54 \pm 0.07 MDA nmol/mg protein로 대뇌와 소뇌에서는 영향이 없었으나, 중뇌에서는 통계적으로 증가되었다. 한편 산국 추출물 100 mg/kg을 전처리하고 MPTP를 투여한 군에서는 2.29 \pm 0.06, 1.83 \pm 0.04 및 1.50 \pm 0.03 MDA nmol/mg protein로, 200 mg/kg을 투여한 군에서는 2.25 \pm 0.07, 1.67 \pm 0.05 및 1.38 \pm 0.04 MDA nmol/mg protein로 나타나 대뇌 및 소뇌에서는 통계학적으로 유의성이 없었으나 중뇌에서 MPTP 단독투여군과 비교할 때 통계적으로 유의성 있게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

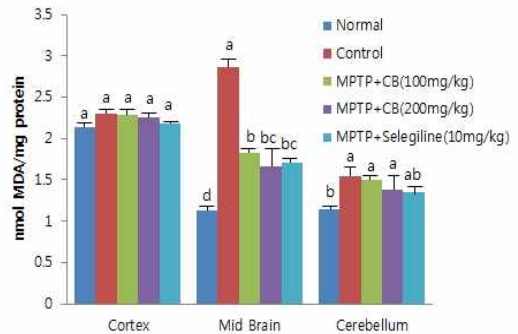


Fig. 3. Effect of *Chrysanthemum boreale* on lipid peroxide content in MPTP-induced mice. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D.(n=10) and values followed by the same superscript are not significant(p<0.05) each other by new multiple square test.

4. 항산화 효소활성계에 미치는 영향

산국 추출물을 전처리한 후 MPTP에 의한 산화적 스트레스에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위하여 뇌조직중 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GPx)의 활성을 관찰한 성적이 Table 2이다. SOD의 경우 정상군에서는 효소의 활성이 대뇌, 중뇌 및 소뇌에서 각각 0.61 \pm 0.13, 0.42 \pm 0.04 및 0.58 \pm 0.04 U/mg protein인데 비하여 MPTP를 5일간 투여한 군에서는 각각 0.58 \pm 0.18, 0.19 \pm 0.05 및 0.45 \pm 0.03 U/mg protein으로 나타나 대뇌와 소뇌에서는 유의성 있는 변화가 없었으나 중뇌에서 억제하는 경향을 보였다. 한편 산국 추출물을 전처리하고 MPTP를 투여한 군에서는 100 mg/kg을 투여한 경우 0.68 \pm 0.10, 0.23 \pm 0.08 및 0.47 \pm 0.07 U/mg protein로 MPTP를 단독으로 투여한 군과 비교하여 별다른 차이점이 없었으나 200 mg/kg을 투여한 경우 0.60 \pm 0.12, 0.30 \pm 0.07 및 0.43 \pm 0.09 U/mg protein로 대뇌 및 소뇌에서는 통계학적으로 유의성 있는 변화가 없었으며, 중뇌에서만 MPTP 단독 투여군과 비교할 때 통계적으로 유의성 있게 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 뇌조직중의 catalase 및 GPx의 활성의 측정에서도 유사한 경향을 보였다.

Table 2. Effect of Chrysanthemum boreale on the antioxidant enzyme system activities in MPTP-induced mice

Treatment	Dose (mg/kg)	SOD*			Catalase**			GPx***		
		Cortex	Mid Brain	Cerebellum	Cortex	Mid Brain	Cerebellum	Cortex	Mid Brain	Cerebellum
Normal		0.61±0.13 ^a	0.42±0.04 ^a	0.58±0.09 ^a	2.17±0.25 ^{ab}	2.87±0.09 ^a	2.97±0.37 ^a	6.40±0.98 ^a	12.7±1.46 ^a	7.30±0.25 ^a
Control		0.58±0.13 ^{ab}	0.19±0.05 ^d	0.45±0.03 ^b	2.46±0.37 ^a	1.86±0.13 ^d	3.36±0.45 ^a	5.80±0.87 ^a	5.30±0.77 ^c	7.00±0.73 ^a
MPTP	100	0.68±0.10 ^a	0.23±0.08 ^d	0.47±0.07 ^b	2.50±0.39 ^a	2.16±0.15 ^d	3.47±0.73 ^a	5.90±0.73 ^a	6.20±0.53 ^c	7.50±0.83 ^a
	200	0.60±0.12 ^{ab}	0.30±0.07 ^c	0.43±0.09 ^b	2.59±0.47 ^a	2.46±0.12 ^c	3.51±0.75 ^a	6.00±0.92 ^a	7.80±0.68 ^{bc}	6.90±0.55 ^a
	Selegiline	0.59±0.07 ^a	0.38±0.06 ^{bc}	0.41±0.06 ^{bc}	2.60±0.52 ^a	2.53±0.21 ^{bc}	3.58±0.73 ^a	6.04±0.82 ^a	8.21±0.59 ^b	6.92±0.61 ^a

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D.(n=10) and values followed by the same superscript are not significant(p<0.05) each other by new multiple square test. * : Superoxide dismutase: U/mg protein : Unit : one unit inhibit the rate of reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50% in a coupled system. ** : μM/mg protein/min, *** : Glutathione peroxidase: NADPH nmol/mg protein/min

5. 뇌중 dopamine, norepinephrine 및 homovanillic acid의 농도 산국 추출물을 전처리한 후 MPTP로 유도한 신경독성에서 catecholamine 및 이의 대사산물의 농도에 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Table 3이다.

정상군에서는 뇌중의 DA, NE 및 HVA의 함량이 각각 2.17 ± 0.36, 0.58 ± 0.09 및 0.46 ± 0.06 mg/kg tissue인데 비하여 MPTP를 투여한 군에서는 현저히 억제되었다. 한편 산국 추출물을 전처리한 후 MPTP를 투여한 군에서는 100 mg/kg을 투여한 경우와 비교하여 별다른 영향이 없었다. 200 mg/kg을 투여한 경우 1.79 ± 0.30 및 0.32 ± 0.05 mg/kg tissue로 DA와 HVA의 함량은 통계학적으로 유의성이 있었으며, NE에 대하여서는 산국 추출물의 전처리로 별다른 영향이 없었다.

Table 3. Influence of Chrysanthemum boreale on dopamine, norepinephrine and homovanillic acid levels in brain of MPTP-induced mice

Treatment	Dose (mg/kg)	DA	NE	HVA
		nmole/g tissue		
Normal		2.17±0.36 ^a	0.58±0.09 ^{NS}	0.46±0.06 ^a
Control		1.38±0.24 ^d	0.55±0.05	0.23±0.03 ^{cd}
MPTP	100	1.56±0.29 ^d	0.59±0.08	0.29±0.04 ^c
	200	1.79±0.30 ^{bc}	0.53±0.07	0.32±0.05 ^{bc}
	Selegiline	2.01±0.25 ^{ab}	0.51±0.04	0.35±0.08 ^b

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D.(n=10). Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal(p<0.05). NS : not significant

고찰

파킨슨병이란 신체의 움직임에 진전(떨림), 강직(근육 강직), 서동, 불안정한 자세, 보행 장애 등의 이상이 발생하는 중추신경계 질환으로 이 질환은 뇌의 일부분 중 흑색질(substantia nigra)이라는 곳의 신경세포가 괴사될 때 발생한다^{23,24}.

파킨슨병의 병은 일본뇌염, 뇌 매독, 이산화탄소 중독, 망간 중독이나 윌슨병 등이 있으며 최근에 와서는 환경호르몬에 의하여 질병이 나타날 수도 있는데, 이에 파킨슨병을 유발하는 것으로 알려진 화학물질로는 유기 농약제인 paraquat, rotenone 와 amphetamine, MPTP 등이 있다^{25,26}. MPTP는 생체내로 유입되면 뇌에서 몇 단계를 거친 후 MPP+로 변환되어 중뇌의 흑질 부위를 비가역적으로 파괴한다. 현재까지 MPTP의 신경독성을 완화시킨다고 알려진 것은 Vitamine E, allopurinol, selenium, selegiline, centrophenoxine 등이 있으며, 주로 활성산소 소거 능력에 의해 도파민성 신경세포의 파괴를 완화하거나, 생체 내에서

의 MAO-B inhibitor로 작용하여 MPTP 대사를 저해시키는 기전으로 파킨슨병의 치료에 활용되고 있다^{27,28}. 최근의 연구결과에 의하면 간질, 치매 및 파킨슨씨 질환 등 퇴행성 뇌신경 질환들의 병태생리 조건들은 산화적 스트레스가 매개하는 과산화 지질의 생성과 밀접한 관계가 있는 사실이 밝혀지고 있어 관심을 갖게 하고 있다²⁹. 이에 본 연구에서는 MPTP를 이용하여 파킨슨병을 유발한 동물모델을 이용하여 산국 추출물의 파킨슨병 치료제로서의 가능성을 살펴볼 목적으로 시중에서 신경독성 완화 물질 중 MAO-B inhibitor로 파킨슨 환자들에게 사용 중인 selegiline을 대조군으로 사용하여 생리적, 생화학적 영향을 비교하고자 하였다.

산국 추출물을 전처리하고 MPTP를 투여하였을 경우 운동 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 운동 능력 시험에 많이 사용되고 있는 현수법, 경사판법 및 회전봉법을 사용하여 실험한 결과, MPTP의 투여로 운동능력이 현저하게 저하되던 것이 개선되는 것을 관찰하였다. 상기의 실험을 토대로 하여 MPTP를 투여함에 따라 신경독성에 의한 파킨슨병 유사 질환 유발이 억제되는 기전을 알아볼 목적으로, 신경독성을 유도한 생쥐에서 뇌 조직을 채취하여 뇌 조직에서 총 MAO의 활성과 MAO-B의 활성, 지질과 산화 함량 및 활성산소 해독 효소 활성의 변화와 뇌 조직에서의 catecholamine 함량 및 이의 대사체의 변화를 관찰하였다.

Monoamine oxidase(MAO)는 미토콘드리아 외막에 존재하는 통합 단백질로서 MAO-A와 MAO-B type이 있다. 특히 생체 내에서 MAO-B의 활성 증가는 MPTP의 대사를 촉진하여 신경독성을 지닌 MPP+의 축적을 증가시킨다³⁰. 그러므로 MAO-B inhibitor는 MPTP의 신경독성을 억제하는 수단으로 이용되고 있다. 본 연구에서 산국 추출물을 투여하였을 때 MPTP투여로 증가된 총 MAO의 함량이 대뇌피질, 중뇌, 그리고 소뇌에서 다소 감소되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 한편, 중뇌에서 MPTP투여로 인한 MAO-B의 활성 증가에 대한 산국 추출물의 작용 또한 그 억제 작용이 미약함을 알 수 있었다. 반면, MAO-B inhibitor인 selegiline은 중뇌에서의 MAO-B 활성 억제 작용이 현저히 억제되었다. 이로보아 산국 추출물은 뇌중 MAO 활성과는 무관한 것으로 생각된다.

현대인의 질병 중 약 90%가 활성산소와 관련이 있다고 알려져 있으며³¹, 구체적으로 그러한 질병에는 암, 동맥경화증, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색증, 간염, 신장염, 아토피, 파킨슨병, 자외선과 방사선에 의한 질병 등이 있다. 활성산소는 생체 내외인성 요인에 의한 친전자성 물질로서 생체 내에서 독작용, 노화, 발암 및 면역 억제작용을 유발하는 원인 물질이다. 또한, 병태 생리학적

현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로서 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 세포 기능을 저하시키며 세포 괴사나 노화현상에 관여하고 있다. 이에 따른 여러 가지 인자에 의하여 생성된 활성산소와 반응한 불포화 지방산은 불포화지방산의 radical이 되고, 산소와 결합하여 hydroxyperoxide를 생성하며, 불포화 지방산은 지질과산화물이 생성되어 MDA로 분해된다^{32,33}. 일반적으로 과산화 지질을 유도하는 물질은 그 물질이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 또는 대사부산물로서 oxygen radical을 생성하여 지질과산화의 생성을 증가시켜 결국은 조직의 괴사를 초래한다. 본 실험에서는 MPTP가 활성산소를 생성하여 지질과산화를 일으켜 MDA의 함량을 증가시킨다는 것을 감안하여 뇌 조직 중의 지질과산화 함량을 측정할 결과 중뇌에서 산국 추출물을 전처리함으로써 용량의존적으로 유의성 있게 MDA의 함량이 감소하는 것이 확인하였다. 이로보아 산국 추출물은 MPTP로 유도한 신경독성에 의한 뇌 조직중의 지질과산화와 단백질의 산화적 손상을 억제함으로써 신경세포를 보호할 것으로 사료되어진다. 중뇌에서 지질과산화물의 함량이 MPTP의 투여로 증가되던 것이 산국 추출물의 전처리로 억제되는 기전을 확인하고자 활성산소의 해독계에 미치는 영향을 관찰하였다.

SOD는 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H₂O₂로 전화시키는 효소로 생체내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다. 세포는 superoxide radicals(O²⁻)에 과도하게 노출되면 SOD의 활성이 증가한다. 실제로 흰쥐를 거의 치사량에 가까운 농도의 산소에 노출시킨 경우, 폐 조직의 Mn-SOD와 Cu-SOD의 활성이 증가된다고 보고되었다^{34,35}. 산국 추출물을 전처리하고 MPTP를 투여한 결과 MPTP로 현저히 억제되던 중뇌의 SOD 활성이 산국 추출물의 투여용량에 따라 유의성있게 증가하였다. Catalase³⁶는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하여 무독화시키는 radical scavenging peroxidase enzyme으로 활성산소를 물로 환원시켜 체외로 배설시키며, GPx³⁷는 catalase와 비슷한 역할을 하여 glutathione을 매개체로 하여 과산화수소를 물과 산소로 분해시키고 활성산소로부터 세포를 보호하는데 중뇌에서 catalase와 GPx의 활성 또한 SOD와 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 산국 추출물이 MPTP에 의해서 감소되던 SOD활성, catalase활성과 GPx의 활성이 감소되는 것을 효과적으로 억제함으로써 활성 산소의 분해를 촉진하는 것으로 사료된다. 생체 내에서 tyrosine으로부터 합성되는 catecholamine는 신경세포 전달 역할을 하며, dopamine, norepinephrine은 dopamine β-hydroxylase와 MAO 또는 COMT와 같은 효소들에 의해 homovanillic acid(HVA)로 대사 된다^{38,39}. Dopamine과 이의 대사산물인 HVA의 뇌중 농도는 MPTP의 투여로 현저히 억제되던 것이 산국 추출물의 전처리로 증가되었으며, NE의 농도에는 별 다른 영향이 없었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때, 산국의 전처리는 신경독성을 유발하는 MPTP를 독성물질인 MPP+로 분해하는 MOA-B의 활성을 조절하는 것이 아니라 MPTP에 의하여 나타나

는 뇌 조직 중 활성 산소 해독계 효소인 SOD, catalase, GPx의 활성을 조절하여 뇌신경세포를 보호하는 것으로 사료된다. 이에 산국은 환경오염 물질에 의한 파킨슨병 유사 질환의 예방효과에 활용될 수 있을 것으로 보이며, 기존의 치료제인 selegiline과 병용 투여하는 것이 더욱 효과적인 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 산국 추출물의 전처리로 MPTP에 의해 유도된 뇌신경독성에 대한 해독기전을 검토할 목적으로 신경생화학적 지표성분들을 측정할 결과, 중추신경계 독성 시험인 현수법, 경사판법 및 회전봉법의 실험에서 MPTP를 투여함에 따라 운동능력이 저하되던 것이 산국 추출물의 전처리로 억제되는 것을 관찰하였다. 뇌중 총 MAO의 활성 및 중뇌 MAO-B의 활성에는 영향이 없었으며, 뇌 조직 중의 지질과산화물 함량은 중뇌에서 정상군에 비하여 MPTP를 투여한 군에서 현저히 증가하던 것이 유의성 있게 감소하였고, 활성 산소 해독계 효소(SOD, catalase와 GPx)의 활성은 증가하였다. 뇌 조직 중 catecholamine의 함량은 dopamine과 HVA의 함량에서 MPTP를 투여한 군에서 현저히 감소되던 것이 산국 추출물이 전처리로 증가하였다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경성대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Onofrj, M., Ghilardi, M.F., Basciani, M. Visual evoked potentials in parkinsonism and dopamine blockade reveal a stimulus-dependent dopamine function in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49: 1150-1159, 1986.
2. Hornykiewicz, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transmission* 70(1):9-15, 2006.
3. Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B., Forno, L.S. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science* 225(4669):1460-1462, 1984.
4. Arai, N., Isaji, M., Kojima, M., Mizuta, E., Kuno, S. Combined effects of cabergoline and L-dopa on parkinsonism in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *J Neural Transmission* 103(11):1037-1316, 1996.
5. Lau, Y.S., Meredith, G.E. From drugs of abuse to parkinsonism: The MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Methods in Molecular Medicine* 79(1):103-116, 2003.
6. Kim, J.G. Illustrated natural drugs encyclopedia. Seoul. Namsandang 4(1):59, 1997.
7. Danbensky, R., Andrew, G. Chinese herbal medicine. Estland Press Seattle. pp 120-137, 1986.

8. 최영전. 한국민속식물. 서울. 아카데미서적. p 53, 1992.
9. Nam, S.H., Yang, M.S. Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. Agricultural Chemistry and Biotechnology 38(3):273-277, 1995.
10. Jang, D.S., Park, K.H., Yang, M.S. Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino. Kor J Pharmacogn 29(2):67-70, 1998.
11. You, K., Bang, C., Lee, K., Ham, I., Choi, H.Y. Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum boreale* flower. Kor J Herbology 26(4):31-37, 2011.
12. 한국약학대학 협의회 약물학분과회. 약물학, 독성학 실험. 서울. 신일북스. pp 113-121, 2011.
13. Wayne, B. Effects of depleted uranium on mouse midbrain catecholamines and related behavior. Int J Environ Res Public Health 7(1):303-313, 2010.
14. Minami, M., Maruyama, W., Dostert, P., Nagatsu, T., Naoi, M. Inhibition of type A and B monoamine oxidase by 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolines and their N-methylated derivatives. Journal of Neural Transmission 92(2):125-135, 1993.
15. Welyer, W., J. I. Salach, J.I. Purification and properties of mitochondrial monoamine oxidase type from human placenta. : Biological Chemistry 260(24):13199-13207, 1985.
16. Youdim, M.B., Weinstock, M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. Neurotoxicology 25(1-2):243-250, 2004.
17. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. : Eur J Biochem 47: 469-474, 1974
18. Aebi, H., Bergmeyer, M.U. Catalase In Methods of enzymetic analysis. : Academic Press, New York., 2: 673-681, 1974.
19. Paglia, E.D., Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. . Lab Clin Med 70: 158-163, 1967.
20. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95(2):351-358, 1979.
21. Kotake, C., Heffner, T., Vosmer, G., Seiden, L. Determination of dopamine, norepinephrine, serotonin and their major metabolic products in rat brain by reverse-phase ion-pair high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Pharmacol Biochem Behav 22(1):85-89, 1985.
22. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.
23. Tanner, C.M., Langston, J.W. Do environmental toxins cause Parkinson's disease. : A critical review. Neurology 40(10):17-30, 1990.
24. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatr 79(4):368-376, 2008.
25. Widdowson, P.S., Farnworth, M.J., Upton, R., Simpson, M.G. No changes in behavior, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rat. Human and Experimental Toxicology 15(7):583-591, 1996.
26. Ferger, B., Teismann, P., Earl, C.D., Kuschinsky, K., Oertel, W.H. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. Pharmacol Biochem Behav 65(3):425-431, 2000.
27. Westm B.D., Sheghrue, P.J., Vanko, A.E.H., Ransorn, R.W., Kinney, G.G. Amphetamine-induced locomotor activity is reduced in mice following MPTP treatment but not following selegiline/MPTP treatment. Pharmacol. Biochem. Behav 84(1):158-161, 2006.
28. Sun, L., Xu, S., Zhou, M., Wang, C., Wu, Y., Chan, P. Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice. Brain Research 1335: 74-82, 2010.
29. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. J Neurochemistry 97(6):1634-1658, 2006.
30. Gao, H., Liu, B., WANQIN ZHANG, W., Hong, J. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. FASEB J 17(13):1954-1956, 2003.
31. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence 19(3):141-158, 1993.
32. Burcham, P.C., Kuan, Y.T. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. Biochem Biophys Res Commun 220(3):996-1001, 1996.
33. Mermett, L. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation Res. 424(1-2):83-95, 1999.
34. Vozenin-Brotans, M.C., Sivan, V., Gault, N., Renard, C., Geffrotin, C., Delanian, S., Lefaix, J.L., Martin, M. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. Free Radic Biol Med 30(1):30-42, 2001.
35. Campana, F., Zervoudis, S., Perdereau, B., Gez, E., Fourquet, A., Badiu, C., Tsakiris, G., Koulaloglou, S. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. J Cell Mol Med 8(1):109-116, 2004.
36. Wood, J.M., Decker, H., Hartmann, H., Chavan, B., Rokos, H., Spencer, J.D., Hasse, S., Thornton, M.J., Shalbf, M.,

- Paus, R., Schallreuter, K.U. Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *FASEB J* 23(7):2065-2075, 2009.
37. Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem* 133(1):51-69, 1983.
38. Joh, T.H., Hwang, O. Dopamine Beta-Hydroxylase. *Biochem. Mol Biol* 493: 342-350, 1987.
39. Manor, I., Tyano, S., Mel, E., Eisenberg, J., Bachner-Melman, R., Kotler, M., Ebstein, R.P. Family-Based and Association Studies of Monoamine Oxidase A and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Mol Psych* (6):626-632, 2002.