

## 香附子の 염증 억제 작용을 통한 항파킨슨 효과

김효근<sup>1#</sup>, 심여문<sup>1,2</sup>, 오명숙<sup>1,2\*</sup>

1 : 경희대학교 약학대학 한약학과, 2 : 경희대학교 약학대학 나노의약생명과학과

### Anti-parkinsonian effect of Cyperi Rhizoma via inhibition of neuroinflammatory action

Hyo Geun Kim<sup>1#</sup>, Yeomoon Sim<sup>1,2</sup>, Myung Sook Oh<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University,  
2 : Department of Life and Nanopharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study was to investigate the neuroprotective effects and mechanisms of Cyperi Rhizoma extracts (CRE) using *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease (PD).

**Methods** : We evaluated the neuroprotective effect of CRE against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity using tyrosine hydroxylase immunohistochemistry (IHC) in primary rat mesencephalic dopaminergic neurons. In addition, the effect of CRE was evaluated in mice PD model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). For evaluations, C57bl/6 mice were orally treated with CRE 50 mg/kg for 5 days and were injected intraperitoneally with MPTP (20 mg/kg) at 2 h intervals on the last day. To identify the CRE affects on MPTP-induced neuronal loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum of mice, the behavioral tests and IHC analysis were carried out. Also, we conducted nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) assay in dopaminergic neurons and IHC using glial markers in SNpc of mice to assess the anti-inflammation effects.

**Results** : In primary mesencephalic culture system, CRE protected dopaminergic cells against 10  $\mu$ M MPP+-induced toxicity at 0.2 and 1.0  $\mu$ g/mL. In the behavior tests, CRE treated group showed improved motor deteriorations than those in the MPTP only treated group. CRE significantly protected striatal dopaminergic damage from MPTP-induced neurotoxicity in mice. Moreover, CRE inhibited productions of NO and TNF- $\alpha$  in dopaminergic culture system and activation of astrocyte and microglia in SNpc of the mice.

**Conclusion** : We concluded that CRE shows anti-parkinsonian effect by protecting dopaminergic neurons against MPP+/MPTP toxicities through anti-inflammatory actions.

**Key words** : Cyperi Rhizoma, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, Parkinson's disease, Neuroinflammation

#### 서 론

香附子は 사초과(莎草科: Cyperaceae)에 속하는 다년초인 *Cyperus rotundus* L.의 근경으로 가는 뿌리를 제거하여 사용하며,  $\beta$ -selinene 등의 sesquiterpene계 정유가 1% 함유되었으며 주성분으로 cyperol, cyperene, isocyperol이 있고, oleanolic acid, patchoulone, cyperotundone,  $\alpha$ -cyperone, cyperotundone, patchoulone, sugeonol, kobusone 등

을 함유하고 있다<sup>1,2)</sup>. 본초학적으로는 理氣의 良藥으로 주로 疏肝理氣, 調經止痛의 효능을 지니고 있다. 특히 肝氣鬱滯에 의한 胸脇腕腹脹痛, 月經不調, 通經을 치료하는 목적으로 사용되었다<sup>3)</sup>. 또한, 香附子は 항산화 활성이 뛰어난 뿐만 아니라<sup>4)</sup> RAW 264.7 세포에서 nitric oxide(NO)와 과산화물의 생성을 억제하며<sup>5)</sup>, 급성과 아급성의 흰쥐 족부종을 억제하는 등<sup>6)</sup>의 항염증 작용과 더불어 자가사멸을 저해하는 등<sup>7)</sup>의 효

\*교신저자 : 오명숙, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실  
· Tel : 02-961-9346 · E-mail : msok@khu.ac.kr  
#제1저자 : 김효근, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실  
· Tel : 02-961-2252 · E-mail : kimhyogeun@khu.ac.kr  
· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 9일 · 채택 : 2013년 9월 13일

파가 보고된 바 있다.

퇴행성 뇌질환은 특정 신경세포군이 선택적으로 서서히 소멸되어 그 기능이 소실되어 나타나는 질병으로, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 등이 이에 해당되며 현대사회의 고령화에 따라 그 수가 점차 증가하고 있는 실정이다<sup>7)</sup>. 파킨슨병은 뇌의 흑질(substantia nigra) 부위의 도파민 신경이 사멸하여 선조체(striatum)로 연결되는 흑질-선조체 도파민성 신경계(nigrostriatal dopaminergic system)의 신경 전달에 장애가 나타나 그 기능이 소실되어 나타나는 질병으로 알츠하이머병 다음으로 높은 유병율을 보이는 퇴행성 뇌질환의 일종이다. 일반적인 증상으로는 서동(bradykinesia), 근경직의 증가(rigidity), 안정떨림(rest tremor), 행동의 동결(freezing), 자세의 변화(postural change), 비정상적인 자세 반사(abnormal postural reflex) 등이 나타난다<sup>8)</sup>. 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나, 연령, 유전적 원인, 환경적 영향에 의한 독성물질<sup>9)</sup>과 더불어 산화 스트레스<sup>10)</sup>, 신경염증(neuroinflammation)<sup>11)</sup> 등이 거론되고 있는데, 특히 유전적 요인이나 환경적 독소로 인해 신경손상이 일어나면 신경염증 세포인 미세 아교 세포(microglia) 등이 활성화되어 사이토카인(cytokine)을 생성하는 기전으로 뇌신경세포사멸을 촉진한다고 알려져 있다<sup>11)</sup>. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) 독성에 단기 노출된 경우에도 흑질과 선조체의 미세 아교 세포가 활성화되며<sup>12)</sup> NO/inducible nitric oxide synthase 이외에도 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6 등의 사이토카인을 생성하여 파킨슨병의 염증매개반응을 활성화하여 신경세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 미세 아교 세포의 활성화를 저해하는 기전으로 MPTP 독성에 의한 뇌신경세포사멸에 대해 신경세포 보호효과가 있음이 밝혀졌는데 이는 항염증 작용이 있는 약물이 파킨슨병에 응용 될 수 있음을 시사하는 바이다<sup>14,15)</sup>.

한의학적 관점에서 파킨슨병에 해당하는 명칭은 없으나, 파킨슨병 환자에서 흔히 볼 수 있는 振顫을 유사 증상으로 볼 수 있으며, 이를 임상에서는 허실에 따라 肝腎陰虛, 氣血陽虛, 痰熱內阻, 氣滯血瘀로 분류하여 치료하였다<sup>16)</sup>. 따라서, 理氣의 良藥인 香附子の 치료 가능성을 가늠할 수 있으며 실제 香附子が 파킨슨병과 밀접한 도파민 세포를 보호함이 밝혀진 바 있다<sup>17)</sup>.

본 연구에서는, 한의학적 이론과 기전 연구결과를 바탕으로 香附子が 세포 모델과 동물 모델에서 항 파킨슨 효능을 갖는지를 확인하고 그의 기전을 연구하고자 하였다. 따라서, 香附子 물 추출물(CRE)을 이용하여 태아중뇌 도파민 세포에서 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP+) 독성에 대한 세포 보호 효과와 NO, TNF- $\alpha$  분비능을 측정하였고, MPTP 독성을 이용한 마우스 모델에서 행동실험, 면역조직화학과 조직분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 香附子(Cyperi Rhizoma)는 정도약업

사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 香附子是 gas chromatography/mass spectrometry를 이용하여 cyperene 0.49 mg/g,  $\beta$ -selinene 0.65 mg/g,  $\alpha$ -cyperone 2.26 mg/g으로 표준화 하였다<sup>18)</sup>. 잡질을 제거한 후 10배의 증류수를 가하여 2시간 동안 환류추출한 후 감압여과(Whatman No. 2)하였다. 여과액을 -60 °C 이하에서 얼려 동결건조하였고(FDU-550R; Eyela Co, Japan), 동결건조 후의 수득율은 9.19 %였다. -20 °C에 보관 후 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

#### 2) 시약

Minimum essential medium(MEM)은 Gibco Industries Inc.(Auckland, NZ)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone(Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. Glutamine, glucose, MPP+, poly-L-Lysine(PLL), paraformaldehyde(PFA), glycerin, MPTP, 3,3-diaminobenzidine(DAB), phosphate buffer(PB), phosphate buffered saline(PBS), ethylene glycol, Triton X-100, dimethyl sulfoxide(DMSO), phosphoric acid, naphthylethylene diamide, sulfanilamide, sodium nitrite 등은 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였다. Biotinylated anti-rabbit antibody, ABC standard kit 등은 Vector(Burlingame, USA)에서 구입하였고, rat TNF- $\alpha$  kit는 invitrogen(Carlsbad, USA)에서 구입하였고, tyrosine hydroxylase(TH)-rabbit in goat primary antibody, macrophage-1 antigen integrin alpha M(Mac-1)-rat in goat primary antibody, glial fibrillary acidic protein(GFAP)-rabbit in goat primary antibody는 Merck Millipore(Billerica, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 태아중뇌 도파민 세포 배양 및 MPP+ 독성 처리

Sprague-Dawley rat 14 일 태아는 Orient Bio(Osan, Korea)에서 구입하였다. 태아중뇌 조직을 얻은 뒤에서 박리하여 10 % FBS를 포함한 MEM에 모은 후, 파이펫을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. PLL로 미리 코팅한 커버슬라이드에  $1.0 \times 10^5$ /well로 seeding한 후 37 °C에서 5 일 동안 증식시켰다. 멸균한 PBS에 용해시킨 CRE를 0.2, 1.0  $\mu$ g/mL로 1 시간 처리한 후 MPP+ 10  $\mu$ M을 처리하여 23 시간을 더 배양하였다. 면역조직화학을 위하여 커버슬라이드에 있는 세포를 4 % PFA로 30 분 고정하였다.

### 2) NO 측정

NO의 농도는 배양액 내의 NO 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. 태아중뇌 도파민 세포에 위에 기술한 바와 같이 CRE와 독성 처리 후 배양액인 상정액을 회수하여 상정액 100  $\mu$ L에 griess reagent 100  $\mu$ L를 반응 시켜 spectrophotometer(Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 그려 NO 농도를

결정하였다.

### 3) TNF- $\alpha$ 분비능 측정

태아중뇌 도파민 세포에 위에 기술한 바와 같이 CRE와 독성 처리 후 배양액인 상정액을 회수하여 TNF- $\alpha$  ELISA kit를 이용하여 매뉴얼에 따라 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하였다. TNF- $\alpha$  antibody가 코팅된 well에 Standard Diluent Buffer 100  $\mu$ L를 zero standard wells에 넣은 후, standard 100  $\mu$ L를 농도별로 희석하여 well에 분주하고, 상정액을 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 실온에서 2 시간 반응시킨 뒤, 4 회 세척하였다. Biotinylated anti-TNF- $\alpha$  Biotin Conjugate solution을 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 실온에서 1 시간 방치 한 후 완충용액으로 세척한 다음 Streptavidin-HRP Working Solution을 100  $\mu$ L씩 분주하고 실온에서 30 분간 방치한 후 4 회 세척하였다. 그 후 Stabilized Chromogen을 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 30 분간 암소에서 방치한 후 Stop Solution을 100  $\mu$ L씩 분주한 다음 450 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 측정값은 4-parameter algorithm로 계산하였다. 4-parameter algorithm은 일반적으로 용량-반응 곡선 같은 생물 검정의 곡선 피팅 분석에 사용된다. 다음은 4-parameter algorithm의 방정식이다.  $F(x) = ((A-D)/(1+(x/C)^B)) + D$ . x는 농도이고 F(x)는 흡광도이며, A는 표준 농도가 0일 때의 흡광도이고, B는 기울기 계수이고, C는 변곡점, D는 무한 표준 농도의 흡광도를 말한다.

### 4) 사육과 투여

C57bl/6 쥐 8 주령은 Orient Bio에서 구입하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도(22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C), 습도(53  $\pm$  3 %) 및 명암주기(12 시간은 자동적으로 조절되도록 하였다. 쥐는 5 마리씩 4 군으로 나누었다. 1 주일 적응시킨 후, 제1군(대조군) 및 제2군(MPTP군)은 식염수를 쥐 체중 kg당 5 mL로 5 일간 1 일 1 회 경구 투여하였다. 제3군(Ropinirol 1 mg/kg 투여군)은 식염수에 용해시킨 Ropinirol을 1 mg/kg으로, 제4군(CRE 50 mg/kg 투여군)은 식염수에 용해시킨 CRE를 50 mg/kg으로 5 일간 1 일 1 회 경구 투여하였다. 5 일째 되는 날 acute 모델로 제1군은 생리식염수를 쥐 체중 kg당 5 mL로 2 시간 간격으로 4 회 복강 내 투여하였으며, 제2군, 제3군, 제4군은 MPTP를 20 mg/kg 체중의 농도로 생리식염수에 용해시켜 쥐 체중 kg당 5 mL로 2 시간 간격으로 4 회 복강 내 투여하였다<sup>19)</sup>. 투여가 완료된 각 군의 쥐를 치사시킨 후, 도파민 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 뇌 조직을 분리하였다. 관류를 한 쥐의 뇌를 적출하여 4 % PFA에 하루 보관하여 고정시킨 후, 동결 시 생기는 조직의 손상을 막기 위해 4  $^{\circ}$ C의 30 % sucrose에 하루 동안 두어, 뇌 조직을 cryostat(CM3000; Leica, Wetzlar, Germany)로 30  $\mu$ m 동결박편 후, 4  $^{\circ}$ C storing solution에 보관하였다.

### 5) Rotarod test

CRE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 rotarod test를 실시하였다. 5 일간의 투여 종료 다음 날 및 셋째 날, 직경 3 cm, 4 rpm 회전 전

봉위에 올려놓고 20 rpm 까지 속도를 조절하여 연습시킨 3 시간 후, 25 rpm에서 본 실험을 시행하였으며 이때 낙하 시간을 측정하였다. 연습은 회당 300 초의 제한 시간을 두고 5 분 간격으로 2 회 시행하였고, 본 실험은 3 회 시행하여 평균값을 사용하였다.

### 6) Pole test

CRE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 Pole test를 실시하였다. 5 일간의 투여 종료 다음날 및 셋째 날, 높이 55 cm, 지름 8 mm의 막대에서 pole test를<sup>19)</sup> 수행하였다. 막대 위에 C57bl/6 쥐를 머리가 위로 향하게 놓고, 쥐가 꼭대기를 180 $^{\circ}$  돌아서 쥐의 머리가 완전히 아래로 내려오는 시간을 'time to turn', 쥐가 꼭대기를 180 $^{\circ}$  돌아서 내려와 네 다리가 땅에 닿을 때까지 걸리는 시간을 'time for locomotion activity'(Time for LA)로 표기하였다. 각 실험은 30 초의 제한시간을 두고 시행하였으며, 각 쥐를 3 회씩 연습시킨 후 5 회 본 실험을 행하였다.

### 7) 면역조직화학 분석

고정한 태아중뇌 도파민 세포와 뇌 조직의 선조체 및 흑질 부분을 골라 PBS로 3 회 세척한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위하여 과산화수소로 처리하여, 1차 항체 rabbit anti-TH(1:2000 dilution), rat anti-Mac-1(1:1000 dilution), 또는 rabbit anti-GFAP(1:1000 dilution)을 하룻밤 반응시켰다. 2차 항체 biotinylated anti-rabbit 또는 anti-rat(1:200 dilution)을 사용하고, ABC 반응을 거쳐 DAB를 이용하여 3 분간 발색시켰다. 각 과정 사이에 PBS로 3 회 세척을 행하였다. 염색반응을 완료시킨 후 태아중뇌 도파민 세포가 있는 커버슬라이드는 마운팅 용액을 이용해 덮어 건조 후 보관하였다. 뇌 조직은 gelatin coated slide에 마운팅 후 70-100% 에탄올과 자일렌의 과정을 거치고 커버슬라이드로 조직을 덮어 보관하였다.

염색을 시행한 태아중뇌 도파민 세포는 optical light microscope(Olympus Microscope System BX51; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 CRE의 세포에 대한 영향을 관찰하였다. TH 양성 세포를 100 배율에서 세어서 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 뇌 조직의 흑질부는 TH 양성세포수를 100 배율에서 세어서 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 선조체는 40 배율에서 ImageJ software(Bethesda, MD, USA)를 사용하여 광학밀도(optical density)를 측정하였으며, background를 제외한 결과 값을 사용하였다. 이미지는 optical light microscope를 이용해 촬영하였다. 또한 뇌 조직의 흑질부에서 Mac-1과 GFAP의 양성반응 정도를 관찰하였다.

## 3. 통계처리

모든 측정값은 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 Graphpad Prism 5.0(SAn Die해, CA) 프로그램을 사용하였으며, one-way ANOVA를 이용하였고, 사후검정은 Tukey test를 이용하여 평균값의 유의성을 5 % 미만의 한계로 조사하였다.

## 결 과

### 1. 태아중뇌 도파민 세포에서 CRE의 MPP+ 독성에 대한 도파민 신경 보호 효과

CRE의 MPP+ 신경독성에 대한 도파민 세포 보호 효과를 측정된 결과 MPP+군은 도파민 세포 수가 대조군 대비하여 66.20 ± 1.41 %을 나타내어 도파민 세포의 수를 유의하게 감소시켰고( $p < 0.001$ ), CRE과 MPP+를 함께 처리한 결과 MPP+의 세포독성에 대하여 CRE 0.2, 1.0 µg/mL농도에서 대조군 대비하여 각각 78.87 ± 3.92 %, 85.90 ± 0.92 %으로 통계적으로 유의하게 도파민 세포를 증가시켰다(Fig. 1).

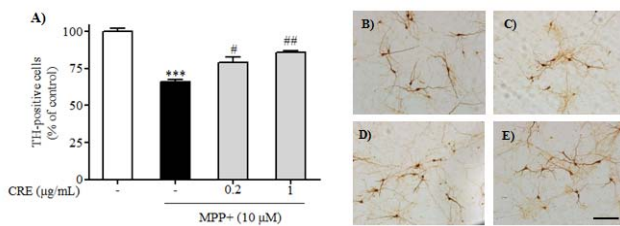


Fig. 1. Protective effects of CRE on MPP+-induced dopaminergic neuronal damage in primary mesencephalic cell cultures. The cells were treated with CRE at 0.2 and 1.0 µg/mL for 1 h and exposed to 10 µM MPP+ for an additional 23 h. After fixation, cells were stained with anti-TH antibody and visualized with DAB. The number of TH-positive cells were measured (A) and the representative photomicrographs are shown in (B-E). (B) Control group; (C) MPP+ group; (D) MPP+/CRE 0.2 µg/mL group; (E) MPP+/CRE 1.0 µg/mL. Scale bar=100 µm. Values are given as the mean ± SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control group, ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  compared with the MPP+ only treated group.

### 2. MPTP유발 파킨슨병 동물 모델에서 CRE가 행동장애에 미치는 영향

CRE의 MPTP 신경독성 유발 파킨슨병 동물 모델에 미치는 영향을 알아보기 위하여 rotarod test와 pole test를 이용한 행동실험을 실시하였다. 행동 장애 개선 효능을 비교하기 위하여 ropinirol을 양성대조군으로 투약하여 실시하였다<sup>19</sup>. Rotarod test 결과 독성 투여 첫 날 대조군은 91.77 ± 5.33 초 동안 회전속도를 견디던 반면 MPTP군은 회전속도를 견디는 운동능력이 감소하여 35.14 ± 6.45 초를 나타내었다. 독성 투여 셋째 날은 대조군 144.4 ± 20.13 초, MPTP군 69.21 ± 14.09 초로 신경독성에 의한 행동장애가 일어난 것을 확인하였다. 반면, CRE 50 mg/kg 5일간 투여한 군의 경우 첫 날 74.52 ± 9.01 초, 셋째 날 125.8 ± 20.77 초를 보이며, 양성대조군과 동등 또는 이상의 효능을 나타내었다(Fig 2). 또한, pole test 결과 MPTP군은 time to turn과 time for LA의 대조군 대비 독성투여 첫 날 278.61 %, 177.55 %로 독성투여 셋째 날 219.61 %, 206.14 %로 증가함으로써 서동이 야기됨을 알 수 있었다(Fig 3). CRE를 50 mg/kg 투여한 경우 통계적으로 유의한 행동장애 개선 효과를 보였으며 이는 양성대조군 보다 뛰어난 서동 회복 효과임을 확인할 수 있었다(Fig 3).

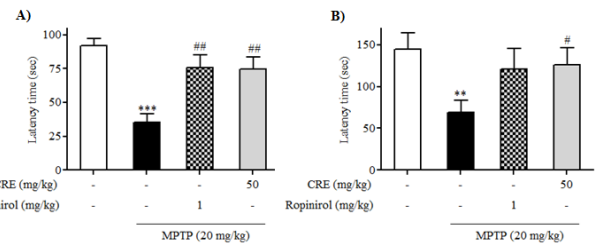


Fig. 2. Protective effect of CRE on MPTP-induced behavioral impairment in a mouse Parkinson's disease model using the rotarod test. Mice were treated with CRE 50 mg/kg for 5 days and with MPTP (four intraperitoneally injections of 20 mg/kg 2 h interval times) on the last day. First day (A) and third day (B) of the last MPTP injection, we conducted the rotarod test. The latency time to fall off was recorded. Values are given as the mean ± SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the control group, ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  compared with the MPTP-only treated group.

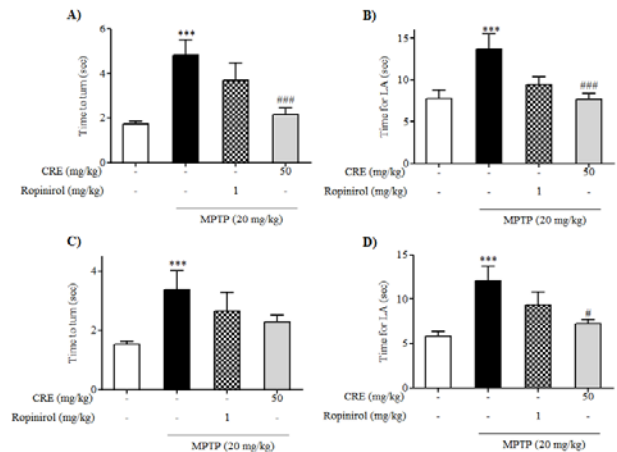


Fig. 3. Protective effect of CRE on MPTP-induced behavioral impairment in a mouse Parkinson's disease model using the pole test. Mice were treated with CRE 50 mg/kg for 5 days and with MPTP (four intraperitoneally injections of 20 mg/kg 2 h interval times) on the last day. First day (A and B) and third day (C and D) of the last MPTP injection, we conducted the pole test. The time to turn completely down ward (A and C; time to turn) and to arrive at the floor (B and D; time for LA) were recorded. Values are given as the mean ± SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control group, ###  $p < 0.001$ , #  $p < 0.05$  compared with the MPTP-only treated group.

### 3. MPTP유발 파킨슨병 동물 모델에서 CRE가 도파민 세포 독성에 미치는 영향

CRE가 C57bl/6 파킨슨병 모델의 도파민 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MPTP로 유도한 파킨슨병 모델 쥐의 뇌를 적출하여 조직분석을 하였다. 도파민 세포 보호효과는 흑질 치밀부에서 TH 양성 세포 숫자를 세고, 선조체에서 광학밀도를 측정하여 확인하였다. CRE를 투여한 경우 흑질 치밀부에서 TH 양성세포 수가 대조군 대비 71.10 ± 1.08 %로, MPTP 투여로 인해 36.74 ± 4.94 %로 감소한 TH 양성 세포 수를 유의적으로 증가시켜 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한, 선조체에서 CRE 투여군의 광학밀도가 대조군 대비 66.78 ± 1.32 %로서, MPTP 투여군 41.45 ± 3.05 %에 비해 유의적으로 도파민

세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이 결과로서 CRE가 흑질 치밀부 및 선조체에서 우수한 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

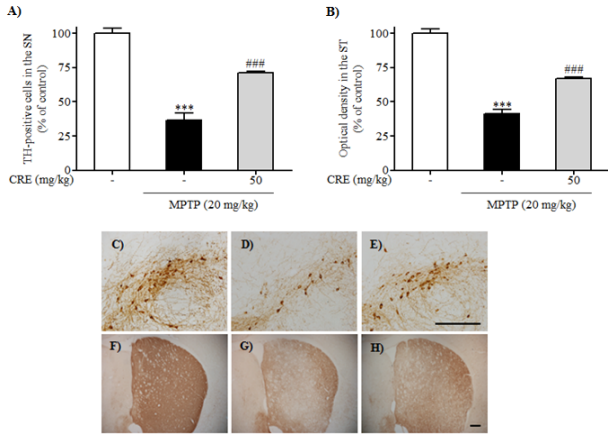


Fig. 4. Protective effect of CRE on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage in a mouse Parkinson's disease model. Representative photomicrographs are shown of the SNpc (C-E) and ST (F-H) of each group. Quantification of the dopaminergic cells were performed by counting the number of TH-immunoreactive (IR) cells in the SNpc (A) and by measuring the optical density in the ST (B). (C, F) Control group; (D, G) MPTP group; (E, H) MPTP + CRE group. Scale bar=200  $\mu$ m. Values are given as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control group, ###  $p < 0.001$  compared with the MPTP-only treated group.

#### 4. 태아중뇌 도파민 세포에서 MPP+에 의한 NO 및 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

태아중뇌 도파민 세포에 위에 기술한 바와 같이 CRE과 독성을 처리하여 MPP+에 의해 유도되는 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정하였다. MPP+에 의하여 NO의 생성이 대조군 대비  $248 \pm 13.38$ 으로 증가하였으며 (\*\*\*)  $p < 0.001$ , CRE 전처리에 의해 0.2, 1.0  $\mu$ g/mL 농도에서 NO의 과생성이 대조군 대비 각각  $206.78 \pm 7.59 \%$ ,  $173.67 \pm 6.36 \%$ 로 유의하게 억제되었다(Fig. 5A). MPP+에 의하여 TNF- $\alpha$ 의 생성이 대조군에 비해  $246.69 \pm 24.72 \%$ 로 증가하였으며, CRE 전처리에 의해 TNF- $\alpha$ 의 과생성이 농도 의존적으로 감소하였으며, 1.0  $\mu$ g/mL 농도에서  $120.53 \pm 19.45 \%$ 로 유의하게 억제되었다(Fig. 5B).

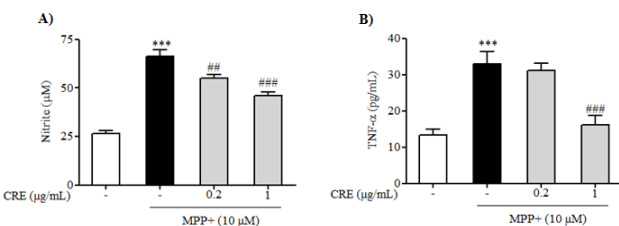


Fig. 5. Inhibitory effect of CRE on overproduction of NO and TNF- $\alpha$  in mesencephalic dopaminergic neurons induced by MPP+. NO was determined by colorimetric assay using Griess reagent (A). TNF- $\alpha$  level was measured by ELISA assay (B). Values are given as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control group, ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$  compared with the MPP+ only treated group.

#### 5. MPTP유발 파킨슨병 동물 모델에서 CRE가 신경 아교 세포에 미치는 영향

CRE가 파킨슨병 동물 모델의 도파민 세포가 밀집되어 있는 흑색질 주변 신경 아교 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조직분석을 하였다. MPTP 투여군에서 정상교세포 (astrocyte) 및 미세 아교 세포(microglia)가 가지를 내뿜으며 응축되는 형태로 활성화 된 것을 확인할 수 있었으며, CRE 투여에 의해 신경 아교 세포 활성화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 6).

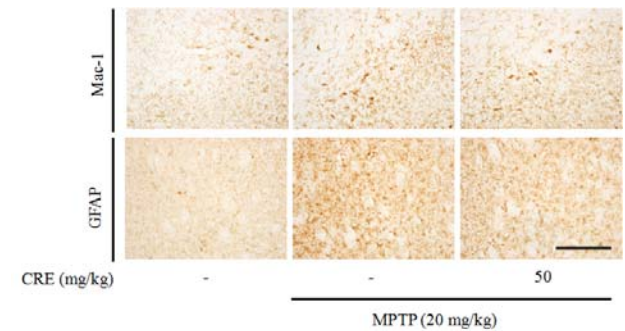


Fig. 6. Inhibitory effect of CRE on MPTP-stimulated glia activation in a mouse Parkinson's disease model. Representative photomicrographs are shown of the astrocyte using GFAP antibody and microglia using Mac-1 in SNpc of each group. Scale bar=200  $\mu$ m.

#### 고찰

본 연구에서는 香附子の MPP+/MPTP독성에 대한 도파민 세포의 보호효과와 이의 기전으로 항염증 효과를 알아보고자 하였다.

MPTP는 도파민과의 구조적 유사성으로 인하여 도파민 수송체에 의하여 도파민성 신경계에 운반되어 선택적으로 도파민성 신경계에 독성을 나타내므로 파킨슨병 모델을 이용한 연구에서 병태모델 유발 독성으로 사용된다<sup>20</sup>. MPTP의 대사체인 MPP+는 도파민 세포의 미토콘드리아의 complex I을 억제하고, mitochondrial permeability transition의 세공을 열어, 미토콘드리아 막전위의 붕괴와 더불어 세포내 caspase의 활성화를 유도함으로써 신경세포의 자가사멸을 일으킨다<sup>21</sup>. 본 실험에서 태아중뇌 도파민 세포에서 香附子の MPP+에 대한 보호 효과를 알아보기 위해 TH로 면역조직화학을 한 후 도파민 세포 수를 세었다. 도파민은 주로 중뇌의 흑질에서 합성되며, TH는 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환하는 도파민 생성의 처음에 작용하는 속도제한효소(rate-limiting enzyme)로 도파민 세포와 도파민의 간접적 측정 척도로 사용된다<sup>22</sup>. 태아중뇌 도파민 세포에서 MPP+로 유도한 독성에 대해 CRE를 처리한 군은 0.2, 1.0  $\mu$ g/mL농도에서 MPP+군에 대비하여 도파민 세포수를 통계적으로 유의하게 증가시킴으로 도파민 세포에 대한 보호효과를 확인하였다.

다음으로, CRE의 MPTP로 유도한 파킨슨병 마우스 모델에서 행동에 미치는 영향을 살펴보았다. 먼저, CRE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 rotarod test와 pole test를 실시하였다. Rotarod test는



회전속도를 건디는 시간을 측정해 운동 기능 감퇴 정도를 판단하는 행동실험으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 또한, Pole test는 앞발의 정교한 근육조절 기능을 조사할 수 있으며, 흑질-선조체 도파민성 신경계의 이상 여부를 가장 민감하게 알 수 있는 행동실험으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. MPTP 투여군에서 총 운동거리 (movement distance)의 감소 및 time to turn과 time for LA의 증가를 확인함으로써 서동이 야기됨을 알 수 있었으며, CRE를 50 mg/kg 투여한 경우 MPTP 투여군에 비해 서동을 회복시킴을 확인할 수 있었다.

CRE가 MPTP로 유발된 운동 완화에 미치는 영향과 더불어, 흑질-선조체의 도파민 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 조직학적 분석을 시행하였다. 흑질에서 투사되는 도파민성 신경말단이 분포하는 선조체는 근육의 긴장을 조절하여 운동을 원활하게 하는데 관여하는데, 파킨슨병의 운동장애인 안정시의 진전, 서동, 근경직의 증가 등은 흑질의 도파민 세포의 소실로 인한 선조체의 도파민 결핍으로 인해 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. TH 항체를 이용하여 면역조직화학조직 분석 결과, CRE의 투여가 흑질에서 MPTP 투여로 인해 감소한 TH 양성 도파민 세포의 손상을 억제해 주었을 뿐만 아니라 선조체의 신경세포 손상을 줄여 주는 것을 확인하였다. 이로 인해 CRE가 흑질의 도파민 세포의 보호활성을 통해 흑질-선조체 도파민성 신경계의 손상을 효과적으로 보호함으로써 C57bl/6 파킨슨병 모델의 행동실험에서 서동을 회복시킴을 확인할 수 있었다.

MPTP는 염증반응을 매개한 세포사멸에 관여하는데<sup>24)</sup> MPTP 투여 시 흑질의 미세 아교 세포가 활성화 되고<sup>25)</sup> IL-1 $\beta$ 의 양이 증가하며, 파킨슨병 환자의 뇌에서도 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ 의 양이 증가한다고 알려져 있다<sup>26)</sup>. 파킨슨병 세포와 동물 모델에서 TNF signaling을 저제한 결과 도파민 세포의 사멸이 감소되며<sup>27)</sup>, TNF 수용체가 결핍되는 형질전환쥐에서는 MPTP 투여독성에 대한 저항성이 있다<sup>28)</sup>는 보고를 통해 파킨슨병 모델에서 신경염증반응을 억제하면 세포사멸을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 CRE를 이용하여 태아중뇌 도파민 세포에서 MPP+에 대한 세포 보호 효과를 확인한 후, 보호효과의 기전을 밝히기 위해 태아중뇌 도파민 세포에서 MPP+에 의해 유도된 염증인자인 NO와 TNF- $\alpha$  생성을 측정하였으며, 동물모델에서 면역조직화학을 통해 흑색질 주변 신경 아교 세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. CRE 전처리에 의해 NO의 과생성이 0.2, 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 유의성 있게 억제되었고, TNF- $\alpha$ 의 과생성이 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 유의성 있게 억제되었으며, 흑색질의 신경 아교 세포 활성화가 억제되는 것을 통해 CRE가 MPP+/MPTP 독성으로 유도한 신경염증반응을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

香附子は 항산화효과와 더불어 항염증작용, 항세포사멸 등의 효과가 밝혀져 있으며<sup>7)</sup>, 본초학적으로 香附子の 理氣 작용이 퇴행성 뇌질환의 원인인 痰飲과 七情傷에 응용할 수 있음을 들어 알츠하이머병에 香附子が 항콜린작용과 presenilin-1, 2 및 APP 과잉발현 억제능력이 있음이 밝혀졌다<sup>29)</sup>. 최근에 聰明湯의 가감방인 香附子聰明湯의 추출물 및 나노분말이 치매의 예방과 치료에 응용될 수 있음이 밝혀졌으며<sup>30)</sup>, 香附子が PC12세포에서 6-Hydroxydopamine으로 유도한 신경독성에 대한 보호효과가 있다는 연구<sup>17)</sup>가 보고되었다. 또한, 香附子

를 포함한 柴胡疎肝散이 파킨슨성 질환을 감소시킴이 보고된 바 있다<sup>31)</sup>. 이와 같은 香附子の 다양한 생물작용(bioactivity)과 퇴행성 뇌질환 개선 가능성들이 복합적으로 작용했으리라 생각된다.

이상으로 본 실험을 통해 香附子が 태아중뇌 도파민 세포에서 MPP+ 독성에 대한 보호 효과를 보였으며, 동물 실험에서 MPTP 독성에 대한 흑질-선조체 도파민성 신경계의 보호를 통해 파킨슨병 마우스 모델의 행동실험에서 서동을 회복시킴을 확인하였다. 이는 NO와 TNF- $\alpha$  생성 억제에 따른 항염증 작용으로 보인다. 본 연구 결과들을 통해서 香附子が 항염증효과로 기인한 도파민 세포의 보호효과로 인해 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료 약물 후보가 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

본 연구에서는 香附子추출물(CRE)의 태아중뇌 도파민 세포 및 동물 모델에서 MPP+/MPTP 신경독성에 대한 도파민 세포 보호 효과 및 신경염증 억제 효과에 대한 연구를 수행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CRE는 태아중뇌 배양 세포 모델에서 MPP+ 신경독성에 의한 도파민 세포 손상으로부터 보호 효과를 보였다. 또한 CRE 투여는 동물 모델에서 MPTP 신경독성에 의한 흑질과 선조체의 도파민 세포 수와 신경 말단 손상을 보호하였다.
2. CRE 투여는 동물모델에서 MPTP로 유도한 파킨슨병 유사 행동장애를 회복시켰으며, 이는 양성대조군인 ropinirol과 동등 또는 이상의 효능을 나타내었다.
3. CRE는 MPP+로 유도된 염증성 인자인 NO와 TNF- $\alpha$  생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 흑질 부위의 MPTP로 유도된 신경아교증(gliosis)을 억제한 것이 관찰되었다.

이상의 결과에서 香附子は MPP+/MPTP 신경독성에 의한 항염증 효과로 인해 파킨슨병의 주요 병태생리인 흑질의 도파민 세포의 손상으로부터 신경세포를 보호함으로써 서동 등의 운동장애를 억제하는 효과가 있음을 확인하였으며, 파킨슨병을 포함한 염증성 퇴행성 뇌질환의 치료약물소재로 이용될 수 있는 가능성을 시사하였다.

## References

1. Korea medicinal botany research society. Medicinal botany. 2th rev. ed. Seoul : Hakchangsa, 2003 : 129.
2. Pharmacology of Oriental Herbs textbook compilation committee. Pharmacology of Oriental Herbs. 8th rev. ed. Seoul : Shinilbooks, 2010 : 657-9.

3. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed. Seoul : Younglim-Sa. 2012 : 478-80.
4. Kilani S, Bouhleb I, Ben R, Abdelwahed A, Hayder N, Mahmoud A, Ghedrida K, Chekir-Ghedira L. Evaluation of the antimutagenic and antiradical potentials of extracts from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus*. Toxicol Environ Chem. 2005 ; 87 : 415-25.
5. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 2001 ; 76 : 59-64.
6. Sundaram MS, Sivakumar T, Balamurugan G. Anti-inflammatory effect of *Cyperus rotundus* Linn. leaves on acute and subacute inflammation in experimental rat models. Biomedicine. 2008 ; 28 : 302-4.
7. Kilani S, Sghanier MB, Limen I, Bouhleb I, Boubaker J, Bhi W, Skandrani I, Neffatti A, Ammar RB, Dijoux-Franca MG, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. Bioresour Technol. 2008 ; 99 : 9004-8.
8. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003 ; 39 : 889-909.
9. Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. Brain Res. 1999 ; 823 : 1-10.
10. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov. 2004 ; 3 : 205-14.
11. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener. 2009 ; 4 : art 47.
12. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. Ann Neurol. 1999 ; 46 : 598-605.
13. Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. Curr Pharm Design. 2005 ; 11 : 999-1016.
14. Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. J Neurosci. 2002 ; 22 : 1763-71.
15. Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. J Neurochem. 1998 ; 71 : 1635-42.
16. Li Q, Zhao D, Bezard E. Traditional Chinese medicine for Parkinson's disease: a review of Chinese literature. Behav Pharmacol. 2006 ; 17 : 403-10.
17. Lee CH, Hwang DS, Kim HG, Oh H, Park H, Cho JH, Lee JM, Jang JB, Lee KS, Oh MS. Protective effect of *Cyperus Rhizoma* against 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage. J Med Food. 2010 ; 13 : 564-71.
18. Kim HG, Hong J, Huh Y, Hwang DS, Choi JH, Oh MS. *Cyperus Rhizoma* inhibits the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced reduction in nigrostriatal dopaminergic neurons in estrogen-deprived mice. J Ethnopharmacol. 2013 ; 148 : 322-8.
19. Park G, Park YJ, Yang HO, Oh MS. Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism. Pharmacol Biochem Be. 2013 ; 104 : 163-8.
20. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. Acta Neuropathol. 2008 ; 115 : 385-98.
21. Sayre LM. Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Toxicol Lett. 1989 ; 48 : 121-49.
22. Denis-Donini S. Expression of dopaminergic phenotypes in the mouse olfactory bulb induced by the calcitonin gene-related peptide. Nature. 1989 ; 339 : 701-3.
23. Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. Behav Genet. 2000 ; 30 : 171-82.
24. Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan DS, Nakano I, Nagatsu T. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 $\beta$  and nerve growth factor in the striatum. Neurosci Lett. 1998 ; 250 : 25-8.

25. Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol*. 1999 ; 156 : 50-61.
26. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*. 1999 ; 53 : 141-5.
27. McCoy, MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2006 ; 26 : 9365-75.
28. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*. 2002 ; 16 : 1474-6.
29. Jung IC, Lee SR, Yun SH. Effects of *Cyperus rotundus* (CPRT) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice. *J Orient Neuropsychiatry*. 2003 ; 14 : 59-74.
30. Oh YJ, Kim BK. A Study of ChongMyungTang (CMT) and HyangbujaChongMyungTang (HCMT) on Dementia -Extract & Nano Powder Drug types. *J Orient Neuropsychiatry*. 2006 ; 17 : 79-105.
31. Kim TH, Cho KH, Jung WS, Lee MS. Herbal medicines for parkinson's disease: a systematic review of randomized controlled trials. *Plos One*. 2012 ; 7 : e35695. doi: 10.1371/journal.pone.0035695.