

파킨슨씨병에 활성을 가지는 수목 추출물 탐색

Neuroprotective effects of plant extracts in cell model of Parkinson's disease

이현정^{1*}, 김연수¹, 김우진¹, 박수진¹, 이학주¹

¹국립산림과학원 녹색산업연구과

1. 서론

파킨슨씨병은 신체의 움직임에 떨림, 불안정한 자세, 보행 장애 등의 이상이 발생하는 중추 신경계 질환이다. 이 질환은 뇌의 일부분 중 흑색질(substantia nigra, 그림 1)이라는 곳의 신경세포가 사멸할 때 발생한다. 그림에서 보듯이 정상인은 흑색질이 뚜렷한 반면 파킨슨씨병 환자에서는 흑색질이 흐릿한 것을 확인할 수 있다. 이 세포는 정상적으로 운동 기능을 담당하는 뇌 영역간 메시지 전달을 하는 도파민(dopamine)을 생성하는데 이 세포가 사멸하면 정상 레벨보다 낮은 레벨의 도파민이 존재하게 되며 이로 인해 파킨슨씨 환자는 휴식기뿐만 아니라 활동 시기에도 근육 긴장도와 운동 조절에 이상을 일으킨다. 최근 연구에서 파킨슨씨병은 나이가 들면서 뇌 시냅스에 존재하는 여러 가지 효소 결합이나 다른 여러 가지 이유에 의해서 신경 전달물질인 도파민이 산화되면서 그로 인해 뇌에 산화적 스트레스가 발생하고 또한 여러 파킨슨씨병과 관련이 있는 단백질들과 결합하여 그 기능을 상실케 하는 도파 quinone이나 도파민 quinone류 들이 생산된다고 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 human neuroblastoma SH-SY5Y cell에 도파민을 직접 처리 하여 이 도파민의 산화로 인해 질병을 유도하였고 각 추출물들을 도파민 처리 24시간 전에 처리하여 그 보호 효과를 cell viability를 지표로 하여 확인하여 보호 효과를 검증하고자 한다.

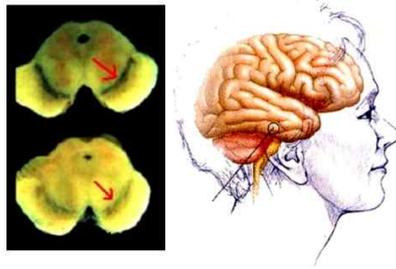


그림 1. 뇌의 흑색질(substantia nigra) 위치(정상인: 위, 파킨슨씨병 환자: 아래)

2. 재료 및 방법

2.1 추출물 시료

광릉, 지리산, 인제 등에서 수집한 수목을 메탄올(methanol, MeOH) 또는 에탄올(ethanol, EtOH)로 상온 추출하여 여과한 후 감압 농축하여 사용하였다.

2.2 실험 방법

Human SH-SY5Y Neuroblastoma cell (ATCC no. CRL-2266)은 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, cat.# 16000-044, USA) 및 antibiotics (Sigma-Aldrich, cat.# A5955, USA)가 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, cat.# D2902, USA) 배지 하에서 배양하였다. Incubator는 37°C 온도를 유지했고 5% CO₂기체가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건을 갖추었다. 96-well plate에 1 x 10⁴ cells/well로 배양한 뒤 48시간 후 SH-SY5Y cell에 도파민을 각각 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M, 1000 μ M 의 농도로 처리하였다. 도파민 처리 24시간 후 MTT assay를 통해 농도 별 cell viability를 측정하였다. 도파민 농도는 위 실험 결과를 토대로 cell

viability 값이 대략 50%를 나타냈던 600 μ M (24 hr)로 결정하였다. 추출물은 100 μ g/ml, 20 μ g/ml, 4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml, 0.16 μ g/ml, 0.032 μ g/ml의 각각의 농도 별로 도파민(600 μ M) 처리 24시간 전에 선행 처리하였으며 각 추출물 시료들의 효과는 EC₅₀값을 지표로 하여 비교 관찰하였다. 시료는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, cat.# D5879, USA)에 녹였으며 처리한 DMSO의 최종 농도는 0.5%가 되게 하였다. 96-well plate에 SH-SY5Y cell을 15만 cell/well로 plating한다. Sample 처리와 도파민 처리는 위와 동일하게 하였다. 도파민(600 μ M)처리 24시간 후에 각 well의 cell을 모은 후 70% 에탄올(ethanol, EtOH)로 고정하여 -20°C에서 보관하였다. 후에 PI 염색하여 30분간 반응시킨 후 FACs를 이용하여 각 cell의 apoptosis (세포 자연사)율을 측정 한 후 EC₅₀ (The term half maximal effective concentration)의 값을 table curve 프로그램을 이용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

도파민의 산화로 파킨슨씨병을 유도한 후 각 추출물에 대한 활성을 검정한 결과이다(표 1).

표 1. SH-SY5Y cell에 dopamine-induced (파킨슨병)에 대한 EC₅₀

No.	수목명	부위	학명	EC ₅₀ [μ g/ml]	No.	수목명	부위	학명	EC ₅₀ [μ g/ml]
1	젓나무	수피	<i>Abies holophylla</i>	>100	31	종가시나무	수피	<i>Quercus glauca</i>	>100
2	젓나무	잎	<i>Abies holophylla</i>	>100	32	종가시나무	잎	<i>Quercus glauca</i>	>100
3	편백	수피	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	>100	33	육박나무	잎	<i>Lozoste lancifolia</i>	>100
4	일본잎갈나무	심재	<i>Larix leptolepsis</i>	>100	34	광나무	목부	<i>Ligustrum japonicum</i>	>100
5	일본잎갈나무	수피	<i>Larix leptolepsis</i>	>100	35	광나무	잎	<i>Ligustrum japonicum</i>	>100
6	읍나무	목부	<i>Kalopanax pictus</i>	>100	36	후박나무	잎	<i>Machilus thunbergii</i>	>100
7	뱅크스소나무	수피	<i>Pinus banksiana</i>	>100	37	아왜나무	수피	<i>Viburnum awabuki</i>	>100
8	뱅크스소나무	잎	<i>Pinus banksiana</i>	>100	38	아왜나무	잎	<i>Viburnum awabuki</i>	>100
9	산딸나무	잎	<i>Cornus kousa</i>	>100	39	육계나무	목부	<i>Cinnamomum loureirii</i>	>100
10	느티나무	수피	<i>Zelkova serrata</i>	>100	40	사스레피나무	목부	<i>Eurya japonica</i>	>100
11	분비나무	수피	<i>Abies nephrolepis</i>	>100	41	사스레피나무	잎	<i>Eurya japonica</i>	>100
12	리기다소나무	수피	<i>Pinus rigida</i>	2.62	42	참식나무	잎	<i>Neolitsea sericea</i>	>100
13	리기다소나무	잎	<i>Pinus rigida</i>	>100	43	흰새덕이	잎	<i>Lisea aciculata</i>	>100
14	소나무	수피	<i>Pinus densiloba</i>	>100	44	흰새덕이	수피	<i>Lisea aciculata</i>	>100
15	소나무	심재	<i>Pinus densiloba</i>	>100	45	흰새덕이	줄기	<i>Lisea aciculata</i>	>100
16	물푸레나무	수피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	3.75	46	센달나무	수피	<i>Machilus japonica</i>	>100
17	물푸레나무	목부	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	>100	47	두충	목부	<i>Eucommia ulmoides</i>	>100
18	충충나무	목부	<i>Cornus controversa</i>	8.16	48	주목	심재	<i>Taxus cuspidata</i>	>100
19	까치박달	목부	<i>Carpinus cordata</i>	>100	49	주목	잎	<i>Taxus cuspidata</i>	>100
20	황벽나무	잎	<i>Phellodendron amurense</i>	>100	50	오동나무	잎	<i>Paulownia coreana</i>	>100
21	개나리	열매	<i>Forsythia koreana</i>	>100	51	오동나무	목부	<i>Paulownia coreana</i>	>100
22	진달래	열매	<i>Rhododendron mucronulatum</i>	>100	52	자작나무	잎	<i>Betula platyphylla</i>	>100
23	노린재나무	수피	<i>Symplocos chinensis</i>	>100	53	청미래덩굴	줄기	<i>Smilax china</i>	>100
24	붉가시나무	목부	<i>Quercus acuta</i>	>100	54	청미래덩굴	잎	<i>Smilax china</i>	>100
25	참가시나무	목부	<i>Quercus salicina</i>	>100	55	산벚나무	목부	<i>Prunus sargentii</i>	>100
26	조록나무	잎	<i>Distylium racemosum</i>	>100	56	산벚나무	수피	<i>Prunus sargentii</i>	>100
27	조록나무	목부	<i>Distylium racemosum</i>	>100	57	예덕나무	수피	<i>Mallotus japonicus</i>	>100
28	동백나무	잎	<i>Camellia japonica</i>	>100	58	히어리	잎	<i>Corylopsis coreana</i>	>100
29	소귀나무	수피	<i>Myrica rubra</i>	>100	59	히어리	목부	<i>Corylopsis coreana</i>	>100
30	종가시나무	목부	<i>Quercus glauca</i>	>100	60	갈참나무	잎	<i>Quercus aliena</i>	6.52

4. 결론

퇴행성 질환인 파킨슨씨병에 효과가 있는 수목 추출물을 탐색한 결과, 리기다 소나무 수피, 물푸레 나무 수피, 갈참나무 잎에서 활성이 나타났으며, 이들 중 리기다 소나무 수피와 물푸레나무 수피는 positive control인 apomorphine (EC₅₀=4.32)보다 우수한 것을 확인하였다. 이들 결과는 파킨슨씨병에 활성이 있는 성분 탐색의 선행연구로 활용하여 앞으로 본 연구실에서는 이들 생약제 추출물들의 성분 분석을 진행할 계획이다.