

## 흰쥐 선조체에서 6-OHDA-유도 도파민 고갈 및 SH-SY5Y 세포주에서 6-OHDA-유도 산화적 스트레스에 대한 *l*-Deprenyl의 신경 보호효과

김은미\*\*\* · 최신규\* · 이경림\* · 김화정\*#

\*이화여자대학교 약학대학, \*\*국립과학수사연구소

(Received August 2, 2005; Revised August 19, 2005)

### Neuroprotective Effect of *l*-Deprenyl Against 6-OHDA-Induced Dopamine Depletion in Rat Striatum and 6-OHDA-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells

Eun-Mi Kim\*\*\*, Sinkyu Choi\*, Kyunglim Lee\* and Hwa-Jung Kim\*#

\*Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

\*National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

**Abstract** — A neurotoxin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) has long been used to form a Parkinson's disease (PD) model by inducing the lesion in catecholaminergic pathways, particularly the nigrostriatal dopamine (DA) pathway. Whereas *l*-deprenyl, a selective inhibitor of monoamine oxidase (MAO) type B, is now widely used in the treatment of PD, the precise action mechanism of the drug remains elusive. In this study, we investigated whether *l*-deprenyl shows protective effect against the DA depletion induced by 6-OHDA in rat brain, and against 6-OHDA-induced neurotoxicity and oxidative stress in catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells that are known to lack MAO-B activity. Pretreatment of *l*-deprenyl significantly enhanced the striatal DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, and 3-methoxytyramine levels compared to the untreated 6-OHDA-lesioned rat, indicating that *l*-deprenyl pretreatment prevents 6-OHDA-induced depletion of not only striatal dopamine but also its metabolites. Treatment of 6-OHDA for 24 hrs decreased the cell viability and increase the generation of ROS in dose-dependent manners. We further investigated whether caspase activity is involved in the action of *l*-deprenyl. Treatment of *l*-deprenyl (0.1~100  $\mu$ M) did not produce any changes in 6-OHDA-induced cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase in SH-SY5Y cells. Our results suggest that the neuroprotective effect of *l*-deprenyl against 6-OHDA is due to its increased scavenger activity, but independent of inhibition of MAO-B or caspase-3 activation.

**Keywords** □ *l*-deprenyl, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), reactive oxygen species (ROS), caspase-3

미국 및 유럽 등지에서 파킨슨씨병 치료제로 사용되고 있는 *l*-deprenyl(selegiline)은 monoamine oxidase(MAO)-B 저해제로서 최근 우리나라에서도 사용이 허가된 약물이다. *l*-Deprenyl의 주된 작용은 도파민 대사 저해에 의한 뇌 내 도파민 함량 증가 작용과 도파민 전구물질인 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa)와 병용 투여시 L-dopa 작용의 증강·지속효과 작용이 있어 초기 파킨슨씨병 치료에 *l*-deprenyl을 단독 투여하거나 또는 L-dopa 치료보조제로 사용되고 있다. *l*-Deprenyl은 선택성 MAO-B 저해작용 이외에도 도파민 흡수(uptake) 억제,<sup>1)</sup> 1-methyl-4-

phenylpyridinium ion(MPP<sup>+</sup>) 병변 쥐와 노화 쥐 뇌에서의 산화적 손상(oxidative damage)에 대한 보호 작용,<sup>2)</sup> MPP<sup>+</sup>와 6-hydroxydopamine(6-OHDA) 등의 신경독성물질들로 유발된 세포사멸 감소작용,<sup>3)</sup> N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 조절을 통한 항산화 작용<sup>4)</sup> 등 여러 신경보호 효과가 보고되어 있다.

도파민은 MAO에 의한 산화적 탈아민반응에 의해 대사되는데 MAO는 기질특이성 및 저해제의 감수성에 따라 norepinephrine 및 5-hydroxytryptamine(세로토닌; 5-HT)에 선택적으로 작용하고 clorgyline에 의해 활성이 저해되는 MAO-A와, benzylamine을 선택적으로 분해하며 clorgyline에는 비교적 감수성이 적은 MAO-B의 두가지 종류로 분류된다. 도파민은 두 종류의 MAO에 의해 모두 분해되나 사람의 뇌에서는 주로 MAO-B에 의하여 대사된다고 알려져 있다.<sup>1)</sup> MAO에 의한 도파민의 대사과정에서

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 02-3277-3021 (팩스) 02-3277-3051

(E-mail) hjkim@ewha.ac.kr

hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )가 생성되며, 정상상태에서  $H_2O_2$ 는 활성이 강한 hydroxyl radical( $\cdot OH$ )으로 되는 반응(Haber-Weiss reaction)이 천천히 일어나지만,  $Fe^{2+}$ 와 같은 금속 이온이 있을 때 이 반응은 매우 빠르게 일어나게 된다(Fenton reaction).

외상 등에 의한 신경손상으로 인하여 도파민 신경이 퇴화하게 되면, 남아있는 신경들은 보상적으로 도파민 생성을 증가시키고 MAO에 의한 도파민 대사가 증가하게 되므로 그에 따른  $H_2O_2$ 의 생성이 증가하게 된다.<sup>5)</sup> 뇌 선조체 부위는 다른 조직에 비하여 도파민이 고농도로 존재하기 때문에 도파민 대사에 따른 ROS의 생성도 증가하게 되므로 산화적 스트레스를 받기 쉬운 것으로 보고되어 있고,<sup>6)</sup> 이외에도 노화에 의한 MAO의 활성 증가에 따른 ROS 생성 역시 도파민 신경에 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 6-OHDA는 실험동물에 정맥내 또는 복강내 투여 시 말초 교감신경계의 신경을 파괴시키며, 뇌에 직접 투여 시 중추 카테콜아민 신경을 파괴시키기 때문에 파킨슨씨병 연구에 널리 사용되고 있다. 6-OHDA는 카테콜아민성 신경전달물질과 구조적으로 유사하기 때문에 ATP 의존성 약물 수송기전에 의하여 선택적으로 카테콜아민 신경에 축적되어 독성을 나타내게 된다. 효소작용에 의하여 독성을 발현하는 MPTP와는 달리 6-OHDA에 의한 독성 발현 기전은 자발적 산화에 의한 것으로 추정되며 반응결과  $H_2O_2$ 와 quinone이 생성된다고 알려져 있다. 이러한 6-OHDA의 자동산화과정에서 생성되는  $H_2O_2$ 는 *in vitro* 실험에서 생체 아민의 흡수를 억제하고, 6-OHDA quinone은 SH,  $NH_2$  및 페놀성 OH와 같은 친핵성 거대분자(nucleophilic macromolecule)와 공유결합을 형성하여 신경 생존에 중요한 역할을 하는 세포분자들의 변성을 일으켜 세포의 퇴행을 일으키는 것으로 보고된 바 있다.<sup>8)</sup>

최근 신경독성물질로 유도된 세포사멸이 파킨슨씨병의 신경세포의 퇴화에 중요한 역할을 할 것이라는 보고들이 있다.<sup>9)</sup> 6-OHDA에 의해 파킨슨씨병을 일으킨 동물 실험에서 6-OHDA는 흑질(substantia nigra)의 도파민 신경에서 세포사멸(apoptosis)을 유발하였다고 보고하였으며,<sup>10)</sup> PC12 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 6-OHDA에 의하여 세포사멸이 유발되었고,<sup>11)</sup> 최근에 역시 PC12 세포를 이용한 실험에서 6-OHDA에 의한 세포사멸은 caspase를 경유하여 나타난다는 연구 결과가 보고되었다.<sup>12)</sup>

*l*-Deprenyl의 신경보호효과는 이 약물에 의한 항산화 작용에 의한 것이라는 많은 보고들이 있다.<sup>13)</sup> 항산화 작용에 대한 *l*-deprenyl의 작용은 크게 직접적인 MAO 저해에 의한 항산화 작용과 간접적 항산화 작용으로 분류될 수 있다. *l*-Deprenyl의 MAO 저해작용에 의한 도파민 대사의 억제로 도파민 turnover가 감소되고 이에 따른  $H_2O_2$ 의 생성이 감소하게 된다. 또한 *l*-deprenyl은 MAO-B를 억제하여 신경독성물질인 MPTP의 독성을 억제하며, MPP<sup>+</sup>에 의한 유리기 생성을 억제하여 이 신경독성물질에 대해 신경보호효과를 나타낸다는 것이 보고되었다.<sup>14)</sup> 간접 작용

으로서는 생체 내 ROS 생성 방어효소 활성에 대한 *l*-deprenyl의 작용으로서, Carrillo 등<sup>2)</sup>은 생후 3주의 어린 흰쥐 수컷에 *l*-deprenyl을 3주간 투여 시 선조체 부위에서 superoxide dismutase(SOD)의 활성이 대조군보다 유의성 있게 증가하였음을 보고하였으며, Knoll<sup>15)</sup>과 Clow<sup>16)</sup>도 각각 이와 유사하게 SOD의 활성이 유의적으로 증가하였음을 보고한 바 있다. 또한 *l*-deprenyl은 선조체내에서 haloperidol로 유도된 도파민의 turnover 증가에 따른 oxidized glutathione(GSSG)의 축적을 저해하고,<sup>16,17)</sup> NMDA 수용체를 저해하여 흥분성 아미노산에 의한 산화적 스트레스를 억제한다고<sup>1)</sup> 보고된 바 있다. 최근 PC12 세포를 이용한 실험에서 *l*-deprenyl(1  $\mu M$ )은 SOD mRNA의 유도 효과를 나타내어 대조군에 비하여 SOD1 유전자의 발현을 증가시키고, 신경성장인자에 의한 SOD 유전자 발현효과를 강화시켰다는 실험 결과도 보고되어<sup>18)</sup> 신경성장인자로서의 *l*-deprenyl의 효과도 검토되고 있다. 또한 *l*-deprenyl의 신경보호 효과로서 세포사멸과 관련하여 Maruyama 등<sup>19)</sup>은 SH-SY5Y 세포를 이용한 실험에서 *l*-deprenyl(20  $\mu M$ )이 신경독성물질인 N-methyl-(R)-salsolinol로 유도된 DNA 손상을 억제하여 세포사멸을 감소시키고  $H_2O_2$ 의 생성을 억제하였다고 보고하였으며, 이외에도 *l*-deprenyl은 MPP<sup>+</sup>와 nitric oxide로 유도된 세포사멸을 억제하였다는 보고<sup>3,19)</sup>들이 있다. 또한 세포사멸과 관련된 Bcl-2 등의 단백질과 tyrosine hydroxylase의 활성 등이 *l*-deprenyl 투여로 증가되었다는 보고들<sup>20,21)</sup>과 최근 *l*-deprenyl의 MAO 저해 작용 및 신경보호 효과에 대한 여러 실험 결과를 고려할 때 *l*-deprenyl에 의한 신경보호 작용은 MAO-B 저해 작용 이외에도 아직 자세히 밝혀지지 않은 작용 기전을 보유할 것으로 추정할 수 있다.

본 연구에서는 6-OHDA를 사용하여 선조체내 도파민 고갈을 일으킨 파킨슨씨병 동물 모델을 형성시켜 *l*-deprenyl을 농도별로 전처치하였을 때 뇌 선조체에서의 도파민과 대사체들의 함량 변화를 조사하였다. 또한 6-OHDA로 산화적 세포손상을 일으킨 SH-SY5Y 세포주에 *l*-deprenyl을 전처치하였을 때 나타나는 세포생존율의 변화와 세포내 발생하는 ROS 및 caspase 활성변화를 조사하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 약물

*l*-Deprenyl · HCl은 초당약품(서울)에서 제공받았으며, 검량선 작성을 위하여 표준품으로 사용한 dopamine · HCl, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanilic acid(HVA), 3-methoxytyramine · HCl(3-MT) 및 내부표준물질 3,4-dihydroxybenzylamine · HCl, 선조체내 도파민 고갈을 일으키기 위하여 사용한 6-OHDA · HCl 및 desipramine · HCl은 Sigma사(St. Louis,

Mo, U.S.A.)의 제품을 사용하였고, 마취제 pentobarbital sodium (엔토발 주사)은 한림제약(서울)에서 구입하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

N-Acetylcysteine, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), Triton X-100, Hank's balanced salts(modified)(HBSS) 및 fluorescence-용 색소인 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate(DCFH-DA)은 Sigma사 제품을 사용하였다. 배지제조에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM)와 fetal bovine serum(BSA, heat inactivated)은 Gibco-Bethesda Research Lab사(Gaithersburg, MD, U.S.A.)의 제품을 구입하였고, 단백질 전기영동과 blot에 사용한 Trizma base, sodium dodesyl sulfate(SDS), glycine 등은 Bio-Rad Lab.사(Richmond, CA, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 기타 시약들은 각각 Sigma 제품의 molecular biology grade 혹은 tissue culture grade 시약을 사용하였다.

### 실험동물

생후 5주령(체중 150~180 g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 식품의약품안전청 국립독성연구소로부터 분양 받아 일주일 이상 실험실에서 적응시킨 후 사용하였다.

### 6-OHDA에 의한 도파민 고갈

체중 250~300 g의 웅성 흰쥐를 pentobarbital sodium(50 mg/kg, i.p.)으로 마취시켜 stereotaxic 기구에 고정한 후, 두피를 제거하고 두개골 접합부중 bregma점을 기준으로 posterior 0.6 mm, lateral  $\pm$ 1.2 mm, ventral -3.5 mm 위치에 Hamilton syringe를 고정하고 6-OHDA(100  $\mu$ g/10  $\mu$ l/hemisphere) 또는 정상 대조군은 vehicle(0.1% ascorbic acid in saline)을 1.5  $\mu$ l/min의 속도로 양측 뇌실(ventricle) 부위에 주입하였다. 모든 동물은 수술 30분 전에 6-OHDA이 아드레날린성 신경말단으로 흡수되는 것을 막기 위하여 desipramine(25 mg/kg)을 복강 주사하였다.<sup>22)</sup>

### 약물투여 및 조직 내 아민류의 추출

*l*-Deprenyl 투여에 의한 효과를 조사하기 위하여 약물을 생리 식염수에 용해하여 흰쥐 체중 kg당 0.25, 1 또는 10 mg을 1회 복강 주사하고 30분 후에 단두하여 뇌를 적출하였다. 대조군은 *l*-deprenyl 대신 생리식염수를 투여한 군으로 하였다. 적출한 뇌 조직은 얼음 상에서 선조체, 해마 및 뇌간을 신속하게 분리한 후 내부표준물질인 3,4-dihydroxybenzylamine(71.4 ng/ml in 0.4 M HClO<sub>4</sub>)을 선조체에는 600  $\mu$ l, 기타 뇌 조직에는 300  $\mu$ l씩을 가하여 균질화 시켰다. 균질화된 조직은 4°C, 15,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 도파민, 세로토닌 및 대사체 들의 분석 시료로 하고, 침전물에는 1 N NaOH 1 ml를 가한 후 단백질 정량을 위한 시료로 하였다.

### HPLC에 의한 조직내 도파민, 세로토닌 및 대사체 들의 정량

표준품의 도파민, DOPAC, HVA와 3-MT는 각각 500 ng/ml가 되도록 0.4 M HClO<sub>4</sub>에 용해시켜 표준원액으로 하였다. 여기에 3,4-dihydroxybenzylamine(71.4 ng/ml in 0.4 M HClO<sub>4</sub>)을 함유하도록 한 후 0.4 M HClO<sub>4</sub>로 희석하여 1.8 ng/ml-214 ng/ml의 표준용액을 만들고, 이를 HPLC에 20  $\mu$ l씩 주입하였을 때 검출되는 표준물질의 피크를 내부표준물질에 대한 면적비로서 검량선을 작성하였다. 이동상은 1.2 ml/min의 속도로 89% 0.17 M monochloroacetic acid buffer를 사용하여 850 mV vs. Ag/AgCl에서 측정하였고, controlled sensitivity는 1 또는 2 nA/V으로 조절하였다. 시료는 분석 직전 해동시켜 여과(0.45  $\mu$ m)하여 주입하였다. 시료 내에 함유되어 있는 아민류의 함량은 검량선으로부터 계산한 후 pmol로 환산하였다. 뇌 조직 내 아민류의 함량은 각각 시료중의 단백질 함량을 측정하여 그 값을 pmol/mg protein으로서 나타내었다. 단백질 함량은 표준물질로서 BSA를 사용한 Lowry 등<sup>23)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다.

### MTT 분석을 이용한 세포생존율 측정

MTT 분석은 MTT tetrazolium salt가 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT formazan으로 변하는 원리를 이용한 실험법으로 세포생존율 측정에 많이 사용된다.<sup>24)</sup> 우선 Hemacytometer로 SH-SY5Y 세포(Pass No. 8~16) 수를 세어서 배지 50  $\mu$ l 안에 4~6×10<sup>4</sup> 세포를 함유하도록 DMEM 배지로 적절히 희석하여 96 well plate에 seeding 하고 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다.

6-OHDA처치에 따른 독성을 측정하기 위하여 배지로 제조한 6-OHDA stock 용액(8 mM)을 배지로 희석시켜 최종 농도가 10~200  $\mu$ M이 되도록 세포가 분주되어있는 용기에 첨가하고 24시간 배양하였다. 배지를 well에서 제거한 후 MTT 시액 50  $\mu$ l를 가하여 2시간 이상 배양시켰다. 현미경하에서 자주색의 결정(MTT formazan)들이 생성된 것을 확인하고 여기에 MTT 용해액을 50  $\mu$ l씩을 가하고 60초간 자동 혼화 시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 없이 MTT 시액과 MTT 용해액만을 넣은 것을 blank로 하였다. MTT 분석용 MTT 시액은 MTT stock soln.(5 mg/ml in HBSS) 1 volume과 DMEM 배지 9 volume을 혼합하여 만들었다. 6-OHDA로 유도된 세포 사멸에 대한 *l*-deprenyl의 효과를 조사하기 위하여 *l*-deprenyl을 DMEM 배지로 용해시켜 최종 농도가 0.01 nM~1 mM이 되도록 세포가 분주되어 있는 용기에 첨가하고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 배양시킨 후 6-OHDA 용액을 50  $\mu$ M 또는 100  $\mu$ M이 되도록 첨가하여 24시간 더 배양하였다.

### Flow cytometry를 이용한 세포내 ROS 측정

세포내 ROS의 발생은 DCFH-DA가 세포내로 들어간 후 deacetylation에 의하여 non-fluorescent DCFH으로 되며, 다시

DCFH는 ROS에 의하여 fluorescent DCF으로 변화하는데 이때의 형광 강도를 측정하는 원리에 의하여 세포내 ROS를 측정하였다.

SH-SY5Y 세포(Pass No. 5~12)를  $1\sim 2 \times 10^6$  cell을 함유하도록 6 well plate에 분주하고 48시간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 6-OHDA에 의한 ROS 생성을 측정하기 위하여 위의 DMEM 배지를 제거한 후 DCFH-DA 용액(10 μM)을 세포가 분주되어있는 용기에 1 ml씩을 넣고 37°C에서 15분간 배양시켰다. 배지 제거 후 HBSS 배지로 희석한 6-OHDA(50 또는 100 μM)을 1 ml씩 가하고 다시 37°C에서 15분간 배양시켰다. 배양 후 얻어진 세포 pellet에 FACS용 PBS 용액 1 ml를 가하여 재현탁시킨 후 FACScan을 시행하였다. FACScan에 의한 형광 강도는 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 측정하였고, 세포는 초당 200~300개 정도를 세도록 PBS 용액으로 다시 적절히 희석하여, 1회 측정 시 10,000개의 세포를 세어서 그 결과를 실험데이터로 하였다.

#### Western blot analysis를 이용한 caspase 활성 측정

SH-SY5Y 세포(Pass No. 8~12)를 1 ml 안에  $2 \times 10^5$  세포가 함유되도록 DMEM 배지로 적절히 희석하여 12 well plate에 분주하고 24~48시간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 약물처리를 위

해 6-OHDA 25 및 50 μM이 포함된 배지 1 ml씩을 각 well에 가하고 37°C에서 12시간 배양시켰으며, PARP 분해에 미치는 *l*-deprenyl의 효과를 조사하기 위한 실험에서는 6-OHDA과 0.1 μM~1 mM의 *l*-deprenyl을 세포에 동시에 처리하여 37°C에서 12시간 배양시켰다. 대조군으로는 항산화제로 알려진 acetylcysteine(500 μM 또는 1 mM)을 6-OHDA과 함께 처리하였으며, 모든 시험군의 세포 추출액으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 시행하였다. SDS-PAGE로 분리한 시료는 anti-PARP 마우스 단일클론 항체와 상온에서 하룻밤 반응시킨 후, LAS 1000을 이용하여 검출하였다.

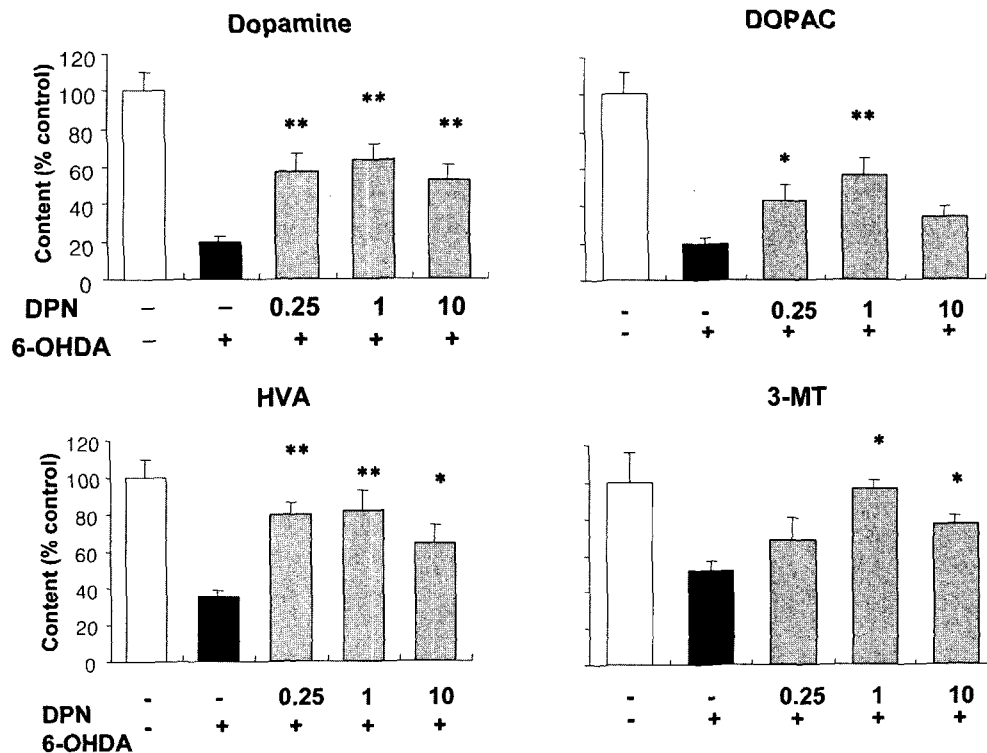
#### 통계 처리

실험결과는 mean±S.D. 또는 S.E.M.으로 표시되었으며 유의성 검정은 ANOVA 및 one-tailed Student t-test를 시행하여 p<0.05 또는 <0.01일 때 유의성이 있는 결과로 판정하였다.

#### 결과 및 고찰

#### 6-OHDA에 의한 도파민 고갈에 대한 *l*-deprenyl 전처치의 영향

*l*-Deprenyl(0.25, 1 및 10 mg/kg)을 6-OHDA 주입 30분전에



**Fig. 1** – Prevention of 6-OHDA-induced dopamine deletion by *l*-deprenyl in rat striatum. Rats were administered (i.p.) with saline or three dosages (0.25, 1 and 10 mg/kg) of *l*-deprenyl (DPN) 30 min before the bilateral incerebrotraventricular injection of vehicle or 6-OHDA (100 μg/10 μl/hemisphere). Rats were sacrificed five days after the surgery and tissue contents of dopamine and its metabolites (DOPAC, HVA and 3-MT) were measured. Data represent mean±S.E.M. from 5~7 rats per group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. 6-OHDA-treated group.

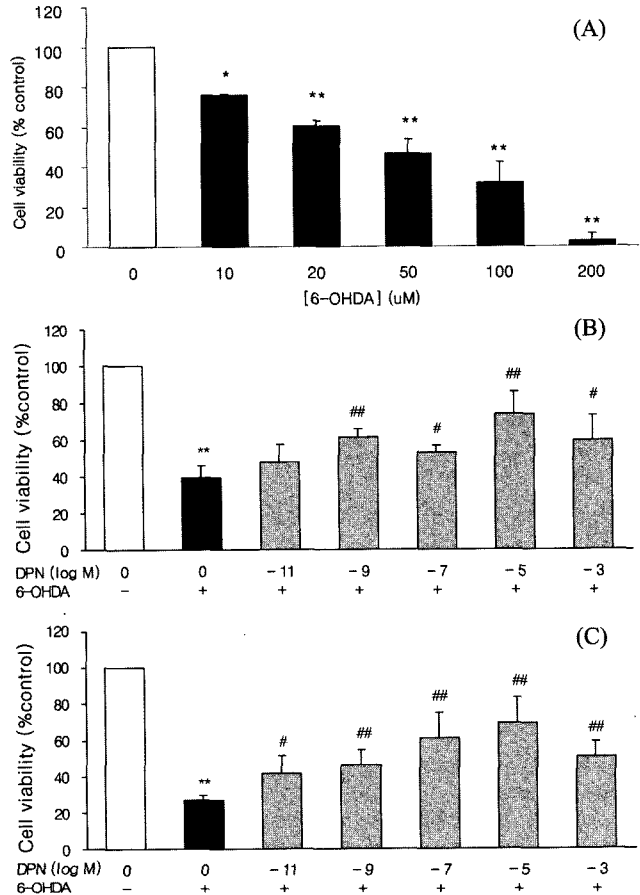
전처치하였을 때 용량 의존적이지 않았으나 세 농도에서 모두 L-deprenyl을 처치하지 않은 6-OHDA 병변 쥐에 비해 선조체내의 도파민 함량이 유의적으로 증가되었으며, DOPAC, HVA 및 3-MT 등의 대사체 들의 함량도 각각 33~56%, 77~97% 및 64~82% 증가되었다(Fig. 1).

Scarr 등<sup>25)</sup>은 여러 농도의 6-OHDA로 선조체 내 도파민 고갈(25~97%)을 일으킨 후 L-deprenyl(2 mg/kg, i.p.)을 투여하였을 때 도파민과 대사체 들의 함량이 변화하지 않았으므로 L-deprenyl이 도파민의 대사에 아무 영향을 미치지 않았다고 보고하였고, Finberg 등<sup>26)</sup>도 6-OHDA로 95% 이상 도파민 고갈을 일으킨 쥐의 미세투석법을 이용한 실험에서 L-deprenyl(1 mg/kg, s.c.) 후처치에 의한 도파민 함량의 변화를 볼 수 없었으며 L-dopa 투여에 따른 선조체의 세포 외액 중의 도파민 함량 변화에도 영향을 주지 못하였다고 보고한 바 있어 병변 쥐의 선조체내 도파민 대사에 MAO-B가 크게 관여하지 않을 것이라고 추론하였다. 이들 연구들이 모두 6-OHDA 주입 후에 L-deprenyl을 투여한 반면, 본 연구에서는 6-OHDA 주입 30분 전에 L-deprenyl을 투여하여 전처치에 따른 병변 쥐에서의 도파민 함량증가 효과를 관찰하였다. 전술한 Scarr 등<sup>25)</sup>과 Finberg 등<sup>26)</sup>의 실험 결과를 고려할 때 6-OHDA에 의해 신경퇴행이 일어난 후에는 L-deprenyl에 의한 도파민 함량 증가 효과를 크게 기대하기 어려우나 L-deprenyl을 전처치할 경우 6-OHDA에 의한 도파민 신경 독성에 대해 보호 효과를 나타낸다고 추측할 수 있다. 그 이외에 6-OHDA에 의한 선조체내 도파민의 고갈 정도의 차이와 L-dopa와 같은 도파민 전구물질의 병용투여에 따라 도파민의 함량도 달라질 것 이므로 이들 약물의 투여여부 등도 L-deprenyl의 6-OHDA에 대한 보호 효과에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

#### SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA에 의한 세포손상에 대한 L-deprenyl의 효과

여러 농도의 6-OHDA 용액(10~200  $\mu$ M) 세포에 첨가하고 24시간 배양한 후 세포생존율을 측정하였을 때 대조군에 비하여 10  $\mu$ M에서 75.8%, 20  $\mu$ M에서 60.1%, 50  $\mu$ M에서 46.3%, 100  $\mu$ M에서 31.5% 및 200  $\mu$ M에서 2.6%로 감소하였으며, 이러한 감소는 농도 의존적인 경향을 보였다(Fig. 2A).

6-OHDA 50  $\mu$ M에서 L-deprenyl을 (0.01 nM~1 mM) 37°C에서 30분간 전처치하였을 때 세포생존율에 미치는 영향을 살펴 보았다. 6-OHDA 50  $\mu$ M에서 세포생존율은 대조군의 39.5%였으나, L-deprenyl 1 nM~1 mM 전처리군에서 세포생존율은 유의적으로 증가하여 대조군의 53.0~73.6%로 회복하였다. 특히 L-deprenyl 10  $\mu$ M 전처리군에서 세포생존율은 대조군의 73.6%로서 6-OHDA 단독 처리군에 비하여 1.86배 증가되었다(Fig. 2B). 6-OHDA 100  $\mu$ M 처리시 세포생존율은 대조군의 27.0%였으나, L-deprenyl 0.01 nM~1 mM 전처리군에서 세포생존율은 유의적으로 증가하



**Fig. 2** - Protective effect of L-deprenyl against 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. (A) Cells were treated with indicated concentrations of 6-OHDA and incubated at 37°C for 24 hrs. Neuronal toxicity was evaluated by assessment of cell viability using the MTT assay. Data are the means  $\pm$  S.D. (n=6). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control group. (B & C) Cells were pretreated with indicated concentrations (10 nM~1 mM) of L-deprenyl (DPN) at 30 min before 50  $\mu$ M (B) or 100  $\mu$ M (C) 6-OHDA treatment, and incubated at 37°C for 24 hrs. Data are the means  $\pm$  S.D. (n=9). \*\*p<0.01 vs. control group. #p<0.05, ##p<0.01 vs. 6-OHDA (50 or 100  $\mu$ M)-treated group.

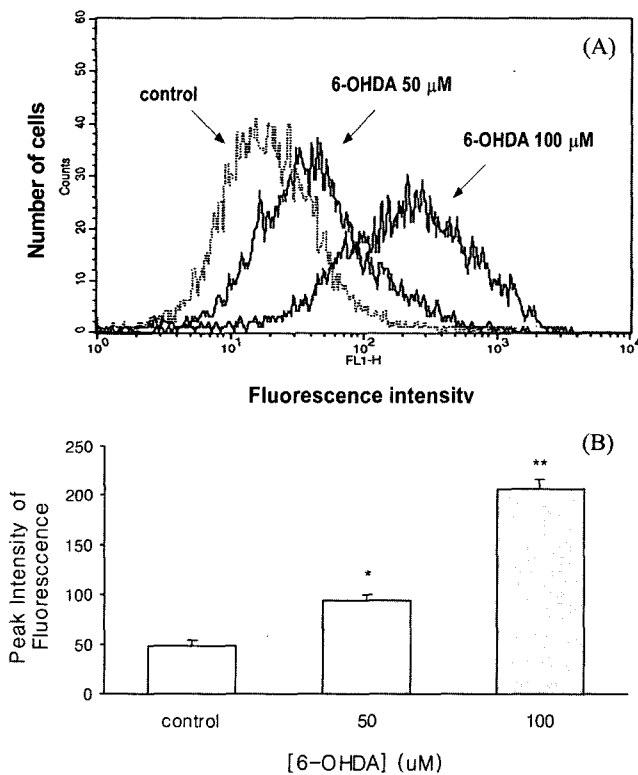
여 대조군의 41.9~69.0%로 회복하였다. 6-OHDA 50  $\mu$ M 처리군에서와 같이 L-deprenyl 10  $\mu$ M 전처리군에서 세포생존율은 가장 크게 증가하여 대조군의 69.0%로서 6-OHDA 단독 처리군에 비하여 2.56배 증가되었다(Fig. 2C).

SH-SY5Y 세포는 6-OHDA의 세포독성에 매우 민감한 것으로 알려져 있는데,<sup>27)</sup> PC12 세포를 사용하여 6-OHDA에 의한 세포 생존율을 측정한 Blum 등<sup>28)</sup>의 실험에서 100  $\mu$ M의 6-OHDA를 24시간 처리하였을 때 세포생존율은 대조군의 약 80% 인 반면, SH-SY5Y 세포를 사용한 Zuo와 Yu<sup>29)</sup>의 실험에서 100  $\mu$ M의 6-OHDA를 24시간 처리하였을 때 대조군의 약 15%였다고 보고하였다. 본 실험 결과 100  $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하였을 때 세포

생존율은 대조군의 30% 정도로서 Zuo와 Yu<sup>29)</sup>의 실험결과보다는 조금 높았으나, 6-OHDA에 의한 세포생존율 감소는 농도의존적으로 나타났음을 관찰하였다. 한편 6-OHDA에 의한 세포손상은 *l*-deprenyl에 의하여 저해되었는데, 50 및 100  $\mu$ M의 6-OHDA에서 0.01 nM~1 mM의 *l*-디프레닐을 전처리(37°C, 30 min)하였을 때 세포생존율이 유의적으로 증가되었고, 증가효과는 10  $\mu$ M의 *l*-deprenyl 전처리군에서 가장 크게 나타났다.

#### 6-OHDA에 의한 ROS 생성에 대한 *l*-deprenyl의 영향

6-OHDA 50  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M을 37°C에서 15분간 배양한 후 세포내에서 발생하는 ROS를 FACS를 이용하여 측정하여 그 결과를 Fig. 3A에 나타내었다. 대조군에 비하여 6-OHDA 처리한 군



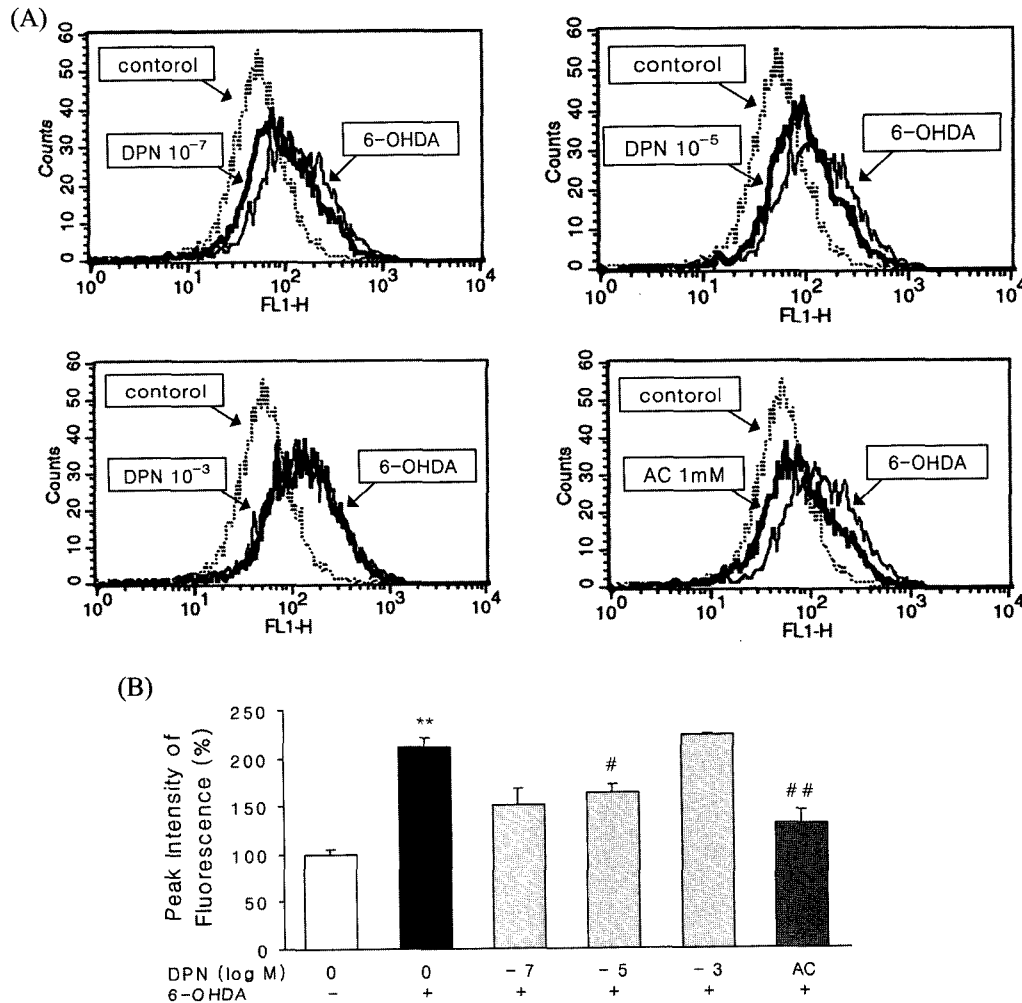
**Fig. 3** - Effect of 6-OHDA on the generation of ROS. Oxidative stress was assessed by examination of changes in generation of ROS by the DCFH-DA dye method using a flow cytometry (FACSscan). (A) DCF fluorescence distribution in SH-SY5Y cells. Cells were incubated with 10  $\mu$ M DCFH-DA for 15 min at 37°C, and then treated with vehicle (control), 50 or 100  $\mu$ M 6-OHDA for 15 min. After treatment of cells with 6-OHDA, the DCF fluorescence of cells were monitored on FACSscan with excitation wave length at 488 nm and emission wavelength at 530 nm. The number of cells used for the construction of the DCF fluorescence histogram was 20,000. (B) Data for peak intensity of fluorescence from DCF fluorescence histograms were obtained from 3 independent experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. the control group.

의 histogram이 우측으로 이동되어 ROS 발생이 6-OHDA의 농도에 따라 증가되었음을 알 수 있었다. 이들의 증가는 대조군에 대한 상대적 비율로 환산하였을 때 6-OHDA 50  $\mu$ M에서 평균 1.98배, 100  $\mu$ M에서 평균 3.84배 증가되었다(Fig. 3B).

*l*-Deprenyl(0.1  $\mu$ M~1 mM)을 37°C에서 30분간 전처리하였을 때 6-OHDA로 유도된 ROS 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 4A는 대조군, 6-OHDA 50  $\mu$ M 단독처리군, 세 농도(0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 및 1 mM)의 *l*-deprenyl 전처리군 및 1 mM의 acetylcysteine 전처리군의 histogram을 나타낸 것이다. 50  $\mu$ M의 6-OHDA에 의하여 histogram은 대조군의 오른쪽으로 이동되었으나, 0.1  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M의 *l*-deprenyl을 전처리하였을 때 histogram의 이동이 억제되었으며, 1 mM의 *l*-deprenyl은 이러한 효과를 나타내지 못하였다. 한편 산소 유리기 제거제로 알려진 acetylcysteine의 전처리에 의하여 역시 억제되었다.

세포내 ROS 발생을 대조군에 대한 상대적 비율로 환산하였을 때 6-OHDA 50  $\mu$ M에서 평균 2.11배 증가하였으나, *l*-deprenyl 10  $\mu$ M 전처리군에서 세포내 ROS 발생은 평균 1.63배로서 6-OHDA에 의한 ROS 발생을 48% 억제하였다. Acetylcysteine 1 mM을 전처리하였을 때 세포내 ROS는 대조군에 비하여 평균 1.31배로서 6-OHDA에 의한 ROS 발생을 80% 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 4B).

6-OHDA(50 및 100  $\mu$ M)에 의한 세포내 ROS의 발생이 농도의존적으로 증가되었으므로(Fig. 3), 6-OHDA에 의하여 산화적 세포손상이 유도되었음을 알 수 있었다. 이러한 6-OHDA에 의한 세포내 ROS 발생은 10  $\mu$ M의 *l*-deprenyl 전처리(37°C, 30 min)에 의하여 유의적으로 감소되었다(Fig. 4). *l*-Deprenyl의 산소유리기 제거제(free radical scavenger)로서의 증가효과는 간접 작용으로서 SOD와 같은 항산화 효소의 활성 증가와 직접적인 ROS 생성 억제 작용으로 나누어 생각할 수 있다. *l*-Deprenyl에 의한 SOD 활성 증가 작용은 수컷과 암컷 흰쥐에 3주간 반복 투여하였을 때 선조체내에서 SOD 활성이 증가하였다는 Knoll의 보고<sup>15)</sup>와 흰쥐와 마우스에서 반복 투여 하였을 때 SOD 및 catalase 활성 증가 작용이 관찰되었다는 Carrillo 등<sup>2)</sup>의 보고에 의하여 증명되었다. 최근 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 PC12 세포에 *l*-deprenyl 1  $\mu$ M을 24시간 배양시켰을 때 SOD 유전자 발현이 증가되었다는 보고<sup>18)</sup> 등이 있다. 직접적인 산소유리기 제거제로서의 *l*-deprenyl의 작용과 관련하여 *l*-deprenyl은 haloperidol에 의한 마우스 선조체내 GSSG 함량 증가를 유의적으로 억제시켰고,<sup>16)</sup> 흰쥐의 선조체에서 MPP<sup>+</sup>로 유도된  $\cdot$ OH의 생성이 *l*-deprenyl의 전처리에 의하여 유의적으로 감소되었으며,<sup>30)</sup> SH-SY5Y 세포를 이용한 실험에서 내인성 신경독성물질인 N-methyl-(R)-salsolinol에 의한  $\cdot$ OH의 생성이 *l*-deprenyl (10  $\mu$ M) 전처리(10분간)에 의하여 유의적으로 감소되었다는 보고<sup>31)</sup>도 있다. 이들 대부분의 실험은 조직 중 또는 세포외액 중



**Fig. 4** – Effect of *l*-deprenyl on the ROS generation induced by 6-OHDA. (A) DCF fluorescence distribution in SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 1 mM of *l*-deprenyl (DPN) or 1 mM of acetylcysteine (AC) for 30 min. Cells were incubated with 10  $\mu$ M DCFH-DA for 15 min at 37°C, and then treated with vehicle (control) or 50  $\mu$ M of 6-OHDA for 15 min. After treatment of cells with 6-OHDA, the DCF fluorescence of cells were monitored on FACScan with excitation wave length at 488 nm and emission wavelength at 530 nm. The number of cells used for the construction of the DCF fluorescence histogram was 40,000. (B) Data for peak intensity of fluorescence from DCF fluorescence histograms were obtained from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  vs. the vehicle (control). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. the 6-OHDA alone.

의  $\cdot$ OH의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였는데 본 실험에서는 세포내 산소유리기의 발생을 flow cytometry에 의하여 직접 측정하였을 때 *l*-deprenyl에 의하여 감소되었음을 확인할 수 있었으므로 산소유리기 제거제로서의 *l*-deprenyl의 직접적인 효과를 증명할 수 있었다. Tatton 등<sup>21)</sup>은 *l*-deprenyl의 항산화 작용은 MAO-B 저해에 따른 도파민 대사 억제로 도파민 대사과정에서 발생하는 산소유리기 생성 감소 작용과 유리기 제거제로서의 증가 효과 때문이라고 추정하였는데, SH-SY5Y 세포에는 MAO-A 활성만 있고 MAO-B는 함유하고 있지 않다는 점<sup>31)</sup>을 고려할 때 본 실험에서 나타난 *l*-deprenyl의 항산화 작용은 적어도 MAO-B 저해효과와는 무관한 다른 기전에 의한 것으로 추정된다. 한편 최근 Grimsby 등<sup>32)</sup>은 MAO-B knockout 마우스를

개발하였는데, 이를 이용하여 *l*-deprenyl의 신경보호 효과를 직접 조사한 연구 결과는 아직 보고된 바 없지만 앞으로 MAO-B knockout 마우스는 *l*-deprenyl의 신경보호 효과와 MAO-B 저해와의 관련성을 밝히는데 매우 유용할 것으로 사료된다.

#### 6-OHDA에 의한 caspase 활성 증가 및 이에 대한 *l*-deprenyl의 영향

Caspase는 세포사멸 과정에 관여하는 단백질 분해효소를 이르며, 이중 caspase-3가 포유류의 세포사멸에 관여할 것으로 추정되는데, PARP는 caspase에 의해 분해되는 기질단백질로서 특히 caspase-3 활성도를 나타내는 척도로서 사용된다.<sup>33)</sup> 6-OHDA에 의한 caspase 활성 증가는 세포사멸 과정 중 caspase에 의하여

PARP의 분해 생성물인 85 kD의 단백질 조각을 anti-PARP 항체를 이용하여 검출하여 확인하였으며, *l*-deprenyl이 6-OHDA에 의한 caspase 활성화에 영향을 미치는지를 조사하였다.

6-OHDA(25~100 µM)을 4시간 및 24시간 처리하였을 때 4시간 처리군에서는 PARP 분해가 관찰되지 않았으나 25 µM의 6-OHDA를 24시간 처리하였을 때 85 kD의 단백질 조각이 검출되었는데, 이것은 6-OHDA에 의하여 caspase 활성이 증가되었음을 의미한다. 또한 25 µM 및 50 µM의 6-OHDA를 12시간 처리하였을 때 PARP의 분해 생성물인 85 kD 단백질의 발현은 농도 의존적으로 나타났다. 그러나 10 µM의 *l*-deprenyl을 25 µM의 6-OHDA과 동시에 처리하여 24시간 배양하거나 0.1 µM~100 µM의 *l*-deprenyl을 6-OHDA과 동시에 처리하여 12시간 배양시켰을 때에도 PARP 분해에 아무런 변화가 관찰되지 않아 *l*-deprenyl은 caspase 활성화증가에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 한편 대조군으로서 1 mM의 acetylcysteine을 25 µM과 50 µM의 6-OHDA과 동시에 처리하여 12시간 배양하였을 때 85 kD이 관찰되지 않았으므로 acetylcysteine은 6-OHDA에 의한 caspase 활

성증가를 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 5).

최근 세포사멸과 관련하여 항세포사멸(antiapoptosis) 작용에 의한 *l*-deprenyl의 신경보호작용이 거론되고 있으며, 실제 보호 작용을 나타내는 *l*-deprenyl의 농도가 효과적으로 MAO-B를 저해하는데 필요한 농도인 0.1 µM 보다 훨씬 적은 농도에서 세포사멸 억제작용을 나타낸다고 하므로,<sup>3)</sup> MAO-B 저해 작용 이외의 다른 기전에 의한 보호효과를 생각해 볼 수 있다. Le 등<sup>3)</sup>은 도파민성 MES 23.5 세포를 사용한 실험에서 TUNEL 방법과 전기영동에 의하여 MPP<sup>+</sup>에 의한 DNA fragmentation이 *l*-deprenyl에 의하여 감소되었음을 보고하였다. 본 연구에서 *l*-deprenyl의 항세포사멸 작용과 관련하여 *l*-deprenyl의 보호효과가 caspase 활성화 억제를 경유하여 나타나는지를 살펴보고자 caspase-3 활성화에 미치는 *l*-deprenyl의 작용을 조사하였다. 실험 결과 10 µM의 *l*-deprenyl을 처리하였을 때 6-OHDA에 의한 PARP 분해에 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 관찰되었으므로(Fig. 5), 6-OHDA에 의한 산화적 세포손상에 대한 *l*-deprenyl의 보호효과가 caspase-3의 활성화 억제와는 직접적인 관련이 없을 것으로 추정되었다. 따라서 본 연구에서는 최근 보고된 *l*-deprenyl의 세포사멸 억제작용과는 일치하지 않는 실험결과를 얻었다. 세포 죽음(cell death)의 한 형태인 세포사멸은 DNA fragmentation과 chromatin 축합 등의 형태학적 특징과 미토콘드리아내의 항 세포사멸 관련 단백질들(eg. Bcl-2, Bcl-xL)과 세포사멸 과정에 관여하는 단백질들(Bax 및 caspase들)의 변화 등으로 세포죽음의 또 다른 형태인 세포괴사(necrosis)와 구분되어 왔다. 그러나 세포사멸과 세포괴사가 세포죽음을 유도하는 기전이 다를 것이라는 믿음에도 불구하고 최근에 동일한 독성 자극에 의해 세포사멸과 세포괴사가 동시<sup>34)</sup> 또는 연속적으로<sup>35)</sup> 나타나고 많은 세포 내 기전들이 두 형태의 세포 죽음에 공통적으로 관여한다는 연구결과들이 보고되고 있다.<sup>36)</sup> 예를 들어 Ca<sup>2+</sup>이나 스트레스-의존성 신경성장 인자인 c-fos 등이 두 형태의 세포 죽음에 동시에 관여하고 미토콘드리아나 cytoskeleton 등의 형태학적 구조 차이의 경계도 뚜렷하지 않을 뿐 아니라 특히 세포사멸에 매우 특이적으로 관련된다고 믿어져 왔던 단백질들인 Bcl-2 및 caspase cascade의 초기에 관여하는 caspase 들(caspase 8/10)이 세포괴사에도 관여한다고 보고된 바 있다.<sup>34)</sup> 이러한 배경하에 caspase cascade의 후반에 관여한다고 알려진 caspase-3, 6 등은 세포괴사와 관련된다는 보고가 없으므로 세포사멸 기전에 특이적 단백질이라고 가정하고, 형태학적 변화, DNA fragmentation 및 Bcl-2 등의 변화를 측정함으로써 *l*-deprenyl의 항세포사멸 작용을 보고한 연구들<sup>20,21)</sup>의 결과와 *l*-deprenyl에 의해 caspase-3 활성이 억제되지 않은 본 연구 결과를 종합해 본다면, *l*-deprenyl의 신경보호효과가 실제로는 세포사멸 과정과 연관이 없다는 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 caspase cascade에 대하여 아직 완전히 밝혀져 있지 않으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 분화된 PC12

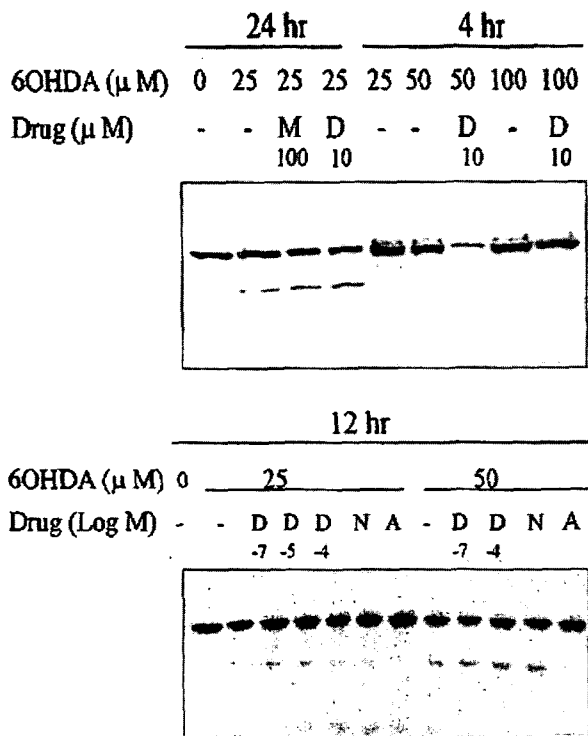


Fig. 5 - No effect of melatonin and *l*-deprenyl on 6-OHDA-induced caspase-3 activation in SH-5YSY cells. Cells were treated with 6-OHDA alone (25, 50 or 100 µM) or co-treated with 6-OHDA and melatonin (M; 100 µM), *l*-deprenyl (D; 0.1~100 µM), nicotineamide (N; 3 mM) or acetylcystein (A; 1 mM) for 4, 12 or 24 hrs. Caspase-3 activity was measured by evaluation of the cleavage of PARP by Western blotting. The sizes of the intact PARP (116 kD) and cleavage fragment of PARP (85 kD) are indicated.



세포에서 비교적 저농도(0.25 mM)에서는 세포사멸을, 고농도 1 mM에서는 세포괴사를 일으켰다는 Tatton 등<sup>21)</sup>의 보고에서처럼 실제 신경독성 물질에 의해 유도되는 세포사멸과 세포괴사의 경계도 확실하게 구분하기 어려우므로 본 실험에서 보인 6-OHDA에 대한 *l*-deprenyl의 보호효과와 항세포사멸 작용과의 관련성에 대하여는 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다. 또한 *l*-deprenyl의 대사체인 *l*-desmethyleselegiline 역시 MAO-B 억제효과가 있어 *l*-deprenyl의 신경보호작용과 관련이 있을 것이라는 보고들<sup>21,37)</sup>이 있으며, 매우 최근에 *l*-deprenyl의 항세포사멸 작용에 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase가 관련되어 있을 것이라는 보고<sup>37)</sup>를 고려할 때 *l*-deprenyl에 의한 신경보호효과에 대한 기전에 대해서 부가적인 연구가 필요할 것이다.

## 결 론

*l*-Deprenyl의 신경보호 작용을 조사하기 위하여 정상 흰쥐 및 6-OHDA로 뇌내 도파민 고갈을 유도한 병변쥐에서 *l*-deprenyl 전처리시 도파민 및 그 대사체의 함량을 측정하였고, 6-OHDA 처리한 사람 SH-SY5Y 신경세포주를 이용하여 *l*-deprenyl 전처리에 의한 세포생존율과 세포내 발생하는 ROS 및 caspase 활성을 측정한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 6-OHDA(200 µg)의 양측 뇌실 내 투여로 선조에서 각각 81%의 도파민 고갈이 유도되었다. *l*-Deprenyl을 전처리 하였을 때 선조체에서 *l*-deprenyl을 처리하지 않은 6-OHDA 병변쥐에서의 도파민 함량에 비해 3배 정도 증가하였고, 도파민 대사체들도 선조체에서 모두 함량이 증가되었다. 이러한 결과로부터 도파민 신경 파괴가 일어나기 전에 *l*-deprenyl을 전처리할 경우 6-OHDA에 의한 신경파괴에 대한 억제효과로 인해 뇌 조직내 도파민 및 대사체들의 고갈이 억제되어 특히 도파민 신경 말단이 존재하는 뇌 조직 내의 도파민 함량이 증가될 수 있다고 사료된다.

2. SH-SY5Y 세포에 10~200 µM의 6-OHDA를 처리(37°C, 24 hr)하였을 때 세포생존율은 유의적으로 감소하였으며, 50 및 100 µM의 6-OHDA 처리(37°C, 15 min)에 의한 세포내 ROS의 발생이 농도의존적으로 증가되어 6-OHDA에 의하여 산화적 세포손상이 유도되었다. 0.01 nM~1 mM의 *l*-디프레닐을 전처리(37°C, 30 min)하였을 때 6-OHDA에 의한 세포 사멸이 억제되었으며, 이러한 억제효과는 *l*-deprenyl 10 µM에서 가장 크게 나타나 세포생존율은 50 및 100 µM의 6-OHDA 단독처리군에 비하여 각각 1.86배 및 2.56배 증가되었다. 6-OHDA에 의한 세포내 ROS 발생 역시 10 µM의 *l*-deprenyl을 전처리(37°C, 30 min)하였을 때 유의적으로 감소되어 50 µM의 6-OHDA 처리군에 비하여 48% 감소되었다.

3. 25 및 50 µM의 6-OHDA 처리(37°C, 12 hr)에 의하여 caspase 활성 증가로 인한 PARP 분해 생성물이 관찰되었으며,

이러한 증가는 농도 의존적인 경향을 보였다. 그러나 10 µM의 *l*-deprenyl을 6-OHDA와 동시에 처리하였을 때 PARP 분해에 아무런 변화가 관찰되지 않아 6-OHDA에 의한 caspase 활성증가에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

이러한 결과로부터 6-OHDA에 의한 세포독성에 대한 *l*-deprenyl의 보호 작용은 MAO 저해효과 이외에도 ROS 생성 억제 작용 등 항산화 작용에 의한 것으로 사료되며, caspase 활성 억제에 의한 항세포사멸 작용은 관찰하지 못하였으나 이에 대하여는 더욱 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 이화여자대학교 약학연구소연구기금 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Gerlach, M., Riederer, P. and Youdim, M. B. H. : The molecular pharmacology of *l*-deprenyl. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* **226**, 97 (1992).
- 2) Carrillo, M. C., Kanai, S., Nokubo, M. and Kitani, K. : Deprenyl induced activities of both superoxide dismutase & catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rat. *Life Sci.* **48**, 517 (1991).
- 3) Le, W., Jankovic, J., Xie, W., Kong, R. and Appel, S. H. : (-)-Deprenyl protection of 1-methyl-4-phenylpyridium ion (MPP<sup>+</sup>)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition. *Neurosci. Lett.* **224**, 197 (1997).
- 4) Gerlach, M., Youdim, M. B. H. and Riederer, P. : Is selegiline neuroprotective in Parkinson's disease? *J. Neural Transm [suppl.]* **41**, 177 (1994).
- 5) Cohen, G. : *Oxidative Stress in Nervous System*, In Sies, H. (ed.) : Oxidative stress. Academic Press, London 383 (1985).
- 6) Olanow, C. and Arendash, G. : Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurol.* **7**, 548 (1994).
- 7) Orelund, L. : Monoamine oxidase, dopamine and Parkinson's disease. *Acta. Neurol. Scand.* **84**(Suppl 136), 60 (1991).
- 8) Heikkila, R. and Cohen, G. : Further studies on the generation of hydrogen peroxide by 6-hydroxydopamine : Potentiation by ascorbic acid. *Molecular Pharmacology* **8**, 241 (1972).
- 9) Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H. and Mizuno, Y. : Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **137**, 120 (1996).
- 10) Marti, M. J., James, C. J., Oo, T. F., Kelly, W. J. and Burke, R. E. : Early developmental destruction of terminals in the striatal target induce apoptosis in dopamine neurons of substantia nigra. *J. Neurosci.* **17**, 2030 (1997).
- 11) Walkinshaw, G. and Waters, C. M. : Neurotoxin induced cell

- death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* **63**, 975 (1994).
- 12) Ochu, E. E., Rothwell, N. J. and Waters, C. M. : Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* **70**, 2637 (1998).
  - 13) Simonian, N. A. and Coyle, J. T. : Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 83 (1996).
  - 14) Wu, R. M., Mohanakumar, K. P., Murphy, D. L. and Chiueh, C. C. : Antioxidant mechanism and protection of nigral neurons against MPP<sup>+</sup> toxicity by deprenyl (Selegiline). *Annals New York Academy of Science.* **738**, 214 (1994).
  - 15) Knoll, J. : The striatal dopamine dependency of life span in male rats, longevity study with (-) deprenyl. *Mech. Aging Dev.* **46**, 237 (1988).
  - 16) Clow, A., Hussain, T., Glover, V., Sandler, M., Dexter, D. T. and Walker, M. : (-)-Deprenyl can induce soluble superoxide dismutase in rat striata. *J. Neural Transm. [Gen Sect]* **86**, 77 (1991).
  - 17) Cohen, G. and Spina, M. B. : Deprenyl suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover. *Ann. Neurol.* **26**, 689 (1989).
  - 18) Li, X. M., Juorio, A. V., Qi, J. and Boulton, A. A. : *l*-Deprenyl potentiates NGF-induced changes in superoxide dismutase mRNA in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **53**, 235 (1998).
  - 19) Maruyama, W., Takahashi, T. and Naoi, M. : (-)-Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide. *J. Neurochem.* **70**, 2510 (1998).
  - 20) Rodriguez-Gomez, J. A., Venero, J. L., Vizuete, M. L., Cano, J. and Machado, A. : Deprenyl induces the tyrosine hydroxylase enzyme in rat dopaminergic nigrostriatal system. *Molecular Brain Research* **46**, 31 (1997).
  - 21) Tatton, W. G. and Chalmers-Redman, R. M. E. : Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition : (-)-Deprenyl-related compounds in controlling neurodegeneration. *Neurology* **47**(Supple 3), S171 (1996).
  - 22) Breese, G. and Traylor, T. D. : Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: Evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **174**, 413 (1970).
  - 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
  - 24) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
  - 25) Scarr, E., Wingerchuck, D. M., Juorio, A. V. and Paterson, I. A. : The effects of monoamine oxidase B inhibition on dopamine metabolism in rats with nigro-striatal lesions. *Neurochem. Res.* **19**, 153 (1994).
  - 26) Finberg, J. P. M., Wang, J., Goldstein, D. S., Kopin, I. J. and Bankiewicz, K. S. : Influence of selective inhibition of monoamine oxidase A or B on striatal metabolism of L-DOPA in hemiparkinsonian rats. *J. Neurochem.* **65**, 1213 (1995).
  - 27) Spina, M. B., Squinto, S. P., Miller, J., Lindsay, R. M. and Hyman, C. : Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: Involvement of glutathione system. *J. Neurochem.* **59**, 99 (1992).
  - 28) Blum, D., Wu, Y., Nissou, M. F., Benabid, A. L. and Verna, J. M. : p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Research* **751**, 139 (1997).
  - 29) Zuo, D. and Yu, P. H. : Increase of survival of dopaminergic neuroblastoma in co-cultures with C-6 glioma by R(-)-deprenyl. *Progress in Brain Research* **106**, 199 (1995).
  - 30) Wu, R. M., Chiueh, C. C., Pert, A. and Murphy, D. L. : Apparent antioxidant effect of *l*-deprenyl on hydroxyl radical formation and nigral injury elicited by MPP<sup>+</sup> *in vivo*. *European Journal of Pharmacology* **243**, 241 (1993).
  - 31) Maruyama, W., Naoi, M., Kasamatsu, T., Hashizume, Y., Takahashi, T., Kohda, K. and Dostert, P. An : Endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl-(R)-salsolinol, induces DNA damage in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **69**, 322 (1997).
  - 32) Grimsby, J., Toth, M., Chen, K., Kumazawa, T., Klaidman, L., Adams, J. D., Karoum, F., Gal, J. and Shih, J. C. : Increased stress response and  $\beta$ -phenylethylamine in MAO-B deficient mice. *Nat. Genet.* **17**, 206 (1997).
  - 33) Lazebnik, Y. A., Kaufman, S. H., Desnoyers, S. Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C. : Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346 (1994).
  - 34) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. : Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: Possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* **12**, 2045 (1996).
  - 35) Portera-Cailliau, C. and Hedreen, J. C., Price, D. L. and Koliatos, V. E. : Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* **15**, 3775 (1995).
  - 36) Leist, M. and Nicotera, P. : Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology. *Experimental Cell Research* **239**, 183 (1998).
  - 37) Kragten, E., Lalande, I., Zimmermann, K., Roggo, S., Schindler, P., Müller, D., Oostrum, J. V., Waldmeier, P. and Fürst, P. : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R(-)-deprenyl. *J. Biol. Chem.* **273**, 5821 (1998).