

六鬱湯의 산화적 스트레스에 대한 뇌세포 보호효과

경희대학교 한의과대학 부인과학교실

정선형, 이진무, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Neuroprotective Effect of *Yukul-tang* against the Oxidative Stress

Sun-Hyung Jung, Jin-Moo Lee, Chang-Hoon Lee,
Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental OB & GY, College of Oriental Medicine, Kyung Hee Univ.

Purpose: In this rapidly aging society, the research and development of traditional oriental medicine treatment is one of the critical factors to protect the increasing neuro-degenerative disorders. In this study, we wanted to verify the effect of *Yukul-tang* (YUT) on neuro-degenerative disease model by assessing the antioxidant and anti-inflammation effects.

Methods: To assess the antioxidant effects of YUT, we carried out DPPH radical and ABTS radical scavenging assays and determined the total polyphenolic contents in YUT. To evaluate the neuro-protective effects of YUT, we performed the MTT and ROS assays and TH immunohistochemistry, NO and TNF- α assays in SH-SY5Y or mesencephalic dopaminergic neurons damaged by 6-OHDA.

Results: The treatment of YUT showed eliminating effects on DPPH radical and ABTS radical. it showed deterring effects on ROS, NO and TNF- α and protecting effects on TH-positive cell in SH-SY5Y cells or mesencephalic dopaminergic neurons. Especially in the case of the treatment of YUT with 0.2ug/mL + 6-OHDA 10uM, the protective effect on dopaminergic neurons was most outstanding.

Conclusion: In this study, we have demonstrated that YUT has an antioxidant effect and a neuro-protective effect on neuro-degenerative disease model caused by neurotoxin such as 6-OHDA. The results of our present study suggest that YUT can be useful agent to prevent and to treat neuro-degenerative diseases.

Key Words: *Yukul-tang* (YUT), 6-OHDA, Antioxidant effect, Protection of Dopaminergic neurons.

I. 서 론

우리나라의 노령화 지수는 2001년 36.3명이었고, 2008년 현재는 59.3명이며, 2050년에는 429.3명으로 예상되어, 향후 급격하게 노령화 사회가 되어갈 것으로 전망 된다¹⁾. 이에 따라 폐경 이후 여성의 삶의 질에 대한 관심이 높아지고 있으며²⁾, 퇴행성 뇌질환 환자의 비중도 커질 것으로 예상 된다^{3,4)}.

更年期 障碍의 증상은 자율신경증상, 정신신경증상, 물질대사증상, 성기증상 및 뇌 조직 퇴행증상 등으로 구분 된다⁵⁾. 최근 노화에 따른 폐경 및 성호르몬 감소가 치매나 우울증 발생 요인이 된다는 보고들과 폐경기 여성이 estrogen의 뇌신경 보호⁶⁻⁸⁾를 받지 못하게 되어 동년 남성보다 퇴행성 뇌질환의 빈도가 2-3배 정도 유의적으로 증가하게 된다는 보고들이 있다^{3,7,9-11)}. 이를 예방하고 개선하기 위한 목적으로 호르몬 보충요법이 보편적으로 처방되었으나, 부작용으로 유방암과 자궁암의 유발 위험성이 제시되고 있고, 인지 능력을 보호하는 효과가 없거나 더 악화시킨다는 발표들이 나오면서¹²⁻¹⁴⁾, 호르몬 보충요법을 대체할 한약재를 이용한 치료법 개발이 요구되고 있다.

한의학 문헌에서 更年期 障碍에 대한 독립된 언급은 없으나, 婦人臟躁, 白帶病, 帶下候, 天癸過期, 年老經水復行, 老年血崩 및 經斷復來 등이 갱년기 장애와 유사한 병태이거나 연관된 병증이며, 그 원인은 腎陰虛, 腎陽虛, 心肝火旺, 心腎不交, 心脾兩虛, 肝鬱 및 血瘀 등이다¹⁵⁾.

<東醫寶鑑>¹⁶⁾의 六鬱湯은 明代 龔의 <古今醫鑑>¹⁷⁾ 처방에 生薑 3片이 추가된

것이며, 氣血濕火痰食 六種의 鬱證을 다스려 諸鬱火를 開通하는 通治方으로 사용되었다. 이후 임상에서는 六鬱湯 또는 加味方으로 月經不調, 痛經, 精神抑鬱症, 노이로제, 胸悶脇痛, 胸膈痞滿, 頭暈目眩, 心煩口渴 및 鬱火 등에 널리 활용되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 六鬱湯에 대한 실험적 연구로서는 스트레스와 위궤양 및 혈중 catecholamine과의 관계²¹⁾, 갑상선 기능 항진증²²⁾에 대한 보고가 있으나, 퇴행성 뇌질환 모델에서 도파민 세포 보호 작용에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 六鬱湯의 산화적 스트레스에 대한 뇌세포 보호효과를 알아보고자 DPPH free radical과 ABTS radical cation 소거능 및 총 폴리페놀 함량을 측정하여 항산화 활성을 분석하고, SH-SY5Y 세포에서 cell viability와 6-OHDA로 유도된 세포독성에 대한 cell viability 및 ROS, 태아중뇌 도파민 세포에서 6-OHDA로 유도된 세포독성에 대한 TH-positive 세포 수, NO 및 TNF- α 등으로 도파민 세포 보호효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 재

실험에서 사용한 六鬱湯은 <東醫寶鑑>¹⁶⁾의 處方에 의해 구성되었으며 각 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였고, 약재의 구성과 1貼의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The Contents of *Yukul-tang* (YUT)

Herbs	Pharmaceutical name	Amount (g)
香附子	Cyperi Rhizoma	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
神麩	Massa Medicata Fermentata	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
陳皮	Citri Pericarpium	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
赤茯苓	Poria	4
貝母	Fritillariae Cirrhosae Bulbus	4
枳殼	Aurantii Fructus	4
蘇葉	Perillae Folium	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	6
Total amounts		52

2) 시약

항산화효과 연구에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (이하 DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (이하 ABTS), potassium persulfate, tannic acid 및 folin 등은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Neuroblastoma cell 보호효과 연구에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (이하 DMEM), minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (이하 FBS) 및 1% penicillin-streptomycin 등은 Gibco (Auckland, New Zealand)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (이하 MTT), 6-hydroxydopamine (이하 6-OHDA), dimethyl sulfoxide (이하 DMSO) 및 Griess reagent 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Primary culture에 사용한 para-formaldehyde (이하 PFA), poly-L-lysine (이하 PLL) 및 diaminobenzidine (이하 DAB) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서, biotinylated anti-rabbit antibody, normal goat serum 및 avidin biotin peroxidase complex (이하 ABC) standard kit 등은 Vector laboratories (Burlingame, USA)에서, rat tumor necrosis factor- α (이하 TNF- α) ELISA kit는 Invitrogen Corp. (Carlsbad, USA)에서, tyrosine hydroxylase (이하 TH)-rabbit in goat primary antibody는 Chemicon International Inc. (Temecula, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물 제조

六鬱湯 1貼 분량의 구성약재 52g에 증류수 520ml를 가하여 100°C에서 2시간 동안 환류추출한 후, Whatman filter paper #2로 여과하였다. 여과액을 55°C에서 감압 농축 (R-200; Buchi, Flawil, Switzerland)하여 얻은 시료를 -60°C에서 동결건조 (FDU-500R; Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 六鬱湯 추출물 (YUT) 13.61g (수득율 26.17%)을 얻었으며, -20°C에서 보관하며 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

2) 항산화 활성 분석

(1) DPPH free radical 소거 활성 측정
DPPH free radical 소거능(%)을 측정하기 위해 0.2mM DPPH ethanolic solution 100 μ l에 농도별 YUT (1, 10, 100, 500 및 1,000 μ g/ml)를 100 μ l씩 가하여 반응시켰다. 반응 30분 후 37°C에서 spectrophotometer (Versamax; Molecular

Device, Sunyvale, USA)를 이용하여 517nm에서 optical density (이하 OD)를 측정하였으며, DPPH free radical inhibition activity는 아래와 같이 계산하였고, IC₅₀을 측정하였다.

$$\text{DPPH free radical inhibition activity (\%)} = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

(2) ABTS radical cation 소거 활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정을 위해 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 상온의 암실에서 24시간 반응시켰다. ABTS와 potassium persulfate 혼합액을 pH 7.40의 phosphate buffer saline (이하 PBS)로 희석하여 732nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되게 하였다. 희석된 용액 950μl에 농도별 YUT 50μl씩 가하여 최종농도를 1, 10, 100, 500 및 1,000μg/ml로 조정하고 5분간 상온에서 반응시킨 후, spectrophotometer로 732nm에서의 흡광도를 측정하여 ABTS cation inhibition activity를 아래와 같이 계산하였으며, IC₅₀을 측정하였다.

$$\text{ABTS cation inhibition activity (\%)} = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

(3) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 YUT 10mg/ml를 증류수로 희석한 후, 2N folin 200μl와 Na₂CO₃ 2ml를 첨가하여 상온 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였으며, total polyphenolic contents는 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

3) SH-SY5Y 세포에 대한 보호효과 측정

(1) 세포배양

American Type Culture Collection (Rockville, USA)로부터 human neuroblastoma인 SH-SY5Y를 분양받아, 60mm dish에서 10% (v/v) FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM으로 37℃와 5% CO₂에서 배양하였다.

(2) Cell viability

96 well plate에 2.5×10⁴/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37℃와 5% CO₂에서 48시간 배양 후, 농도별 YUT (0.1, 1, 10, 50, 100 및 200μg/ml) 100μl를 PBS에 녹여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양한 다음 DMSO로 생성된 formazan을 녹여 15분간 shaking하고, spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 대한 cell viability

96 well plate에 2.5×10⁴/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37℃와 5% CO₂에서 48시간 배양 후, 농도별 YUT (0.1, 1, 10, 50, 100 및 200μg/ml) 100μl와 6-OHDA를 처리하였다. 이 때 pre-treatment군은 먼저 농도별 YUT를 21시간 처리 후 6-OHDA 200μM를 3시간 처리하여 배양하였고, co-treatment군은 농도별 YUT와 6-OHDA 150μM를 동시에 24시간 처리하였으며, post-treatment군은 먼저 6-OHDA 150μM를 3시간 처리 후 농도별 YUT를 가하여 21시간 배양하였다. 그 후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양하고, DMSO로 생성된 formazan을 녹여 15분간 shaking하였다. Spectrophotometer

를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(4) 6-OHDA에 의한 ROS 생성

ROS 측정은 H₂ DCF-DA를 사용해 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 96 well plate에 2.5×10⁴/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂, 95% air에서 48시간 배양 한 후, YUT를 1, 10 및 50µg/ml 농도로 pre-treatment 하였다. PBS로 세척 후, 10µM H₂ DCF-DA를 넣어 30분 배양하였다. PBS로 세척 후, 200µM의 6-OHDA를 처리하여 0, 30, 60 및 120분에서 fluorescence excitation 495nm, emission 530nm로 측정하였다.

4) Primary culture에서 6-OHDA에 대한 세포 보호효과 측정

(1) 태아중뇌세포 배양 및 약물처리

Orient Bio. (Osan, Korea)에서 14일 된 Sprague-Dawley 태아를 구매하여 forceps으로 태아 중뇌 조직을 얼음위에서 박리하고 10% FBS를 포함한 MEM에 모은 후, pipet을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. 조직에 trypsin을 처리하여 세포 수를 counting한 후, PLL로 미리 coating한 coverslip에 1.5×10⁵의 조직을 seeding한 다음, 37°C 배양기에서 5일간 배양하였다. FBS가 없는 MEM에서 태아중뇌세포에 0.2와 1µg/ml의 YUT를 가하고 6시간 배양 후 10µM의 6-OHDA를 처리하였다. 18시간 후 4% PFA로 고정한 다음 pH 7.2의 PBS로 세척하였다.

(2) TH 면역조직화학

세척된 태아중뇌세포를 1% bovin serum albumin과 normal goat serum으

로 blocking한 후, 0.1% Triton X-100과 normal goat serum을 포함하는 PBS로 primary antibody (1:2,000 rabbit anti rat TH)를 희석하여 세포와 상온에서 반응시켰다. 일정 시간이 지난 뒤 PBS로 세척한 후 secondary antibody인 biotinylated anti rabbit IgG (H+L)을 반응시키고, PBS 세척을 거쳐 ABC solution에서 90분간 반응시킨 후 DAB에 5분간 발색시켰다. Gelatin-coated slide에 mounting 후 각 군당 무작위로 4개의 sample을 선택하여 각 각 9구역에서 현미경 (Axioskop 2; Carl Zeiss Inc., Gottingen, Germany)을 이용하여 세포 수를 계측 (100×) 후, 무처리 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(3) NO 측정

태아중뇌세포에 0.2와 1µg/ml의 YUT 및 10µM의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 100µl을 회수하여 Griess reagent 100µl를 첨가하고 상온 암실에서 10분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite를 이용해 표준 곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

(4) TNF-α 측정

태아중뇌세포에 0.2와 1µg/ml의 YUT 및 10µM의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 50µl을 incubation buffer 50µl와 diluent buffer가 포함된 human TNF-α 항체코팅 96 well plate에 가하였다. 추가로 rat TNF-α biotin conjugate 50µl를 가하여 상온에서 1시간 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하고, thymol을 포함한 streptavidin peroxidase 희석액 100µl를 가하여 상온에서 45분 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하였

다. 이 후 TMB substrate 용액 100 μ l를 가하여 암실에서 30분간 진탕배양 후 stop solution 100 μ l를 가하여 반응을 종결시켰다. ELISA reader로 450nm 파장에서 흡광도를 0pg/ml ~ 1,000pg/ml의 TNF- α standard를 이용한 standard curve에 대입하여 TNF - α 의 농도 (pg/ml)를 구하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS ver 12.0K for windows를 이용하여 one-way ANOVA test로 통계적 유의성을 검증하였으며, $p < 0.05$ 인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 항산화 작용에 미치는 영향

1) DPPH free radical 소거 활성 효과
DPPH free radical 소거능을 농도별 YUT 처리 후 측정된 결과, 10 μ g/ml YUT에서 10.21%, 100 μ g/ml YUT에서 36.10%의 소거능을 보이다가 그 이후 급격히 증가하여 500 μ g/ml YUT와 1,000 μ g/ml YUT에서는 각각 92.40%와 99.71%의 소거능을 나타내었으며, IC₅₀은 257.30 μ g/ml 이었다(Fig. 1).

2) ABTS radical cation 소거 활성 효과
ABTS cation 소거능을 농도별 YUT 처리 후 측정된 결과, 10 μ g/ml YUT까지는 10% 이하의 소거능을 보이다가 그 이후 급격히 농도 의존적으로 증가하여 500 μ g/ml와 1,000 μ g/ml에서는 각각 93.96%와 93.00%의 소거능을 나타내었으며, IC₅₀은 144.10 μ g/ml 이었다(Fig. 2).

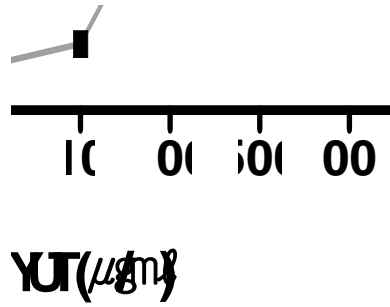


Fig. 1. Effect of YUT on the generation of DPPH free radical

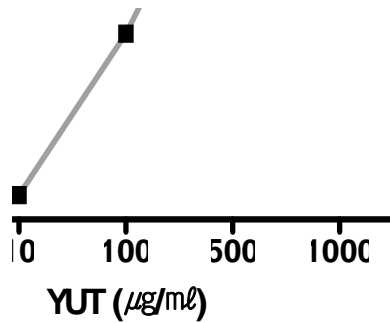


Fig. 2. Effect of YUT on the generation of ABTS cation

3) 총 폴리페놀 함량

YUT 10mg/ml의 total polyphenolic contents를 tannic acid 표준곡선으로부터 구한 결과 0.78%로 나타났다.

2. SH-SY5Y 세포에 미치는 영향

1) Cell viability

YUT의 SH-SY5Y 세포에 대한 영향을 알아보기 위해 0.1, 1, 10, 50, 100 및 200 μ g/ml 농도의 YUT에 처리 후 측정된 결과, 대조군 세포 생존율 100%를 기준으로 농도 의존적으로 감소하였으며, 10 μ g/ml ($p < 0.05$), 50 μ g/ml ($p < 0.01$) 및 100 μ g/ml와 200 μ g/ml ($p < 0.001$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

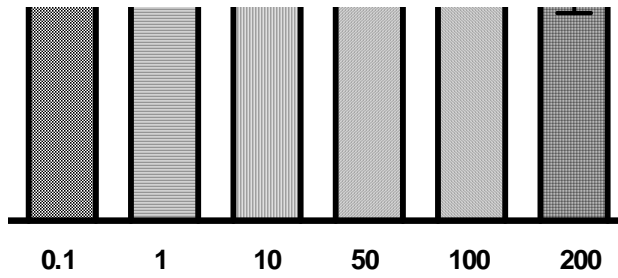


Fig. 3. Dose-dependent effect of YUT treatment on the viability of SH-SY5Y cells ***; p<0.001 compared with control **; p<0.01 compared with control *; p<0.05 compared with control

2) 6-OHDA에 대한 cell viability

6-OHDA에 대한 SH-SY5Y 세포 보호 효과를 농도별 YUT 처리 후 측정된 결과, pre-treatment군의 경우 10μg/ml 이하의 YUT에서 6-OHDA 단독의 66.48%에 비하여 증가된 cell viability를 나타내었으나 유의한 차이는 없었다.

Post-treatment군의 경우 모든 농도의 YUT에서 6-OHDA 단독의 47.43%에 비하여 유의한 (p<0.001) cell viability 증가를 나타내었다.

Co-treatment군의 경우 10μg/ml 이하의 YUT에서 6-OHDA 단독의 57.59%에 비하여 증가된 cell viability를 나타내었으며, 0.1μg/ml (p<0.001)와 1μg/ml (p<0.05)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

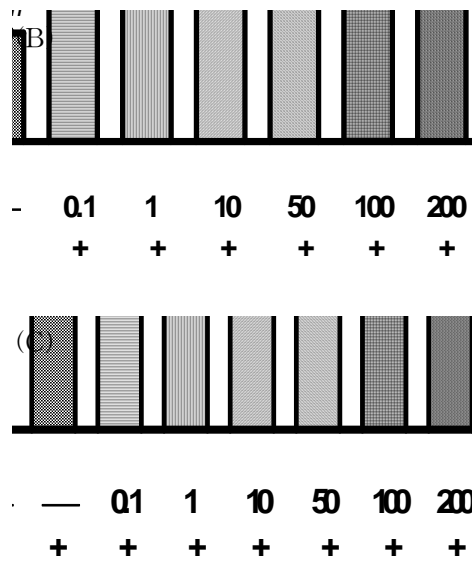
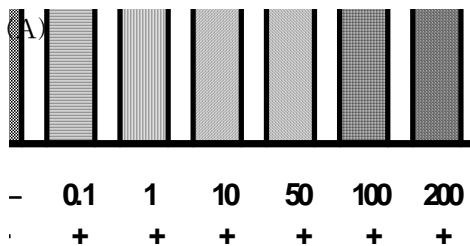


Fig. 4. Effect of YUT on the viability of 6-OHDA treated SH-SY5Y cells (A) Cell viability of YUT pre-treatment (B) Cell viability of YUT post-treatment (C) Cell viability of YUT co-treatment ###; p<0.001 compared with control ***; p<0.001 compared with the only 6-OHDA treated group **; p<0.01 compared with the only 6-OHDA treated group *; p<0.05 compared with the only 6-OHDA treated group



3) 6-OHDA에 의한 ROS 억제효과
YUT의 6-OHDA에 대한 ROS 생성에

미치는 영향을 알아보기 위하여 1, 10 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 YUT를 pre-treatment하고, 6-OHDA를 처리하여 0분, 30분, 60분, 120분 후 ROS 생성을 측정된 결과, 6-OHDA만을 단독 처리한 경우 control group에 비해 유의하게 ROS 생성이 증

가하였으며, 농도별 YUT추출물을 처리 후 6-OHDA를 투여하였을 때, 30분, 60분, 120분에서 모두 유의하게 6-OHDA만을 단독 처리하였을 때에 비해 ROS 생성이 억제되었다(Fig. 5).

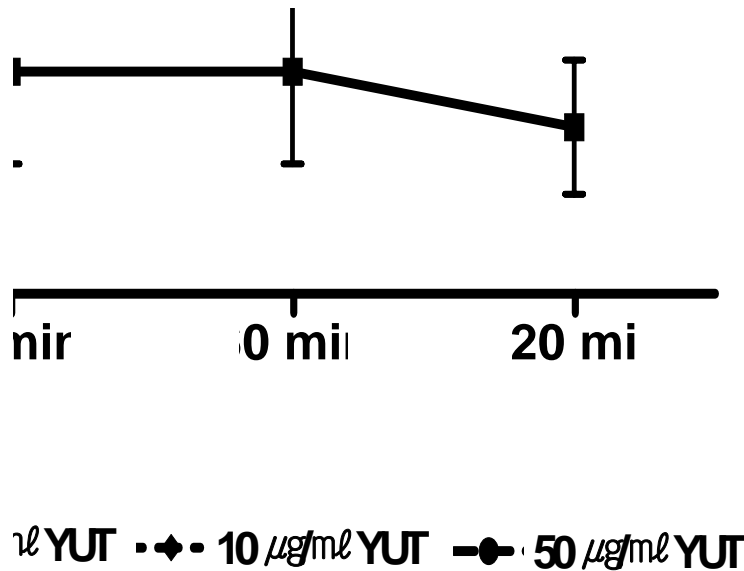


Fig. 5. Inhibitory effect of YUT on ROS production by 6-OHDA in SH-SY5Y cells

3. 태아중뇌 도파민 세포에 미치는 영향

1) TH-positive 세포 수

태아중뇌세포를 이용하여 YUT의 6-OHDA에 대한 세포 보호효과를 관찰한 결과, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ YUT에서 68.64%로 6-OHDA 단독의 37.63%에 비하여 통계적으로 유의한 ($p < 0.001$) 세포 생존을 증가를 나타내었으며, 1 $\mu\text{g/ml}$ YUT에서는 49.82%로 유의한 ($p < 0.01$) 세포 생존을 증가를 나타내었다(Fig. 6 & Fig. 7).

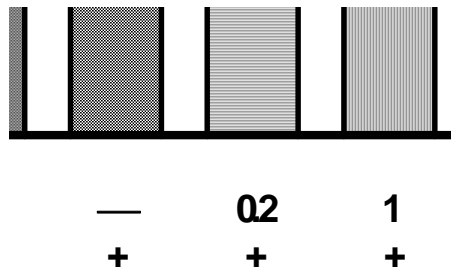


Fig. 6. Neuroprotective effect of YUT in mesencephalic dopaminergic neurons against neurotoxicity induced by 6-OHDA ###; $p < 0.001$ compared with control ***; $p < 0.001$ compared with the only 6-OHDA treated group **; $p < 0.01$ compared with the only 6-OHDA treated group

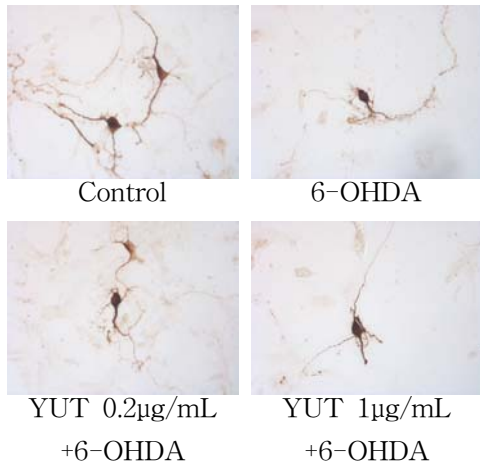


Fig. 7. Neuroprotective effect of YUT against neurotoxicity induced by 6-OHDA in mesencephalic dopaminergic neurons (400X)

2) NO 생성 억제효과

태아중뇌세포에 YUT와 6-OHDA를 처리한 후 배양액 내 NO의 농도를 관찰한 결과, 0.2µg/ml YUT에서 107.83%로 6-OHDA 단독의 171.30%에 비하여 유의하게 (p<0.01) NO가 감소하였으며, 1 µg/ml YUT는 6-OHDA 단독에 비하여 NO가 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 8).

3) TNF-α 생성 억제효과

태아중뇌세포에 YUT와 6-OHDA를 처리한 후 배양액 내 TNF-α의 농도를 관찰한 결과, 0.2µg/ml YUT에서 2.31±0.58pg/ml로 6-OHDA 단독의 4.53±0.62pg/ml에 비하여 유의하게 (p<0.05) TNF-α가 감소되었으며, 1µg/ml YUT는 6-OHDA 단독에 비하여 TNF-α가 감소하였으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 9).

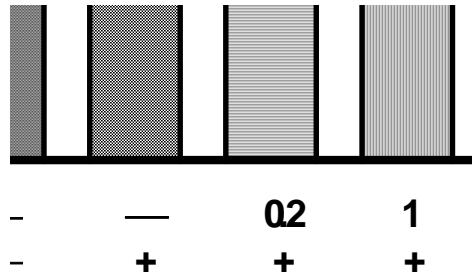


Fig. 8. Inhibitory effect of YUT on the NO production in mesencephalic dopaminergic neurons treated by 6-OHDA
##; p<0.01 compared with control **; p<0.01 compared with the only 6-OHDA treated group

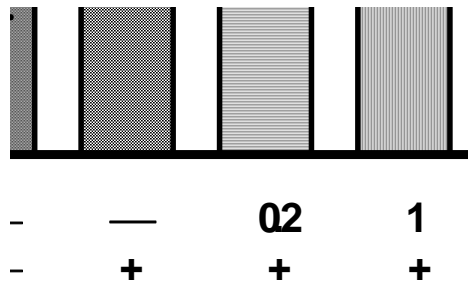


Fig. 9. Inhibitory effect of YUT on the TNF-α production treated by 6-OHDA in mesencephalic dopaminergic neurons #; p<0.05 compared with control *; p<0.05 compared with the only 6-OHDA treated group

IV. 고 찰

여성 인구의 평균 30% 이상이 갱년기 여성이고, 고령화 사회가 되면서 그 비율은 매년 증가하고 있다¹⁵⁾. 폐경기 이후는 여성 평균 수명의 약 1/3이상을 차지하는데¹⁵⁾, 급격한 노령화 사회로 폐경 이후 여성 건강의 큰 위협인 퇴행성 뇌 질환 환자의 비중이 커질 것으로 예상된다^{3,4)}.

최근에는 estrogen의 항산화효과, apoptosis 조절, 뇌혈류의 증가, 뇌내 염증 반응에 대한 항염 효과 등 신경 보호효과와 인지능력, 운동기능 조절, 통증, 감정상태 등의 영향에 대해 알려지고 있다. 또한閉經 후 뇌내 estrogen의 감소로 인해 혈관운동증상, 우울증 및 불안 외에도 기억력, 인지기능 및 업무수행능력에도 지대한 영향을 끼친다는 보고들이 있어,閉經은 여성의 지적, 정서적, 사회적인 면의 급격한 퇴행을 초래할 수 있는 계기라고 할 수 있다³⁾.

뇌는 산화 스트레스에 손상받기 쉬워서, 노화, 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경 뇌질환을 발생하게 하며²³⁻²⁵⁾, 일단 한번 손상 받은 신경세포는 재생되지 않기 때문에 신경세포 보호에 대한 연구가 중요한데, 아직 그 효과가 증명된 치료약은 개발되고 있지 않은 실정이다²⁶⁾. 최근에는 노박덩굴²⁶⁾, 鈞鈎藤²⁷⁾, 大黃²⁸⁾, 防己²⁹⁾, 黃連³⁰⁾ 등의 한약재와 祛風至寶丹³¹⁾, 黃連解毒湯³²⁾, 血府逐瘀湯³³⁾, 延齡固本丹, 六味地黃湯, 八物湯 및 四物湯³⁴⁾ 등의 한약처방이 뇌신경보호효과가 있음이 보고되고 있다.

韓醫學에서 腦는 6개 奇恒之府의 하나로 腎과 매우 밀접한 관계를 가지고 있으며,閉經 이후 노화가 진행됨에 따라 腎氣가 점차 쇠하여 陰精이 虧損하게 되면 腎精이 缺乏되어 腦에 上衝하지 못해 髓海가 空虛해지게 되어 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘 등의 증상과 함께 심하면 知能低下, 癡呆 등이 발생하게 된다³⁵⁾.

도파민은 monoamines의 한 종류인 catecholamine 중 하나로 스트레스 상황에서 뇌의 monoamines의 함량이 변화되는데, 일부 질환과 고혈압 및 정신과 질

환의 치료에 사용되는 약제들이 뇌의 catecholamine 대사에 영향을 미쳐 그 기능을 변화시킬 수 있기 때문에 관심이 되고 있다³⁶⁾.

도파민 세포는 도파민 생성에 관여하는 주요 물질로 자발적 운동조절, 동기 부여와 보상, 스트레스 등 감정에 근거한 행동 및 복합적 인지 과정을 조절하는 역할을 하고 있다. 따라서 도파민 함량의 과부족 시 무도병과 파킨슨증후군, 정신병, 우울, 치매, 강박증 같은 질병을 야기시킨다^{3,23,37-39)}.

스트레스 상황 하에서는 도파민이 증가하는 것으로 보고되고 있는데, 스트레스 상황 하에서 증가된 도파민 분비를 억제하는 한약재에 대한 연구는 많이 있어 왔다^{21,40-43)}. 반면, 우울증의 경우에는 도파민 농도와 활성이 낮아진다는 보고도 있으며⁴⁴⁾, 한약재가 도파민 함량을 증가시켰다는 연구^{45,46)}도 있다.

更年期 障礙의 정신신경증상에는 不眠, 神經質, 不安, 抑鬱, 頭痛, 易刺激性 등이 있으며, 뇌조직 퇴행증상으로는 記憶力 減退, 精神集中不良, 思考力 減退, 癡呆 등이 있는데, 이중 기억력 감퇴와 감정변화가閉經期 女性이 경험하는 가장 흔하고 심한 증상이라는 보고가 있다^{5,47)}. 또한閉經期는閉經에 따른 신체변화, 가족 구성원의 변화 등 강도 높은 생활사건 스트레스를 받게 되어 鬱證이 다 말할 수 있는 시기이기도 하다⁴⁸⁾.

六鬱湯은 <東醫寶鑑>¹⁶⁾에 기재된 것으로, 明代 龔의 <古今醫鑑>¹⁷⁾ 처방에 生薑 3片이 추가된 것이다. <東醫寶鑑>¹⁶⁾에는 六鬱湯을 2종류 기재하고 있는데, 하나는 龔의 처방이고, 다른 하나는 朱의 처방이다. 두 처방이 약제 구성과 용

량에 다소 차이가 있으나 모두 氣血濕火 痰食 六種의 鬱症을 다스려 諸鬱火를 開通하는 通治方으로 쓰였으며, 시대적으로 볼 때 金元代 朱의 六鬱湯에 대한 개념이 明代 龔의 六鬱湯 처방 개념에 영향을 주었다고 할 수 있겠다. 반면, 朱의 <丹溪心法>⁴⁹⁾에 나타난 六鬱湯은 氣鬱湯, 濕鬱湯, 痰鬱湯, 熱鬱湯, 血鬱湯, 食鬱湯에 대한 각각의 처방을 총칭하는 명칭으로, 朱의 越鞠丸을 基本方으로 하여 加味한 처방들이며^{18,49)}, 朱는 氣血이 沖化하면 萬病이 발생하지 않으나 佛鬱하게 되면 萬病이 발생하니 모든 질병은 鬱에서 발생한다고 하였다. 또한, 李의 <醫學入門>⁵⁰⁾의 六鬱湯도 <東醫寶鑑>에 기재된 朱의 六鬱湯과 용량이 다소 다르게 기재되어 있어, 各 醫書에 나타난 六鬱湯의 처방내용들이 상이한 부분들이 있으나, 그 효능은 모두 能解諸鬱 하는 것으로 일치한다. 鬱證은 思慮過度나 失意, 悲嘆 등 정신적인 스트레스에 의해 발생하는 증이라 할 수 있으며, 최근에는 憂鬱症과 동일한 개념으로 해석하고 있다^{51,52)}.

六鬱湯에 대해 최근 보고된 실험논문으로는, 趙²¹⁾ 등은 스트레스에 효과가 있음을, 趙 등²²⁾이 갑상선기능항진증에 효과적임을 발표하였으나, 퇴행성 뇌질환 모델에서의 도파민 세포 보호작용에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

六鬱湯은 解鬱降火하여 諸鬱症의 通治方으로 활용되고 있으며, 閉經期 전후의 更年期 女性들이 제반 鬱證에 노출되기 쉽고⁴⁸⁾, 更年期 障碍 중 가장 흔하고 심하게 경험하는 증상이 기억력 감퇴와 감정변화로^{5,47)}, 이는 도파민 세포 활성화와 연관되어 있다.

이에 저자는 六鬱湯의 更年期 障碍에 대한 활용 가능성을 알아보기 위하여 六鬱湯의 항산화효과와 6-OHDA로 유도된 SH-SY5Y human neuroblastoma cell 및 태아중뇌 dopamine 세포에서의 보호효과를 관찰하였다.

DPPH free radical의 안정성, 높은 민감도 및 검사의 편의성 등으로 인해 DPPH free radical 소거법은 항산화 작용 평가에 흔히 사용되는 검사법으로⁵³⁾, 농도별 六鬱湯 추출물 처리 후 DPPH free radical 소거능은 농도 의존적으로 증가 하여, 500 μ g/ml와 1,000 μ g/ml 농도에서는 각각 92.40%와 99.71%의 소거능을 나타내었으며, IC₅₀은 257.30 μ g/ml이었다.

ABTS radical cation 생성은 시료의 항산화 작용을 광학적으로 측정하는 것으로, 수용성 및 지용성 항산화 물질의 항산화 효과 측정에 흔히 사용된다⁵⁴⁾. 농도별 六鬱湯 추출물 처리 후 ABTS cation 소거 활성 효과를 측정한 결과 농도 의존적으로 증가하여, 500 μ g/ml와 1,000 μ g/ml 농도에서는 각각 93.96%와 93.00%의 소거능을 나타내었으며, IC₅₀은 144.10 μ g/ml이었다.

Polyphenol은 천연 항산화 물질로 노화에 관련된 질환의 위험성을 낮추는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾. 六鬱湯 추출물 10mg/ml의 총 페놀 함량을 tannic acid 표준곡선으로부터 구한 결과 0.78%로 나타났으며, 이상의 결과를 통해 六鬱湯의 항산화효과를 확인할 수 있었다.

6-OHDA는 주로 카테콜라민 세포에 작용하는 신경독성물질로, 도파민 신경세포의 DNA를 손상시켜 apoptosis를 일으키고, mitochondria의 에너지 생성을

방해하고, 다양한 cytokine을 분비하여 신경세포를 사멸시킨다⁵⁶⁻⁵⁸). 최근에는 6-OHDA를 이용하여 퇴행성 뇌질환을 유발한 동물모델을 활용하여 신경세포 사멸기전에 대한 연구들이 이루어지고 있다⁵⁸⁻⁶⁰).

6-OHDA로 유발된 신경손상에 대한 六鬱湯의 효과를 관찰하기에 앞서, SH-SY5Y 세포에 농도별 六鬱湯 추출물을 처리한 결과, 대조군 세포 생존율 100%를 기준으로 농도 의존적으로 감소하였으며, 10 μ g/ml ($p < 0.05$), 50 μ g/ml ($p < 0.01$) 및 100 μ g/ml와 200 μ g/ml ($p < 0.001$)에서 유의하게 감소하여 六鬱湯이 세포에 대한 독성을 가지고 있다고 해석해 볼 수 있다.

6-OHDA와 六鬱湯 추출물을 pre-treatment, post-treatment, co-treatment로 나누어 살펴본 실험에서는 post-treatment의 cell viability가 가장 유효하게 나타나서, post-treatment 모든 농도에서 유의한 ($p < 0.001$) cell viability 증가를 나타내었다.

뇌신경세포 사멸은 oxidative stress와 mitochondrial defects가 주요소이며, 그 사멸과정에서 NO, reactive oxygen species (ROS)와 TNF- α 등의 cytokine 생성으로 인한 염증반응이 주요 원인이며, 노화, 알츠하이머, 파킨슨병 등의 뇌조직 퇴행성 변성이 산화적 스트레스와 염증에 의해 이루어진다는 것이 잘 알려져 있다^{23,25,60-62}).

六鬱湯 추출물을 처리한 후에 6-OHDA를 처리하여 도파민 뉴런 세포사멸을 유도한 후 ROS의 염증반응 억제효과를 살펴본 실험에서는 모두 유의적으로 억제 효과가 있었다. ROS는 세포막의 지질,

조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA 손상을 유발하여 퇴행성 뇌질환을 포함한 다양한 질병을 유발한다²⁵).

흰쥐 태아중뇌세포에서 六鬱湯 추출물 pre-treatment에 의한 도파민 신경세포의 보호효과를 TH-positive cell을 통해 관찰한 결과, 0.2 μ g/ml ($p < 0.001$)와 1 μ g/ml ($p < 0.01$) 六鬱湯 추출물 처치군에서 6-OHDA 단독 처치군에 비하여 통계적으로 유의한 세포 생존율 증가를 나타내었다.

흰쥐 태아중뇌세포에서 六鬱湯 추출물 pre-treatment로 NO 생성 억제효과를 알아본 실험에서 0.2 μ g/ml ($p < 0.01$) 六鬱湯 추출물 처치군이 6-OHDA 단독 처치군에 비하여 통계적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다.

흰쥐 태아중뇌세포에서 六鬱湯 추출물 pre-treatment로 cytokine의 일종인 TNF- α 의 억제효과를 알아본 실험에서 0.2 μ g/ml ($p < 0.05$) 六鬱湯 추출물 처치군이 6-OHDA 단독 처치군에 비하여 통계적으로 유의하게 TNF- α 의 생성을 억제하였다.

본 연구를 통해 六鬱湯의 항산화효과, ROS, NO, TNF- α 의 염증반응 억제 효과, TH - positive cell에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 이를 통해 퇴행성 뇌질환의 빈도가 유의적으로 높아지게 되고, 제반 鬱證에 노출되기 쉬운 閉經期 女性の 更年期 障碍에서도 六鬱湯의 효과가 인정되며, 향후 이에 대한 추가적인 연구들이 필요하리라 사료된다. 또한, 본 연구에서 태아중뇌세포에서는 6-OHDA로 유발된 산화적 스트레스에 대하여 0.2 μ g/ml의 저농도 六鬱湯 추출물에서 보다 양호한 효과를 보여 이에

관한 추가적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

六鬱湯의 산화적 스트레스에 대한 뇌 세포 보호효과를 알아보려고 DPPH free radical과 ABTS radical cation 소거능 및 총 폴리페놀 함량을 측정하여 항산화 활성을 분석하고, SH-SY5Y 세포에서 cell viability와 6-OHDA로 유도된 세포 독성에 대한 cell viability 및 ROS, 태아 중뇌 도파민 세포에서 6-OHDA로 유도된 세포독성에 대한 TH-positive 세포 수, NO 및 TNF- α 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 六鬱湯은 농도 의존적으로 DPPH free radical 과 ABTS cation의 소거 활성 효과를 보였으며, 각각의 IC₅₀은 257.30 μ g/ml와 144.10 μ g/ml이었고, 총 폴리페놀 함량은 0.78% 였다.
2. SH-SY5Y 세포에 농도별 六鬱湯을 처리한 결과, cell viability가 농도 의존적으로 감소하였다.
3. SH-SY5Y 세포에서 六鬱湯을 6-OHDA와 pre-treatment, post-treatment, co-treatment한 결과, post-treatment의 모든 농도에서 유의하게 cell viability 증가를 보였다.
4. SH-SY5Y 세포에서 六鬱湯의 6-OHDA에 의한 ROS의 생성에 대한 영향을 관찰한 결과 모든 시간과 농도에서 6-OHDA를 단독 처리한 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.
5. 태아중뇌세포에서 0.2 μ g/ml와 1 μ g/ml

六鬱湯을 처리하고 6-OHDA를 투여하여 TH-positive cell의 수를 측정한 결과 모든 농도에서 6-OHDA를 단독 처리한 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다.

6. 태아중뇌세포에서 0.2 μ g/ml와 1 μ g/ml 六鬱湯을 처리하고 6-OHDA를 투여하여 NO 생성을 측정한 결과 0.2 μ g/ml 농도에서 6-OHDA를 단독 처리한 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.
7. 태아중뇌세포에서 0.2 μ g/ml와 1 μ g/ml 六鬱湯을 처리하고, 6-OHDA를 처리하여 TNF- α 생성을 측정한 결과 0.2 μ g/ml 농도에서 6-OHDA를 단독 처리한 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.

참고문헌

1. 대한민국 통계청. <http://www.kosis.kr/search/totalsearch2.jsp>
2. 김동일 등. 갱년기클리닉의 운영방안과 활용 약물에 관한 고찰. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):418-436.
3. 김진홍. 알츠하이머 질환과 에스트로젠. 대한폐경학회지. 2000;6(1):3-11.
4. 정병주 등. 파킨슨병으로 유발된 진전이 한약 치료를 통하여 호전된 치험 1례. 대한한방내과학회지. 2006;27(4):954-961.
5. 방혜연, 김지혁, 황의완. 스트레스와更年期障碍에 관한 文獻的 考察. 동 의신경정신과 학회지. 1992;3(2):143-159.
6. Brann DW et al. Neurotropic and Neuroprotective Actions of Estrogen: Basic Mechanisms and Clinical

- Implications. *Steroids*. 2007;72(5):381-405.
7. Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(4):631-652.
 8. Haaxma Ca et al. Gender differences in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(8):819-824.
 9. 강한승 등. 폐경기모델 백서 해마에서 식물성 에스트로젠에 의한 뇌-혈액장벽 유전자 occludin 발현의 변화. *Korea J. Environ. Biol*. 2006;24(2):166-171.
 10. 대한폐경학회 편찬위원회. 폐경기 여성의 관리. 서울:군자출판사. 2001;62-65.
 11. Elisabetta V, Valeria B, Adriana M. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative disease. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2008;29:507-519.
 12. 이정호. 폐경 여성에서 호르몬 요법 시 인지 능력과 치매에 대한 효과. *대한폐경회지*. 2005;11(2):85-91.
 13. Rossouw JE et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-333.
 14. Stephen RR et al. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the women's health initiative memory test: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;289(20):2663-2672.
 15. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학. 서울:정담. 2002;221-222.
 16. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1988;163-166.
 17. 龔信. 古今醫鑑. 江西:科學技術出版社. 1990;98-100.
 18. 裴庚哲 編著. 標準臨床方劑學. 서울:傳統醫學研究所. 1995;300-302.
 19. 楊蘊祥. 古今名方. 河南:科學技術出版社. 1983;168-169.
 20. 李尙仁 등. 方劑學. 서울:영림사. 1998;228-229.
 21. 조영도, 김지혁, 황의완. 六鬱湯이 拘束스트레스 흰쥐의 胃潰瘍 및 血中 Catecholamine 含量에 미치는 영향. *경희한의대논문집*. 1992;15:431-448.
 22. 조충식, 최훈섭, 김철중. 육울탕이 백서의 갑상선기능항진증에 미치는 영향. *大韓本草學會誌*. 2006;21(4):11-17.
 23. 주미선 등. 반룡환의 흰쥐태아중뇌에서의 도파민세포 보호효과. *大韓本草學會誌*. 2008;23(3):53-60.
 24. 김효근 등. 백자인의 6-하이드록시도파민으로 유도된 뇌세포독성에 대한 보호효과. *大韓本草學會誌*. 2008;23(3):19-25.
 25. 김현주, 이상룡. 加味補陽還五湯과 八味合聰明湯의 microglia 보호, 항산화 및 acetylcholinesterase 억제 효과. *동의신경과학회지*. 2008;19(2):65-75.
 26. 이갑득, 김광진, 박용기. 노박덩굴에 함유된 celastrol 성분의 파킨슨병을 유발시킨 쥐에서의 도파민 신경세포 보호효과. *대한한의학회지*. 2008;29(4):94-103.
 27. 강상렬 등. 鈞鉤藤이 뇌허혈을 유발시킨 백서에서의 뇌신경보호효과. *대*

- 한한의학회지. 2002;23(1):1-10.
28. 김범희 등. Gerbil의 전뇌허혈에 대한 大黃의 신경보호효과. 대한한의학회지. 2002;23(3):74-84.
 29. 정혁상 등. 防己가 백서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈손상에 미치는 보호효과. 대한한의학회지. 2001;22(1):10-21.
 30. Im HI et al. Baicalein Prevents 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Dysfunction and Lipid Peroxidation in Mice. *J Pharmacol Sci.* 2005;98:185-189.
 31. 정성욱, 장규태, 김장현. 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에서 祛風至寶丹의 뇌손상 및 인지기능 보호효과. 대한한의학회지. 2005;26(2):52-62.
 32. 이민정 등. 黃連解毒湯의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):161-168.
 33. Cho EH, Kwon JN, Kim YG. Neuroprotective Effect of HyulBuChookau-Tang on Focal Cerebral Ischemia of the Rats. *J Korean Oriental Med.* 2006;27(2):70-85.
 34. 강봉주, 홍성길, 조동욱. MPP+와 6-OHDA에 대한 한약탕제의 보호효과 연구. 한국한의학연구원논문집. 1999;5(1):119-131.
 35. 박진성, 강형원, 유영수. 생체의 알츠하이머병 실험 모델에서 星香正氣散 加蒲公英의 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):157-171.
 36. 민헌기. 임상내분비학. 서울:고려의학. 1990;337-345.
 37. 민성기. 최신정신의학. 서울:일조각. 1998;18-33, 199-202, 238-245, 258-259, 380.
 38. 신문균. 신경해부학. 서울:현문사. 1992;45-46.
 39. Shankar JC, Julie K. Andeson. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2005;37:942-946.
 40. 조광훈, 정대규. 歸脾湯과 二神交濟丹이 拘束스트레스 생쥐의 腦部位別 Mono-amines 함량에 미치는 영향. 동의경산한의학 학술대회. 2001;5:46-61.
 41. 류재규, 황의완. 歸脾湯과 Ascorbic Acid가 熱 및 游泳 Stress Guinea Pig의 뇌 Catecholamine 함량에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):41-49.
 42. 송필정, 정대규. 養心湯 및 養心湯加柿葉이 拘束Stress 흰쥐의 腦部位別 Catecholamine 함량에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1997;8(1):49-68.
 43. 김성호, 이상용. 淸肝逍遙散의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):61-68.
 44. Gonzalez MM, Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *PNAS.* 2008;105(12):4898-4903.
 45. 이정호, 정대규. 逍遙散과 淸肝逍遙散이 스트레스 생쥐의 腦部位別 Monoamines 함량에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):1-14.
 46. 홍성유, 박선동. 시호가 우울증 모델 白鼠의 catecholamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):245-253.

47. Berg JA, Larson CA, Pasvogel AE. Menopausal symptom perception and severity: results from a screening questionnaire. *J Clin Nurs*. 2008;17(7):940-948.
48. 정선형 등. 갱년기 장애의 심한 근골격계 통증을 생활사건 스트레스와 연관지어 고찰한 치험1례. *대한한방부인과학회지*. 2008;21(2):252-262.
49. 陳柱木 刁 註釋. 金元四大家 醫學全書(下). 서울:法仁文化社. 2007;328-329.
50. 李梴. 編註醫學入門. 서울:南山堂. 1988;336-337.
51. 黃義完. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1987;608-611.
52. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울:高文社. 1990;60-62.
53. Nishizawa M et al. Non-reductive scavenging of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. *Chem Pharm Bull*. 2005;53(6):714-716.
54. Re R et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-1237.
55. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arc Biochem and Biophysics*. 2008;476:107-112.
56. Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 1994;59(2):401-415.
57. Wu Y et al. Unlike MPP+, apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells is independent of mitochondrial inhibition. *Neuroscience Letters*. 1996;221:69-71.
58. Singh S et al. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res* 124. 2006;10:419-426.
59. Hanrott K et al. 6-Hydroxydopamine-induced Apoptosis is mediated via Extracellular auto-Oxidation and Caspase 3-dependent Activation of Protein Kinase Cdelta. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2006;281(9):5373-5382.
60. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol*. 2008;115(4):385-398.
61. Mosley RL et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clin Neurosci Res*. 2006;6(5):261-281.
62. Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British Journal Pharmacology*. 2007;150:963-976.