

Dopamine에 의해 산화적 스트레스를 받은 Neuronal Cell에 뇌 보호 효과를 가지는 수종 생약추출물의 검색

구 역 · 이학주¹ · 이동호² · 이현정¹ · 함아름 · 미응천*
서울대학교 약학대학 천연물과학연구소, ¹국립산림과학원, ²고려대학교 생명과학대학

Neuroprotective Effects of Some Plant Extracts Against Dopamine-induced Oxidative Stress on Neuronal Cell

Uk Koo, Hak-Ju Lee, Dong Ho Lee, Hyun-Jung Lee, Ah-Rom Ham and Woongchon Mar*

Natural Product Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

²College of Life sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract – Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. Neuro-pathologically, PD is characterized by the selective loss of dopaminergic neurons. The neuronal toxicity of cytosolic excess dopamine (DA) has been described in many studies using several cell lines. In dopaminergic neurons, cytosolic excess DA is easily oxidized via monoamine oxidase (MAO)-B, tyrosinase or by auto-oxidation to produce neurotoxic metabolites such as DA quinone. So, in the present study, we induced cell death by treatment of DA (600 μ M) in human neuroblastoma SH-SY5Y cell which was treated samples before 24 hr, and cell viability was measured by fluorescence activated cell sorter (FACs) analysis. Of those tested, the extracts of *Poria cocos* (赤茯苓)(whole), *Gastrodia elata* (rhizomes), *Eucommia ulmoides* (炒)(barks), *Syneilesis palmata* (whole), *Acorus gramineus* (rhizomes), *Ligustrum japonicum* (leaves) showed neuroprotective effects in dose dependent manner.

Key words – Dopamine, Neuroprotective effects, FACs analysis, EC₅₀

파킨슨병은 뇌의 흑질(substantia nigra)부위에 분포하는 dopamine(DA)의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며, 이로 인한 운동신경 피질의 자극이 감소되어 경직, 운동완만(운동느림), 정지 시 떨림, 굽은 자세와 같은 증상들을 특징으로 하는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환이다. 심각한 인식 장애와 미약한 언어 장애도 발생하는데 만성적이고 진행적이다.

특히 최근 연구에서 뇌 시냅스에 존재하는 효소 결합이나 다른 여러 가지 이유에 의해서 신경 전달물질인 DA이 dopaminergic신경 세포질에 과도하게 축적되면서 신경 독성을 나타내게 된다고 보고 되고 있다.¹⁾ 과도한 양의 DA는 dopaminergic신경 세포에서 Monoamine oxidase (MAO)-B, Tyrosinase 또는 자가 산화에 의해서 신경 독성 대사물질인

DA quinone 을 생성하게 된다.²⁾ DA quinone은 dopaminergic 신경 세포에 직접 산화적 스트레스로 작용하거나, 파킨슨병과 관련이 있는 여러 중요한 단백질들 (tyrosine hydroxylase, α -synuclein, parkin 과 DA transporter 등)과 결합하여 quinoprotein 을 형성하여 결과적으로 그 단백질들의 기능을 억제³⁻⁸⁾하기 때문에 이 DA quinone이 파킨슨병의 중요한 병인의 하나로 여겨지고 있다.

이러한 배경 하에 본 실험실에서는 dopaminergic신경 세포에 과도한 DA의 산화로 인한 파킨슨병에 보호 효과를 가지는 우수한 천연 자원을 탐색하여 보고자 neuronal cell death의 모델로 널리 사용되는 human SH-SY5Y neuroblastoma cell을 이용하였으며 과도한 DA을 처리하여 cell death를 일으켰다. 그리고 다양한 생약 추출물들을 대상 시료로 하여 DA 처리 24시간 전에 human SH-SY5Y neuroblastoma cell에 처리함으로써 각 시료들의 neuroprotective effects를 FACs analysis를 통해 확인하였다. 또한 부위별로 성분 차

*교신저자(E-mail): mars@snu.ac.kr
(Tel): 82-2-880-2473

이가 많이 나는 생약 추출물들은 부위별로 추출하여 각 부위별 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

생약의 추출 및 시료 조제 - 실험에 사용된 생약시료들은 한국식물추출물은행에서 MeOH 추출물로 구입하여 한국 식물 추출물 은행의 정확한 감정을 거친 후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 자생 식물 사업단에 보관되어 있다.

Cell culture - 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 (Sigma-Aldrich, cat.# D2902, USA) 배지 하에서 배양하였다. Incubator는 37°C 온도를 유지했고 5% CO₂가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건을 갖추었다. 세포는 6-well plate에 3.0×10⁵ cells/well로 배양하였다.

시료의 전처리 - 시료는 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 µg/ml의 농도 별로 DA 600 µM (Sigma-Aldrich, cat.# H8502, USA) 처리 24시간 전에 선행 처리하였으며 각 추출물 시료들의 효과는 EC₅₀ 값을 지표로 하여 비교 관찰하였다. 그리고 양성 대조군은 파킨슨병 치료제로 널리 보고된 Apomorphine^{9,12}으로 선정하여 각 시료들의 EC₅₀ 값과 비교하여 neuroprotective effects를 비교하였다. 시료 및 Apomorphine은 10% dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, cat.# D5879, USA)에 녹였으며 처리한 DMSO의 최종 농도는 0.5%가 되게 하였다.

SH-SY5Y Cell의 DA 농도 별 cell viability - 6-well plate에 3.0×10⁵ cells/well로 배양한 뒤 48시간 후 SH-SY5Y cell에 DA를 각각 200, 400, 600, 800, 1000 µM의 농도로 처리하였다. DA처리 24시간 후 FACs analysis를 통해 농도 별 세포의 apoptosis율을 측정하였고 cell viability(%)는 100(%) - apoptosis율(%)로 나타냈다. DA 농도는 위 실험 결과를 토대로 cell viability 값이 44.17%를 나타냈던 600 µM (24 hr)로 결정하였다(Fig. 1).

FACs analysis - 세포 apoptosis율을 측정하기 위해 채취한 세포를 PBS로 3회 세척한 후 차가운 70% 에탄올로 -20°C에서 24시간 고정시켰다. 이를 1000 rpm에서 5분간 원심 분리 하고 PBS로 씻어 준 후, 40 µg/ml의 Propidium Iodide (PI, Sigma-Aldrich, USA)로 암실에서 30분간 염색 하고 유세포 분석기 (FACS, Coulter EPICS XL, USA)로 세포 apoptosis율을 측정하였다. Apoptosis가 일어난 세포는 PI 염색 강도가 감소하여 일반세포와 비교할 수 있다. 모든 시료는 duplicate로 측정하여 평균값을 산출하였고 cell viability(%)는 100(%) - 세포 apoptosis율(%)로 나타냈다.

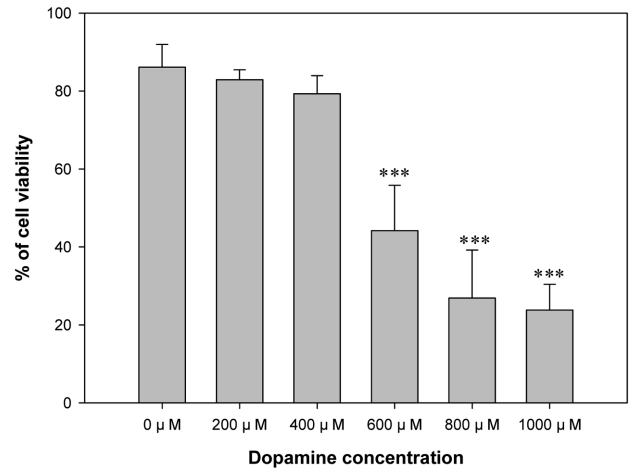


Fig. 1. Cells were treated with 0, 200, 400, 600, 800, 1000 µM DA for 24 hr. Cell viability was determined by the FACs analysis. The values are mean±S.E. of three independent experiments. ****P*<0.001 vs the control group.

Cell viability로부터 EC₅₀(The term half maximal effective concentration)의 값을 table curve 프로그램을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

천마(*Gastrodia elata*)등 24종 45가지의 생약과 부위별 성분 차이가 많이 나는 종의 각 부위별 MeOH 추출물을 대상으로 하였으며, 몇몇 시료들은 한방 원리에 의해 약효가 달라지는 심을 제거한 걸쭉질(거심)을 사용하거나, 볶아서 사용하거나(초), 다른 시료들(음간)과 달리 햇볕건조, 또는 술에 담근 후 말려서 볶는(주초)등의 방법으로 각각의 효과를 알아보았다. 이들 각각의 시료가 과도한 DA에 의해 손상을 입은 human SH-SY5Y neuroblastoma cell에서 갖는 뇌 보호 효과는 EC₅₀값을 지표로 하여 비교해 보았다. 각 생약시료 및 Apomorphine을 각각 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 µg/ml의 농도로 cell viability를 test한 결과 6가지의 추출물에서 농도 구배에 맞게 효과를 보여 Human SH-SY5Y Neuro-blastoma cell에 과도한 DA으로 유도되는 손상에 대한 보호 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 양성 대조군으로는 pure compound인 Apomorphine을 사용하였으며 EC₅₀값은 4.3 µg/ml가 나왔다. 이러한 연구 결과를 토대로 현재 본 연구실에서는 보호 효과를 보인 적복령(*Poria cocos*) (whole), 천마(*Gastrodia elata*) (rhizomes), 두충(*Eucommia ulmoides*) (초)(barks), 우산나물(*Syneilesis palmate*) (whole), 석창포(*Acorus gramineus*) (rhizomes), 광나무(*Ligustrum japonicum*) (leaves)등의 생약시료 추출물 중

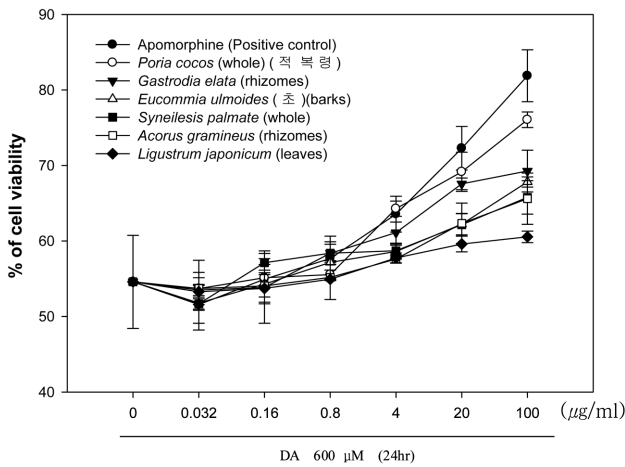


Fig. 2. Neuroprotective effects of six plant extracts and apomorphine on DA-induced cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Cell viability was determined by the FACs analysis. The values are mean±S.E. of two independent experiments.

이미 6-hydroxydopamine 에 의해 산화적 스트레스를 받은 human SH-SY5Y neuroblastoma cell 에서의 neuroprotective effect가 입증된 광나무(*Ligustrum japonicum*) (leaves)¹³⁾를 제외한 각 생약시료의 세부 분획 추출물에 대한 효과를 연구 중에 있다. 위 시료들이 추출물 상태임을 감안하면 앞으로의 세부 분획물의 효과 연구에서는 양성대조군 Apomorphine의 EC₅₀값인 4.3 μg /ml보다 낮은 농도에서 EC₅₀값의 효과를 볼 것으로 기대된다. 또한 본 연구실에서 선행 연구를 통해 동물모델에서 효과가 입증된 시료 농도인, 10 μg/ml 보다 낮은 농도에서 EC₅₀ 값의 효과를 보여준 생약시료들은 동물모델에서의 효과가 있을 것으로 예상 되어 파킨슨병의 동물 모델로 널리 쓰이는^{14,16)} 6-hydroxydopamine으로 유도된 rat 동물모델에도 적용하고자 한다.

이 중 두충(*Eucommia ulmoides*) (barks)은 볶아서 사용한 초에서 효과를 보여, 앞으로 볶아서 사용한 경우와 그렇지 않은 경우의 세부 분획물의 성분 차이나 볶은 후의 독성 감소등과 관련된 세부 실험을 진행할 예정이다. 그리고 석창포(*Acorus gramineus*)는 항 우울효과¹⁷⁾, NMDA receptor 관련 neuroprotective 효과¹⁸⁾와 excitotoxic neuronal death 억제 효과¹⁹⁾ 등이 보고 되고 있어 향후 항우울제, 알츠하이머병, 파킨슨병 등 여러 뇌신경 관련 질환 에 효과적인 치료제로 활용할 수 있을 것으로 본다. 그래서 본 연구소에서는 석창포(*Acorus gramineus*)의 세부 분획 추출물에 대한 효과를 연구 중에 있으며 파킨슨병 동물모델에서의 효과 또한 연구 중에 있다.

Table I. Neuroprotective effects of some plant extracts on SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Data shown in the table are EC₅₀ (The term half maximal effective concentration)

| Scientific name | Family name | Part used | Habitat | EC ₅₀ (μg/ml) |
|--|---------------|-----------|---------|--------------------------|
| Positive Control (Apomorphine) | | | | 4.3 |
| 진득찰 (<i>Siegesbeckia glabrescens</i>) | Compositae | whole | Korea | >100 |
| 우산나물 (<i>Syneilesis palmate</i>) | Compositae | whole | Korea | 14.0 |
| 왕대 (<i>Phyllostachys bambusoides</i>) | Gramineae | leaves | Korea | >100 |
| 왕대 (<i>Phyllostachys bambusoides</i>) | Gramineae | stems | Korea | >100 |
| 석잠풀 (<i>Stachys riederi var. japonica</i>) | Labiatae | whole | China | >100 |
| 광나무 (<i>Ligustrum japonicum</i>) | Oleaceae | leaves | Korea | 56.4 |
| 예덕나무 (<i>Mallotus japonicus</i>) | Euphorbiaceae | leaves | Korea | >100 |
| 예덕나무 (<i>Mallotus japonicus</i>) | Euphorbiaceae | stems | Korea | >100 |
| 산겨릅나무 (<i>Acer tegmentosum</i>) | Aceraceae | leaves | Korea | >100 |
| 산겨릅나무 (<i>Acer tegmentosum</i>) | Aceraceae | stems | Korea | >100 |
| 귀룽나무 (<i>Prunus padus</i>) | Rosaceae | whole | Korea | >100 |
| 천궁 (<i>Cnidium officinale</i>) | Umbelliferae | rhizomes | Japan | >100 |
| 천궁 (<i>Cnidium officinale</i>) | Umbelliferae | rhizomes | Korea | >100 |
| 천궁 (<i>Cnidium officinale</i>) | Umbelliferae | rhizomes | China | >100 |
| 당귀 (<i>Angelica sinensis</i>) | Umbelliferae | roots | China | >100 |
| 당귀 (<i>Angelica sinensis</i>) (주근) | Umbelliferae | roots | China | >100 |
| 참당귀 (<i>Angelica gigas</i>) | Umbelliferae | roots | Korea | >100 |
| 참당귀 (<i>Angelica gigas</i>) (당귀미) | Umbelliferae | roots | Korea | >100 |

Table I. Continued

| Scientific name | Family name | Part used | Habitat | EC ₅₀ (μg/ml) |
|--|---------------|-----------|---------|--------------------------|
| 백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) | Ranunculaceae | roots | Korea | >100 |
| 백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (주초) | Ranunculaceae | roots | Korea | >100 |
| 백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (초) | Ranunculaceae | roots | China | >100 |
| 백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (햇별건조) | Ranunculaceae | roots | Korea | >100 |
| 백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) | Ranunculaceae | roots | China | >100 |
| 으아리 (<i>Clematis mandshurica</i>) | Ranunculaceae | roots | China | >100 |
| 천마 (<i>Gastrodia elata</i>) | Orchidaceae | rhizomes | China | 9.4 |
| 복령 (<i>Poria cocos</i>) | Polyporaceae | barks | China | >100 |
| 복령 (<i>Poria cocos</i>) | Polyporaceae | whole | China | >100 |
| 적복령 (<i>Poria cocos</i>) | Polyporaceae | whole | China | 7.6 |
| 원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) (거심) | Polygalaceae | roots | China | >100 |
| 원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) | Polygalaceae | roots | China | >100 |
| 원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) (거심,초) | Polygalaceae | roots | China | >100 |
| 원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) | Polygalaceae | roots | Korea | >100 |
| 백선피 (<i>Dictamnus dasycarpus</i>) | Rutaceae | barks | China | >100 |
| 비수리 (<i>Lespedeza cuneata</i>) | Leguminosae | whole | Korea | >100 |
| 고본 (<i>Ligusticum sinense</i>) | Umbelliferae | roots | China | >100 |
| 고본 (<i>Angelica tenuissima</i>) | Umbelliferae | roots | Korea | >100 |
| 두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) | Eucommiaceae | barks | Korea | >100 |

Table I. Continued

| Scientific name | Family name | Part used | Habitat | EC ₅₀ (μg/ml) |
|--|---------------|-----------|---------|--------------------------|
| 두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) | Eucommiaceae | leaves | Korea | >100 |
| 두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) | Eucommiaceae | branches | Korea | >100 |
| 두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) (초) | Eucommiaceae | barks | Korea | 11.02 |
| 까마귀밥나무 (<i>Ribes fasciculatum</i> var. <i>Chinense</i>) | Saxifragaceae | stems | Korea | >100 |
| 은행나무 (<i>Ginkgo biloba</i>) | Gingkoaceae | roots | Korea | >100 |
| 석창포 (<i>Acorus gramineus</i>) | Araceae | rhizomes | China | 36.6 |
| 참취 (<i>Aster scaber</i>) | Compositae | whole | Korea | >100 |
| 할미꽃 (<i>Pulsatilla koreana</i>) | Ranunculaceae | whole | Korea | >100 |

결 론

천마(*Gastrodia elata*) 등 24종의 생약과 부위별 성분 차이가 많이 나는 종의 각 부위별 MeOH 추출물을 대상으로, 이들 시료가 각각의 농도 별로 과도한 DA에 의해 손상을 입은 neuronal cell에서 갖는 neuroprotective effects를 cell viability를 지표로 검색한 결과, 적복령(*Poria cocos*) (whole), 천마(*Gastrodia elata*) (rhizomes), 두충(*Eucommia ulmoides*) (초)(barks), 우산나물(*Syneilesis palmate*) (whole), 석창포(*Acorus gramineus*) (rhizomes), 광나무(*Ligustrum japonicum*) (leaves) 등 6가지 생약 추출물들이 농도 구배에 맞게 효과를 보여 주어 향후 파킨슨병 치료제 개발을 위한 후보물질로 제시될 가능성을 보여주었다.

사 사

본 연구는 국립 산림 과학원의 연구비 지원(FP0702-2008-01)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Junn, E. and Mouradian, M. M. (2001) Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38

- mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J Neurochem* **78**: 374-383.
2. Sulzer, D. and Zecca, L. (2000) Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res* **1**: 181-195.
 3. Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and Murata, M. (2008) Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosci Res* **60**: 106-113.
 4. Ben-Shachar, D., Zuk, R. and Glinka, Y. (1995) Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem* **64**: 718-723.
 5. Cavalieri, E. L., Li, K. M., Balu, N., Saeed, M., Devanesan, P., Higginbotham, S., Zhao, J., Gross, M. L. and Rogan, E. G. (2002) Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis* **23**: 1071-1077.
 6. Smythies, J. and Galzigna, L. (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta* **1380**: 159-162.
 7. Stokes, A. H., Hastings, T. G and Vrana, K. E. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* **55**: 659-665.
 8. Xu, Y., Stokes, A. H., Roskoski, R., Jr. and Vrana, K. E. (1998) Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J Neurosci Res* **54**: 691-697.
 9. Deffond, D., Durif, F. and Toumilhac, M. (1993) Apomorphine in treatment of Parkinson's disease: comparison between subcutaneous and sublingual routes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **56**: 101-103.
 10. Turjanski, N. and Lees, A. J. (1990) Apomorphine in the treatment of Parkinson's disease. *Medicina (B Aires)* **50**: 365-368.
 11. Castaigne, P., Laplane, D. and Dordain, G. (1971) Clinical experimentation with apomorphine in Parkinson's disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **2**: 154-158.
 12. Poewe, W., Kleedorfer, B., Gerstenbrand, F. and Oertel, W. (1988) Subcutaneous apomorphine in Parkinson's disease. *Lancet* **1**: 943.
 13. Sung, S. H., Kim, E. S., Lee, K. Y., Lee, M. K. and Kim, Y. C. (2006) A new neuroprotective compound of *Ligustrum japonicum* leaves. *Planta Med* **72**: 62-64.
 14. Silvestrin, R. B., de Oliveira, L. F., Batassini, C., Oliveira, A. and E. Souza TM (2008) The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*.
 15. Jin, F., Wu, Q., Lu, Y. F., Gong, Q. H. and Shi, J. S. (2008) Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* **600**: 78-82.
 16. Morris, J. K., Zhang, H., Gupte, A. A., Bomhoff, G L., Stanford, J. A. and Geiger, P. C. (2008) Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1240**: 185-195.
 17. Tao, G., Irie, Y., Li, D. J. and Keung, W. M. (2005) Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorg Med Chem* **13**: 4777-4788.
 18. Cho, J., Kong, J. Y., Jeong, D. Y., Lee, K. D., Lee, D. U. and Kang, B. S. (2001) NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci* **68**: 1567-1573
 19. Cho, J., Joo, N. E., Kong, J. Y., Jeong, D. Y., Lee, K. D. and Kang, B. S. (2000) Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J Ethnopharmacol* **73**: 31-37.

(2009년 2월 5일)