

돌외 에탄올 추출물 엑스가 6-hydroxydopamine-유도 파킨슨병 백서 모델에서의 L-DOPA 요법에 미치는 영향

서광훈 · 최현숙 · 신건성 · 황방연 · 이명구*
충북대학교 약학대학

Neuroprotective Effects of Herbal Ethanol Extracts from *Gynostemma pentaphyllum* on L-DOPA Therapy in 6-hydroxydopamine-lesioned Rat Model of Parkinson's Disease

Kwang Hoon Suh, Hyun Sook Choi, Keon Seong Shin, Bang Yeon Hwang and Myung Koo Lee*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, 52, Naesudong-ro, Heungduk-gu, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – The neuroprotective effects of herbal ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* (GP-EX) in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA were investigated. Rats were prepared for the Parkinson's disease model by 6-OHDA-lesioning for 14 days. The rats were then treated with L-DOPA (10 and 20 mg/kg) with or without the oral administration of GP-EX (30 mg/kg, daily) for 28 days. L-DOPA (20 mg/kg) treatment for 28 days enhanced dopaminergic neuronal cell death in 6-OHDA-lesioned rat groups, but L-DOPA (10 mg/kg) did not. However, the oral administration of GP-EX (30 mg/kg) for 28 days ameliorated the enhanced neurotoxic effects induced by chronic L-DOPA treatment in 6-OHDA-lesioned rat groups by increasing tyrosine hydroxylase (TH)-immunohistochemical staining and the number of TH-immunopositive cells surviving in the substantia nigra. In addition, GP-EX administration (30 mg/kg) for 28 days recovered the levels of dopamine and norepinephrine of the striatum in 6-OHDA-lesioned rat groups, which were markedly reduced by L-DOPA treatment (20 mg/kg). GP-EX (30 mg/kg) did not produce any signs of toxicity, such as weight loss, diarrhea, or vomiting in rats during the 28-day treatment period. These results suggest that GP-EX has protective functions against chronic L-DOPA-induced neurotoxic reactions in dopaminergic neurons in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. Therefore, GP-EX may be beneficial in the prevention of adverse symptoms in parkinsonian patients.

Key words – *Gynostemma pentaphyllum*, Dopamine, Tyrosine hydroxylase, 6-Hydroxydopamine-lesioned rats, L-DOPA therapy

파킨슨병(Parkinson's disease)은 기저핵내 선조체(striatum)-흑질(substantia nigra) 부위의 dopamine 신경계(dopaminergic neuron)의 퇴행에 의하여 증상이 나타나며, 주요 증상으로는 진전, 서동, 경직 등의 운동장애와 질환이 진행되는 경우 정신이상, 불안, 우울증, 노인성 치매 등의 증상을 나타낸다. Dopamine 신경계 퇴행의 주요 원인으로는 유전인자(α -synuclein, parkin, PINK1 등) 및 환경인자(신경독성 물질)에 의한 dopamine 신경세포사 등이 보고되고 있으며,^{1,2)} dopamine 신경세포사에 의하여 dopamine 함량 감소와 dopamine 생합성 효소 tyrosine hydroxylase(TH, EC 1.14.16.2)

및 aromatic L-amino acid decarboxylase의 활성 감소가 동반된다.^{3,4)}

파킨슨병의 증상완화 또는 치료에는 dopamine의 전구체인 L-DOPA 요법이 가장 많이 선택되고 있다. 그러나 장기간의 L-DOPA 요법에 의하여 파킨슨병 환자는 혈액 및 뇌 중의 L-DOPA, dopamine, norepinephrine 및 dopamine 대사체(DOPAC, HVA) 등이 증가하며, 과량의 L-DOPA, dopamine 및 대사체의 축적은 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 및 quinone 화합물을 생성하여,⁵⁾ 산화스트레스(oxidative stress)-유도 신경독성/신경세포사(apoptosis)를 일으킨다.^{6,7)} 그러므로 파킨슨병 치료제의 개발을 위해 dopamine 신경계의 활성화 및 효능증가 유도 제제, 항산화

*교신저자(E-mail): myklee@chungbuk.ac.kr
(Tel): +82-43-276-2754

제, 항염증제, 신경증식-유도 제제 등의 연구가 보고되고 있으나,⁸⁾ 임상응용은 아직 이루어 지지 않고 있다. 또한, 장기간 L-DOPA 요법에 따른 신경독성의 부작용으로부터 신경세포사를 방지·지연시키는 산화스트레스 제어작용의 신경세포 보호 제제/보조 요법에 대한 연구가 진행되고 있다.^{8,9)}

돌의(*Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Gynostemmae* Herba, GP)는 다년생 식물로 국내 및 아시아 지역에 분포되어 있다. GP의 주성분은 gypenosides 화합물, flavonoids 등을 함유하고 있다.¹⁰⁾ GP는 엑스(ethanol 또는 수침 엑스) 및 gypenosides를 사용하여 다양한 생리활성이 연구되었으며 중국에서는 콜레스테롤 저하 작용 제제로 시판되고 있다.¹⁰⁾

최근 저자들은 GP의 ethanol 엑스(GP-EX)가 동물모델을 이용하여 만성 스트레스에 의한 체중저하, 면역기능 저하, 불안-우울 증상 등에 대한 개선작용을 보고하였다.¹¹⁻¹³⁾ 또한, GP-EX는 백서 뇌실의 6-hydroxydopamine(6-OHDA) 투여에 의한 선조체-흑질의 dopamine 신경세포 독성에 대한 방어작용을 나타내고 있음을 보고하였다.¹⁴⁾ 이는 GP-EX가 산화스트레스-유도 dopamine 신경세포의 퇴행을 예방하는 효능이 있음을 나타내고 있다.

6-OHDA는 산화제의 존재하에 비효소학적으로 dopamine 으로부터 생합성되며,¹⁵⁾ 선택적으로 dopamine 신경세포사를 유도하는 신경독성물질로서, 파킨슨병의 실험동물(백서 및 생쥐) 모델의 작성에 응용되고 있다.¹⁶⁾

따라서 본 연구에서는 GP-EX의 파킨슨병 치료 중에 증상 개선 효능을 검토하기 위하여, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델을 작성하고 파킨슨병 증상발현 중에 장기간 L-DOPA 단독요법 및 L-DOPA와 GP-EX와의 병용 투여요법을 시행하여, L-DOPA 요법에 의한 치료효능 및 독성작용에 대한 GP-EX의 세포독성 방어 효능을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 - GP는 원광식품(경남 거창군 남상면 둔동리)에서 구입하여 품종을 확인하였다(표준품 보관: 충북대학교 약학대학 생약학교실). GP의 잎(leaves, 10 kg) 부위를 채취하여 음건한 후 세절한 다음 ethanol(80%)로 추출하고 증발 농축하여 시료로 사용하였다(GP-EX, 0.96 kg). L-DOPA, dopamine, isoproterenol, 6-ODHA, apomorphine hydrochloride, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, EDTA-Na, ascorbic acid 등의 시약은 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. TH 항체는 Chemicon International(Temecula, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG vectastain(avidin/biotin complex)(ABC) 키트 및 vectastain diaminobenzidine(DAB) 키트는 Vector Laboratories(Burlingame, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다. 실험동물은 백서(Sprague-Dawley, 웅성, 250-280 g, Samtaco

Co, 수원)를 사용하였으며, 주야 주기 12 시간, 온도 23±2°C의 조건하에서 사육하였다.

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델의 작성 - 파킨슨병 동물모델은 뇌실부위에 6-OHDA를 투여하여 작성하였다.¹⁶⁾ 간략히 기술하면, 실험동물을 마취한 다음(Zoletil 50 사용, 100 mg/kg, i.p., Vibac, Carros, France), 뇌경위 수술기구(Stereotaxic apparatus, KOPF instrument, 미국)를 사용하여 동물을 고정된 후, 한쪽 부위의 흑질 치밀부위에 6-OHDA (8 µg/2 µl, 1 µl/min)를 투여하였다(위치: bregma에서 앞 -5.3 mm, 중앙선에서 +1.9 mm 옆, 경막에서 -7.5 mm 깊이).¹⁷⁾ 모델작성의 확인(hemi-parkinsonism)은 6-OHDA 투여 2 주 후에 apomorphine(0.5 mg/kg, s.c.)을 투여하여 회전운동을 평가하였다(1분에 4 회 이상의 회전 운동).¹⁸⁾

실험동물의 GP-EX 투여 - 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에 대한 L-DOPA 및 GP-EX의 투여는 모델 작성(6-OHDA 투여 2 주 후) 후에 1일 1회, 4 주 동안 투여 하였다. L-DOPA(10 mg/kg 및 20 mg/kg, i.p.)는 benserazide (15 mg/kg, i.p.)와 병용 투여하였으며 실험에 사용된 그룹은 다음과 같다. 그룹 A, ascorbic acid(0.1%-함유 생리식염수 투여군; 그룹 B, 6-OHDA 투여군(6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델); 그룹 C, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 + L-DOPA(10 mg/kg) 투여군; 그룹 D, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 + L-DOPA(20 mg/kg) 투여군; 그룹 E, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 + L-DOPA(10 mg/kg) 투여군 + GP-EX(30 mg/kg) 투여군; 그룹 F, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 + L-DOPA(20 mg/kg) 투여군 + GP-EX(30 mg/kg) 투여군.

TH-면역조직화학(TH-immunohistochemistry) 염색 - 실험동물에 6-OHDA를 뇌실 투여한 다음 4주 후에 좌심실을 통한 관류고정(4% paraformaldehyde/50 mM phosphate 완충용액)을 시행한 다음 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에서 24 시간 고정 하였다. 고정된 뇌 조직을 30% sucrose/PBS 용액/isobutane을 이용하여 동결박편을 제조하여 저온 보관하였다(두께 35 µm; Cryostat, Leica, Nuolch, Germany). TH-면역조직화학 염색은 일차 TH 항체(rabbit anti-TH antibody, 1:1000)와 반응시킨 다음 세척하고, 이차 항체와 1 시간 실온에서 배양하고 세척한 후에 ABC 및 DAB kit를 사용하여 발색시킨 다음 탈수반응과 xylene 투명화 반응 후에 polymount로 봉입하여 관찰하였다. 흑질 치밀부위의 TH-면역조직화학의 염색성 측정은 광학현미경(x 200 배, Zeiss Axiolab, Jena, Germany)을 사용하여 측정하였고, TH-면역양성 신경세포(TH-immunopositive cell)(dopamine 신경세포)의 수는 흑질에서 일정면적 내의 염색 세포수를 계수하여 시행하였다.^{16,18)}

Dopamine 및 norepinephrine의 함량 측정 - 뇌의 시료(선조체-흑질 부위) 중의 dopamine 및 norepinephrine 함량은

HPLC 방법을 이용하여 측정하였다.^{14,19)} 시료에 trichloroacetic acid(3.0 M, 100 μ l) 및 isoproterenol(1 nmol/ml, 100 μ l, 내부표준)을 가한 다음 원심 분리하였다. 상등액을 Toyopak SP 카트리지(Toso, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리한 후, 흡착된 아민화합물은 0.6 M KCl-acetonitrile(1:1, v/v, 2 ml) 혼합액을 사용하여 용출시켰다. 용출액에 DPE 시약을 가하여 형광 유도체화한 다음 최종 반응액을 HPLC에 주입하여 dopamine 함량을 측정하였다. HPLC의 조건: column, TSK gel ODS 120T(5 μ m, 0.45 \times 25 cm, Toso); 이동상, acetonitrile-methanol-0.1 M NaOAc 완충액(pH 5.0) (50:5:45, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, RF-10AXL 형광검출기(Ex. 350 nm, Em. 475 nm, Shimadzu, Kyoto, Japan).

결과정리 - 실험결과는 means \pm S.E.M.으로 표시하였으며 유의성 검정은 Tukey 법에 의한 ANOVA 법에 의하여 계산하였다.

결과 및 고찰

GP-EX는 10-50 mg/kg 농도 범위에서 실험동물에 대하여 체중감소, 구토, 설사, 사망 등의 부작용은 관찰되지 않았으며,^{11,12)} 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 GP-EX 투여 용량은 30 mg/kg으로 설정하였고 실험기간 중에 구토, 설사, 사망 등의 부작용은 나타나지 않았다.

파킨슨병 동물모델의 확인은 6-OHDA 주입 2주 후 apomorphine(0.5 mg/kg, s.c) 투여에 의한 회전운동으로 확인하였으며,¹⁸⁾ 확인된 동물모델을 이용하여 장기간 L-DOPA 투여시에 GP-EX와의 병용투여가 신경세포 보호작용에 미치는 영향을 검색하기 위하여 선조체-흑질 부위의 TH-면역조직화학에 의한 신경세포 염색성 및 TH-면역양성 신경세포수의 측정, dopamine 및 norepinephrine의 함량을 검토하였다.

정상군(6-OHDA 미처치)에서는 TH-면역조직화학 염색에 의한 TH-면역양성 신경세포가 흑질 치밀부(substantia nigra compacta)와 흑질 외측부(substantia nigra lateralis)에서 연속적으로 관찰되었고 TH-면역양성 신경세포는 흑질 망상부(substantia nigra reticulata)에서 그물처럼 엉켜있었으며,²⁰⁾ 생리식염수를 주입한 그룹(대조군)의 흑질 부위에서도 TH-면역양성 신경세포는 정상군에 비하여 감소하지 않았다(Fig. 1A).²⁰⁾ 그러나 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델은 6-OHDA-투여 흑질(substantia nigra reticulata) 부위에서 대조군에 비하여 TH-면역조직화학적 염색성이 현저히 감소하였다(Fig. 1B).²⁰⁾ 또한, TH-면역양성 신경세포의 수는 6-OHDA-유도 동물모델의 흑질 부위(6-OHDA 뇌실투여 동측 부위)에서 유의적으로 감소하여(50.9% 감소, $p < 0.01$)(Fig. 2B), 파킨슨병 증상을 나타내었다. 이 결과는 6-OHDA 투여에 의한 dopamine 신경세포의 파괴로 인하여 TH-발현 신경세포의

활성이 감소되었음을 나타내고 있으며, 이는 6-OHDA 투여가 ROS 생성을 유도하고 선택적으로 흑질-선조체의 dopamine 신경계의 세포사를 유도하기 때문이다.²¹⁾

6-OHDA-유도 동물모델(파킨슨병 증상 발현)에서의 L-DOPA의 투여(10 mg/kg, 4 주간)는 흑질의 TH 면역조직화학 염색성 및 dopamine 신경세포군의 생존률은 L-DOPA 미투여군(Fig. 1B 및 2B)에 비하여 완화하게 증가하는 경향을 나타내었다(12.4% 증가, $p > 0.05$)(Fig. 1C 및 2C). 그러나 파킨슨병 동물모델에 대한 L-DOPA(20 mg/kg, 4 주간)의 투여군은 TH-면역조직화학 염색에 의한 염색성이 감소하였으며(Fig. 1D), TH-면역양성 신경세포가 L-DOPA 미투여군(Fig. 2B)에 비하여 유의적으로 감소하였다(21.3% 감소, $p < 0.05$)(Fig. 2C). 이는 6-OHDA-유도 동물모델에서, 장기간의 L-DOPA 투여가 농도에 따라 신경세포 보호작용 또는 독성-유도작용으로 서로 다르게 나타나지만 파킨슨병의 증상을 악화시킬 수 있음을 제시하고 있다.²²⁾

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법(10 및 20 mg/kg)과 병행하여 GP-EX(30 mg/kg, 4 주간)을 투여하여 GP-EX의 효능을 검색하였다. GP-EX(30 mg/kg) 및 L-DOPA(10 mg/kg)의 병용투여는 L-DOPA 단독 투여에 비하여 TH-면역조직화학 염색성 및 TH-면역양성 세포수가 증가하였으며(10.6% 증가, $p > 0.05$)(Fig. 1E 및 2E),

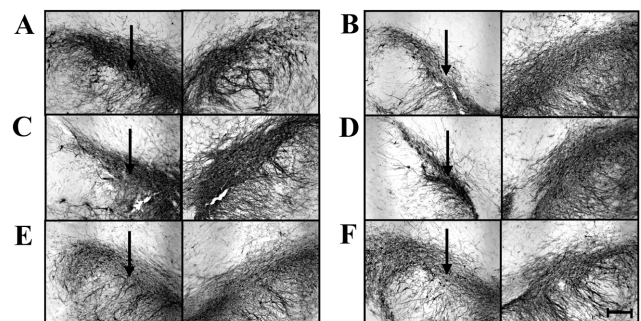


Fig. 1. Photomicrographs of TH immunoreactivity on substantia nigra tissue sections from representative rats of each group. Normal groups (A), 6-OHDA-lesioned groups (B), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) (D), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (E), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (F). Rats were treated with L-DOPA (10 and 20 mg/kg/day, i.p.) and GP-EX (30 mg/kg/day, p.o.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) in 6-OHDA-lesioned rat groups. The data were representative of 7-10 animals per group. The arrow indicates saline-treated side (A) and 6-OHDA-lesioned sides (B-F). Brain tissues were cut and each three serial section was selected and processed for TH-immunohistochemical staining using TH antibody. The pictures were visualized under the light microscope with a magnification of 100 \times and scale bar is 100 μ m.

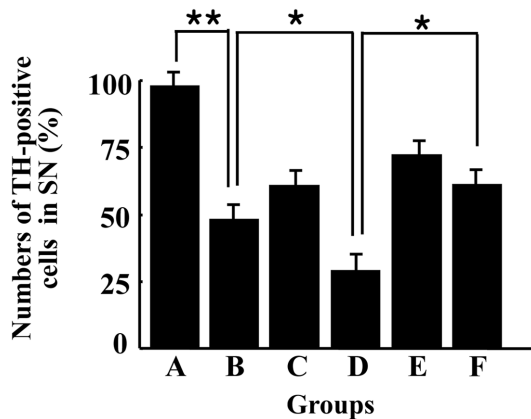


Fig. 2. The numbers of surviving TH-immunopositive cells in the left substantia nigra (SN) (6-OHDA-lesioned side) analyzed as a percentage of that in the right contralateral side (intact side). Normal groups (A), 6-OHDA-lesioned groups (B), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) (D), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (E), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (F). Rats were treated with L-DOPA (10 and 20 mg/kg/day, i.p.), and GP-EX (30 mg/kg/day, p.o.) in 6-OHDA-lesioned rat groups. These data were representative of 7–10 animals per group. TH-immunopositive cells were analyzed as a percentage of each intact side. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to normal groups (ANOVA followed by Tukey's test).

특히 GP-EX(30 mg/kg) 및 L-DOPA(20 mg/kg)의 병용투여 군에서 TH-면역양성 세포수가 현저히 증가하여 dopamine 신경세포의 보호작용을 나타내었다(32.9% 증가, $p < 0.05$)(Fig. 1F 및 2F).

따라서 파킨슨병 동물모델에서 L-DOPA 고용량을 장기간 투여한 군은 TH-발현세포의 염색성이 유의적으로 감소되어 있음을 확인하였다. 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 경우, 혈액 및 뇌중에 dopamine 및 norepinephrine의 함량, dopamine의 대사체인 DOPAC 및 HVA의 함량이 증가하며, L-DOPA/dopamine 또는 대사체 상호간의 축합반응에 의하여 tetrahydropapaveroline 및 salsolinol과 같은 isoquinoline 유도체가 생성되며,^{15,19} 특히 L-DOPA 및 isoquinoline 화합물은 산화스트레스에 의한 신경독성을 나타내고 있다.^{15,19,23} 그러나 GP-EX는 6-OHDA-유도 파킨슨 동물모델에서 L-DOPA 요법에 의하여 나타나는 신경세포 독성에 대한 방어 작용을 나타내고 있으며, 이는 GP-EX의 항산화스트레스 작용에 의한 것으로 사료된다.¹⁴

다음으로 6-OHDA-유도 파킨슨 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법에 의한 TH-면역조직화학 염색성 및 dopamine 신경세포 수의 감소, 이에 대한 GP-EX의 신경세포 보호작용을 검색하기 위하여 선조체-흑질 부위의 dopamine 및 norepinephrine의 함량을 측정하였다. 6-OHDA-유도 파킨슨

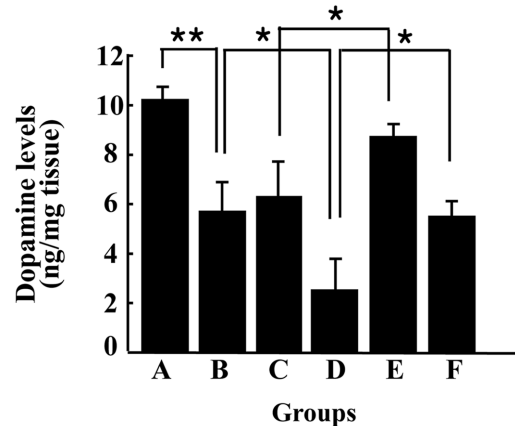


Fig. 3. Effects of GP-EX on the levels of dopamine in the striatum of brain in 6-OHDA-lesioned rats. Normal groups (A), 6-OHDA-lesioned groups (B), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) (D), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (E), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (F) Rats were treated with L-DOPA (10 and 20 mg/kg/day, i.p.) and GP-EX (30 mg/kg/day, p.o.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) in 6-OHDA-lesioned rat groups. After 4 weeks, the brains were removed and the levels of dopamine were determined by an HPLC method. Results represent means±S.E.M. for 7–10 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to normal groups (ANOVA followed by Tukey's test).

병 동물모델의 선조체-흑질 부위의 dopamine 함량은 6-OHDA-처리 부위(동측 부위)에서 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(대조군의 44.2% 함량 감소, $p < 0.01$)(Fig. 3B). 또한, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에 대하여 L-DOPA(10 mg/kg) 투여군에서는 dopamine 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며(5.8% 함량 증가, $p > 0.05$)(Fig. 3C), L-DOPA(20 mg/kg) 투여군은 dopamine 함량이 유의적으로 감소하였다(21.3% 감소, $p < 0.05$)(Fig. 3D). 이는 고농도의 L-DOPA 투여가 TH-발현 신경세포사를 유도하는 것으로 사료된다(Fig. 1D 및 2D). 그러나 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 L-DOPA(10 및 20 mg/kg) 투여기간 중에 GP-EX(30 mg/kg)을 병용투여하는 경우, 선조체-흑질부위의 dopamine 함량은 유의적으로 증가하였다(각각 21.7% 및 32.3% 함량 증가, $p < 0.05$)(Fig. 3E 및 F).

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델의 선조체-흑질 부위에서의 norepinephrine 함량은 대조군에 비하여 감소하였으며(44.5% 함량 감소, $p < 0.01$)(Fig. 4B), 장기간 L-DOPA(10 및 20 mg/kg)의 투여군에서도 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 4C 및 D). 그러나 L-DOPA(10 및 20 mg/kg)와 GP-EX(30 mg/kg)을 병용투여하는 경우, 선조체-흑질 부위의 norepinephrine 함량은 유의적으로 증가하였다(각각 23.1% 및 16.5% 함량 증가, $p < 0.05$)(Fig. 3E 및 F).

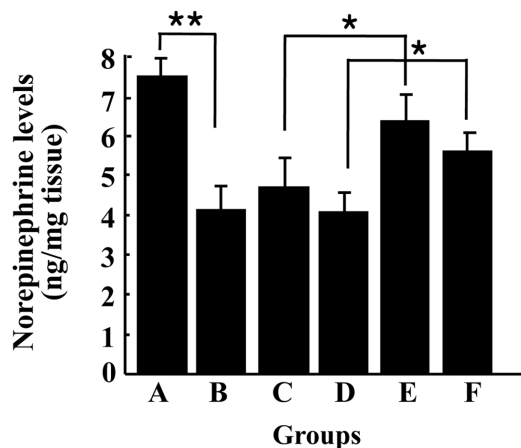


Fig. 4. Effects of GP-EX on the levels of norepinephrine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. Normal groups (A), 6-OHDA-lesioned groups (B), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) (D), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (10 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (E), 6-OHDA-lesioned groups + L-DOPA (20 mg/kg) + GP-EX (30 mg/kg) (F) Rats were treated with L-DOPA (10 and 20 mg/kg/day, i.p.) and GP-EX (30 mg/kg/day, p.o.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) in 6-OHDA-lesioned rat groups. After 4 weeks, the brains were removed and the levels of norepinephrine were determined by an HPLC method. Results represent means±S.E.M. for 7-10 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to normal groups (ANOVA followed by Tukey's test).

MPTP-유도 파킨슨병 동물 모델에서도 6-OHDA는 산화제(Fe^{2+} , H_2O_2)의 존재하에 비효소학적 반응으로 dopamine으로부터 생합성되며 선택적으로 dopamine 신경계의 세포사를 유도하는 신경 독성물질로 작용하고 있다.^{15,24} 또한, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 장기적인 L-DOPA 요법을 시행하는 경우 이상행동 및 dopamine 신경세포에 대한 독성작용을 나타내고 있음이 보고되고 있다.²⁵

6-OHDA를 백서 뇌중에 투여하고 동시에 GP-EX를 2주간 병용 투여하는 경우, 선조체-흑질 부위에서 6-OHDA에 의한 dopamine 신경계의 파괴는 현저히 감소하였다.¹⁴ 본 연구에서는 GP-EX는 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법에 의한 dopamine 신경계의 세포사에 대한 방어작용을 나타내었다. 또한, GP-EX는 만성 스트레스에 의하여 유도되는 불안, 체중감소, 면역기능 감소 등에 대한 개선 작용을 나타내고 있다.¹¹⁻¹³ 그러므로 GP-EX는 파킨슨병의 예방과 장기간 L-DOPA 요법 시행중에 보조요법제로 응용될 수 있음을 제시하고 있다.

GP는 주성분인 gypenosides와 flavonoid 화합물 등을 함유하고 있다.² Gypenosides-함유 분획(25-400 $\mu\text{g/ml}$)은 백서 피질배양세포(cortical cells)에서 glutamate-유도 신경독성에 대한 보호작용을 나타내었으며,²⁶ gypenosides-함유 분

획(100-400 mg/kg)은 MPTP-유도 파킨슨병 동물모델에서 dopamine 신경세포 보호작용을 나타내고 있다.²⁷ 최근 GP의 butanol 분획에서도 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 dopamine 신경세포 보호작용을 나타내었으며, GP-EX 및 butanol 분획으로부터 수종의 gypenoside 화합물(gynosaponin TN-1, gynosaponin TN-2, gypenoside XLV, gypenoside LXXIV) 등을 분리하였으므로 gypenosides 계열 화합물이 주요 생리활성 물질이라고 사료된다(미발표 자료).¹⁴ 그러나 6-OHDA-유도 동물모델에서는 GP-EX의 투여용량(30-50 mg/kg)은 상대적으로 저용량에서 효능이 나타났으며, 이는 천연물 GP의 원산지에 따른 차이를 고려하더라도 gypenosides 화합물 이외에 다른 생리활성 물질이 관여할 수 있음을 제시하고 있으며 이와 관련한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

GP 물추출물의 LD_{50} (mice) 값은 $2.86(\pm 0.3)$ g/kg(i.p.) 이고, 6-750 mg/kg(백서, 24 주간 경구투여) 범위에서 체중감소, 장기변화, 간기능 등의 독성작용을 나타내지 않으며, 축적독성 및 최기형성 독성반응을 유도하지 않는 것으로 보고되고 있다.^{2,28} 또한 GP-EX의 시제품을 제조하여 스트레스에 의한 항불안 개선작용을 위한 임상실험에서 투여용량(400 mg/day, 투여 기간 6 주간)의 범위에서 특이한 부작용을 나타내지 않았다.²⁹

신경퇴행성 뇌신경세포의 보호작용을 나타내는 천연물은 GP 이외에, black tea 추출물, 천연물을 이용한 열다한소탕(yeoldahanso-tang) 등이 보고되고 있다.^{30,31} 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환은 증상의 진행과 약물요법이 장기간에 걸쳐 진행되므로 치료제제 등에 의한 약물상호작용, 신경독성 등이 검증되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 연구결과에 의하면 GP-EX는 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 경우 L-DOPA에 의한 선조체-흑질 dopamine 신경세포의 신경독성에 대한 보호작용을 나타내고 있다. 따라서 GP-EX는 파킨슨병 환자에 대한 증상개선 효능과 L-DOPA 요법의 문제점의 개선에 기여할 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 2011년도 생물건강산업개발연구센터(KIAT, MKE)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Masliyah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A. and Mucke, L. (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* **287**: 1265-1269.

2. Hatano, T., Kubo, S., Sato, S. and Hattori, N. (2009) Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **111**: 1075-1093.
3. Joh, T. H., Park, D. H. and Reis, D. J. (1978) Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4744-4748.
4. Young, E. A., Duchemin, A.-M., Neff, N. H. and Hadji-constantinou, M. (1998) Parallel modulation of striatal dopamine synthetic enzymes by second messenger pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **357**: 15-23.
5. Graham, D. G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* **14**: 633-643.
6. Ziv, I., Zilkha-Falb, R., Offen, D., Shirvan, A., Barzilai, A. and Melamed, E. (1997) Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells: a possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Mov. Disord.* **12**: 17-23.
7. Cheng, N., Maeda, T., Kume, T., Kaneko, S., Kochiyama, H., Akaike, A., Goshima, Y. and Misu, Y. (1996) Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. *Brain Res.* **743**: 278-283.
8. Yacoubian, T. A. and Standaert, D. C. (2009) Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**: 676-687.
9. Bowers, W. J., Howard, D. F. and Federoff, H. J. (1997) Gene therapeutic strategies for neuroprotection: implications for Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **144**: 58-68.
10. Razmovski-Naumovski, V., Huang, T. H. W., Tran, V. H., Li, G. Q., Duke, C. C. and Roufogalis, B. D. (2005) Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem. Review* **4**: 197-210.
11. Choi, H. S., Lim, S. A., Park, M. S., Hwang B. Y., Lee, C. K., Kim, S. H., Lin, S. C. and Lee, M. K. (2008) Ameliorating effects of the ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* on electric footshock stress. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 341-346.
12. Im, S. A., Choi, H. S., Hwang, B. Y., Lee, M. K. and Lee, C. K. (2009) Augmentation of immune responses by oral administration of *Gynostemma pentaphyllum* ethanol extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 35-40.
13. Choi, H. S., Shin, K. S., Choi, S. O., Kim, S. H., Lee, C. K., and Lee, M. K. (2011) Ameliorating effects of herbal ethanol extract from *Gynostemma pentaphyllum* on chronic stress-induced anxiety in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 32-37.
14. Choi, H. S. Park, M. S., Kim, S. H., Hwang, B. Y., Lee, C. K. and Lee, M. K. (2010). Neuroprotective effects of herbal ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Molecules* **15**: 2814-2824.
15. Borah, A. and Mohanakumar, K. P. (2009) Long term L-DOPA treatment causes production of 6-OHDA in the mouse striatum: Involvement of hydroxyl radical. *Ann. Neurosci.* **16**: 160-165.
16. Schober, A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **318**: 215-224.
17. Paxinos, G. and Watson, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed., Academic Press, Australia.
18. Lee, C. S., Sauer, H. and Bjorklund, A. (1996) Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axonterminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience* **72**: 641-653.
19. Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, W. Y., Park, H. D., Kang, M. H., Hong, J. T. and Lee, M. K. (2003) Aggravation of L-DOPA-induced neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 1787-1795.
20. Saurer, H. and Oertel, W.H. (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**(2): 401-415.
21. Sotelo, C., Javoy, F., Agid, T. and Glwinski, J. (1973) Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I. Morphological study. *Brain Res.* **58**: 269-290.
22. Melamed, E., Offen, D., Shirvan, A., Djaldetti, R., Barzilai, A. and Ziv, I. (1998) Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann. Neurol.* **44**: S149-154.
23. Nagatsu, T. (1997). Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease, *Neurosci. Res.* **29**: 99-111.
24. Borah, A. and Mohanakumar, K.P. (2009) L-DOPA-induced 6-hydroxydopamine production in the striata of rodents is sensitive to the degree of denervation. *Neurochem. Int.* **56**: 357-362.
25. Mura, A., Mintz, M. and Feldon, J. (2002) Behavioral and anatomical effects of long-term L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) administration in rats with unilateral lesions of the nigrostriatal system. *Exp. Neurol.* **177**: 252-264.
26. Shang, L., Liu, J., Zhu, Q., Zhao, L., Feng Y., Wang, X. Cao, W. and Xin, H. (2006) Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity. *Brain Res.* **1102**: 163-174.
27. Wang, P., Niu, L., Gao, L., Li, W. X., Jia, D., Wang, X. L. and Gao, G. D. (2010) Neuroprotective effect of gypenosides against oxidative injury in the substantia nigra of a mouse model of Parkinson's disease. *J. Int. Med. Res.* **38**: 1084-1092.
28. Attawish, A., Chivapat, S., Phadungpat, S., Bansiddhi, J., Techadamrongsin, Y., Mitrijit, O., Chaorai, B. and Chavalit-tumrong, P. (2004) Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. *Fitoterapia* **75**: 539-551.
29. Jeong, S. H., Lee, M. K., Park, M. S. and Kim, J. M. (2011) Randomized, double-blind study of efficacy and safety of

- Gynostemma pentaphyllum* ethanol extract in a normal population. *Kor. J. Clin. Pharm.* **21**: 131-137.
30. Chaturvedi, R, K., Shukla, S., Seth, K., Chauhan, S., Sinha, C., Shukla, Y. and Agrawal, A. K. (2006) Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **22**: 421-434.
31. Bae, N., Ahn, T., Chung, S., Oh, M. S., Ko, H., Oh, H., Park, G. and Yang H. O. (2010) The neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease. *J. Ethnopharmacol.* **134**: 313-322.
- (2011. 10. 31 접수; 2011. 12. 12 심사; 2011. 12. 15 게재확정)