

## Rotenone- 및 MPTP-유도 파킨슨병 동물 모델에서 돌외 에탄올 추출물의 Dopamine 신경세포 보호작용

서광훈 · 최현숙\* · 신건성 · 조정정 · 김승환\*\* · 황방연 · 이종길 · 이명구#

충북대학교 약학대학, \*충청대학교 식품영양학과, \*\*경희대학교 체육교육대학

(Received March 13, 2013; Revised March 29, 2013; Accepted April 8, 2013)

### Neuroprotective Effects of Herbal Ethanol Extract from *Gynostemma pentaphyllum* on Dopamine Neurons in Rotenone- and MPTP-induced Animal Model of Parkinson's Disease

Kwang Hoon Suh, Hyun Sook Choi\*, Kun Seong Shin, Ting Ting Zhao, Seung Hwan Kim\*\*,  
Bang Yeon Hwang, Chong Kil Lee and Myung Koo Lee#

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*Department of Food and Nutrition, Chungcheong University, Chungbuk 363-890, Korea

\*\*College of Physical Education, Kyunghee University, Youngin 449-701, Korea

**Abstract** — The neuroprotective effects of herbal ethanol extract (GP-EX) from *Gynostemma pentaphyllum* on dopamine neurons in animal model of Parkinson's disease (PD) were investigated. Rats and mice were administered with rotenone (2.5 mg/kg) for 28 days and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 30 mg/kg) for 5 days for the PD models, respectively and the animals were simultaneously treated with GP-EX (30 mg/kg, daily). After preparing the PD models, the animals were also administered with L-DOPA (10 mg/kg) for 14 days with or without GP-EX treatment. Treatment with GP-EX (30 mg/kg) inhibited the rotenone- and MPTP-induced neurotoxic effects in dopamine neurons of rats or mice, which was determined by the numbers of tyrosine hydroxylase-immunohistochemical staining survival cells, as well as the levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid. GP-EX (30 mg/kg) also showed the protective effects on neurotoxicity which was induced by long-term administration of L-DOPA (10 mg/kg) in rotenone- and MPTP-induced animal model of PD. The used doses of GP-EX (30 mg/kg) did not produce any signs of toxicity, such as weight loss, diarrhea, or vomiting, in rats and mice during the treatment periods. These results suggest that GP-EX has the protective functions against chronic L-DOPA-induced neurotoxic reactions in dopamine neurons of rotenone- and MPTP-induced animal model of PD. Therefore, the natural GP-EX may be beneficial in the prevention of PD progress and L-DOPA-induced neurotoxicity in PD patients.

**Keywords** □ *Gynostemma pentaphyllum*, animal model of Parkinson's disease, rotenone, MPTP, L-DOPA, tyrosine hydroxylase, dopamine neuron

파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 대뇌 기저핵의 선조체(striatum)-흑질(substantia nigra, SN)의 dopamine 신경계(dopamine neuron)의 퇴행으로 인한 신경질환으로, 주요 병인에는 중금속/탄화수소 노출 등의 환경적 인자, 중추 노화 관련인자, 산화스트레스(oxidative stress), 유전인자( $\alpha$ -synuclein, parkins, PINK1, DJ-1 등) 등으로 보고되고 있다.<sup>1)</sup> 각종 산화스트레스는 환경인자/오염, 중금속, 살충제 및 기타 유발인자에 의하여 생체

내 각 조직에서 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성하고 생성된 ROS에 의하여 세포사 및 조직손상을 유도하며, 신경퇴행 질환인 PD, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 근위축성측삭경화증(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 다운증후군(Down's syndrome) 등의 염증 및 진행과정과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>2)</sup>

PD의 약물요법은 일차적으로 dopamine 효능제 또는 dopamine의 전구체인 L-DOPA 요법이 주로 선택되어 시행되고 있다.<sup>3)</sup> 그러나 PD 동물모델에서 장기간의 L-DOPA 요법은 ROS 형성에 의하여 신경독성이 발생하고 있으며,<sup>4)</sup> PD 환자에서 L-DOPA의 장기투여는 약물효능의 감소 뿐 아니라 이상운동증(dyskinesia),

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2822 (팩스) 043-276-2754  
(E-mail) myklee@chungbuk.ac.kr

운동동요(motor fluctuation) 및 다른 합병증을 유발한다.<sup>3)</sup> 그러므로 L-DOPA 요법과 병행하여 신경독성 보호-방어 작용의 보조 약물 치료제의 개발에 대한 필요성이 제시되고 있다.<sup>5)</sup>

PD 동물모델의 작성은 대표적으로 6-hydroxydopamine(6-OHDA)의 뇌실투여법이 사용되고 있으며, 이외에 rotenone 및 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)이 사용되고 있다. Rotenone은 *Leguminosa* 식물의 추출물로 살충제와 살어제로 사용되며 미토콘드리아의 세포독성 작용에 의한 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 특히, 과량 노출시에 dopamine 신경세포에 선택적인 독성을 나타내어 PD 증상이 나타나며,<sup>7)</sup> 만성적으로 rotenone 노출 후에는 산화스트레스와 microtubule의 기능장애에 의하여 proteasome의 저해작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다.<sup>8,9)</sup> 또한 MPTP는 뇌내 흑질(SN compacta)의 dopamine 신경세포에서 미토콘드리아의 monoamine oxidase(MAO, type B)에 의하여 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP<sup>+</sup>)으로 대사되어 산화스트레스에 의한 complex I 기능 감소작용으로 인하여 독성 반응을 나타낸다.<sup>10,11)</sup> MPTP는 영장류와 C57BL/6 검정 생쥐에서 신경세포를 파괴하며 PD 동물모델 작성에 응용되고 있다.<sup>12)</sup>

둘의(*Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Gynostemmae* Herba, GP)는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 다년생 식물로 국내 및 아시아 지역에 분포되어 있으며, GP의 주성분은 gypenosides 화합물, flavonoids 등을 함유하고 있다.<sup>13)</sup> GP 추출물(ethanol 또는 수침 엑기스) 및 gypenosides를 사용하여 다양한 생리활성이 연구되었으며, 주요 생리활성으로는 혈관내피세포 보호 작용, 심혈관 기능개선 작용, 콜레스테롤 저하작용, 면역기능 조절 작용, 암세포 성장저해 작용, 항당뇨 작용, 간 기능 보호 작용, 항염증 작용(만성 기관지염 및 위궤양) 등이 보고되고 있다.<sup>14)</sup> 최근 GP의 ethanol 추출물(GP-EX)은 동물모델을 이용하여 만성 스트레스에 의한 체중저하, 면역기능 저하, 불안-우울 증상 등에 대한 개선작용을 보고하였다.<sup>15-17)</sup> 또한 GP-EX는 백서 뇌실의 6-OHDA 투여에 의한 선조체-흑질의 dopamine 신경세포 독성작용에 대한 방어작용을 나타내고 있음을 보고하였다.<sup>18)</sup>

PD는 발병이후 연령의 증가와 더불어 병이 진행되면서 노령으로 인한 다른 중추신경계 질환(노인성 치매, 불안-우울증 등)과 상호 연계되어 질환의 증상이 복합적으로 나타난다. PD 발병 후에 환자는 L-DOPA를 포함한 주요 약물요법 이외에 다양한 증상에 대한 완화요법/대증요법을 병용하여 시행하고 있다. 따라서 본 연구에서는 PD의 진행과정 및 약물요법 중에 발생하는 dopamine 신경세포에 대한 독성작용, 합병증 등을 개선하기 위하여, GP-EX의 dopamine 신경세포 보호작용에 주목하고 6-OHDA 이외에 PD 동물모델에 주로 사용되는 rotenone 및 MPTP를 사용하여 dopamine 신경세포의 세포사 유도작용에 대한 GP-EX의 신경세포 보호작용에 대하여 검토하였다. 이는 rotenone- 및 MPTP-유도 PD 동물모델을 이용하여 GP-EX가

PD 증상발현 과정 및 장기간 L-DOPA 단독요법에 대한 GP-EX의 효능을 재확인하기 위한 것이다.

## 재료 및 실험방법

### 실험재료

GP 시료는 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, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid(HVA), isoproterenol, rotenone, MPTP, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, EDTA-Na, ascorbic acid 등의 시약은 Sigma(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. Tyrosine hydroxylase(TH) 항체는 Chemicon Int. (Temecula, CA, 미국)에서, anti-rabbit IgG, vectastain(avidin/biotin complex, ABC) 키트 및 vectastain diaminobenzidine (DAB) 키트는 Vector Laboratories(Burlingame, CA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

### PD 동물모델의 작성

Rotenone-유도 PD 동물모델은 실험동물(rat, 250~280 g, 웅성)에 rotenone(2.5 mg/kg, i.p.)을 olive oil에 녹여 1일 1회, 28일간 투여하여 작성하였다.<sup>19)</sup> MPTP-유도 PD 동물모델은 실험동물(23~25 g, C57BL/6 mice, 웅성)에 MPTP(30 mg/kg, i.p.)를 1일 1회, 5일간 투여하여 작성하였다.<sup>20)</sup> 실험동물은 주야 주기 12시간, 온도 23±2°C의 조건하에서 사육하였다. 모든 실험동물은 충북대학교 동물실험윤리위원회(CBNU Animal Care and Use Committee)의 취급기준에 의하여 수행되었다.

### GP-EX 및 L-DOPA 투여

GP-EX(30 mg/kg, p.o.)는 1일 1회 rotenone 및 MPTP와 병용 투여 하였으며(rotenone, 28일; MPTP, 19일), L-DOPA 투여 기간 중에는 L-DOPA와 병용 투여하였다. Rotenone-유도 PD 동물모델에 대한 L-DOPA 투여는 rotenone 투여 14일 후부터 14일간 병용투여 하였으며, MPTP-유도 PD 동물모델에 대한 L-DOPA 투여는 MPTP 최종 투여 후부터 14일간 시행하였다. L-DOPA(10 mg/kg, i.p.)는 benserazide(15 mg/kg, i.p.)와 함께 1일 1회 투여하였다.

각각의 투여그룹은 다음과 같다(n=6-8). 그룹 A, 생리식염수 투여군; 그룹 B, rotenone(2.5 mg/kg) 또는 MPTP(30 mg/kg) 투여군; 그룹 C, rotenone(2.5 mg/kg) 또는 MPTP(30 mg/kg)+GP-EX(30 mg/kg) 투여군; 그룹 D, rotenone(2.5 mg/kg) 또는

MPTP(30 mg/kg)+L-DOPA(10 mg/kg) 투여군; 그룹 E, rotenone (2.5 mg/kg) 또는 MPTP(30 mg/kg)+L+DOPA(10 mg/kg)+GP-EX(30 mg/kg) 투여군.

#### TH-면역조직화학(TH-immunohistochemistry) 염색

실험동물은 좌심실을 통한 관류고정(4% paraformaldehyde/50 mM phosphate 완충용액)을 시행한 다음, 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 고정 하였다. 고정된 뇌 조직을 30% sucrose-PBS 용액-isobutane 혼합액을 이용하여 동결 박편을 제조하여 저온 보관하였다(두께 35  $\mu$ m; Cryostat, Leica, Nuolch, Germany). TH-면역조직화학 염색은 일차 TH 항체 (rabbit anti-TH antibody, 1 : 1000)와 반응시킨 다음 세척하고, 이차 항체와 1시간 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( $\times 200$ 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.<sup>21,22)</sup>

#### Dopamine, DOPAC 및 HVA 함량 측정

뇌시료(선조체-흑질 부위)에 대한 dopamine, DOPAC 및 HVA

의 함량은 HPLC 방법을 이용하여 측정하였다. Dopamine 함량은 시료에 trichloroacetic acid(3.0 M, 100  $\mu$ l) 및 isoproterenol (1 nmol/ml, 100  $\mu$ l, 내부표준)을 가한 다음 원심 분리하고 상등액을 Toyopak SP 카트리지(Toso, Tokyo, 일본)를 사용하여 전처리한 후, 흡착된 아민화합물은 0.6 M KCl-acetonitrile(1 : 1, v/v, 2 ml) 혼합액을 사용하여 용출하고 용출액에 DPE 시약을 가하여 형광 유도체화한 다음 최종 반응액을 HPLC에 주입하여 측정하였다.<sup>17)</sup> 또한 시료중의 DOPAC 및 HVA의 함량은 시료에 HClO<sub>4</sub>(300  $\mu$ l)를 가한 다음 균질화 하고 원심분리(50,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 15분)한 다음 상등액은 여과시킨 후 여과액(50  $\mu$ l)을 HPLC-전기화학검출기(ECD)를 이용하여 정량하였다.<sup>23)</sup> Dopamine, DOPAC 및 HVA의 함량은 ng/g tissue로 계산하였다.

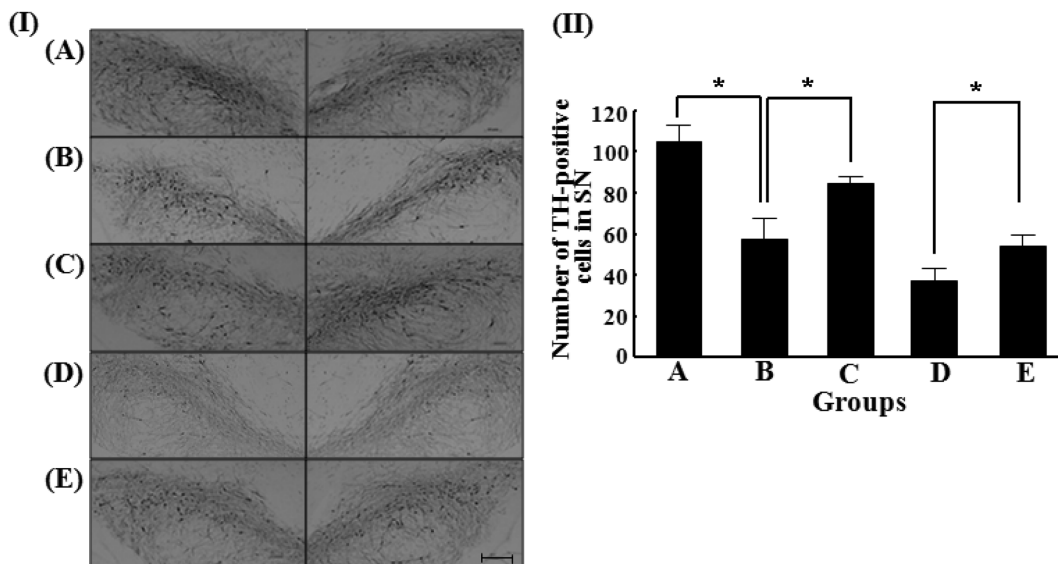
#### 결과정리

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

#### 실험결과

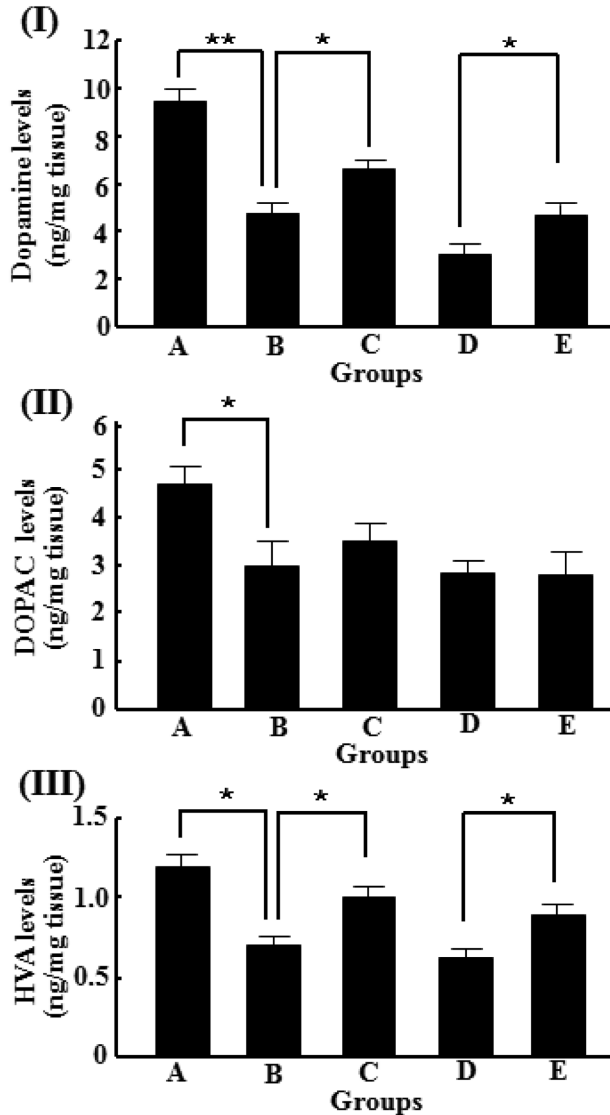
##### Rotenone-유도 PD 동물모델에서 GP-EX의 dopamine 신경세포 보호작용

Rotenone-유도 PD 동물모델에서 rotenone 투여군의 TH-면역



**Fig. 1** – Photomicrographs of TH immunoreactivity on SN tissue sections from representative rats of each group (I) and the number of surviving TH-immunopositive cells in the SN analyzed as a percentage of that in the control groups (II). Normal groups (0.9% saline) (A), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups (B), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+GP-EX (30 mg/kg) (C), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg) (D), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg)+GP-EX (30 mg/kg) (E). The data were representative of 6~8 animals per group. Brain tissues were cut, and then 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  $\mu$ m. TH-immunopositive cells were analyzed as a percentage of each control. \* $p$ <0.05 compared to each group (ANOVA followed by Tukey's test).

양성 신경세포수는 대조군에 비하여 49.8% 감소하였으며, 이러한 신경세포수 감소는 GP-EX(30 mg/kg)와의 병용투여에 의하여 10.1%( $p < 0.05$ )의 유의적인 증가를 보였다(Fig. 1, I-A 및 C). 또한 rotenone 투여군에 L-DOPA(10 mg/kg)의 병용투여는 TH-면



**Fig. 2** – Effects of GP-EX on the levels of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum of brains in rotenone (2.5 mg/kg)-treated rats. Normal groups (0.9% saline) (A), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups (B), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+GP-EX (30 mg/kg) (C), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg) (D), Rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg)+GP-EX (30 mg/kg). Rats were treated with L-DOPA (10 mg/kg) and GP-EX (30 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) in rotenone (2.5 mg/kg)-treated groups. After 4 weeks, the brains were removed and the levels of dopamine, DOPAC and HVA were determined by an HPLC method. Results represent means $\pm$ S.E.M. for 6–8 animals per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to each group (ANOVA followed by Tukey's test).

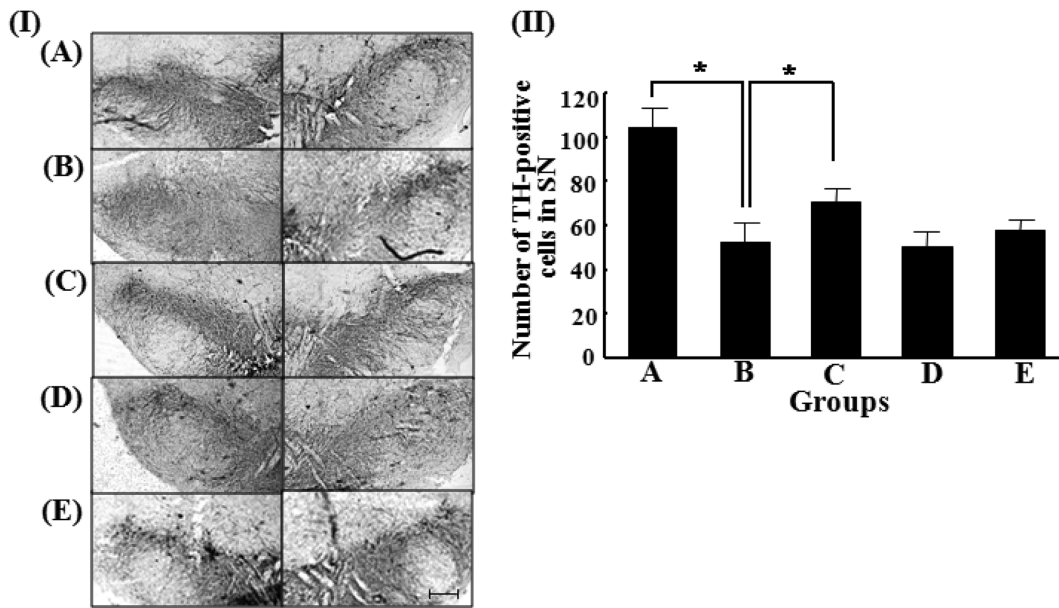
역양성 신경세포수가 L-DOPA 미투여군과 비교시 57.8% 감소하였으며, 이러한 신경세포수의 감소는 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여로 9.5%( $p < 0.05$ )의 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 1, II-E).

다음으로 rotenone-유도 PD 동물모델에서 GP-EX의 신경세포 보호작용의 기전을 검색하기 위하여 선조체-흑질 부위의 dopamine, DOPAC 및 HVA의 함량을 비교 검토하였다. Rotenone-유도 PD 동물모델에서 dopamine 함량은 rotenone의 투여로 대조군에 비하여 45.1%로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 2, I). 그러나 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여로 dopamine 함량은 유의적으로 증가하였다(18.1%,  $p < 0.05$ )(Fig. 2, I-C). Rotenone-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg) 병용투여는 dopamine 함량이 대조군에 비해 68.3% 감소하였으며(Fig. 2, I-D), 이러한 감소작용은 L-DOPA(10 mg/kg) 투여기간 중에 GP-EX(30 mg/kg)와 병용투여함으로써 dopamine 함량은 53.8%( $p < 0.05$ )로 유의적으로 증가하였다(Fig. 2, I-D 및 I-E). DOPAC 함량은 rotenone-유도 PD 동물모델에서 대조군에 비하여 36.3% 감소하였다(Fig. 2, II-B). 또한 rotenone-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg)의 투여군에서도 DOPAC의 함량은 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 이는 GP-EX의 병용투여에 의하여 증가하지 않았다(Fig. 2, II-D, II-E). HVA 함량은 rotenone-유도 PD 모델에서 55.7% ( $p < 0.05$ )로 유의적인 감소를 나타내었으며, 이러한 감소작용은 GP-EX(30 mg/kg)의 투여로 24.9%( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 그러나 L-DOPA(10 mg/kg)의 투여는 HVA 함량이 감소하였으며, GP-EX(30 mg/kg)와의 병용투여는 선조체-흑질 부위의 HVA 함량이 유의적으로 증가하였다(30.8%,  $p < 0.05$ )(Fig. 2, III-D, III-E).

#### MPTP-유도 PD 동물모델에서 GP-EX의 dopamine 신경세포 보호작용

MPTP-유도 PD 동물모델에서 MPTP-투여군은 흑질에서 TH-면역양성 신경세포의 신경섬유는 염색성이 감소하고 TH-면역양성 신경세포의 수가 45.7%( $p < 0.05$ )의 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 3, I-A, B). MPTP와 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여는 흑질의 TH-면역조직화학 염색성 및 TH-면역양성 신경세포 (dopamine 신경세포군)의 생존률에는 유의적인 차이는 보이지 않았으며(Fig. 3, I 및 II), MPTP-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg)와의 병용투여에서도 TH-면역조직화학 염색성 및 TH-면역양성 세포수에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3, I 및 II). 또한 MPTP-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg)와 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여에서도 L-DOPA 단독투여에 비하여 TH-면역조직화학 염색성 및 TH-면역양성 세포수가 3.6% 증가하였으나 유의적이지 않았다(Fig. 3, II-E).

MPTP-유도 PD 동물모델에서 dopamine 함량은 대조군에 비하여 64.2%( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, 이러한 감소작용은 GP-EX(30



**Fig. 3** – Photomicrographs of TH immunoreactivity on SN tissue sections from representative mice of each group (I) and the number of surviving TH-immunopositive cells in the SN analyzed as a percentage of that in the control groups (II). Normal groups (0.9% saline) (A), MPTP (30 mg/kg)-treated groups (B), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+GP-EX (30 mg/kg) (C), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg) (D), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg)+GP-EX (30 mg/kg). Mice were treated with L-DOPA (10 mg/kg) and GP-EX (30 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) in MPTP (30 mg/kg)-treated groups. The data were representative of 6~8 animals per group. Brain tissues were cut and then 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× and scale bar is 100 μm. TH-immunopositive cells were analyzed as a percentage of each control. \**p*<0.05 compared to each group (ANOVA followed by Tukey's test).

mg/kg)의 병용투여에 의하여 83.3%(*p*<0.05)의 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 4, I-B 및 -C). MPTP-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg) 병용투여군의 dopamine 함량은 대조군에 비해 72.9%(*p*<0.05) 증가하였으며(Fig. 4, I-B 및 -D), 이는 L-DOPA에 의한 치료효능으로 사료된다. MPTP-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg) 및 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여로 dopamine 함량이 증가하였으나 유의적이지 않았다(Fig. 4, I-D 및 -E). DOPAC의 함량은 MPTP-유도 PD 동물모델에서 대조군에 비하여 47.9% 감소하였으며, 이러한 감소작용은 GP-EX(30 mg/kg)와의 병용투여로 83.0%(*p*<0.05) 증가하였다(Fig. 4, II-B 및 -C). MPTP-유도 동물모델에서 L-DOPA(10 mg/kg)와의 병용투여군에서도 DOPAC의 함량은 증가하였으며(Fig. 4, II-B 및 -D), 이러한 증가작용은 L-DOPA와 GP-EX(30 mg/kg)와의 병용투여에 의하여 증가하였으나 유의적이지 않았다(Fig. 4, II-D 및 -E). 또한, HVA 함량은 MPTP-유도 PD 동물모델에서 대조군에 비하여 42.7% 감소하였으며, 이러한 감소작용은 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여에 의하여 대조군의 78.4%(*p*<0.05) 증가하였다(Fig. 4, III-B 및 -C). 그러나 L-DOPA(10 mg/kg) 투여군에서도 HVA의 함량은 증가하였으며(Fig. 4, III-B 및 -D), 이러한 증가작용은 L-DOPA와 GP-EX(30 mg/kg)와의 병용투여에 의하여 유의적으로 증가하였다(Fig. 4, III-D 및 -E). MPTP-유도 PD 동물모델에서

GP-EX(30 mg/kg) 투여에 의하여 dopamine 및 dopamine 대사체의 함량은 증가하였다.

### 고 찰

PD 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 경우 혈액 및 뇌중에 dopamine 및 norepinephrine의 함량, dopamine의 대사체인 DOPAC 및 HVA의 함량이 증가하고 있다.<sup>24)</sup> 또한 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 경우 L-DOPA/dopamine 또는 대사체 상호간의 축합반응에 의하여 salsolinol, tetrahydropapaveroline과 같은 isoquinoline 유도체가 생성되며,<sup>23)</sup> 특히 L-DOPA 및 isoquinoline 화합물은 산화스트레스에 의한 신경독성을 나타내고 있다.<sup>23,25,26)</sup> 그러므로 장기간 L-DOPA 요법에 의한 나타나는 신경독성에 대한 독성 완화작용은 L-DOPA 치료 효능의 증가 및 L-DOPA의 부작용 예방에 중요하다.

신경독성물질인 rotenone 및 MPTP는 PD 동물모델의 작성에 자주 사용되고 있다. Rotenone 투여 동물모델은 미토콘드리아의 complex 1 저해에 의하여 선조체의 dopamine 신경세포가 파괴되며 이는 catecholamine과 대사체의 함량 감소된다.<sup>10)</sup> 이러한 dopamine 신경세포의 특이적인 세포사와 신경돌기 퇴화의 유도가 PD를 일으키는 것으로 사료된다.<sup>6,7)</sup> MPTP는 MAO(type B)

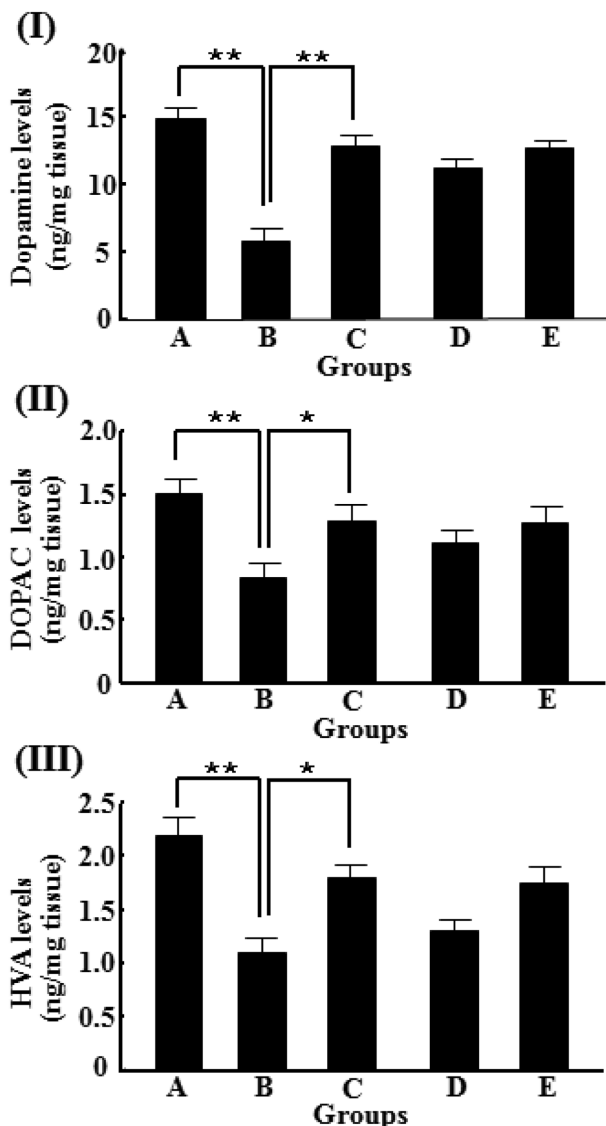


Fig. 4 – Effects of GP-EX on the levels of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum of brains in MPTP (30 mg/kg)-treated mice. Normal groups (0.9% saline) (A), MPTP (30 mg/kg)-treated groups (B), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+GP-EX (30 mg/kg) (C), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg) (D), MPTP (30 mg/kg)-treated groups+L-DOPA (10 mg/kg)+GP-EX (30 mg/kg). Mice were treated with L-DOPA (10 mg/kg) and GP-EX (30 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) in MPTP (30 mg/kg)-treated groups. After 20 days, the brains were removed and the levels of dopamine, DOPAC and HVA were determined by an HPLC method. Results represent means±S.E.M. for 6~8 animals per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to each group (ANOVA followed by Tukey's test).

에 의하여  $MPP^+$ 로 대사되어 미토콘드리아의 대사를 방해하여 dopamine 신경세포를 파괴한다.<sup>11)</sup>

GP-EX는 만성 스트레스에 의한 생체기능 저하에 대한 개선효능 및 만성 스트레스-유도 면역기능 저하에 대한 개선효능을 나타

내고 있다.<sup>15,17)</sup> 또한 GP-EX는 백서에서 6-OHDA-유도 dopamine 신경독성 작용에 대한 방어작용을 나타내어 PD-유도에 대한 방어작용을 나타내고 있음을 보고하였다.<sup>27)</sup> 본 연구에서는 PD 동물모델의 dopamine 신경세포에 대한 GP-EX의 신경세포 보호작용을 추가로 검토하기 위하여 rotenone- 및 MPTP-유도 PD 동물모델을 이용하여 GP-EX의 활성을 검색하였다.

GP 물추출물의  $LD_{50}$ (mice) 값은  $2.86(\pm 0.3)$  g/kg(i.p.)이며, 6-750 mg/kg(백서, 24 주간 경구투여) 범위에서 체중감소, 장기변화, 간기능 등의 독성작용을 나타내지 않았으며, 축적독성 및 최기형성 독성반응을 유도하지 않는 것으로 보고되고 있다.<sup>28,29)</sup> 또한 GP-EX는 10~50 mg/kg 농도 범위에서 실험동물에 대하여 체중감소, 구토, 설사, 사망 등의 부작용은 관찰되지 않았으며,<sup>15,16)</sup> 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 GP-EX의 투여용량은 30 mg/kg으로 설정하였고 실험기간 중에 구토, 설사, 사망 등의 부작용은 나타나지 않았다.

Rotenone-유도 PD 동물모델에서의 L-DOPA의 투여(10 mg/kg)는 흑질의 TH 면역조직화학 염색성 및 dopamine 신경세포군의 생존률은 L-DOPA 미투여군 비하여 감소하였다(Fig. 1 및 2). 그러나 TH-면역양성 신경세포가 GP-EX(30 mg/kg) 투여군에서는 TH-면역조직화학 염색에 의한 염색성이 증가하고 TH-면역양성 신경세포수가 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). 또한 rotenone(2.5 mg/kg)-유도 PD 동물모델에서 장기간 L-DOPA(10 mg/kg)와 GP-EX(30 mg/kg)의 병용 투여는 L-DOPA 단독 투여에 비하여 TH-면역조직화학 염색성 및 TH-면역양성 세포수가 유의적이지는 않지만 증가하였으며, dopamine 함량 및 HVA 함량이 유의적으로 증가하였다. 이 결과로부터 GP-EX는 rotenone-유도 신경세포 독성작용에 대한 보호작용과 rotenone-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA-유도 세포독성 작용에 대한 보호효능이 있음을 나타내고 있다.

MPTP의 투여는 dopamine 신경세포의 독성작용에 의하여 TH-조직화학 염색성 및 TH-면역양성 세포수가 감소하며, GP-EX(30 mg/kg)의 투여는 이러한 MPTP-유도 세포 독성을 저해하여 신경세포 보호작용을 나타내고 있다(Fig. 3 및 4). MPTP-유도 PD 동물모델에서 저농도 L-DOPA(10 mg/kg)의 투여는 dopamine 신경세포의 보호작용을 나타내었으며, L-DOPA(10 mg/kg)과 GP-EX(30 mg/kg)의 병용투여는 L-DOPA 단독투여에서 보다 dopamine 신경세포의 보호작용을 나타내었으나 유의적인 증가는 나타내지 않았다. 그러므로 고농도 또는 장기간의 L-DOPA 투여에 의한 실험의 진행이 필요할 것으로 사료되지만, 이 결과로부터 GP-EX는 MPTP-유도 dopamine 신경세포 독성 작용에 대한 보호작용이 있음을 나타내고 있다.

MPTP-유도 PD 동물모델에서의 L-DOPA 투여는 6-OHDA 함량이 증가하며, 이는 MAO 저해제에 의하여 민감화되는 것으로 나타났다.<sup>24)</sup> 또한 MPTP-유도 PD 동물모델에서도 6-OHDA는

산화제( $Fe^{2+}$ ,  $H_2O_2$ )의 존재하에 비효소학적 반응으로 dopamine 으로부터 생합성되며 선택적으로 dopamine 신경계의 세포사를 유도하는 신경 독성물질로 작용하고 있다.<sup>24,25</sup> 최근 GP-EX는 6-OHDA-유도 신경세포 독성작용에 대한 방어작용을 나타내고 있으며, 이는 GP-EX의 항산화스트레스 작용에 의한 것으로 제시되었다.<sup>17</sup>

Rotenone-유도 PD 동물모델에서 저용량 L-DOPA(10 mg/kg)의 투여는 신경세포의 보호작용을 나타내지 않았으며, 이 결과는 MPTP- 및 6-OHDA-유도 PD 동물모델에서 저용량 L-DOPA의 작용과 다르게 나타났다. 그러나 고용량 L-DOPA(20 mg/kg)의 투여는 6-OHDA-유도 PD 동물모델에서 dopamine 신경세포의 독성을 증가시키는 것으로 나타났다.<sup>30</sup> 또한 MPTP-유도 PD 동물모델에서 L-DOPA 투여(10 mg/kg)의 투여에 의한 dopamine 신경세포의 보호작용은 GP-EX 투여에 의하여 증가하였으나 유의적이지 않았다. 따라서 GP-EX는 L-DOPA(10 mg/kg) 투여군에 의한 부분적 dopamine 신경세포의 보호효능 보다는 L-DOPA(20 mg/kg) 투여군의 신경세포에 대한 독성작용에 대하여 유의적인 신경세포 보호작용을 나타내고 있다. 이러한 결과로부터 GP-EX는 3종류(rotenone, MPTP 및 6-OHDA)의 PD 동물모델에서 dopamine 신경세포 보호작용이 있음을 의미하며, 장기간 L-DOPA-투여와 GP-EX와의 병용 투여는 L-DOPA의 투여 농도와 PD 동물모델에 따라 GP-EX의 효능이 다르게 나타났음을 제시하고 있다. 또한 GP-EX는 신경독성 물질(rotenone, MPTP 및 6-OHDA)에 대한 보호효능과 PD 동물모델(rotenone-, MPTP- 및 6-OHDA-유도 PD 모델)에서 장기간 L-DOPA 요법에 대한 dopamine 신경세포 보호작용이 있음을 나타내고 있다(Fig. 1).<sup>27</sup>

장기간의 L-DOPA 투여는 PD에서 운동장애와 같은 부작용을 유도하며, 선조체 dopamine 신경계 및 PC12 세포주에서 ROS 형성에 의한 산화스트레스-유도 신경독성을 증가시킨다.<sup>31,32</sup> 또한 L-DOPA는 6-OHDA-유도 백서 PD 동물모델에서 투여-용량에 따라 신경세포 보호 및 신경독성 작용의 이중기능(dual functions)을 나타내고 있으며,<sup>33</sup> MPTP-유도 PD 동물모델에서도 동일한 작용을 나타내고 있다. 그러나 고용량의 L-DOPA의 투여는 dopamine 신경세포의 독성작용을 유도하고 있으며,<sup>34</sup> *in vitro* 모델인 신경세포 및 PC12 세포에서도 L-DOPA는 낮은 농도(3~10  $\mu$ M)에서는 증식작용 및 보호작용을 나타내고 있다.<sup>35</sup>

최근 GP의 butanol 분획(GP-BX)는 L-DOPA-투여의 6-OHDA-유도 PD 동물모델에서 만성 스트레스에 의하여 유도되는 세포독성을 감소시켜 dopamine 신경세포에 대한 보호작용을 나타내었으며, 이는 GP-BX의 ROS 및 면역기능의 제어작용에 의한 것임을 제시하고 있다.<sup>30,36</sup> 또한 gypenosides 및 gypenoside-활성분획은 뇌조각배양세포(rat primary cortical cell culture) 상에서 glutamate에 의한 산화스트레스 신경독성 및 염증작용에

대한 방어작용을 나타내고 있으며,<sup>37</sup> MPTP-유도 PD 동물모델에서 dopamine 신경세포사에 대한 방어작용을 나타내고 있다.<sup>38</sup> GP-BX 분획은 6-OHDA-유도 PD 동물모델에서 dopamine 신경세포 보호작용을 나타내었으며,<sup>30</sup> GP-EX 및 GP-BX 분획으로부터 수종의 gypenoside 화합물(gynosaponin TN-1, gynosaponin TN-2, gypenoside XLV, gypenoside LXXIV) 등을 분리하였다.<sup>18</sup>

L-DOPA는 고농도(toxic)에서 L-type  $Ca^{2+}$  통로-CaMKII 신호전이를 매개한 adenylyl cyclase의 활성화에 의하여 PC12 세포내 cyclic AMP 함량이 증가하고 있음을 보고하고 있다.<sup>39</sup> Forskolin-유도에 의한 저농도의 cyclic AMP는 PC12 세포내 일시적(transient) ERK1/2의 인산화를 유도하여 dopamine 생합성과 세포의 증식을 유도하며, 고농도의 cyclic AMP는 지속적(sustained) ERK1/2의 활성화를 유도하여 세포의 분화 및 세포사(apoptotic cell death)를 유도한다.<sup>40</sup> 또한 6-OHDA의 세포독성의 기전은 산화스트레스에 의한 세포사 신호전이와 ERK 활성화가 관여하고 있음이 보고되고 있으나,<sup>41,42</sup> ERK의 경시적인 활성화와 관련한 연구는 미흡한 상태이다. 그러므로 L-DOPA 및 6-OHDA의 세포독성과 ERK 활성화의 상관관계에 대한 연구는 추가로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

신경퇴행성 뇌신경세포의 보호작용을 나타내는 생리활성물질은 활성검색의 방법에 따라 분류된다. 천연물은 GP 이외에, black tea 추출물이 6-OHDA-유도 dopamine 신경계의 퇴행에 대한 보호작용이 보고되었으며,<sup>43</sup> 8-(3-chlorostyryl)caffeine 및 산화스트레스, 신경염증 및 흥분성 신경독성(neuronal excitotoxicity)에 대응하는 효능을 가진 BN82451 화합물은 6-OHDA-유도 PD 동물모델에서 운동이상의 저해작용을 나타내었으며,<sup>44,45</sup> 10종의 천연물 제제인 열다한소탕(Yeoldahanso-tang), 지모사포닌의 일종인 PYM50028(coganne), TMCA(원지로부터 분리), protocatechuic acid 및 melatonin은 MPTP-유도 PD 동물모델에서 신경독성 보호작용을 나타내고 있음을 보고하고 있다.<sup>17,46-49</sup>

PD와 같은 신경퇴행성 질환은 증상의 진행과 약물요법이 장기간에 걸쳐 진행되므로, 생리활성 물질은 다른 제제와의 약물 상호작용, 신경독성 등이 검증되어야 할 것으로 사료된다. PD 치료제 개발을 위한 신경보호 제제요법의 임상시도는 제한점을 가지고 있으며, 질환의 임상적 측정의 제한성, 신경영상(neuroimage) 전략의 제한성, 동물모델의 제한성, 질환의 이질성(heterogeneity) 및 진행성 등을 제시하고 있다.<sup>5</sup> PD 동물모델은 6-OHDA 및 MPTP 투여에 의한 방법이 주로 사용되고 있으나, 일부 연구자는 이 모델의 병리학적 소견과 시간적인 질환의 진행이 인간의 증상과 다르다는 것을 지적하고 있다.<sup>50</sup> 또한  $\alpha$ -synuclein, parkin 및 다른 단백질 등이 유전적 PD 연구에서 확인된 것과 같이 유전인자에 기초한 모델(genetic-based models)이 독성인자에 기초한 모델(toxin-based models)에 대체하여 개발되어야 함을 제시하고 있다.<sup>5</sup>

## 결 론

GP-EX는 PD 동물모델에서 rotenone 및 MPTP에 의한 dopamine 신경세포 독성작용에 대한 신경세포 보호작용을 나타내었다. 또한 GP-EX는 rotenone- 및 MPTP-유도 PD 동물모델에서 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 경우 L-DOPA에 의한 선조체-흑질 dopamine 신경세포의 신경독성에 대한 보호작용을 나타내고 있음을 제시하였다. 더욱 GP-EX는 6-OHDA에 의한 dopamine 신경세포 독성작용에 대한 보호작용을 나타내고 있다.<sup>27)</sup> 따라서 GP-EX는 PD의 진행과정에 대한 dopamine 신경세포의 보호작용과 L-DOPA 요법의 PD 환자에 대한 증상개선에 기여할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 논문은 지식경제부(MKE) 및 한국산업기술진흥원(KIAT)의 지원으로 광역경제권연계협력사업(R0002019) 및 생물건강산업개발연구센터(KIAT 및 MKE)의 지원을 받아 수행된 연구임.

## 참고문헌

- Kim, Y. J. : Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Korean Neurol. Assoc.* **22**, 421 (2004).
- Migliore, L. and Copped, F. : Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.* **31**, 73 (2009).
- Olanow, C. W., Watts, R. L. and Koller, W. C. : An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease treatment guidelines. *Neurology* **56**, 1 (2001).
- Cheng, N., Maeda, T., Kume, T., Kaneko, S., Kochiyama, H., Akaike, A., Goshima, Y. and Misu : Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. *Brain Res.* **16**, 278 (1196).
- Yacoubian, T. A. and Standaert, D. C. : Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 676 (2009).
- Dhillon, A. S., Tarbutton, G. L., Levin, J. L., Plotkin, G. M., Lowry, L. K., Nalbone, J. T. and Shepherd, S. : Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J. Agromed.* **13**, 37 (2008).
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M., Chade, A. R., Comyns, K., Richards, M. B., Meng C., Priestley, B., Fernandez, H. H., Cambi, F., Umbach, D. M., Blair, A., Sandler, D. P. and Langston, J. W. : Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* **119**, 866 (2011).
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R. M., Sherer, T. B., Mastroberardino,

- P. G., McLendon, C., Kim, J. H., Lund, S., Na, H. M., Taylor, G., Bence, N. F., Kopito, R., Seo, B. B., Yagi, T., Yagi, A., Klinefelter, G., Cookson, M. R. and Greenamyre, J. T. : Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol. Dis.* **22**, 404 (2006).
- Chou, A. P., Li, S., Fitzmaurice, A. G. and Bronstein, J. M. : Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. *Neurotoxicology* **31**, 367 (2010).
- Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B. and Forno, L. S. : The importance of the '4-5' double bond for neurotoxicity in primates of the pyridine derivative MPTP. *Neurosci. Lett.* **48**, 87 (1984).
- Nicklas, W. J., Vyas, I. and Heikkila, R. E. : Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* **36**, 2503 (1985).
- Heikkila, R. E., Manzino, L., Cabbat, F. S. and Duvoisin, R. C. : Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* **224**, 1451 (1984).
- Yoshikawa, K., Arimitsu, M., Kuki, K., Takemoto, T. and Arihara, S. : Studies on the constituents of Cucurbitaceae plants. XVIII. On the saponin constituents of *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO. (13). *Yakugaku Zasshi* **107**, 361 (1987).
- Razmovski-Naumovski, V., Huang, T. H. W., Tran, V. H., Li, G. Q., Duke, C. C. and Roufogalis, B. D. : Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem. Rev.* **14**, 197 (2005).
- 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. : Ameliorating effects of the ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* on electric footshock stress. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**, 341 (2008).
- Im, S. A., Choi, H. S., Hwang, B. Y., Lee, M. K. and Lee, C. K. : Augmentation of immune responses by oral administration of *Gynostemma pentaphyllum* ethanol extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**, 35 (2009).
- Choi, H. S., Shin, K. S., Choi, S. O., Kim, S. H., Lee, C. K. and Lee, M. K. : Ameliorating effects of herbal ethanol extract from *Gynostemma pentaphyllum* on chronic stress-induced anxiety in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**, 32 (2011).
- Choi, H. S., Park, M. S., Kim, S. H., Hwang, B. Y., Lee, C. K. and Lee, M. K. : Neuroprotective effects of herbal ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Molecules.* **15**, 2814 (2010).
- Schmidt, W. J. and Alam, M. : Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model



- of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **70**, 273 (2006).
- 20) Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Przedborski, S. : Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* **5**, 1403 (1999).
- 21) Schober, A. : Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell. Tissue Res.* **318**, 215 (2004).
- 22) Lee, C. S., Sauer, H. and Bjorklund, A. : Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axonterminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience.* **72**, 641 (1996).
- 23) Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, S. Y., Park, H. D., Kang, M. H., Hong, J. T. and Lee, M. K. : Aggravation of L-DOPA-induced neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1787 (1996).
- 24) Borah, A. and Mohanakumar, K. P. : L-DOPA-induced 6-hydroxydopamine production in the striata of rodents is sensitive to the degree of denervation. *Neurochem. Int.* **56**, 357 (2010).
- 25) Borah, A. and Mohanakumar, K. P. : Long term L-DOPA treatment causes production of 6-OHDA in the mouse striatum: Involvement of hydroxyl radical. *Ann. Neurosci.* **16**, 160 (2009).
- 26) Nagatsu, T. : Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* **29**, 99 (1997).
- 27) Suh, K. H., Choi, H. S., Shin, K. S., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. : Neuroprotective effects of herbal ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* on L-DOPA therapy in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**, 341 (2011).
- 28) Hatano, T., Kubo, S., Sato, S. and Hattori, N. : Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **111**, 1075 (2009).
- 29) Attawish, A., Chivapat, S., Phadungpat, S., Bansiddhi, J., Techadamrongsin, Y., Mitrijit, O., Chaorai, B. and Chavalittumrong, P. : Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. *Fitoterapia.* **75**, 539 (2004).
- 30) Lee, M. K., Choi, H. S., Chen, L., Suh, K. H., Shin, K. S., Kim, S. H., Hwang, B. Y. and Lee, J. K. : Neuroprotective effects of herbal butanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* on the exposure to chronic stress in a 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease treated with or without L-DOPA, Mechanisms in Parkinson's disease-models and treatments. Ch. 18, Intech, 351 (2012).
- 31) Basma, A. N., Morris, E. J., Nicklas, W. J. and Geller, H. M. : L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J. Neurochem.* **64**, 825 (1995).
- 32) Megallia, S., Aktanb, F., Daviesc, N. M. and Roufogalisa, B. D. : Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **8**, 507 (2005).
- 33) Cenci, M. A. : L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13**, S263 (2007).
- 34) Tillerson, J. L., Caudle, W. M., Revern, M. E. and Miller, G. W. : Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Exp. Neurol.* **178**, 80 (2002).
- 35) Mena, M. A., Davila, V. and Sulzer, D. : Neurotrophic effects of L-DOPA in postnatal midbrain dopamine neuron/cortical histoculture cocultures. *J. Neurochem.* **69**, 1398 (1997).
- 36) Im, S. A., Choi, H. S., Choi, S. O., Kim, K. H., Lee, S., Hwang, B. Y., Lee, M. K. and Lee, C. K. : Restoration of electric footshock-induced immunosuppression in mice by *Gynostemma pentaphyllum* components. *Molecules.* **17**, 7695 (2012).
- 37) Shang, L., Liu, J., Zhu, Q., Zhao, L., Feng, Y., Wang, X., Cao, W. and Xin, H. : Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity. *Brain Res.* **1102**, 163 (2006).
- 38) Wang, Z. J. and Luo, D. H. : Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Carbohydr. Polym.* **68**, 54 (2007).
- 39) Jin, C. M., Yang, Y. J., Huang, H. S., Kai, M. and Lee, M. K. : The mechanisms of L-DOPA-induced cytotoxicity in rat adrenal pheochromocytoma cells: Implications of oxidative stress-related kinases and cyclic AMP. *Neuroscience.* **170**, 390 (2010).
- 40) Park, K. H., Park, H. J., Shin, K. S., Choi, H. S., Kai, M. and Lee, M. K. : Modulation of PC12 cell viability by forskolin-induced cyclic AMP levels through ERK and JNK pathways: an implication for L-DOPA-induced cytotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Toxicol. Sci.* **128**, 247 (2012).
- 41) Jin, C. M., Yang, Y. J., Huang, H. S., Lim, S. C., Kai, M. and Lee, M. K. : Induction of dopamine biosynthesis by L-DOPA in PC12 cells: Implications of L-DOPA influx and cyclic AMP. *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 88 (2008).
- 42) Kulich, S. M. and Chu, C. T. : Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *J. Biosci.* **28**, 83 (2003).
- 43) Chaturvedi, R. K., Shukla, S., Seth, K., Chauhan, S., Sinha, C., Shukla, Y. and Agrawal, A. K. : Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **22**, 421 (2006).
- 44) Spinnewyn, B., Mautino, G., Marin, J. G., Rocher, M. N., Grandoulier, A. S., Ferrandis, E., Auguet, M. and Chabrier,

- P. E. : BN82451 attenuates L-dopa-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **60**, 692 (2011).
- 45) Song, L., Kong, M., Ma, Y., Ba, M. and Liu, Z. : Inhibitory effect of 8-(3-chlorostyryl) caffeine on levodopa-induced motor fluctuation is associated with intracellular signaling pathway in 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* **1276**, 171 (2009).
- 46) Bae, Y. : Pharmacologic treatment of Parkinson's disease. *J. Kor. Soc. Health-Syst. Pharm.* **27**, 173 (2010).
- 47) Visanji, N. P., Orsi, A., Johnston, T. H., Howson, P. A., Dixon, K., Callizot, N., Brotchie, J. M. and Rees, D. D. : PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP+ in mesencephalic neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease. *FASEB J.* **22**, 2488 (2008).
- 48) Zhang, H. N., An, C. N., Zhang, H. N. and Pu, X. P. : Protocatechuic acid inhibits neurotoxicity induced by MPTP *in vivo*. *Neurosci. Lett.* **474**, 99 (2010).
- 49) Antoln, I., Mayo, J. C., Sainz, R. M., del Bro Mde, L., Herrera, F., Martn, V. and Rodriguez, C. : Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **943**, 163 (2002).
- 50) Betarbet, R., Sherer, T. B. and Greenamyre, J. T. : Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.* **24**, 308 (2002).