

MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델에서 열다한소탕 가감방 (MYH)의 신경 세포 보호 효과

고가연 · 김윤하 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질의학

Abstract

Neuroprotective Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) in a Parkinson's Disease Mouse Model

Ga-Yeon Go, Yoon-Ha Kim, Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

To evaluate the neuroprotective effects of modified Yuldahanso-tang (MYH) in a Parkinson's disease mouse model.

Methods

- 1) Four groups (each of 8 rats per group) were used in this study.
- 2) The neuroprotective effect of MYH was examined in a Parkinson's disease mouse model. C57BL/6 mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 30 mg/kg/day), intraperitoneal (i.p.) for 5 days.
- 3) The brains of 2 mice per group were removed and frozen at -20°C , and the striatum-substantia nigra part was separated. The protein volume was measured by Bradford method following Bio-Rad protein analyzing kit. Using mouse/Rat Dopamine ELISA Assay Kit.
- 4) The brains of 2 mice per group were separated and removed. TH-immunohistochemical was examined in the MPTP-induced Parkinson's disease mice to evaluate the neuroprotective effects of MYH on ST and SNpc.
- 5) Two mice out of each group were anesthetized and skulls were opened from occipital to frontal direction to take out the brains. The brains added TTC solution for 20 minutes for staining.
- 6) The water tank used for morris water maze test was filled with 28°C water, and a round platform of 10cm in diameter was installed for mice to step on. The study was carried out once a day within 30 seconds, keep exercising to step on the platform in the pool.
- 7) The brains of two mice out of each group were fixed in 10% formaldehyde solution and paraphillin substance was infiltrated. They were fragmented by microtome, and observed under an optical microscope after Hematoxylin & Eosin staining.
- 8) A round acrylic cylinder with its upper side open was filled with clean water and depressive mouse models were forced to swim for 15 minutes. After 24 hours the animals were put in the same equipment for 5 minutes and were forced to swim.
- 9) The convenient, simple, and accurate high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous determination of Neurotransmitters in MPTP-MYH group.

Results

- 1) MYH possess Dopamine cell protective effect on MPTP-induced injury in striatum and substantia nigra pars compacta.
- 2) MYH inhibits the loss of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-IR) cells in the striatum and substantia nigra pars compacta on MPTP-induced injury in C57BL/6 mice.

- 3) MYH possesses improvement effect on MPTP-induced memory deterioration in C57BL/6 mice through the reduction of prolonged Sort of lost time by MPTP injection using the Morris water maze test.
- 4) MYH possesses hippocampal neuron protective effect on MPTP-induced injury in C57BL/6 mice.
- 5) MYH possesses improvement effect on MPTP-induced motor behaviour deficits and depression in C57BL/6 mice through the reduction of prolonged losing motion by MPTP injection using the Forced swimming test.
- 6) MYH increases serotonin product amount on MPTP-induced injury in C57BL/6 mice.

Conclusions

This experiment suggests that the neuroprotective effect of MYH is mediated by the increase in Dopamin, TH-ir cell, Hippocampus and Serotonin. Furthermore, MYH essential oil may serve as a potential preventive or therapeutic agent regarding Parkinson's disease.

Key Words: Modified Yuldahanso-tang (MYH), Parkinson's disease, Dopamin, TH-ir cell, Hippocampus, Serotonin.

Received June 2, 2015 Revised June 2, 2015 Accepted June 18, 2015
 Corresponding Author Taek-Won Ahn
 Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Cheonan Oriental Hospital of Daejeon University
 Doojeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan city, Chungcheongnamdo, 331-958, Korea
 Tel: +82-41-521-7535 Fax: +82-41-521-7007 E-mail: twahn@dju.kr

© The Society of Sasang Constitutional Medicine.
 All rights reserved. This is an open access article
 distributed under the terms of the Creative
 Commons attribution Non-commercial License
 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

I. 緒 論

파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)은 중뇌에 존재하는 도파민성 신경세포의 사멸이 동반되며 가장 빈번히 발생하는 신경퇴행성 질환중의 하나이다. 1817년 James Parkinson에 의해 처음으로 기술되었고 임상적으로는 운동 완서, 근경직, 떨림 등의 증상이 대표적이거나 최근에는 치매를 포함한 다양한 정도의 인지기능 장애의 중요성이 점차 커져가고 있다. 파킨슨병은 치매, 중풍과 더불어 노인 3대 질환으로 꼽힌다. 2011년도부터 2013년도 건강보험심사평가원 질병, 행위 통계에 따르면 파킨슨병은 70~80대 노인뿐 아니라 40~50대 중, 장년층에서도 발병비율이 높아지고 있으며 국내에서 파킨슨병으로 진료를 받는 환자 수는 연평균 약 9%씩 증가하여 2013년 기준 80,002명이다. 이런 추세로 볼 때 2040년에는 파킨슨병이 Alzheimer disease와 더불어 kidney cancer, malignant melanoma, colon cancer, lung cancer 등보다 사망률이 더 높을 것으로 추정된다. 고령화 사회로 접어들면서 노인인구의 증가에 따라 파킨슨병의 유병률 또한 급증하고 있는 것을 볼 때, 퇴행성 뇌질환에 대한 연구의 필요성이 대두

되고 있다. 파킨슨병 치료 약물은 대증치료로서, 1960년대에 소개된 Levodopa가 주로 사용되지만, 진행된 파킨슨병 환자들에게서는 Levodopa의 치료 효과가 제한되어 있고 장기간 이 약물을 투여 받은 환자에서 산화물질인 ROS 형성에 의하여 신경독성이 발생하고 있으며, 그 외 약물 효능의 감소, 이상운동증 (dyskinesia), 운동 동요 (motor fluctuation) 및 다른 합병증이 발생하는 것으로 알려져 있다.

한의학적으로 파킨슨을 주요한 증상의 측면에서 볼 때 역대 문헌의 震顫, 瘳, 攣과 中風의 偏枯 등의 용어로 서술될 수 있다. 『內經』⁶에서 "諸風掉眩, 皆屬於肝..... 諸暴強直 皆屬於風"이라 하여 震顫, 強直 및 기타 파킨슨병의 증상에 대한 병리 및 생리를 최초로 언급하였다. 병인은 공통적으로 風, 火, 痰, 瘀이며, 임상유형은 肝腎陰虛, 氣血兩虛, 痰熱內阻, 氣滯血瘀로 분류할 수 있고, 장부로는 肝, 脾, 腎, 心과 밀접한 관계가 있다.⁷

『東醫壽世保元』⁸에 기재된 열다한소탕 (熱多寒少湯)은 태음인 (太陰人) 肝受熱裏熱病을 치료하도록 만들어진 처방으로, 임상에서는 태음인의 대사 증후군을 비롯한 성인병에 유효한 처방으로 활용되고

있다⁹. 열다한소탕에 석창포(石菖蒲), 용안육(龍眼肉), 원지(遠志)를 가감한 열다한소탕 가감방은 태음인의 중풍 초기단계에서 뇌세포의 손상을 보호하는 등 활용 빈도가 높은 처방으로 알려져 있다¹⁰. 본 연구에서는 이러한 임상적 활용에 착안하여, 열다한소탕 가감방이 파킨슨병의 주요 원인인 환경 독성이 유발하는 뇌신경 세포 파괴에 대하여 구체적으로 어떤 효과를 보이는지 확인하여 파킨슨병을 비롯한 퇴행성 뇌신경 질환의 치료의 가능성을 알아보기 위하여 실험적 연구를 진행하였다.

지금까지 뇌 기능에 끼치는 열다한소탕의 영향에 대한 선행 연구로는 배⁹, 김 등¹⁰의 열다한소탕 가감방의 자가탐식(自家貪食) 관련 연구와 최 등¹¹의 열다한소탕 가감방으로 호전된 파킨슨병 환자 1례 등이 있다. 그러나 지금까지의 연구는 열다한소탕 가감방의 단순 증례 또는 자가 탐식 기전에 대한 것들 위주였으며 열다한소탕 가감방을 통한 도파민 양의 측정이나 행동 실험에서의 변화, HPLC를 통한 표준 분석 등에 관련한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 연구에서는 배⁹의 연구를 통하여 알려진 열다한소탕 가감방(modified Yeoldahanso-tang ; 이하 MYH라 칭함)을 이용하여 MYH가 뇌 신경 세포를 어떠한 기전으로 보호하며, 그 결과 동물 행동은 어떤 변화를 보이는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 이에 MPTP 주입후 파킨슨병 병태 mouse 모델을 만든 후 선조체-흑질 부위

를 절개하여 도파민 양 측정 및 TH 면역화학조직 염색을 시행하였고 TTC 용액을 이용하여 허혈의 크기 변화를 확인하였다. 또한 Morris water maze test와 해마 뇌 조직검사를 통해 기억력 증진 효과를 확인하였으며 Forced swimming test와 HPLC 유효 성분 분석을 통하여 항우울 효과를 알아보았다.

본 연구를 통하여 MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델을 이용한 MYH의 신경 세포 보호 효과를 확인하여 파킨슨 병을 비롯한 퇴행성 뇌 신경 질환의 치료와 예방에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 研究材料 및 方法

1. 研究材料

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 천안한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. MYH는 『東醫壽世保元』⁸에 근거하였으며, 그 구성비는 이전의 연구에 사용된 MYH의 구성비와 같다^{9,10}(Table 1).

2) 동물

수컷 6 주령의 20~22 g C57BL/6 mouse (대한바이오

Table 1. Plant Constituents of MYH⁹

N0.	Scientific name	Contents(g)
1	<i>Puerarialobata</i> (Willd.) <i>Obwi</i>	12
2	<i>Angelica tenuissima</i> <i>Nakai</i>	8
3	<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Georgi</i>	4
4	<i>Playtycodon grandiflorum</i> (Jacq)	2
5	<i>Angelicae Daburica</i>	4
6	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> <i>Kom</i>	4
7	<i>Rapbanus sativa</i> <i>L</i>	4
8	<i>Polygala tenuifolia</i> (Willd.)	8
9	<i>Acorus gramineus</i> <i>Soland.</i>	12
10	<i>Dimocarpus longan</i> <i>Lour</i>	12
total		70

*MYH, modified Yeoldahanso-tang

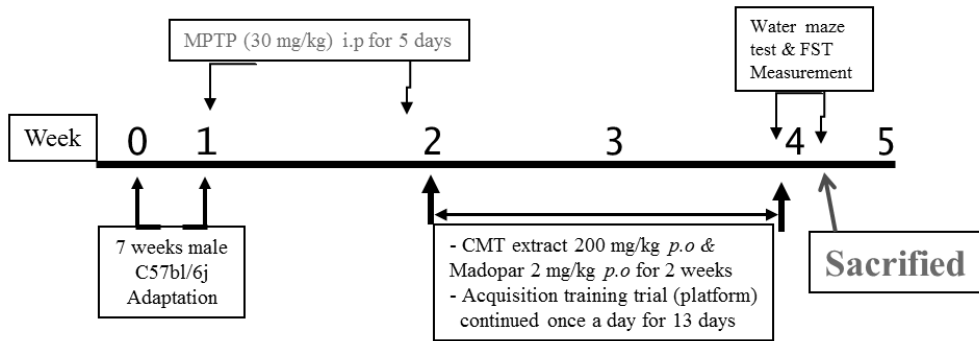


Fig. 1. Experimental design of MPTP Parkinson disease mouse model

A schematic representation of the experimental protocols used in this study.

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

링크, Korea)를 공급받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$ 환경에서 12 시간의 light-dark cycle이 유지되는 동물 사육실 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (승인번호: DJUA RB2013-042)의 승인을 받았다.

3) 기기

기기(機器)는 열탕추출기 (대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치 (Rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기 (freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 배양기 (Forma scientific Co., USA), 원심분리기 (한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA leader (Molecular Devices, USA), HPLC (Waters Co. Milford, MA, USA) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 검액 조제

약재를 깨끗이 세척하고 잘게 절단한 후 중량 비율

대로 혼합하고, 중량의 4배의 물을 가하여 용기 약탕기 95°C 에서 3시간동안 끓인 다음 여과지로 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vacuum evaporator)로 농축하였다. 감압 농축을 실시하여 얻은 분말은 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전히 건조시켰으며, 이후 분말을 냉동 보관 (-84°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) MPTP에 의한 파킨슨병 mouse 모델

약 25.3g의 수컷 C57BL/6 mouse에 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, 30 mg/kg, in saline)를 1일 1회 5일간 복강에 투여하여 파킨슨병 유도 mouse를 제작한 후 2일간 방치하여 격리시킨 후 사육실로 이동시켜, 14일간 MYH와 Madopar[®] (MD)를 경구투여 하였다.

3) 실험군 구성 및 실험 설계

실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무게별로 균등하게 10마리씩 4 group으로 나누고, 각 group 별로 다음과 같이 처치하였다(Fig 1).

- Control group : mice received saline only.
- MPTP group : Mice received intraperitoneal (i.p.) injections of MPTP-HCL (30mg/kg of free base; Sigma, USA) in saline at 24h intervals for 5 days.

- Madopar[®] + MPTP group : MPTP 복강 주입한 mouse에 14일간 MD (Levodopa+Benserazide) 2 mg/kg을 경구 투여하였다.
- MYH + MPTP group : MPTP 복강 주입한 mouse에 14일간 MYH 200 mg/kg을 경구 투여하였다.

4) MYH의 도파민 변화 연구

(1) 선조체-흑질 혼탁액의 도파민 양 측정

총 2마리 mouse의 뇌를 적출하여 -20℃에서 얼린 후 뇌시료 (선조체-흑질 부위)부분을 분리하였다. 뇌시료 (선조체-흑질 부위, 0.25g)부분에 200~500 μ l의 extraction buffer (0.3 M sucrose, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.1% protease inhibitor, 0.1% phosphatase inhibitor, 0.5% NP 40)를 넣어 호모제나이저 (homogenizer)로 균질화한 후 최종 부피가 0.2 ml이 되도록 extraction buffer를 가해 잘 혼합한 뒤 2시간 동안 4℃에서 용해시켰다. 여기에 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 3분씩 5번 동안 vortex하고 4℃, 15,000rpm에서 15분간 원심 분리 한 후 상등액 (100 μ l)을 취하였다. 단백질 양은 Bio-Rad 단백질 분석 키트에 기술된 Bradford 방법 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 따라 측정하였다. Mouse/Rat Dopamine ELISA Assay Kit (DOU39-K01, Eagle Biosciences, Inc)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 100 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 이 후 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 μ l씩 넣었다. 그 후 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양한 다음, microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 200 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. 그 다음 stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450nm로 측정

하였다.

(2) 선조체-흑질의 TH 면역 반응 세포 염색

분리된 생쥐의 뇌를 적출하여 Zamboni's fluid (4% paraformaldehyde, 1.5% saturated picric acid, 0.1M PB)용액으로 관류 고정된 후 4시간 후 고정하였다. 이를 30% Sucrose에 조직이 포화될 때 까지 4℃ 보관 뒤 OCT compound로 조직을 붙여 CO₂ gas로 급속 동결하여 Cryostat (RJL-2800, IMEB Inc., CA, USA)로 30 μ m 두께로 floating section 하였다. 준비한 조직은 항체에 따라 서로 다른 10% Serum (S-5000, VECTOR)으로 1시간 동안 실온에서 전처리 한 후 일차 항체를 처리한다. TH-면역조직화학 염색은 일차 TH 항체 (rabbit anti-TH antibody, 1 : 1000)와 반응시킨 후 항체들을 사용하였다. 일차 항체는 4℃에서 48시간 Orbital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 세 차례 씻어낸 후 이차항체를 처리한다. 이차항체는 Fluorescein goat anti-rabbit IgG (F-2765, Molecular probe, diluted 1:200)로 4℃에서 2시간 동안 Orbital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 네 차례 씻어낸 후 슬라이드에 조직을 6장씩 붙였다. Mounting은 형광 전용액 (H-1000, VECTOR)을 사용하였다. 형광현미경은 AXIO scope (CARL ZEISS)를 사용하였으며, program은 Meta Morph (ver.6.1)로 분석하였다.

5) MYH의 뇌 허혈 및 조직 손상 분석

mouse 2마리를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼냈다. 꺼낸 뇌를 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2mm의 두께로 자르고 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색하였다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분, 즉 혈액 공급이 되지 않아 뇌세포가 파괴된 곳은 콜라겐으로 채워지므로 하얗게 염색되었다. 허혈 크기의 측정은 Brian¹²의 방법으로 수행하였다. 허혈의 크기 (AT)는 [(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]이고, A는 사진상(Fig 5)에 나타난

허혈 면적, ST는 각각 section (2mm)의 전체 면적이다. 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다¹³.

6) MYH의 기억력에 대한 연구

(1) Morris water maze test

Morris water maze test란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28°C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 mouse가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 원형 수조의 중심을 지나면서 직교하는 두 개의 가상선을 그어 수조를 4개의 사분면으로 나누었다. 그 중 하나의 사분면 중앙에 아크릴로 만든 도피대, 즉 platform을 설치하였다. 수조에 40cm 깊이로 물을 담고 도피대가 보이지 않게 하기 위해서 1kg의 탈지분유를 풀었다. 수조의 위 천장에는 비디오 카메라를 설치하여 학습이 이루어지는 동안 동물의 움직임을 촬영하였다. 학습은 1일 1회 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 연습을 반복 하여 실시하였다. 선별된 mouse 10마리를 한 군으로 하여 정상군 (C57BL/6-nr), 대조군 (MPTP control), 양성대조군 (MPTP-MD 2 mg/kg)과 MYH (MPTP-MYH 200 mg/kg)으로 분류하였고, 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복 훈련을 실시하였다.

(2) 해마 조직 분석

생쥐의 뇌를 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음 파라핀린 물질을 삼투시켜 고화시켰다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고 광학 현미경상에서 관찰하였다.

7) MYH의 우울증상에 대한 효과

(1) Forced swimming test

강제 수영 검사는 다른 말로 절망행동검사라고 불리며 약물 개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 윗면이 개방된 원통모양의 아크릴 실린더 (지름 20cm, 높이 40cm)에 깨끗한 수돗

물 (수온 25±2°C)을 실린더 바닥에서부터 15cm까지 붓고 mouse를 15분 동안 강제로 수영시켰다. 그 후 물에서 건져 올려 마른 수건으로 닦고 사육 상자로 돌려보낸 후 (pretest session) 24시간 후에 동물을 동일한 장비에 5분 동안 빠뜨려 쥐가 하는 행동을 측정하였다 (test session). 처음 실험시 수분간은 이를 벗어나기 위해 심한 저항을 보이거나 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어났다. 두 번째 날 검사 시에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고 부동행동의 자세를 측정하였다. 전형적인 부동행동이란 동물이 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 뒤로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 단순 떠있는 상태이다. 사람에게 의한 오차를 줄이기 위해 캠퍼터등의 기록 장치를 이용하여 기록하고, 기록된 영상을 통하여 test session (5분) 동안 동물의 행동이 나타나는 시간을 측정하였다. 이번 검사에서는 동물이 발버둥치지 않고 물위에 가만히 떠있는 행동 상태를 부동성의 증가로 보고 절망 행동의 지표로 삼았다(Immobility behavior).

(2) HPLC를 이용한 신경전달물질 함량의 분석

총 2마리 mouse의 뇌를 적출하여 호모제나이즈 (homogenizer)로 균질화한 후 5 ml 에탄올을 가하여 6시간 이상 shaking water bath에서 배양하였다. 그 후 3M filter로 모두 거른 다음 0.2 ml로 가압 농축하였다. 농축된 추출액을 HPLC 분석을 통해 도파민 (dopamine), 세로토닌 (serotonin), 멜라토닌 (melatonin), 에피네프린 (epinephrine), 노르에피네프린 (norepinephrine)의 함량을 분석하였다. 뇌 추출물 분석을 위한 HPLC (Waters Co. USA)는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 분석과장은 220 nm, 유속은 1.0 ml/min 이었고, 컬럼은 Luna C18 col-

Table 2. Solvent Gradient Condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A ^a	B ^b
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

a: Water with 0.1% formic acid.

b: Acetonitrile with 0.1% formic acid.

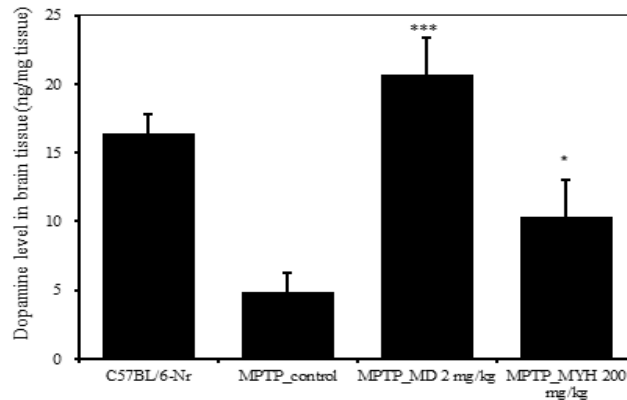


Fig. 2. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the levels of dopamine in the brain tissue in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. The dopamine level was initiated at 3 weeks after orally administered of MYH extract (200 mg/kg, p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means±E (N=8). Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD (2 mg/kg,p.o); MYH extract (200 mg/kg, p.o). The brains were removed and the levels of dopamine were determined by an ELISA method. Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (*p<0.01, ***p<0.001).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

umn (250 mm x 4.6 mm; particle size 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였다. 표준성분 시료는 Sigma USA사의 serotonin과 melatonin을 이용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수 (0.1% TFA 함유), B 용매로 100% 아세트니트릴에 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였고 용매계는 용매기울기 용리로서 아래 표(Table 2)에 나타내었다. 표준물질 대비 이용된 시료의 피크를 비교하여 자동적으로 HPLC 피크가 탐색되고 정량되는 방법을 사용하였으며 검출된 세로토닌의 양은 그래프 피크의 면적을 구한후 뇌조직의 중량대비 면적을 측정하여 ng/g으로 나타내었다.

3. 통계

모든 실험은 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS 10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 T-test (T 검정)을 한 후 α=0.05 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)

III. 研究結果

1. MYH의 도파민 보호 효과

1) 선조체 흑질 혼탁액의 도파민 보호 효과

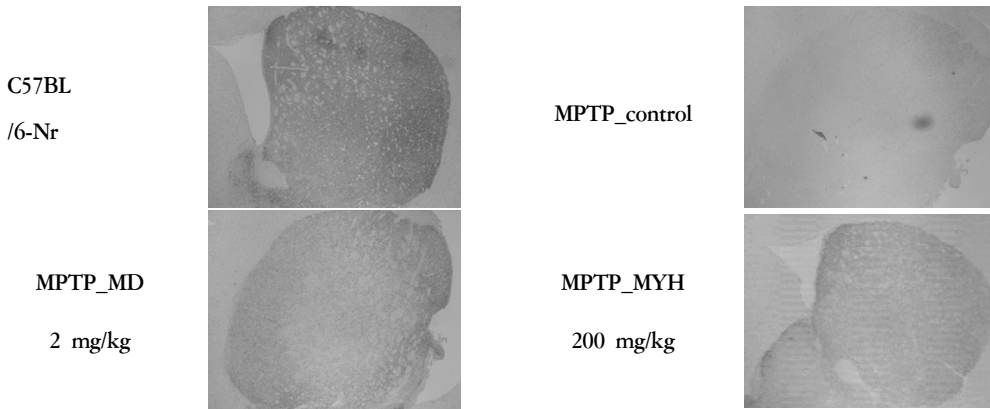


Fig. 3. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the Immunohistochemistry of TH-immunoresponsive (TH-IR) neurons in the Striatum (ST) in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. The hippocampal lesion level was initiated at 3 weeks after orally administered of MYH extract (200 mg/kg, p.o) and injected MPTP induced Parkinson's disease mice. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD(2mg/kg, p.o); MYH extract (200mg/kg, p.o). TH-IR cells in the ST of mice were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody. Representative photomicrographs are shown of the ST from each group. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon,×40).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

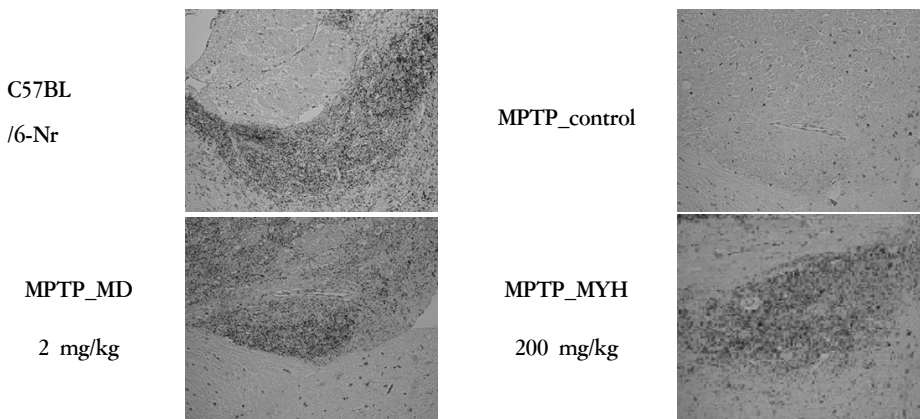


Fig. 4. TH-IR cells in the SNpc of mice were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody in a subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD (2 mg/kg, p.o); MYH extract (200 mg/kg, p.o). TH-IR cells in the ST of mice were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody. Representative photomicrographs are shown of the substantia nigra (SNpc) from each group. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon,×40).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

실험에 참가한 mouse 중 총 2마리의 뇌 선조체 (ST)-흑질 (SN) 부위를 직접 갈라 도파민의 양을 측정하였다. 대조군인 MPTP-MD group은 MPTP group의 도파

민 양에 비해 4배 넘게 증가한 것을 확인할 수 있으며 MPTP-MYH group의 도파민 양은 MPTP group에 비해 약 2배 이상 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig 2).

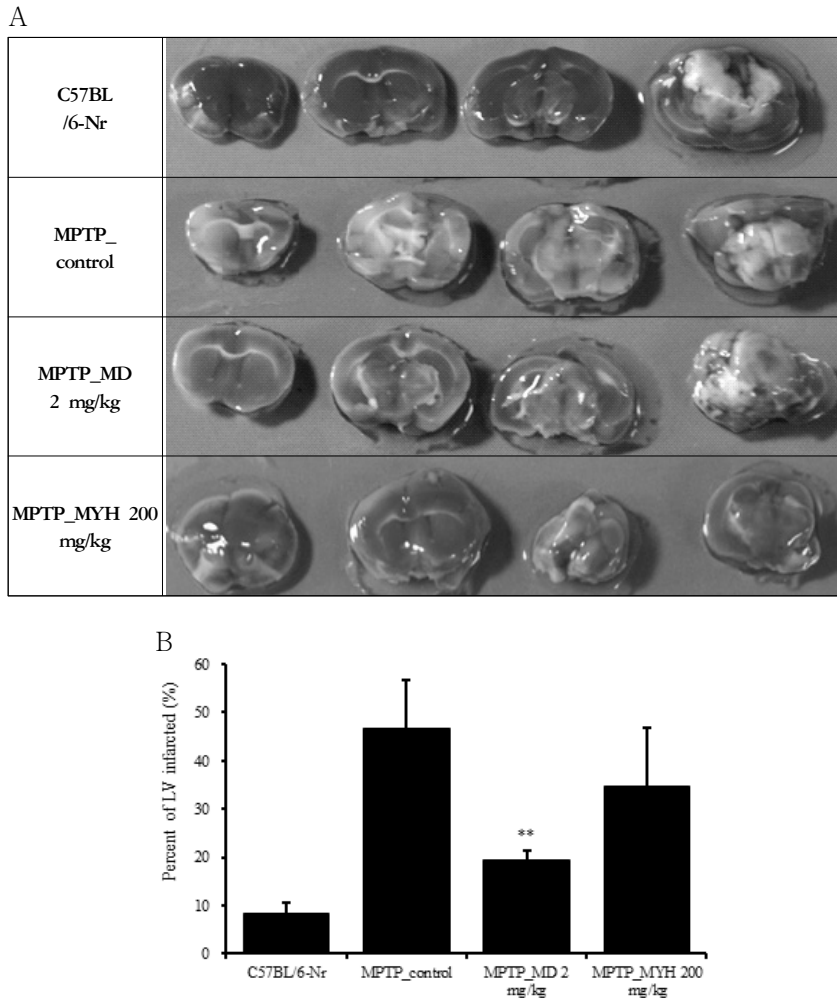


Fig. 5. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the coronal section in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. (A) Brain cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H tetrazolium chloride and (B) % LV using various BH(brain Hipocampus) imaging measurements. Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD (2 mg/kg, p.o); MYH extract (200 mg/kg, p.o). Data represent means±E (N=8). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (**p<0.005).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

2) 선조체 흑질의 TH 면역 반응 세포 보호 효과

총 2마리 Mouse의 선조체와 흑질에서 TH 면역 반응 세포의 분포와 범위를 면역화학조직염색을 통하여 알아보았다. 염색 양상을 보면 선조체(Fig 3)와 흑질(Fig 4) 모두 MPTP group에 비해 MPTP- MYH group에서 염색 농도가 훨씬 짙은 것을 알 수 있으며 이것은 TH 면역 반응 세포의 갯수와 밀집도가 더 높다는 것을

뜻한다.

2. MYH의 뇌허혈 및 조직 손상 보호 효과

Mouse의 전체 뇌를 TTC 용액 처리하여 허혈된 면적을 살펴보았다. 그 결과 MPTP group에서는 뇌혈관의 50%에 해당되는 부분이 허혈 상태로 변화하였으며 MPTP-MD group은 뇌혈관의 20%, MPTP-MYH group은 뇌혈관의 35% 정도가 허혈 상태로 변한 것을 확인할 수 있었다. 아래의 뇌 단면 그림을 보면 MYH를

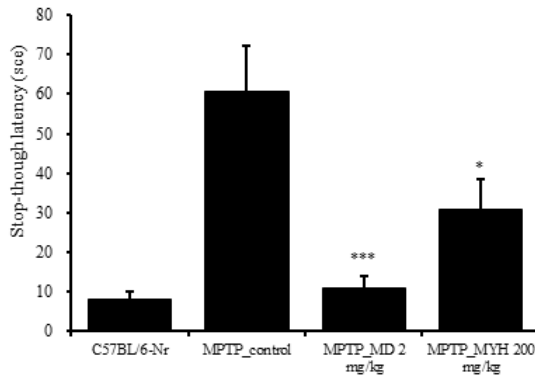


Fig. 6. Effects of Modified Yulдахanso-tang (MYH) on the impairment of learning and memory of the Stop-through type Morris water maze test in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. Measuring Lardist which is the total distance (in cm) was initiated at 2 weeks after orally administered of WGM extract (200mg/kg, p.o) and in 14th day, the retention trial was carried out after the acquisition training trial and injection MPTP to the induced Parkinson's disease mice. Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD (2mg/kg, p.o); MYH extract (200mg/kg, p.o). Lardist this is the total distance (in cm) covered By the animal in large movement, and smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data (Lardist plus Smldist) represent means±SE (N=8). Data represent means±SE (N=8). Statistically significant value compared with MPTP-induced Parkinson's diseasemice group (control) data by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

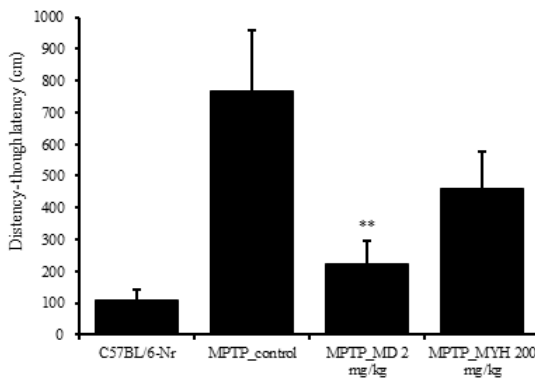


Fig. 7. Effects of Modified Yulдахanso-tang (MYH) the spatial working memory deficits of the distance movement-through type Morris water maze test in the MPTP-induced Parkinson's disease mice.

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. Measuring Lardist which is the total distance (in cm) was initiated at 2 weeks after orally administered of WGM extract (200mg/kg, p.o) and in 14th day, the retention trial was carried out after the acquisition training trial and injection MPTP to the induced Parkinson's disease mice. Control, MPTP-induced Parkinson's disease mice; MD (2 mg/kg,p.o); MYH extract (200 mg/kg, p.o). Lardist this is the total distance (in cm) covered By the animal in large movement, and smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data (Lardist plus Smldist) represent means±E (N=8). Data represent means±SE (N=8). Statistically significant value compared with MPTP-induced Parkinson's disease mice group (control) data by T test (**p<0.005).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

사용하였을 경우 콜라겐으로 채워진 허혈 부분이 MPTP group에 비해 줄어든 것을 볼 수 있다. 그러나 MPTP-MD group은 통계학적으로 유의성을 가지는데 반해 MPTP-MYH group은 뇌의 허혈 부분을 유의하

게 감소시키지는 못하였다(Fig 5).

3. MYH의 기억력에 대한 효과

1) Morris water maze test

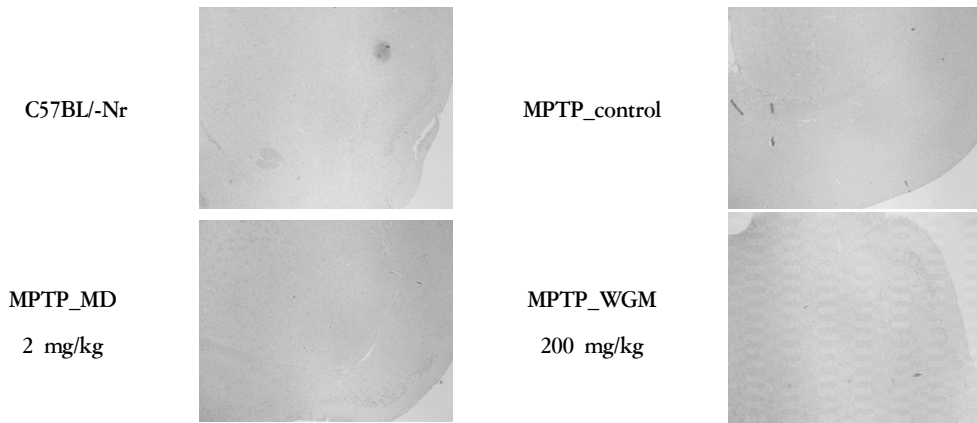


Fig. 8. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the histological analysis of hippocampal lesion in the MPTP-induced Parkinson's disease (Pd) mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. The hippocampal lesion level was initiated at 3 weeks after orally administered of MYH extract (200 mg/kg, p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced PD mice; MD 2 mg/kg, p.o); MYH extract (200 mg/kg, p.o). They were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, ×40).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

Morris water maze를 이용하여 mouse의 기억력 변화를 살펴보았다. 연구에 사용된 mouse들을 MD와 MYH를 경구 투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복 학습 훈련을 실시하여 선별된 mouse의 균을 나누어 실험을 진행하였다. 그 결과 MPTP group은 정상군에 비해 platform까지 찾아가는데 걸린 시간(Fig 6)은 6배, 찾아가면서 헤맨 거리(Fig 7)는 8배에 달해 기억력이 현저히 저하됨을 알 수 있었다. MPTP-MYH group은 MPTP group에 비해 platform까지 찾아가는데 걸린 시간은 통계학적으로 유의성 있는 단축을 보였다. 그러나 찾아가는데 까지 걸린 거리, 즉 헤맨 거리는 유의성 있는 단축을 보이지 못하였다.

2) 해마 조직에 대한 효과

이번 연구에서는 해마의 조직 검사를 위해 총 2마리의 Mouse가 실험에 이용되었다. 그 결과 정상군보다 MPTP group에서 눈에 띄게 해마의 신경이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. MPTP-MD group과 MPTP-MYH group은 MPTP에 의해 사라졌던 해마 신경이 많이 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig 8).

4. MYH의 우울증상에 대한 효과

1) MYH의 Forced swimming test에서의 효과

Forced swimming test를 실험한 결과 MPTP group은 무동 시간이 212.0 ± 0.24 초, MPTP-MD group은 125.7 ± 0.20 초, MPTP-MYH group은 무동 시간이 137.3 ± 0.33 초로 MYH를 처리한 경우 MPTP 단독 처리한 mouse보다 약 75초 가량 무동 시간이 단축된 것을 확인할 수 있었다. MPTP-MD group 결과보다 대략 10초 정도의 차이만 나타내었다. 이는 MYH가 MPTP 주입으로 파킨슨 병을 유발한 mouse에게서 우울 및 행동 능력 저하의 개선에 통계적인 유의성 ($p < 0.01$)을 갖는다는 것을 뜻한다(Fig 9).

2) MYH의 세로토닌 생성량에 대한 효과

HPLC를 이용한 표준 분석 및 신경 전달 물질 분석을 하였다. 총 5종류의 신경전달물질인 도파민, 세로토닌, 멜라토닌, 에피네프린, 노르에피네프린을 분석하였고 그 중에서 세로토닌만 HPLC 분석에서 확인되

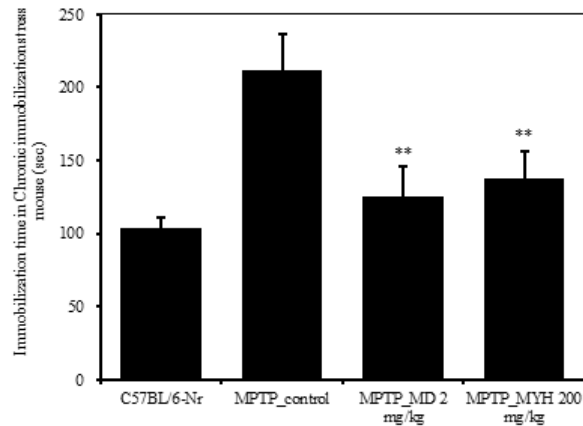


Fig. 9. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the immobility time during the forced swim test in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. The FST behaviour was videotaped for later analysis and the periods of immobility were scored from videotapes. Data represent means \pm SE (N=8). Statistically significant value compared with MPTP-induced Parkinson's disease mice group (control) data by T test (** $p < 0.005$).

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

었다. 세로토닌의 HPLC 분석시 나타나는 표준 품을 확인하였으며 그 후 정상 쥐 외 다른 group mouse의 뇌 성분에 함유된 세로토닌의 패턴을 확인하여 표준 물질을 동정하였다. 검출된 세로토닌의 양은 그래프 피크의 면적을 구한후 뇌조직의 중량대비 면적을 측정하여 ng/g으로 나타내었다. 그 결과 각 group의 세로토닌 생성량이 미세하게 다른 것을 확인할 수 있었다. 이 자료를 토대로 정상군과 MPTP group, MPTP-MD group, MPTP-MYH group의 뇌의 세로토닌 함량을 비교해 보았을 때 정상군에 비하여 MPTP group의 세로토닌 생성량이 감소를 나타내었다. 그리고 MPTP-MD group ($p < 0.001$)과 MPTP-MYH group ($p < 0.001$)은 대조군에 비하여 세로토닌 생성량이 통계학적으로 유의성 있게 증가를 나타내었다(Fig 10).

IV. 考察 및 結論

파킨슨병은 신경계 퇴행성 질환 중 가장 흔한 질환으로 뇌의 흑색질 파괴로 인하여 신경전달 물질인 도파민이 부족해져 생기는 질환이다. 시냅스 전 단백질

인 알파 시누클레인의 신경 축적이 특징이고 서동증인 신체의 느린 증상, 휴식기의 떨림증, 근육 강직, 종종 걸음, 그리고 자세 고정으로 정의되는 다양한 파킨슨 증상이 나타난다⁴. 중뇌 흑질의 도파민 신경 세포는 흑질-선조체 섬유를 통해 선조체와 긴밀하게 연결되어 있으며 선조체는 다시 시상, 시상저핵 및 대뇌 피질 운동 영역등과 긴밀하게 연계되어 수의 운동을 조절한다. 파킨슨병은 중뇌 흑질에 존재하는 도파민 신경 세포의 선택적 사멸을 병리학적 특징으로 하며 따라서 파킨슨병 환자는 전체적인 수의운동의 불균형을 동반한다. 파킨슨 병 치료를 위한 약물로 도파민의 전구체인 levodopa(L-dopa)를 투여하는 방법이 가장 많이 이용되어 왔으나 장기적인 levodopa(L-dopa) 투여는 환자에게 심각한 부작용을 가져오며 심지어 잔존하는 도파민 신경세포의 사멸을 촉진할 수 있다는 주장이 있다. 최근에는 선조체나 시상저핵 등의 운동기능 조절 중추에 전극을 심어 환자의 운동 기능 장애를 치료하려는 수술적 기법이 환자들에게 시행되고 있으나 이와 같은 뇌심부 자극술은 말기 환자에 국한하여 적용될 수 있는 최후의 수단이다⁵. 파킨슨병의 원인으로 다양한 기전이 알려져 있지만

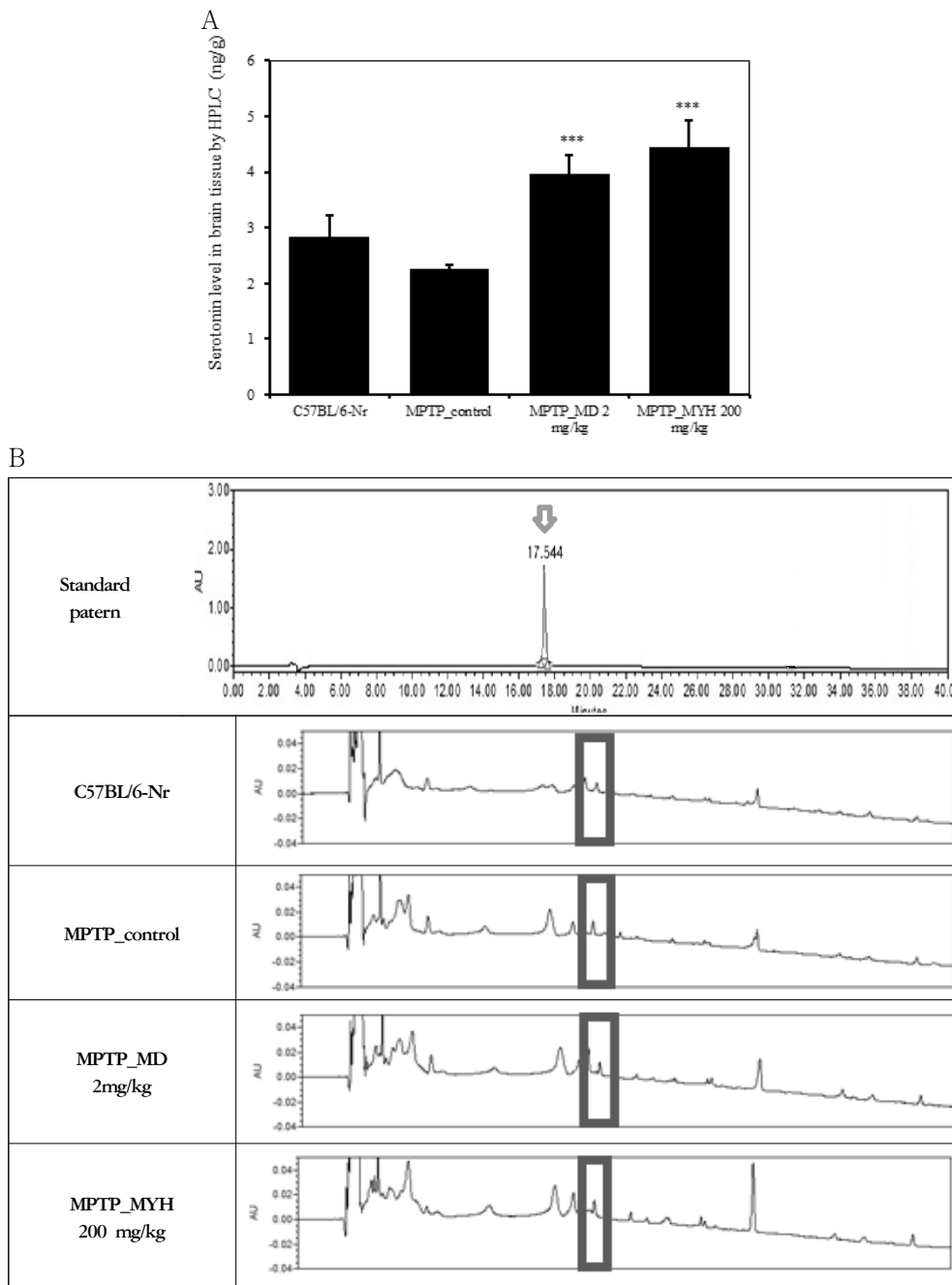


Fig. 10. Effects of Modified Yuldahanso-tang (MYH) on the levels of serotonin in the brain tissue in the MPTP-induced Parkinson's disease mice

(A) C57BL/6 mice were orally administered of MYH or MD and the acquisition training trial continued once a day for 13 days. The serotonin level was initiated at 3 weeks after orally administered of MYH extract (200 mg/kg, p.o) and injected MPTP induced Parkinson's disease mice. Data represent MYH extract (200 mg/kg, p.o). (B) The brains were removed and the levels of serotonin were determined by an HPLC method. Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (***)p<0.001.

*MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

최근에 와서는 환경 호르몬에 의한 질병 유발이 주된 원인으로 알려지고 있다. 파킨슨병을 유발하는 것으로 알려진 화학 물질로는 유기 농약제인 paraquat, rotenone, amphetamine, MPTP 등이 있다^{6,17}. MPTP는 생체 내로 유입되면 뇌에서 MPP+로 변환되어 중뇌의 흑질 부위를 비가역적으로 파괴한다. 현재까지 MPTP의 신경 독성을 완화시킨다고 알려진 것은 Vitamine E, allopurinol, selenium, centrophenoxine 등이 있으며, 주로 활성 산소를 제거하여 도파민성 신경 세포의 파괴를 완화하거나, 생체 내에서의 MAO-B inhibitor로 작용하여 MPTP 대사를 저해시키는 기전으로 파킨슨병의 치료에 활용되고 있다^{18,19}. 고령화 사회로 진입한 후 퇴행성 뇌질환자가 급증하고 있으며 특히 파킨슨병 유병율이 연 9%씩 증가하고 있으므로 파킨슨병을 비롯한 각종 퇴행성 뇌질환에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있는 가운데 다양한 부작용을 야기시키는 양방 치료를 대신할 대체 연구에 관심이 쏠리고 있다. 열다한소탕은 동의수세보원에 수록된 태음인 처방으로 약물 구성은 갈근(葛根)을 군약으로 하여 황금(黃芩)과 고본(藜蘆), 나복자(蘿菴子), 길경(桔梗), 승마(升麻), 백지(白芷)로 되어 있으며 본초학상 갈근은 解表약에 속하고 脾胃二經에 귀경하여 解肌退熱하고 승마나 황금과 배합할 수 있다²⁰. 또한 고본과 백지는 모두 解表약으로서 散寒, 祛風하여 피부과 질환에 다용한다²¹. 열다한소탕에 석창포, 용안육, 원지를 가감한 MYH는 태음인의 중풍 치료약으로 다용될 뿐만 아니라 뇌신경 세포 보호 및 항 치매 효과가 있어 퇴행성 뇌질환 치료에 널리 이용되고 있다. 지금까지 MYH를 이용한 파킨슨병 관련 선행 연구로는 배⁹의 『파킨슨병 병태모델에서 自家 飮食作用 活性化를 통한 熱多寒少湯 加減方의 뇌신경 보호 효과』와 김 등¹⁰의 『熱多寒少湯 加減方의 自家 飮食 유도 활성화와 관련 단백질 탐색』을 대표적으로 꼽을 수 있다. 배⁹의 연구는 MYH를 통해 MPTP가 유발한 독성으로부터 Human neuroblastoma cells인 SH-SY5Y 세포를 증식시키고 보호하는 효과가 있으며 이상 단백질의 응집을 분해하는 자가탐식을 유도하는

효과, TH 면역 조직 화학염색 실험에서 흑색질, 선조체에서의 TH 양성 세포수 감소를 억제하는 효과, MYH 중에서도 원지와 나복자가 그 유도 효과가 가장 큰 것을 확인하는 연구이며 또한 행동 실험을 통해 T-turn time을 측정하여 파킨슨병의 대표적인 증상인 서동에 대한 개선 효과를 규명한 연구였다. 김 등¹⁰의 연구는 배⁹의 연구를 통해 밝혀진 MYH의 자가탐식 유도효과를 기반으로 하여 자가탐식이 이루어지는 기전을 밝혀내었다. 많은 연구에서 autophagy의 활성화는 다양한 신경질환에서 뇌신경 보호효과를 한다고 알려져 있는데^{22,23} 그 중 가장 중요한 신호전달체계 경로로 뽑히는 것은 mTOR (mammalian target of rapamycin)이다²⁴⁻²⁶. mTOR의 하, 상위 경로의 활성을 측정하여 어떤 경로에서 자가탐식의 활성화가 이루어지는지 밝혀내고자 하였고 그 결과 mTOR의 상위 경로 중 주요 조절인자인 AMPK가 mTOR 활성을 억제하며 이는 mTOR의 하위 경로인 Beclin-1의 활성화를 유도하여 自家 飮食 작용을 증가 시킴을 밝혀내었다^{10,23}.

이에 본 저자는 MYH가 자가탐식을 유도하는 효과로 인해 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환에 치료 효과를 보인 점을 감안하여 MPTP 주입으로 파킨슨병을 유발한 동물 모델을 이용하여 선조체-흑질 부위의 도파민과 TH 면역 반응 세포를 측정하였고 뇌허혈 및 조직 손상에 대한 변화를 관찰하여 도파민 신경세포의 보호를 알아보았다. 또한 Morris water maze test와 해마 조직 검사, Forced swimming test와 HPLC를 이용한 신경전달물질 함량의 분석을 통해 MYH의 파킨슨병에 관련한 다양한 효능을 실험을 통해 규명하고자 하였다.

본 연구에서는 정상군 외 파킨슨 유발 mouse (MPTP group)군과 양성 대조군인 MPTP - MD group, MPTP 후 MYH 경구 투여한 군 (MPTP - MYH group)으로 나뉘었으며 각 group마다 실험 대상 쥐는 8마리로 책정하였다.

먼저 파킨슨 병 유발의 중요한 원인이 되는 도파민 양을 측정하는 실험을 시행하였다. 파킨슨 병은 여러 가지 원인에 의해 중뇌 선조체-흑질 부위의 도파민이

사멸하여 발생하는 질환이다. 따라서 mouse의 선조체-흑질 혼탁액에서 도파민 양을 측정한다면 직접적이면서도 중요한 뇌의 변화를 알 수 있는 방법이 될 것이다. 실험 결과 MPTP group에 비해 MPTP-MYH group에서 도파민 양이 2배 가까이 늘어난 것을 확인할 수 있었고 그 효과는 통계적 유의성을 가졌다. 비록 MPTP-MD group의 도파민 증량만큼은 아니었지만 파킨슨병 병태 생리학적 원인의 가장 직접적인 원인인 도파민 감소 부분에 있어 보호를 확인한 것은 MYH도 파킨슨병 치료에 있어 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 입증한 결과이다(Fig 2).

또한 도파민의 증량 변화를 알아보기 위하여 우리 몸의 선조체와 흑질에 분포하며 면역을 담당하는 TH 면역 반응 세포의 증가, 감소를 측정하였다. TH는 도파민과 에피네프린을 합성하는 과정의 전반적인 속도 조절을 담당하는 것으로 도파민 신경 세포의 분화가 적절히 일어나지 못하거나 여러 원인으로 인한 중뇌 도파민 신경세포의 사멸 후 재생 과정에서 적절한 TH 유전자 발현 조절이 일어나지 않는 것이 파킨슨병의 병리적 원인으로 밝혀졌다. 이에 따라 TH 유전자 유도 발현이 파킨슨병 치료에 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정된다^{27,28}. 결과를 보면 TH 면역 반응 세포 역시 MPTP group보다 MPTP-MYH group에 더 많이 분포한 것을 확인할 수 있었다(Fig 3-4).

선조체-흑질 부위의 도파민 양의 변화를 알아보았다면 이제는 전체 뇌의 조직 및 신경 전달물질의 양 변화를 알아보기 위한 실험을 진행하였다. mouse의 경동맥을 막아 뇌로 가는 혈액 공급을 막은 이후 뇌를 후두부에서 전두부 방향으로 두 개를 열어 2mm 두께로 자른다. 혈액 공급이 되지 않은 뇌세포는 신경이 사멸된 뒤 콜라겐으로 변하게 되고 그 때 TTC 용액을 가하게 되면 정상 조직은 적색, 허혈 상태로 변한 콜라겐은 염색이 되지 않아 하얗게 표시가 된다. 이 염색법은 조직학적으로 뇌 신경 세포 파괴를 단기간에 알 수 있는 방법으로서 허혈 부분을 육안으로 쉽게 비교할 수 있는 장점이 있다. 실험 결과 MPTP group은 뇌세포 사멸 부분이 총 50%에 달하는 만큼 군데 군데

하얗게 표시된 곳이 많았고, MPTP-MYH group은 허혈 면적이 35%로 MPTP group에 비해 상대적으로 하얗게 나타난 면적이 좁았다. 그러나 육안으로 허혈 면적이 줄어든 것을 확인한 것과는 달리 허혈 면적의 비중을 이용하여 통계 처리 하였을 때는 유의성을 가지지 못했다(Fig 5).

앞서 MYH 복용 후 도파민 신경세포의 보호를 확인하였다. 그렇다면 그것이 파킨슨병 질환의 증상중 하나인 인지 장애, 기억력 저하의 증상 개선에는 어떠한 효과를 끼치는지 알아보기 위해 Morris water maze test와 해마 조직 분석을 시행하였다. Morris water maze test는 일정 기간 동안 mouse를 Morris water maze내 위치한 platform에 찾아갈 수 있도록 훈련을 시킨 다음, 얼마간의 해마는 시간과 거리가 걸려서 platform까지 가는 그 수치를 측정하는 실험이다. 그 결과 시간은 유의성 있는 감소를 보였으나 거리는 통계학적 유의성을 가지지 못하였다. 해마 거리는 유의성의 결과를 얻지 못했지만 해마 시간의 단축이 뜻하는 것은 파킨슨병으로 인해 떨어진 인지 기능 및 기억력 저하를 치료하는데 MYH가 효과가 있다는 것을 알 수 있었다(Fig 6,7).

다음은 mouse의 뇌를 조직 검사하여 기억력을 담당하는 해마의 손상 정도와 면역을 담당하는 세포의 변화를 살펴보았다. 해마는 측두부에 위치한 변연계의 가장 중심적인 신경 구조로 세포 구축학적으로 해마 본체(Hippocampal Proper)와 치상회(Dentate Gyrus) 세포영역으로 이루어져 있다. 해마의 기능에 대해서는 초기에는 변연계가 정서 경험과 정서 표현을 정교화시키는 기능을 할 것이라는 가설이 제안되었고 이후 해마가 학습 및 기억과 같은 인지 기능에 관련된 신경 구조일 것이라는 견해들이 제시되면서 수많은 실험 연구들이 진행되었다. 기억의 저장시 전기적 활성도가 증가하면서 신경 전달이 급격히 증가하여 시냅스의 유효성이 변화하는 시냅스 가소성이라는 현상이 일어나는데, 서술 기억에 중요한 역할을 하는 해마의 신경 회로에서 이런 장기 시냅스 강화를 관찰할 수 있다²⁹. 파킨슨병에 걸리게 되면 해마의 위축이 일어

나게 되고 그로 인해 인지 장애 및 기억력 저하 더 나아가서 치매로 발전하는 경우가 많이 있다. 따라서 조직 검사를 통해 MPTP로 파킨슨병 유발한 mouse의 해마 위축 정도와 함께 MYH 투여군이 얼마나 위축된 해마를 회복하는지 알아보았다. 그 결과 해마의 위축 정도가 MPTP group에 비해 MPTP-MYH group에서 많이 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig 8).

파킨슨병에 걸리게 되면 정신과적 증상이 흔히 동반된다고 알려져 있다. 기질적인 변화가 원인이 되거나 혹은 신체 변화에 따른 감정 변화에 의한 것으로 추정되며 그 중 우울감이 대표적인 증상이다. 대부분의 연구 결과에 따르면 파킨슨병에서 우울 증상의 동반 빈도는 약 40~70%에 달한다. 그동안 발표된 연구들에 의하면, 파킨슨병의 운동 기능 장애가 발생하기 전에 우울증이 발견된다는 연구들이 있으며 파킨슨병 환자군과 신체장애의 정도가 비슷한 다른 질환의 환자군을 비교해보면 파킨슨병 환자군에서 우울증의 빈도가 더 높다고 보고되고 있다³⁰⁻³². 그렇지만 이렇게 많은 수의 환자군이 우울 증상을 겪고 있으나 겉으로 드러난 신체 강직이나 진전 등의 재활 치료에 밀려 우울 증상에 대한 관심이 상대적으로 적은 것이 사실이다. 이번 실험에서는 파킨슨병으로 인한 무운동성과 우울 경향에 대해 알아보기 위해 Forced swimming test와 HPLC를 이용한 신경전달물질 함량을 분석하였다. 먼저 Forced swimming test로 무동 시간을 측정한 결과, MPTP 투여로 파킨슨병 유발된 군에 비해 MPTP-MYH group의 무동 시간은 약 75초 가량 줄어든 것을 볼 수 있었다. 이는 MYH가 파킨슨병 mouse 모델의 우울 및 행동 능력 저하 개선에 효과를 갖는다는 것을 뜻한다(Fig 9).

모든 물질은 고유의 파장을 가지고 있으며 대표적인 뇌 신경 전달 물질인 도파민, 세로토닌, 노르에피네프린, 에피네프린, 멜라토닌 역시 그 파장 값을 가지고 있다³³. 5가지 신경 전달 물질의 표준품을 이용하여 실험에 사용된 mouse의 뇌 에탄올 추출물을 HPLC를 사용해 분석해보았다. 그 결과 세로토닌 외에 다른 물질은 분석이 되지 않았다. 외부 정보는 뇌에서 단기

기억으로 저장되고 이런 단기 기억은 세로토닌 수용체의 활성화(PKA)로 유도된다. 세로토닌은 신경세포의 발달, 운동, 기분, 공격성, 식욕, 수면, 인지 기능 등 고위 대뇌 기능에 중요한 역할을 하는 신경 전달 물질로서 주로 중뇌와 송과선의 신경내 분비 세포에서 합성되며 시상하부에서 ST와 미상핵을 지나 해마로 전달되어 뇌 전체에 분포하게 된다. 중추신경계와 말초신경계에서 중요한 신경 전달 물질, 신경 조절인자, 신경 호르몬이며 많은 생리적 기능들을 조절한다³⁴. HPLC를 이용하여 검출된 세로토닌 양을 정상군, MPTP group, MPTP-MD group, MPTP-MYH group으로 나누어 살펴보았다. 그 결과 정상군에 비해 MPTP-MYH group의 뇌 무게당 세로토닌 양이 유의성 있게 증가한 것을 확인할 수 있었고 MPTP-MD group보다도 더 유의성 있는 결과를 얻었다. 이는 MYH가 파킨슨병으로 파괴된 세로토닌의 양을 증가시킨다는 것을 뜻하며 앞서 시행하였던 Forced swimming test에서의 기억력 향상과 부동 시간 감소와도 연결시켜 생각할 수 있다(Fig 10).

이상의 연구결과를 종합해 보았을 때 MYH가 MPTP로 유도된 파킨슨병 동물 모델에 대해 뇌 신경 세포 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 도파민과 면역 반응 세포 양을 직접적으로 늘렸으며 기억력을 증대시켜 행동이 재빨라졌을 뿐만 아니라 실제로 뇌의 기억력 담당 기관인 해마의 위축이 회복되었다. 우울감은 감소되었고 몸의 고급 생리 기능을 담당하는 신경 전달 물질인 세로토닌의 증가를 확인하였다. 이를 바탕으로 살펴보았을 때, MYH는 파킨슨병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 효과가 있을 것으로 예상할 수 있으며 도파민의 양을 늘리는 것에만 국한되어 있는 양방 치료제와 달리 파킨슨병의 다양한 증상을 전체적으로 관리할 수 있을 것으로 사료된다.

그러나 실험을 진행한 mouse의 수가 많지 않았다는 한계가 있으며, 해마 조직과 TH 면역 반응 세포 증가의 기전 연구 등이 이루어지지 않은 점이 한계점으로 남는다. 이런 한계를 보완하여 향후 in vitro 실험 결과

를 발판 삼아 임상 시험으로의 연계가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. Acknowledgement

본 연구는 한국연구재단의 이공분야기초연구사업의 일환으로 수행되었음. (NRF-2010-0024561)

VI. References

1. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement disorders:official journal of the Movement Disorder Society*. 2014.
2. Lee HJ. Characteristic of attention and frontal executive function in patients with Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia and Sleep Quality. Kyungbuk university.2013:13.
3. Ahn SA. Direct medical costs for patients with parkinson's disease : based on national patients sample for the national health insurance claims data. Graduate School of Sungkyunkwan University Master's thesis. 2014:14.
4. Hubert H. Updates in the medical management of Parkinson's disease. medical grand rounds. cleveland clinic journal of medicine. 2012;79(1):28-35.
5. Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F et al. Deletion of *chr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*.2000;24(4):415-9.
6. Hong WG. Jungkyohwangjenaekyeong. Seoul: Dongyang euihak yeonkuwon choolpanboo. 1995:23-5, 39-40, 119, 303-4.
7. Park SM, Lee SH, Yin CS, Kang MK, Lee YH. Literature Review on Parkinson's disease in Oriental medicine. *J. Korean acupuncture & Moxibustion Society*. 2004; 21(1):202-210.
8. Lee JM. Dongeuisoosebowonsasangbonchokwon. Seoul: Eulyumoonhwas. 2002:27-278.
9. Bas NY. Neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement on Parkinsonian model. Graduate School of Daejeon University Master's thesis. 2011:1-110.
10. Kim HJ, Bas NY, Jang MH, Yang HO, Ahn TW. Autophagy inducing Effect of modified Yeoldahanso-tang and its related Proteins in SH-SY5Y cells. *J Sasang Constitut Med*. 2013;25(3):208-217.
11. Choi JS, Jang MH, Ahn TW. A Case Study of Parkinson's Disease Patient Treated with Yuldahanso-tang gagam. *J Sasang Constitut Med*. 2012;24(3): 104-113.
12. BR Perri, DH Smith, H Murai, G Sinson, KE Saatman, R Raghupathl et al. Metabolic Quantification of Lesion Volume following Experimental Traumatic Brain Injury in the Rat. *Journal of Neurotrauma*. 1997;14:15-22.
13. Vosselera M, N. Abegunewardene, N. Hoffmannb, S.E. Petersene, D. Beckera, D. Cleppienbet al. Area at Risk and Viability after Myocardial Ischemia and Reperfusion Can Be Determined by Contrast-Enhanced Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Eur Surg Res*. 2009;43:13-23.
14. Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson. *Harrison's Principles of Internal medicine*. 16th edition. Seoul: MIP. 2006:2631-2638.
15. Han JT. Activated microglia exacerbate dopaminergic neuronal degeneration in Parkinsonian animal model. Eulji university. 2012:12-3.
16. Widdowson PS, Farnworth MJ, Upton R., Simpson MG. No changes in behavior, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rat. *Human and*

- Experimental Toxicology. 1996;15(7): 583-591.
17. Ferger, B., Teismann, P., Earl, C.D., Kuschinsky, K., Oertel, W.H. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65(3):425-431.
 18. Westm B.D., Sheghrue, P.J., Vanko, A.E.H., Ransorn, R.W. Kinney, G.G. Amphetamine-induced locomotor activity is reduced in mice following MPTP treatment but not following selegiline/MPTP treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav* 2006;84(1):158-161.
 19. Sun, L., Xu, S., Zhou, M., Wang, C., Wu, Y., Chan, P. Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice. *Brain Research.* 2010; 1335:74-82.
 20. The National College of Oriental Medicine Bonchohak Professor Co-ed : Bonchohak. Seoul: Younglimsa. 1992: 129,132,148,151,178.
 21. Jung WS. A study on the alteration of general characteristics and therapeutic effect of GamiYeoldahansotang (加味熱多寒少湯) in patients with Atopic Dermatitis. Graduate School of Kyunghee University Master's thesis. 2002:14.
 22. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane C. J, Rubinsztein D. C. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human Molecular Genetics.* 2008; 7:1209 - 1216.
 23. Cell signaling Technology (<http://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling.jsp>)
 24. Slomovitz B. M, Coleman R. L. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;21:5856-64.
 25. Jaclyn L. P, Gideon M. B, Wendy B. B, Phillip A. D. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates.* 2008;32 - 50.
 26. Sebastian A, Antje S. L, Sebastian W, Björn S. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *MCB.* 2011;06159-11.
 27. Messripour, M. and Clark, J. B. : Tyrosine hydroxylase Direct mesurment using high performance liquid chromatography. *J. Neurochem.* 1982;38:1139-43.
 28. Sung Joon Kim, Jin Chul Yoo, Hong Sung Jeon, Jae Seong Kim, Seungactivity in rat brain synaptosomes: Kim, Myong Hwa Sim, et al. Development and application of tyrosine hydroxylase gene and neurotrophic factor inducible material screening from medicinal herbs for prevent of neuronal cell degradation. Chosun University. 2007.
 29. Lee TH, Lee EY. Effect of Daekumeumja Herb-acupuncture on c-Fos Expression in Hippocampus of Alcohol Intoxicated Rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 2006;23(3):43
 30. Cummings JL. Depression in Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry* 1992;149:443-454.
 31. Fetoni V, Soliveri P, Monza D, Testa D, Girotti F. Affective symptoms in multiple system atrophy and Parkinson's disease : response to levodopa therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;66:541-544.
 32. Burn DJ. Depression in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 9. 2002:44-54.
 33. Go GY, Kim YH, Ahn TW. Neuroprotective Effects of Hyangsayangwi-tang in MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. 2014;26(2):176.
 34. Seo JH, Shin MS, Kim CJ, Lee KS, lim BB. The influence of treadmill exercise in hot environments about serotonin expression in the rat brain, generating neurons and short-term memory. *Korean Journal of Sport Science.* 2009;20(4);744.