



MPTP로 유도된 파킨슨병 생쥐 모델에 대한 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕의 신경세포 보호 효과 비교 연구

서지은¹ · 이한울² · 배창환¹ · 윤동학³ · 김희영² · 김승태^{1,2}

¹부산대학교 한의학전문대학원 한의과학과, ²부산대학교 건강노화한의학연구센터, ³경희운동학한의원

Comparative Study of the Neuroprotective Effect of *Sihogyejji-tang*, *Sihosogan-tang*, and *Sihocheonggan-tang* on an MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Model

Ji Eun Seo¹, Hanul Lee², Chang-Hwan Bae¹, Dong Hak Yoon³,
Hee-Young Kim², Seungtae Kim^{1,2}

¹Department of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University,

²Korean Medicine Research Center for Healthy Aging, Pusan National University,

³KyungHee YDH Oriental Clinic

Objectives : Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide and is characterized by the loss of the dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN). In a previous *in vitro* study, we demonstrated that *Sihogyejji-tang* (SG), *Sihosogan-tang* (SS), and *Sihocheonggan-tang* (SC) have the potential to be candidate medicines for PD. This study aimed to compare the neuroprotective effect of SG, SS, and SC using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mouse model. **Methods :** Eight-week-old male C57BL/6 mice were intraperitoneally administered with 30 mg/kg of MPTP for 5 days and orally administered SG, SS and SC for 12 days from the first MPTP injection. Motor function was assessed using the pole test and the rotarod test. Dopaminergic neuronal survival in the SN and striatum was evaluated through tyrosine-hydroxylase immunohistochemistry. **Results :** MPTP administration resulted in behavioral impairment and dopaminergic neuronal death in the SN and striatum. In the pole test, treatment with SG, SS, and SC alleviated the MPTP-induced motor dysfunction on day 5 and 12. In the rotarod test, SS and SG alleviated the MPTP-induced motor dysfunction on day 5, while only SS showed improvement on day 12. SS and SG significantly protected dopaminergic neurons in the SN from MPTP toxicity, and all three compounds (SG, SS, and SC) showed significant protection in the striatum. Notably, SS demonstrated superior efficacy in suppressing MPTP-induced motor dysfunction and dopaminergic neuronal death compared to SG and SC. **Conclusions :** These findings suggest that SS is the most effective formula among SG, SS, and SC for PD, indicating its potential role in the treatment of PD.

Key words : Parkinson's disease, *Sihogyejji-tang*, *Sihosogan-tang*, *Sihocheonggan-tang*, substantia nigra, striatum

Received June 29, 2023, Revised August 7, 2023, Accepted August 12, 2023

Corresponding author: **Seungtae Kim**

Department of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49 Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Gyeongsangnam-do, Korea

Tel: +82-51-510-8473, Fax: +82-51-510-8437, E-mail: kimst@pusan.ac.kr

This work was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : HF21C0053).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

파킨슨병은 중뇌의 흑질에 있는 도파민성 신경세포가 파괴되어 흑질-선조체 경로의 도파민 결핍으로 인해 진전, 서동증, 강직 등의 증상을 특징으로 하는 신경퇴행성 뇌질환이다¹⁾. 또한 파킨슨병은 치매, 뇌졸중과 함께 세계 3대 노인성 질환 중 하나로 전 세계적으로 60세 이상 인구의 약 1%, 85세 이하 인구의 5%가 파킨슨병 환자인 것으로 알려져 있으며²⁾, 우리나라도 고령화로 인해 노인 인구가 증가함에 따라 파킨슨병 환자가 지속적으로 증가하는 추세이다. 실제로 2004년부터 2013년까지 10년간 파킨슨병 유병률은 해마다 약 13.2%씩 증가하였고³⁾, 이후로도 꾸준히 증가하여 2021년에는 국내 파킨슨병 환자가 11만 6504명으로 집계되었다. 파킨슨병의 원인은 명확하게 밝혀지지 않았지만 α -synuclein의 축적⁴⁾, 미토콘드리아 기능장애 및 산화스트레스¹⁾, *PARKIN*, PTEN-induced kinase 1 (*PINK1*), *DJ-1* 등 관련 유전자의 변형⁵⁾이 원인이라는 주장이 제기되고 있다.

현재 의료 기술로는 파킨슨병을 근본적으로 치료하기 어렵기에, 병의 진행을 억제하거나 증상을 완화하는 것에 초점을 두고 있으며, 서양의학에서는 주로 약물요법과 수술요법을 이용해 파킨슨병을 치료하고 있다. 약물요법은 주로 도파민 전구체인 레보도파를 사용하고⁶⁾, 도파민 작용제, monoamine oxidase-B 억제제 등도 자주 활용한다. 그러나 레보도파는 장기 복용 시 약물 효능이 감소될 뿐만 아니라 이상운동증(dyskinesia) 및 운동동요(motor fluctuation)와 같은 부작용을 유발하는 문제점이 존재한다⁶⁾. 그렇기에 평생 약물을 복용해야 하는 파킨슨병 환자들은 효과적이고 저렴하면서도 부작용이 적은 파킨슨병 치료제가 필요한 상황이다.

한방건강보협약은 엑스산제로 조제되는 56종 처방으로, 다양한 질환을 치료하는데 사용되고 있으며, 건강보험이 적용되기에 환자들이 저렴한 비용을 지불하고 한약을 복용할 수 있다는 장점이 존재한다. 저자들은 선행연구를 통해 56개 한방건강보협약 중 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕 등이 파킨슨병에 효과가 있을 가능성이 존재하는 것을 확인하였다⁷⁾. 시호계지탕은 소시호탕과 계지탕의 합방으로 시호·계지·황금·인삼·작약·반하·감초·생강·대추로 구성되어 있으며 흉복부가 갑자기 아픈 증상을 치료하는데 사용하고⁸⁾, 시호소간탕은 시호·진피·천궁·작약·지각·향부자·감초로 구성되어 있으며 간위불화(肝胃不和)에 응용되는 처방으로 정서적 자극의 기체(氣滯)로 인한 실증의 소화불량에 주로 사용하며⁹⁾, 시호청간탕은 시호·치자·황금·인삼·천궁·청피·연교·길경·감초로 구성되어 있으며 소간해울(疏肝解鬱), 청열해독(淸熱解毒)의 효능이 있는 처방이다¹⁰⁾. 이 세 처방과 관련

된 선행연구를 살펴보면 시호계지탕은 위점막 손상을 억제하고¹¹⁾, 시호소간탕은 불안 및 우울증을 치료하고¹²⁾ 인지 장애를 개선하는 효과가 있으며¹³⁾, 시호청간탕은 아토피성 피부염을 치료한다는 연구 결과가 존재하지만¹⁰⁾, 현재까지 파킨슨병과 관련된 연구는 없는 실정이다.

이에 저자들은 MPTP를 이용하여 파킨슨병 동물모델을 제작하고, 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕을 투여한 후, 운동 기능 개선효과와 흑질의 도파민성신경세포 보호 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 한방건강보협약은 시호계지탕(HS-35, 한국신약, 논산, 한국), 시호소간탕(HS-36, 한국신약), 시호청간탕(No. 34, 경방신약, 인천, 한국) 엑스산제로, 직접 구매 후 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후 수행되었다. 실험동물은 체중 22~25 g의 8주령 수컷 C57BL/6계 검정 생쥐(샌타코, 오산, 한국)를 사용하였다. 실험 1주일 전부터 실험기간 동안 모든 실험동물은 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 온도는 22±2°C, 습도는 55±5%, 12시간 간격의 명암 주기로 일정한 사육환경 조건을 유지하였다.

3. 파킨슨병 유발 및 약물 투여

총 19마리의 동물을 무작위로 정상군(normal group), MPTP군(MPTP group), 시호계지탕군(MPTP+SG), 시호소간탕군(MPTP+SS), 시호청간탕군(MPTP+SC)의 5군으로 나누었다. 정상군은 3마리를 다른 군은 각각 4마리씩 배정하였다. 정상군은 5일간 1일 1회 24시간 간격으로 생리식염수 0.1 mL를 복강 내 주입하였고, 나머지 군들은 파킨슨병을 유발하기 위해서 MPTP (Sigma, St. Louis, 미국)를 30 mg/kg 용량으로 복강 내 주입하였다. 시호계지탕(252 mg/kg), 시호소간탕(247 mg/kg), 시호청간탕(354 mg/kg) 투여량은 성인 1일 최대 복용량을 생쥐에 맞게 표면적을 기준으로 환산하였으며¹⁴⁾, 한약투여군 생쥐의 경우 환산된 용량을 물 0.2 mL에 녹여 12일 동안 1일 1회 경구투여하였고, 정상군과 MPTP군 생쥐의 경우 같은 양의 물을 한약투여군과 같은 방법으로 투여하였다(Fig. 1).

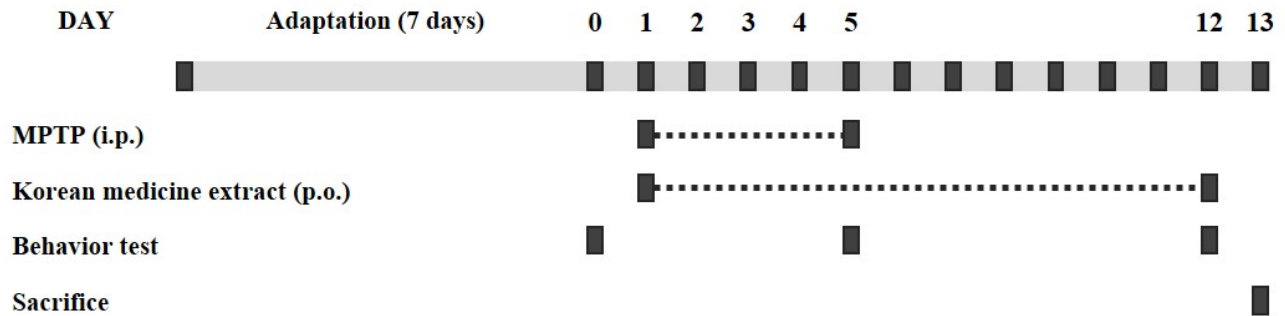


Fig. 1. Schedule of experiment.

From day 1, the mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 30 mg/kg of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophridine (MPTP) per day for 5 days, and were orally (p.o.) administered vehicle or Korean medicine extract for 12 days. Behavior test was performed on days 0 (1 day prior to the first administration of MPTP) 5, and 12.

4. 행동측정실험

행동 측정실험으로는 파킨슨병 생쥐 모델의 운동기능 평가에 가장 적합하다고 알려진 pole test와 rotarod test를 실시하였다. pole test는 1×1×55 cm 플라스틱으로 제작된 막대기의 꼭대기에 생쥐를 올려둔 후 위에서 바닥까지 내려오는 시간을 측정하는 방법이고, rotarod test는 rotarod가 2분간 회전속도를 4 rpm에서 40 rpm까지 점진적으로 상승하도록 세팅한 후 생쥐들을 rotarod에 올려놓고, rotarod가 회전하기 시작한 때부터 생쥐들이 rotarod에서 떨어질 때까지 걸린 시간을 측정하였다.

5. 면역조직화학염색법

MPTP 첫 투여로부터 13일 뒤, 생쥐들을 isoflurane (포란액; JW중외제약, 서울, 한국)으로 마취시킨 후, phosphate buffered saline (PBS)으로 관류하여 체내의 혈액을 제거하고, 4% paraformaldehyde (PFA) 용액을 관류시켜 조직을 고정한 후 생쥐의 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌를 24시간 동안 PFA에 담가 완전히 고정하고, 30% sucrose 용액에 담귀 조직을 절편할 때까지 4℃ 냉장고에 보관하였다. 뇌 조직을 cryotome (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일)을 이용하여 30 μm의 두께로 절편을 하였고, 흑질과 선조체를 선별하여 면역조직화학염색법을 실시하였다. 조직을 PBS로 5분간 3회 세척한 후, PBS에 H₂O₂를 1% 농도로 넣고 15분간 반응시켰다. 그 후 일차 항체를 PBS에 1:1000의 비율로 희석한 용액에 조직을 넣은 후 상온에서 하루 동안 반응시켰다. 일차 항체로는 anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 미국)를 사용하였다. 그 후 이차항체 (goat anti-rabbit IgG) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, 미국)를 조직과 상온에서 1시간 동안 반응시키고, Avidin Biotin Complex (Vector Laboratories Inc.)를 만들어 상온에서 1시간

동안 반응시켰다. 마지막으로 diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc.)으로 발색한 후 slide glass에 mounting을 시키고, Axio Scope.A1 microscope (ZEISS, Oberkochen, 독일)와 AxioCamICc3 camera (ZEISS)를 이용하여 조직의 사진을 촬영하였다. 흑질의 도파민성 신경세포의 수는 직접 세었다.

6. 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. One-way analysis of variance 실시 후 Duncan's multiple-range test를 실시하여 *p*<0.05인 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

결 과

1. Pole test

막대기 끝에서 바닥까지 내려오는 시간을 측정하는 pole test를 이용하여 생쥐의 운동 능력을 평가한 결과는 다음과 같다. MPTP 투여 전(0일차), 정상군은 4.31±1.3초, MPTP군은 4.28±0.41초, 시호계지탕군은 4.1±1.08초, 시호소간탕군은 3.92±0.77초, 시호청간탕군은 4.06±0.87초 소요되었으며, 군 간의 통계적 유의성은 없었다. MPTP와 한방건강보협약을 5회 투여한 후(5일차), 정상군은 4.49±0.85초 소요되었으나 MPTP군은 6.59±0.85초로 정상군에 비해 내려오는 시간이 유의하게 증가하였으며, 시호계지탕군(4.33±1.16초), 시호소간탕군(3.55±0.72초), 시호청간탕군(3.66±1.22)은 MPTP군에 비해 내려오는 시간이 유의하게 감소하였다. 12일간의 한방건강보협약 투여 후(12일차), 정상군은 4.04±0.58초가 소요되었는데, MPTP군의 경우 5.11±1.02초가 소요되어 내려오는 시간이 유의하게 증가하였으며, 한약이 투여된 군의 경우

시호소간탕군(2.19±0.42초), 시호청간탕군(3.01±0.5초), 시호계지탕군(3.05±0.39초)의 순서로 모두 정상군 및 MPTP군에 비해 유의하게 빠르게 내려왔다(Fig. 2).

2. Rotarod test

회전하는 rotarod 위에 머무는 시간을 측정하는 rotarod test를 실시한 결과, MPTP 투여 전(0일차)의 경우 정상군은 71.78±24.39초, MPTP군은 71.11±24.39초, 시호계지탕군은 52.23±8.94초, 시호소간탕군은 70.11±10.90초, 시호청간탕군은 62.67±8.32초였으며, 군 간의 통계적 유의성은 없었다. MPTP와 한방건강보협약을 5회 투여한 후(5일차), 정상군은 67.67±31.10초였으나 MPTP군(20.00±10.43초), 시호계지탕군(29.11±6.57초), 시호소간탕군(40.00±11.93초), 시호청간탕군(39.89±10.91초) 모두 정상군에 비해 유의하게 감소하였지만, 시호소간탕군과 시호청간탕군의 경우 MPTP군에 비해 유의하게 증가하였다. 12일간의 한방건강보협약 투여 후(12일차), MPTP (30.33±2.29초), 시호계지탕군

(26.78±7.34초), 시호소간탕군(58.89±12.31초), 시호청간탕군(25.11±7.18초) 모두 정상군에 비해 rotarod에 머무는 시간이 유의하게 감소하였지만, 시호소간탕군은 MPTP군에 비해 유의하게 rotarod에 머무는 시간이 증가하였다(Fig. 3).

3. 흑질과 선조체의 도파민성 신경세포 평가

흑질 내 도파민성 신경세포의 수를 측정한 결과, 정상군(100±12.2%)에 비해 MPTP군(60.19±11.09%), 시호계지탕군(76.31±8.27%), 시호청간탕군(70.6±14.8%)의 도파민성 신경세포 수가 유의하게 감소하였지만, 시호계지탕군의 경우 MPTP군에 비해 도파민성 신경세포의 수가 유의하게 많았다. 시호소간탕군(92.48±8.76%)의 경우, 도파민성 신경세포의 수가 정상군과 유의한 차이가 없었으며, MPTP군, 시호계지탕군, 시호청간탕군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

선조체의 도파민성 신경세포 파괴 정도를 확인하기 위해 TH 발현을 측정한 결과, 정상군(100±8.13%)에 비해 MPTP군(42.64±

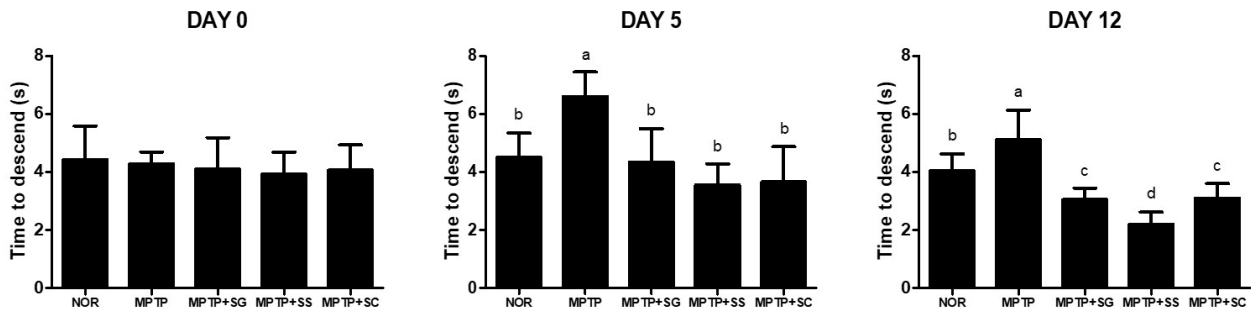


Fig. 2. Total time taken in the pole test.

NOR, saline-administrated group; MPTP, MPTP-administrated group; MPTP+SG, MPTP-administrated group with *Sihogyegi-tang*; MPTP+SS, MPTP-administrated group with *Sihosogan-tang*; MPTP+SC, MPTP-administrated group with *Sihocheonggan-tang*. Data presented as means±standard deviation. Means with different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple-range test.

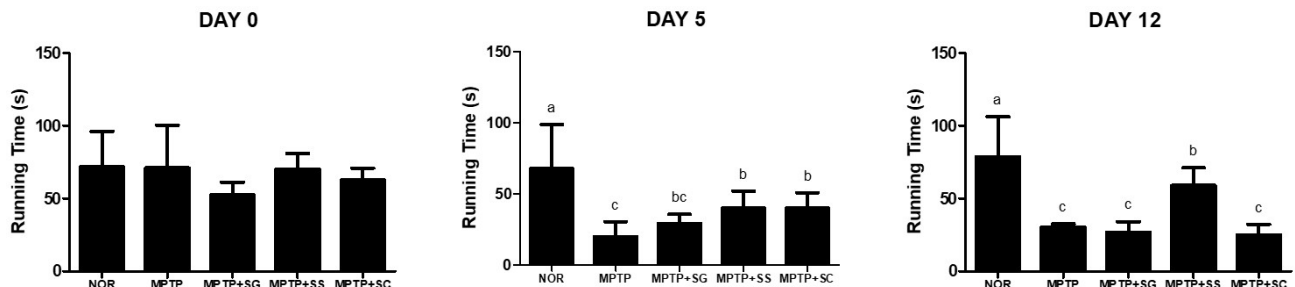


Fig. 3. Latency to fall in the rotarod test.

The time that the mice remained on the cylinder was measured on day 0, 5, and 12. NOR, saline-administrated group; MPTP, MPTP-administrated group; MPTP+SG, MPTP-administrated group with *Sihogyegi-tang*; MPTP+SS, MPTP-administrated group with *Sihosogan-tang*; MPTP+SC, MPTP-administrated group with *Sihocheonggan-tang*. Data presented as means±standard deviation. Means with different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple-range test.

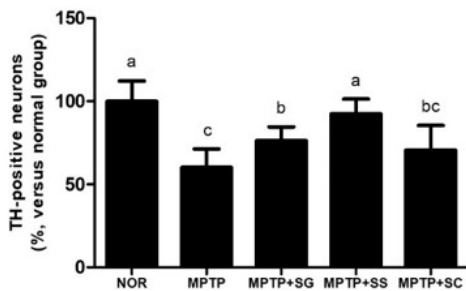
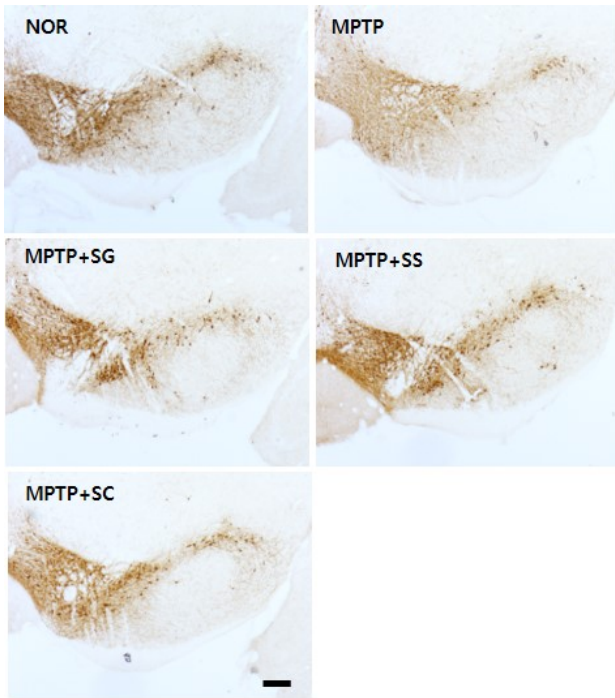


Fig. 4. Comparison of the protective effect of *Sihogyegi-tang*, *Sihosogan-tang*, and *Sihocheonggan-tang* on dopaminergic neurons in the substantia nigra.

Number of TH-positive cells in the substantia nigra was manually counted. TH, tyrosine hydroxylase; NOR, saline-administrated group; MPTP, MPTP-administrated group; MPTP+SG, MPTP-administrated group with *Sihogyegi-tang*; MPTP+SS, MPTP-administrated group with *Sihosogan-tang*; MPTP+SC, MPTP-administrated group with *Sihocheonggan-tang*. Scale bar, 200 μ m. Data presented as means \pm standard deviation. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

10.88%), 시호계지탕군(62.23 \pm 5.5%), 시호소간탕(82.38 \pm 12.47%) 그리고 시호청간탕군(62.96 \pm 13.79%) 모두 유의하게 감소하였지만, MPTP군에 비교하면 3종의 한방건강보험약 모두 유의하게 증가하였다. 특히 시호소간탕군은 선조체 내 TH 발현이 MPTP군, 시호계지탕군, 시호청간탕군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

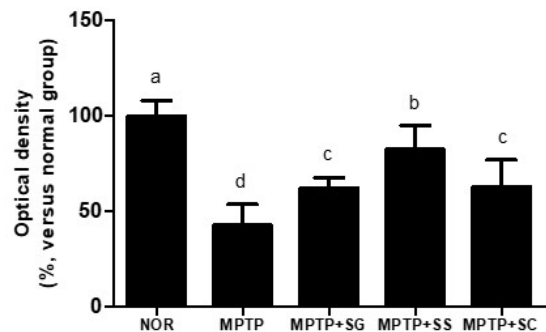
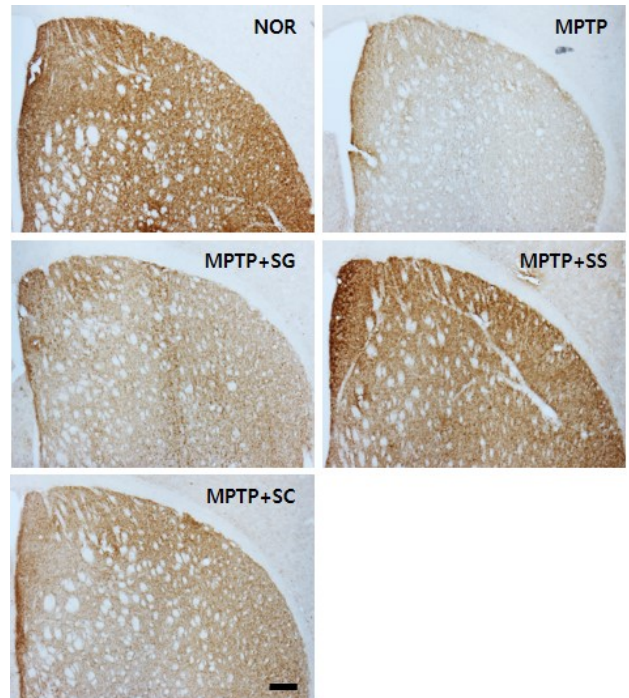


Fig. 5. Comparison of the protective effect of *Sihogyegi-tang*, *Sihosogan-tang*, and *Sihocheonggan-tang* on dopaminergic neurons in the striatum.

The optical density of TH-positive neurons in the striatum. TH, tyrosine hydroxylase; NOR, saline-administrated group; MPTP, MPTP-administrated group; MPTP+SG, MPTP-administrated group with *Sihogyegi-tang*; MPTP+SS, MPTP-administrated group with *Sihosogan-tang*; MPTP+SC, MPTP-administrated group with *Sihocheonggan-tang*. Scale bar, 200 μ m. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

고찰

본 연구는 도파민성 신경세포의 선택적인 파괴를 유도하는 물질인 MPTP를 투여하여 제작한 파킨슨병 동물모델에 대한 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕 한방건강보험약의 도파민성 신경세포 보호 효과를 평가하였으며, 시호소간탕이 운동 기능을 개선시키고 흑질의 도파민성 신경세포를 보호하는 효과가 가장 우수함을 확인

하였다.

본 연구팀은 선행연구를 통해 56종의 한방건강보협약 중 항산화 효과가 높으면서 신경세포에 대한 독성이 낮아 파킨슨병의 발병 및 진행을 억제하는데 도움이 될 것으로 추정되는 한방건강보협약 5종(시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕)을 제시하였다⁷⁾. 하지만 선행연구는 세포를 이용하여 항산화 효과를 중심으로 진행한 연구였기에, 항산화 효과와 관련된 주요 효소의 활성과 생체에 투여했을 때의 효과를 확인할 필요가 있었다. 이에 본 연구팀은 먼저 항산화 효과 관련 효소의 활성을 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포주에 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕을 투여한 후 superoxide dismutase (SOD) activity assay와 catalase activity assay를 실시하였다. SOD는 superoxide anion radical (O_2^-)을 H_2O_2 로 바꾸는 효소로 활성 산소를 없애는 역할을 하고¹⁵⁾, catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 반응을 촉매하는 효소로써 활성산소로부터 보호하는 역할을 한다¹⁵⁾. SOD와 catalase의 활성을 평가한 결과 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕이 갈근탕과 청상견통탕보다 우수한 것으로 나타났기에(자료는 제시하지 않음), 이 세 가지 한방건강보협약의 효능을 파킨슨병 동물모델에 투여한 후 운동 기능과 흑질 내 도파민성신경세포의 파괴 정도를 기준으로 평가하였다.

행동실험은 pole test와 rotarod test를 실시하였는데, pole test는 생쥐가 막대 위에서 아래까지 내려오는 시간을 측정하는 방법으로¹⁶⁾, 운동 장애가 발생하는 경우 내려오는데 오랜 시간이 소요된다는 특징이 있다. MPTP와 한방건강보협약을 5회 투여한 후(5일차) pole test를 실시한 결과, MPTP를 투여하면 막대 위에서 아래까지 내려오는 시간이 유의하게 길었으며, 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕을 투여한 경우 세 처방 모두 내려오는 시간이 유의하게 단축되는 것을 확인하였다. 7일간 한방건강보협약을 추가로 투여한 후(12일차) pole test를 한번 더 실시한 결과, MPTP를 투여한 생쥐들은 MPTP를 투여하지 않은 생쥐들에 비해 여전히 내려오는 시간이 유의하게 길었으며, 한방건강보협약을 투여한 모든 생쥐들은 투여하지 않은 생쥐들에 비해 유의하게 내려오는 시간이 단축되었으며, 특히 시호소간탕을 복용한 생쥐들이 다른 생쥐들에 비해 유의하게 빠르게 내려왔다.

Rotarod test는 회전하는 원통 위에 생쥐가 머무는 시간을 측정해 운동 기능을 평가하는 방법으로¹⁷⁾, 운동 기능이 좋을수록 원통에 오래 머물게 된다. MPTP와 한방건강보협약을 5회 투여한 후(5일차) rotarod test를 실시한 결과, MPTP를 투여한 모든 군의 생쥐들이 원통 위에 머문 시간이 정상군에 비해 유의하게 감소하였지만, 시호소간탕군과 시호청간탕군의 경우 MPTP군에 비해 유의하

게 오래 머물렀다. 7일간 한방건강보협약을 추가로 투여한 후(12일차) rotarod test를 한번 더 실시한 결과, 5일차와 마찬가지로 MPTP를 투여한 모든 군의 생쥐들이 원통 위에 머문 시간이 정상군에 비해 유의하게 감소하였지만, 한방건강보협약을 투여한 생쥐 중 시호소간탕군 생쥐만 유일하게 MPTP군 생쥐에 비해 원통 위에 머문시간이 유의하게 오래 머물렀다. 이는 시호소간탕이 시호계지탕과 시호청간탕에 비해 MPTP로 인한 운동기능의 장애를 억제하는 효과가 강하다는 것을 의미한다.

다음으로 한방건강보협약의 흑질 내 도파민성 신경세포 보호 효과를 확인하였다. 본 연구에 사용된 파킨슨병 모델은 MPTP를 30 mg/kg의 용량으로 1일 1회, 총 5일간 투여하게 되는데, MPTP를 생쥐에게 투여하면 12시간 후부터 신경변성 및 도파민성 신경세포의 파괴가 일어나기 시작하고, MPTP 투여가 중단되더라도 도파민성 신경세포는 지속적으로 파괴되어 첫 MPTP 투여로부터 12일이 지나면 도파민성 신경세포가 50% 정도 감소된다¹⁸⁾. 본 연구에서도 기존 연구와 비슷한 시점에서 흑질과 선조체의 도파민성 신경세포가 절반 정도 파괴되는 것을 확인하였고, 한방건강보협약 3종을 경구투여한 결과 시호계지탕과 시호소간탕은 MPTP 투여로 인한 흑질의 도파민성 신경세포의 파괴를 억제하는 효과가 있었고, 세 처방 모두 선조체의 도파민성 신경세포의 파괴를 억제하는 효과가 있었다. 하지만 세 처방의 효과를 비교해보니, 시호소간탕이 시호계지탕과 시호청간탕에 비해 도파민성 신경세포 보호 효과가 유의하게 좋았다. 이러한 결과와 행동실험 결과를 종합하면, 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕 한방건강보협약 중 시호소간탕이 MPTP 투여로 인한 운동기능의 저하와 도파민성 신경세포의 파괴를 억제하는 효과가 가장 좋은 것으로 사료된다.

시호소간탕, 시호계지탕, 시호청간탕 모두 시호가 균약이지만, 시호 투여량은 시호소간탕이 다른 두 처방의 60%에 불과하기에, 시호 외에 다른 약재로 인해 효과가 강하게 나타났을 가능성이 매우 높다. 시호소간탕을 구성하는 약재인 시호, 진피, 황금, 작약, 지각, 향부자, 감초를 다른 두 처방과 비교하면, 시호는 세 처방에 모두 존재하고, 천궁과 감초는 시호소간탕과 시호청간탕에, 작약은 시호소간탕과 시호계지탕에 존재하기에, 시호소간탕에만 존재하는 약재는 진피, 지각, 향부자 3종으로, 모두 이기약(理氣藥)이라는 공통점이 존재한다. 시호계지탕은 이기약이 없고, 시호청간탕은 이기약으로 청피가 있지만 투여량이 시호소간탕의 진피보다 적기에, 시호소간탕이 다른 두 처방에 비해 효과가 좋은 이유가 이기약 때문일 가능성이 존재하며, 실제로 진피, 지각, 향부자는 파킨슨병에 효과가 있다는 연구가 존재한다. 진피(*Citrus unshiu* Markovich)는 귤의 성숙한 과피(果皮)로, 진피가 포함된 처방인 가미

육군자탕이 파킨슨병 환자에게 효과가 있다는 연구가 존재한다¹⁹⁾. 지각은 광귤나무(*Citrus aurantium*)의 털익은 열매로, 지각이 파킨슨병에 효과가 있다는 연구는 없지만 광귤나무의 꽃이 파킨슨병 동물모델에서 효과가 있다는 연구가 존재한다²⁰⁾. 향부자(*Cyperus rhizoma*)는 파킨슨병 동물모델의 도파민성신경세포를 보호하는 효과가 보고된 바가 있다²¹⁾. 종합하면 시호소간탕이 다른 두 처방과 다르게 이기약인 진피, 지각, 향부자가 포함되어 있고, 이 세 약재는 파킨슨병에 효과가 있다는 연구 결과가 있기에 세 처방 중 가장 효과가 좋을 가능성이 존재하지만, 이기약이 다량 포함된 처방 구성으로 인해 효과가 더욱 강하게 나타날 가능성도 있기에 이를 입증하기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

본 연구는 파킨슨병 동물모델을 이용하여 파킨슨병 치료에 적용이 가능할 것으로 기대되는 한방건강보협약을 도출하였다는 의의가 있지만, 다음과 같은 한계점이 존재한다. 첫째, 비록 세포실험을 통해 동물실험에 사용할 한방건강보협약을 선정했지만⁷⁾, 한약 처방의 특성상 처방을 구성하는 약재가 일부 중복되는 경우가 다수 존재하기에, 본 연구에 사용하지 않은 한방건강보협약 중에서도 파킨슨병 동물모델에서 효과가 나타날 가능성이 존재한다. 둘째, 본 실험에서 생쥐에 투여한 한방건강보협약의 양은 사람 기준 1일 최대 투여량인 6포를 기준으로 환산하였는데, 일반적으로 약은 투여량에 따라 효능의 변화가 나타나기에, 투여량의 변화에 따른 효능의 차이를 비교하는 후속 연구가 필요하다. 셋째, 본 연구는 세 종의 한방건강보협약 중 시호소간탕이 파킨슨병 동물모델에 가장 우수한 도파민성신경세포 보호효과를 나타낸다는 것을 확인하였지만, 시호소간탕의 작용기전이 명확하지 않고 양성대조군이 없다는 문제점이 존재하기에, 양성대조군을 포함한 시호소간탕의 작용기전 연구가 필요하다. 넷째, 본 연구는 파킨슨병 동물모델을 이용하여 한방건강보협약 3종의 효과를 비교하여 시호소간탕이 가장 효과가 좋다는 것을 확인했지만, 동물모델에서 효과가 있다고 해서 반드시 임상에서 효과가 있는 것이 아니기에, 파킨슨병 환자를 대상으로 임상연구를 진행하여 효과를 검증할 필요가 있다. 이러한 한계점을 극복하기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

선행연구를 통해 선정된 한방건강보협약인 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕의 파킨슨병 치료 효과를 MPTP를 투여하여 제작한 파킨슨병 동물모델을 이용하여 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

① Pole test와 rotarod test를 이용하여 파킨슨병 동물모델에 대한 한방건강보협약 3종의 운동기능 개선 효과를 확인한 결과, 시호소간탕이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

② 파킨슨병 동물모델에 대한 한방건강보협약 3종의 흑질과 선조체 내 도파민성 신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 tyrosine hydroxylase-immunohistochemistry를 실시한 결과, 시호소간탕이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

시호소간탕은 MPTP 투여로 인한 운동장애를 개선하고 도파민성 신경세포의 파괴를 억제하는 효과가 우수하기 때문에 파킨슨병 환자의 증상 개선 및 질병 진행 억제에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 시호소간탕이 어떠한 기전을 통해 MPTP 투여로 인한 운동 기능 저하를 억제하고 도파민성 신경세포를 보호하는지 명확하지 않기 때문에 이와 관련된 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

None.

Funding

This work was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : HF21C0053).

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003 ; 39(6) : 889-909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
2. Luquin MR, Kulisevsky J, Martinez-Martin P, Mir P, Tolosa ES. Consensus on the definition of advanced Parkinson's disease: A neurologists-based delphi study (CEPA study). *Parkinsons Dis*. 2017 ; 2017 : 4047392. <https://doi.org/10.1155/2017/4047392>
3. Lee JE, Choi J, Lim HS, Kim JH, Cho JH, Kim GS, et al. The prevalence and incidence of Parkinson's disease in South Korea: A 10-year nationwide population-based study. *J Korean Neurol Assoc*. 2017 ; 35(4) : 191-8. <https://doi.org/10.17340/jkna.2017.4.1>
4. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 ; 1822(2) : 261-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.002>
5. Dodson MW, Guo M, Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2007 ; 17(3) : 331-7. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.010>
6. Olanow CW, Watts RL, Koller WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. *Neurology*. 2001 ; 56(11 Suppl 5) : S1-88. https://doi.org/10.1212/wnl.56.suppl_5.s1
7. Seo JE, Lee H, Bae CH, Yoon DH, Kim HY, Kim S. Comparative study of 12 herbal formulae covered by the national health insurance service in Korea. *Korean J Acupunct*. 2022 ; 39(2) : 34-42. <https://doi.org/10.14406/acu.2022.006>
8. Lee SH, Heo YJ, Cho YS. 4 cases of chronic abdominal pain children treated by Sihogyjeji-tanggagam with acupuncture and moxibustion treatment. *JPPKM*. 2021 ; 35(6) : 261-6. <https://doi.org/10.15188/kjopp.2021.12.35.6.261>
9. Ko SJ, Kim JS, Park JW, Ha NY. Korean medicine clinical practice guideline for functional dyspepsia. 1st ed. Gyeongsan : Division of clinical practice guideline of Korean medicine in National Institute for Korean Medicine Development. 2021 : 100. Available from: URL:https://nikom.or.kr/nckm/module/practiceGuide/view.do?guide_idx=192&menu_idx=14
10. An JH, Hwang ML, Yoon HJ, Jung HA. A Review on the Sihochonggan-tang & Sihochonggan-san for the treatability of atopic dermatitis. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology&Otorhinolaryngology&Dermatology*. 2017 ; 30(1) : 10-6. <https://doi.org/10.6114/JKOD.2017.30.1.010>
11. Kim BR, Huh K, Lim SW. Effect of Sihogyje-tang extract on indomethacin-Induced Gastric mucosal Lesions in Rats. *Korean J Orient Int Med*. 2010 ; 31(3) : 477-87.
12. Sun Y, Xu X, Zhang J, Chen Y. Treatment of depression with Chai Hu Shu Gan San: A systematic review and meta-analysis of 42 randomized controlled trials. *BMC Complement Altern Med*. 2018 ; 18(1) : 66. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2130-z>
13. Li Z, Zeng Q, Hu S, Liu Z, Wang S, Jin Y, et al. Chaihu Shugan San ameliorated cognitive deficits through regulating gut microbiota in senescence-accelerated mouse prone 8. *Front Pharmacol*. 2023 ; 14 : 1181226. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1181226>
14. Food and Drug Administration. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville : U.S. Food and Drug Administration. 2005 : 6-9. Available from: URL:<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>
15. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 ; 11(4) : 341-6. <https://doi.org/10.2174/187152011795677544>
16. Abe K, Taguchi K, Wasai T, Ren J, Utsunomia I, Shinohara T, et al. Biochemical and pathological study of endogenous 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-induced parkinsonism in the mouse. *Brain Res*. 2001 ; 907(1-2) : 134-8. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02573-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02573-2)
17. Park G, Park YJ, Yang HO, Oh MS. Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 ; 104 : 163-8. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.017>
18. Kang JM, Park HJ, Choi YG, Choe IH, Park JH, Kim YS, et al. Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *Brain Res*. 2007 ; 1131(1) : 211-9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.089>
19. Kum WF, Durairajan SSK, Bian ZX, Man SC, Lam YC, Xie LX, et al. Treatment of idiopathic Parkinson's disease with traditional

- Chinese herbal medicine: a randomized placebo-controlled pilot clinical study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011 ; 2011 : 724353. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep116>
20. Elyasi L, Ghazvini H. The protective effects of Citrus aurantium extract on a 6-Hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in male rats. *Anatomical Sciences.* 2020 ; 17(1) : 1-6.
21. Lee CH, Hwang DS, Kim HG, Oh H, Park H, Cho JH, et al. Protective effect of Cyperi rhizoma against 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage. *J Med Food.* 2010 ; 13(3) : 564-71. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.1252>