

MPP+로 유도된 파킨슨병 세포 모델에서 Hepad S9-1의 신경세포 보호 효과

목서희^{1,2}, 박병준^{1,2}, 주인환¹, 박종민¹, 김동희^{1*}

1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 뉴로영진한의원

Neuroprotective Effect of Hepad S9-1 in MPP+–treated PC12 Cells

Seo-Hee Mok^{1,2}, Byung-Jun Park^{1,2}, In-Hwan Joo¹, Jong-Min Park¹, Dong-Hee Kim^{1*}

1: Department of Pathology, College of Korean Medicine, Daejeon University,

2: Neuro Young Jin Korean Medicine Clinic

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease. Levodopa has a good effect for a period of two to five years, but long-term use reduces the effectiveness of the drug and accompanies side effects. To date, there is no strategy that has been able of fundamental treatment of Parkinson's disease. We developed Hepad S9-1 composed of 5 herbal materials (*Paeonia lactiflora* Pallas, *Uncaria sinensis* Havil, *Spatholobus suberectus* Dunn, *Panax ginseng* C. A. Meyer, and *Glycyrrhiza uralensis* Fischer). This in vitro study was conducted to search a novel disease-modifying drug, observing the effect of Hepad S9-1, a plant derived compounds on the apoptotic process of PC12 cells which was induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed to determine the effect of MPP+ or Hepad S9-1 on cell viability in PC12 cells. In addition, we examined cell protective effect of Hepad S9-1 in MPP+–induced PC12 cells. And gene and protein expression level of various factors that regulate apoptosis were confirmed by real-time PCR and western blot analysis. As a result of the study, Hepad S9-1 significantly inhibited MPP+–induced neuronal cell death. Also, Hepad S9-1 inhibited apoptosis-inducing Bcl-2 associated X (Bax) gene and protein expression, cytochrome C protein expression, caspase-9, caspase-7, caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase (PARP) activation. In addition, the neuroprotective ability was objectively confirmed by up-regulating the genes and proteins expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) that defend at apoptosis. Therefore, it seems that Hepad S9-1 can be additionally applied to the treatment of Parkinson's disease to suppress the progression of dopaminergic neuronal cell death.

keywords : Hepad S9-1, Parkinson's disease, Apoptosis, PC12 cell, Neuroprotective effect

서 론

파킨슨병은 도파민성 뉴런의 소실과 α -synuclein의 축적으로 인한 루이소체의 발생이 조직학적 특징으로 나타나는 신경 퇴행성 질환으로 안정 시 떨림, 서동증, 경직 및 자세 불안정성 등의 증상이 나타나며, 알츠하이머병 다음으로 흔하여 60세 이상 인구의 약 1%가 앓고 있고 연령 증가에 따라 발병률이 증가한다¹⁻³.

현재로서는 파킨슨병의 진행을 정지시키거나 지연시키는 치료법은 없으며, 파킨슨병의 증상 완화만 가능하다. 가장 중요한 치료제인 레보도파는 장기간 복용하면 이상운동증(dyskinesia)이 발생하며, 약효의 발현이나 지속시간에 변동이 일어나는 운동 동요 현상(motor fluctuations)이 나타나 환자의 삶의 질이 현저히 떨어진다⁴⁻⁶.

따라서 α -synuclein의 합성(synthesis)과 응집(agggregation), 미토콘드리아 기능장애(mitochondrial dysfunction), 신경염증(neuroinflammation)과 같은 병리기전에 개입하여 질병의 진행을 억제 또는 중단시키고자 하는 질병 경과 변형 치료법(disease-modifying treatments)에 대한 관심이 높아지고 있으며, 항체를 이용한 면역치료(immunotherapy) 등의 새로운 기법들도 연구되고 있다^{7,8}. 그러나 현재까지 만족스러운 결과가 얻어진 적은 없다.

한의학에서는 中風, 振顫, 瘓, 攣, 瘓癱 등의 용어로 파킨슨병의 증상을 서술하였고, 氣血兩虛, 氣滯血瘀, 肝腎陰虛, 氣滯血瘀 등이 병리 기전으로 언급되고 있다. 《黃帝內經》에서 발견되는 諸風掉眩, 皆屬於肝, 諸暴強直 皆屬於風과 같은 표현은 파킨슨병의 가장 대표적인 증상인 振顫과 硬直을 風病으로 인식하였음을 보여준다⁹.

최근 파킨슨병의 한의학적 치료에 대하여 관심이 높아지고 있으며, 다양한 천연물에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 2010년부터 2014년까지 진행된 임상 연구들에 따르면, 파킨슨병을 肝腎不

足, 肝腎陰虛, 氣血兩虛, 心肝腎虛, 氣滯血瘀, 肝風內動 등으로 변증하여 한약 치료를 시행하였고 한약 치료를 진행한 시험군은 대조군에 비해 증상이 호전되었으며, 사용된 한약재들 중 白芍藥, 當歸, 熟地黃, 甘草, 天麻 등의 순으로 사용 빈도수가 높게 나타났다¹⁰.

이러한 다양한 한약재들 중 白芍藥은 MPTP로 유도된 파킨슨병 쥐 모델에서 감소된 bcl-2/bax 비율을 농도의존적으로 회복시켰고 로타로드(rota-rod) 검사에서 낙하 시간을 증가시켰으며, 실험동물의 자발적인 운동을 증가시켰다¹¹. 그리고 鈎藤은 PC12 cell에 물 추출물을 처리하였을 때 총 glutathione(GSH) 수치가 증가하고 ROS의 생성과 세포사를 감소시키는 유의한 효과가 있었으며, 또한 6-OHDA로 유도한 caspase -3 활성을 억제함으로써 세포사멸을 억제하는 신경세포 보호능이 확인되었다¹². 또한 鷄血藤은 에탄올 추출물로 전 처리한 SH-SY5Y 세포에 처리했을 때, etoposide로 인해 전형적으로 나타나는 세포 형태의 변화가 억제된 것이 확인되었으며, 절단된 PARP, cleaved caspase-3, p53의 인산화 등 세포사멸 관련 지표 역시 감소되었다¹³.

人蔘은 Rb1, Rg1, Rd, Re와 같은 주요 ginsenoside가 신경염증과 세포사멸 억제를 비롯한 다양한 기전을 통해 파킨슨병에 대한 신경세포보호능을 가진다는 것이 밝혀졌으며¹⁴, 甘草는 H₂O₂로 유도된 신경교세포의 손상을 보호하였고 세포사 촉진 단백질인 Bax에 의존적으로 활성화되는 caspase 3의 활성화를 개선하였다¹⁵.

본 연구에서 사용한 시료인 Hepad S9-1은 선행 연구들¹¹⁻¹⁵을 통해 파킨슨병 관련 효능과 신경세포 보호능이 확인된 白芍藥, 鈎藤, 鷄血藤, 人蔘, 甘草를 같은 비율로 배합한 처방으로 In vitro에서 PC12 세포에 MPP+를 처리하여 세포사멸을 유도하고, Hepad S9-1를 처리하여 Hepad S9-1의 신경세포 보호 효과를 확인하였다. 세포사멸에 관련된 bax, bcl-2, bcl-xl의 유전자 및 단백질 발현량, cytochrome c, caspase family, PARP 단백질 발현량을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

Dong-Hee Kim, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon 34520, Republic of Korea

E-mail : dhkim@dju.kr · Tel : +82-42-280-2623

Received : 2023/03/30 · Revised : 2023/06/21 · Accepted : 2023/06/28

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2023.08.37.4.68>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

재료 및 방법

1. 시료 제작

본 연구에 사용된 Hepad S9-1의 구성 약재는 한약재 유통업체인(주)음니허브에서 구입하여 사용하였으며, 처방의 1첩 구성은 아래와 같다(Table 1). 10첩 분량의 Hepad S9-1(200 g)에 2 L의 증류수를 넣어 100°C에서 3시간동안 추출하였으며, 여과지를 사용하여 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물은 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 감압농축하고 freeze dryer(ilShinbiobase, Korea)를 사용하여 동결건조를 진행하였다. 동결건조 완료 후, 13.70 g(수득률 : 6.85%)의 분말을 획득하였고 -20°C에 보관하면서 실험 당일 소분하고 증류수에 용해시켜 사용하였다.

Table 1. The prescription of Hepad S9-1

Herbal medicine name	Scientific name	Origin	weight(g)
白芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Korea	4
釣鉤藤	<i>Uncaria sinensis</i> Havil	Korea	4
鷄血藤	<i>Spatholobus suberectus</i> Dunn	Korea	4
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Korea	4
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Korea	4
Total amount			20

2. 세포 배양

랫트 유래 크롬 친화 세포종인 PC12 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank; KCLB)에서 구입하였고 10%의 fetal bovine serum(Welgene, Korea)이 추가된 RPMI-1640(Welgene, Korea)배지를 사용하였으며, 내부 온도는 37°C, CO₂ 농도는 5%로 유지되는 세포배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

3. 세포 생존율 측정

PC12 세포를 48 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 배양하였으며, 24시간 후, MPP+에 의한 세포독성을 측정하기 위해 MPP+를 100, 200, 500, 600 μM 농도로 처리하여 배양하였고 Hepad S9-1에 의한 세포독성을 측정하기 위해 Hepad S9-1을 50, 100, 200, 400 μg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 또한 MPP+로 인한 세포독성에 대한 Hepad S9-1의 세포 보호 효과를 확인하기 위해 Hepad S9-1을 50, 100, 200 μg/mL 농도로 1시간 동안 전처리한 후, MPP+를 500 μM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, EZ-Cytox(DoGenBio, Korea)에 포함된 용액을 각 well당 20 μL씩 추가하고 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 micro plate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군에 대한 백분율로 세포생존율을 표시하였다.

4. 유전자 발현량 측정

PC12 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 배양하였으며, 24시간 후, Hepad S9-1을 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하고 1시간 동안 전처리한 후, MPP+를 500 μM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 accuPrep® universal RNA extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 accupower® cyclescript RT premix(Bioneer, Korea)와 혼합하고 PCR cycler(alpha cycler 1; PCRmax, U.K.)를 사용하여 45°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 특정 유전자를 증폭시켜 확인하기 위해 real-time PCR을 진행하였으며, cDNA와 특정 유전자에 맞는 primer, SYBR green premix(PCR Biosystems, USA)를 혼합하고 real-time PCR cycler(Exicycler™ 96; Bioneer, Korea)를 사용하여 95°C에서 2분 동안 반응시키고 95°C에서 5초, 62.5°C에서 30초를 40회 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량 하였으며, 사용된 primer들의 정보는 Table 2와 같다.

5. 단백질 발현량 측정

PC12 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 배양하였으며, 24시간 후, Hepad S9-1을 50, 100, 200 μg/mL 농

도로 처리하고 1시간 동안 전처리한 후, MPP+를 500 μM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 원심분리하여 얻은 세포는 protease inhibitor(Sigma-Aldrich, USA) 및 phosphatase inhibitor(Sigma-Aldrich, USA)가 포함된 RIPA buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 정량하였고 sample loading buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 12% acrylamide gel을 사용하여 단백질을 분리하였고 이를 PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane은 3% BSA에 담가 상온에서 2시간 동안 반응시켜 blocking을 진행하였으며, TBS-T buffer로 세척하고 각 primary antibody(Cell Signaling Technology, USA)와 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 세척하고 secondary antibody(Jackson ImmunoResearch, USA)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 이를 다시 세척하여 ECL solution(iNtRON Biotechnology, Korea)으로 특정 단백질을 발색시켰다. 발색 후, chemidoc fusion FX(VILBER, France)를 통해 단백질 발현량을 분석하였으며, 사용된 primary antibody들에 대한 정보는 Table 3과 같다.

Table 2. Real-Time PCR Primer Sequences

Gene name	Size(bp)	F/R	Sequences
Bax	147	Forward	ACGTCTGCGGGGAGTCAC
		Reverse	AGGCCCTGTCTTCATGATCT
Bcl-2	102	Forward	GGTGAAGTGGGGGAGGATTG
		Reverse	AGAGCGATGTTGTCCACCAG
Bcl-xl	125	Forward	ATCTTGGCTTTGGATCCTGG
		Reverse	CCCGTTGCTCTGAGACATT
β-actin	116	Forward	AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA
		Reverse	TCCGAGTCCATCACAATGC

Table 3. Primary Antibodies Used for Western Blotting

Protein name	Molecular weight (kDa)	Cat. No.	Manufacturer
Bax	20	2772S	Cell Signaling Technology
Bcl-2	28	2876S	
Bcl-xl	30	2764S	
Cytochrome c	14	11940S	
Cleaved Caspase-3	17, 19	9661S	
Cleaved Caspase-7	20	9491S	
Cleaved Caspase-9	17, 38	9507S	
Cleaved PARP	89	94885S	
Beta-actin	45	3700S	

6. 통계처리

결과는 mean±standard error of mean으로 나타내었으며, SPSS Statistics Version 21.0(IBM, USA)을 이용하였으며, 먼저 두 그룹 간의 통계적 비교는 independent sample t-test를 사용하여 수행하였고 Tukey's HSD test를 통해 유의수준 0.05로 설정하여 유의성을 검정하였으며, p<0.05, p<0.01 및 p<0.001의 3가지 유의수준으로 나누어 표기하였다.

결 과

1. MPP+ 및 Hepad S9-1의 세포생존율

PC12 cell에서 MPP+에 의한 세포 손상을 확인하기 위해 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군을 100.0±5.1%로 나타났을 때, MPP+ 100 μM에서 90.8±5.3%, 200 μM에서 81.1±2.6%, 500 μM에서 63.5±2.5%의 세포 생존율이 나타났다(Fig. 1A). 또한 Hepad S9-1의 세포 독성을 확인하기 위해 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군을 100.0±4.3%로 나타났을 때, Hepad S9-1 50 μg/mL 농도에서 100.5±3.2%, 100 μg/mL 농도에서 100.6±1.3%, 200 μg/mL 농도에서 102.9±2.6%, 400 μg/mL 농도에서 91.1±2.1%의 세포 생존율이 나타났다(Fig. 1B). 이에 따라 MPP+는 적당한 세포의 독성을 유도하는 500 μM 농도로 설정하였고 Hepad S9-1은 세포에 대한 독성이 나타나지 않는 200 μg/mL 이하의 농도로 설정하여 이후 실험을 진행하였다.

2. MPP+로 손상된 세포에 대한 Hepad S9-1의 세포보호능

MPP+로 세포 손상이 유도된 신경세포(PC12 cell)에서 Hepad

S9-1의 세포보호능을 확인하기 위해 세포 생존율을 측정된 결과, Hepad S9-1은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있는 증가가 확인되었으며(Fig. 2), 이를 통해 Hepad S9-1이 MPP+로 유도되는 세포사멸을 방어하는 신경세포 보호 효과를 확인할 수 있었다.

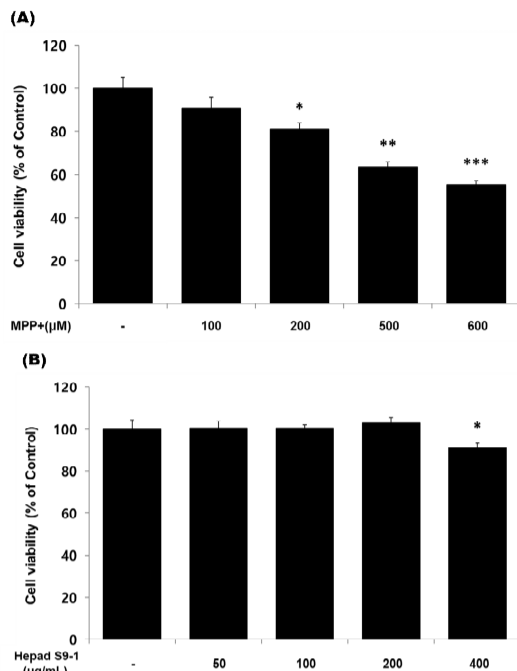


Fig. 1. Cell viability of MPP+ or Hepad S9-1 in PC12 cells. The cells were treated by 100, 200, 500, and 600 μM of MPP+ or 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hepad S9-1 for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$ compared to control). (A); cell viability of MPP+, (B); cell viability of Hepad S9-1.

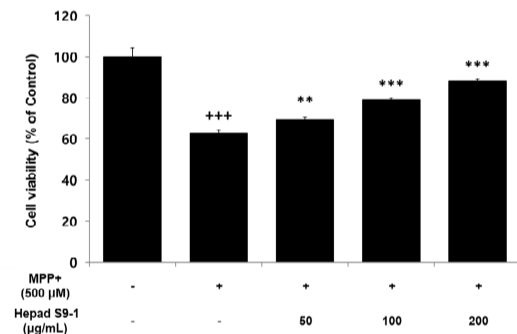


Fig. 2. Protective effect of Hepad S9-1 in PC12 cells on MPP+ induced cytotoxicity. The cells were treated by 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hepad S9-1 for 1 h and were exposed to 500 μM of MPP+ for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, +++ : $p < 0.001$ compared to control, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$ compared to MPP+).

3. 세포 사멸 관련 유전자 발현량

MPP+로 유도된 세포사멸에 대하여 Hepad S9-1의 보호 효과를 확인하기 위해 세포사멸을 조절하는 bcl-2-associated X(Bax), B-cell lymphoma-2(Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large(Bcl-xl) 유전자 발현량을 측정하였다. 그 결과, Hepad S9-1는 세포사멸을 촉진하는 Bax 유전자의 발현량을 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있게 감소시켰으며, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2와 Bcl-xl 유전자 발현량을 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 3).

4. 세포 사멸 관련 단백질 발현량

MPP+로 유도된 세포사멸에 대하여 Hepad S9-1의 보호 효과를 확인하기 위해 세포사멸을 조절하는 다양한 단백질들의 발현량을 측정하였다. 그 결과, Hepad S9-1는 유전자 발현량 결과와 동일하게 세포사멸을 촉진하는 Bax 단백질의 발현량을 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있게 감소시켰으며, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2와 Bcl-xl 단백질 발현량을 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있게

증가시켰다(Fig. 4A, 4B). 또한 cytochrome c를 비롯한 활성화(cleaved)된 caspase family(caspase-3, 7, 9) 및 poly ADP-ribose polymerase(PARP)의 발현량을 측정된 결과, Hepad S9-1는 해당 단백질들의 발현량을 MPP+ 단독처리군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4C, 4D).

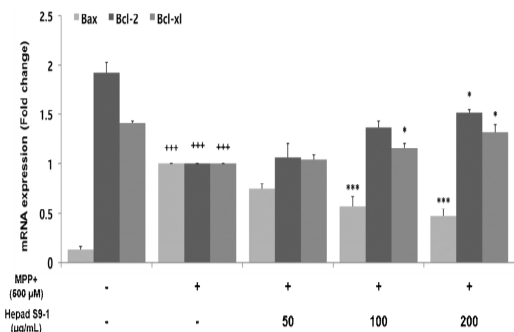


Fig. 3. Effect of Hepad S9-1 on apoptosis-related gene expression level in MPP+ induced PC12 cells. The cells were treated by 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hepad S9-1 for 1 h and were exposed to 500 μM of MPP+ for 24 h. The mRNA expression level were measured using a real-time PCR. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, +++ : $p < 0.001$ compared to control, * ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.001$ compared to MPP+).

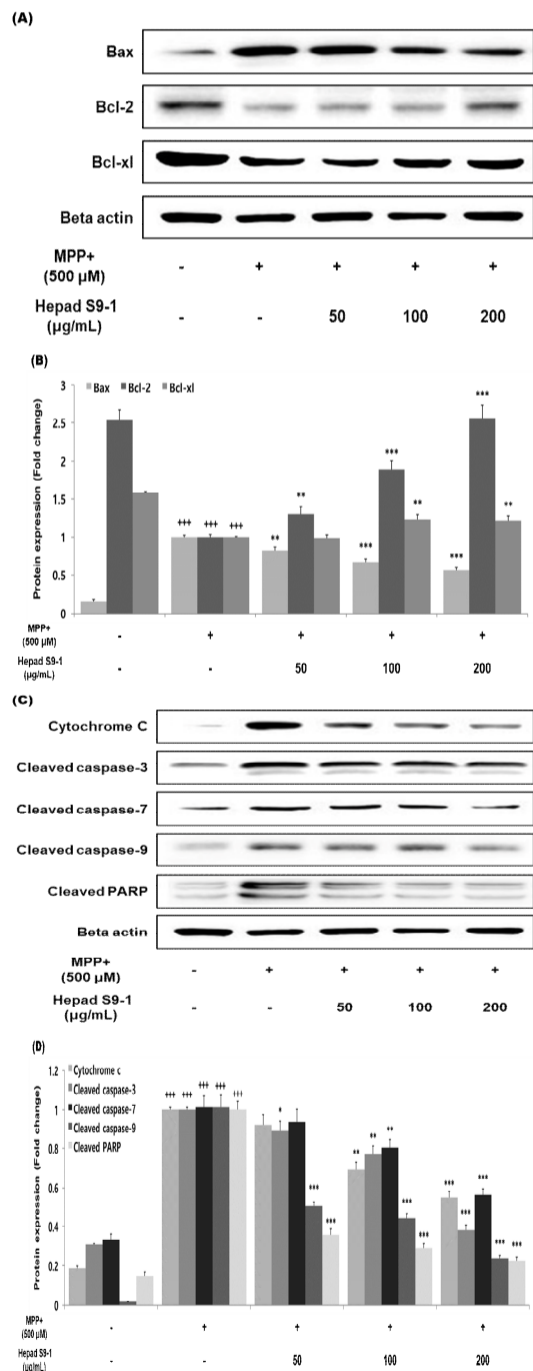


Fig. 4. Effect of Hepad S9-1 on apoptosis-related protein expression level in MPP+ induced PC12 cells. The cells were treated by 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hepad S9-1 for 1 h and were exposed to 500 μM of MPP+ for 24 h. The mRNA expression level were measured using a western blot assay. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, +++ : $p < 0.001$ compared to control, * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$ compared to MPP+). (A, C); protein expression level (B); graph image

고찰

파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 흔한 신경퇴행성 질환이다. 인구 고령화에 따라 파킨슨병 환자가 증가하면서 사회적·경제적 부담이 증가되고 있다¹⁶⁾. 파킨슨병의 병리학적 특징은 중뇌의 흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)의 신경세포 손실이며, 사망할 때까지 환자의 중뇌 흑질 치밀부에서는 50-70%의 신경세포 손실이 일어난다^{17,18)}. 파킨슨병은 신경변성이 계속 진행되는 질환이기 때문에, 신경변성을 지연시키거나 중단시키는 질병 경과 변형치료법(disease-modifying therapy)이 필요하다¹⁹⁾. 그러나 현재까지 질병 경과 변형치료법이라 할만한 치료법은 없으며, 현재 가장 보편적으로 사용되는 항파킨슨제인 레보도파는 같은 용량의 복용을 지속하면 효과가 감소하므로 점차 복용량을 늘려야 하며, 그에 따라 레보도파 유발 운동이상증(levodopa-induced dyskinesia, LID)을 발생시키는 등 한계가 뚜렷하다^{20,21)}.

세포사멸은 신경계 질환의 주된 특성 중 하나로, 파킨슨병에서는 도파민성 신경세포의 세포사멸이 확인된다^{22,23)}. 세포사멸은 중추신경계의 성숙 과정에서 신경세포가 정확하게 프로그램대로 자연사(natural death)할 수 있도록 하는 중요한 과정이지만, 그 조절에 이상이 생기면서 일어나는 신경변성은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)을 비롯한 다양한 만성 신경 퇴행성 질환을 초래한다²⁴⁾. 세포사멸을 조절하는 핵심적인 단백질은 bcl-2 family protein이며, 이들은 세가지 하위군으로 분류할 수 있는데 pro-survival 단백질인 bcl-2 sub-family(Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1a), pro-apoptotic 단백질인 BH3 sub-family (Bad, Bid, Bim, Bik, Blk, Hrk, Noxa, Puma), 그리고 bax sub-family(Bax, Bak)이다²⁵⁾. Pro-survival 단백질들은 세포사멸을 억제함으로써 세포가 생존할 수 있도록 하는데, 활성화된 bax와 bak의 BH3 domain과 결합하여 이들의 pro-apoptotic 작용을 억제하는 기전을 통해서이며, Bcl-2, bcl-xl는 Bax와 Bak을 직접 활성화시킬 수 있는 BH3-only 단백질을 중화하여 세포사멸을 막을 수 있다²⁶⁾. 세포사멸이 일어나는 두 가지 경로인 내인성 경로와 외인성 경로는 파킨슨병의 도파민성 신경세포의 사멸과 유관한 것으로 밝혀졌으며, 외인성 경로가 파킨슨병의 발병과 진행에서 어떤 역할을 하는지는 아직 분명하지 않지만, 내인성 경로에 의한 신경세포 사멸의 기전은 자세히 밝혀져 있다^{27,28)}.

세포사멸 신호에 의해 bax, bak와 같은 pro-apoptotic 단백질이 활성화되면 미토콘드리아 막에 기공을 내고 그 결과 미토콘드리아 막간 공간에서 세포질로 cytochrome c가 방출되고 cytochrome c가 apaf-1과 결합한 apaf-1/cytochrome c 복합체에 의해 유도된 procaspase-9는 단백질분해(proteolysis)로 caspase-9로 활성화되며, 이는 caspase-3, caspase-6, caspase-7을 활성화한다^{27,28)}. 이러한 실행형 caspase들에 의해 단백질 분해가 이뤄지면서 세포사멸로 이어진다. DNA 수복에 관여하여 세포의 생존에 중요한 효소인 poly ADP ribose polymerase(PARP)는 활성화된 caspase에 의해 분해되는데, 그 결과 DNA의 수복이 이뤄지지 못하면서 세포사멸이 일어난다²⁷⁻²⁹⁾.

본 연구에서 사용된 Hepad S9-1은 파킨슨병을 치료하기 위해 임상에서 사용되고 있는 처방으로, 선행 연구에서 신경세포 보호능이 보고된 白芍藥, 釣鉤藤, 鷄血藤, 人蔘, 甘草가 같은 비율로 배합되어 있다. 본 연구는 Hepad S9-1의 신경 세포 보호능과 세포사멸 억제 효과를 확인하기 위해 in vitro에서 PC12 세포에 전처리한 후 MPP+ 처리하여 세포사멸 관련 지표의 변화를 측정하여 대조군과 비교하였다. Hepad S9-1은 400 µg/mL 농도를 제외한 모든 실험 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고 MPP+에 의한 세포사멸을 50 µg/mL 농도에서 10%, 100 µg/mL 농도에서 17%, 200 µg/mL 농도에서 21% 이상 억제하였다(Fig. 3). 세포사멸을 유도하는 인자인 bax의 유전자 및 단백질 발현은 200 µg/mL 농도에서 각각 50, 40% 이상 감소되었으며, 미토콘드리아 내부로 방출되어 사멸을 촉진하는 cytochrome c의 단백질 발현 역시 45% 감소되었다. 또한 200 µg/mL 농도에서 세포사멸을 억제하는 인자인 bcl-2와 bcl-xl의 유전자 발현을 각각 1.5, 1.3배로 증가시켰고, 단백질 발현을 각각 2.5, 1.2배로 증가시켰다. 마지막으로 cleaved PARP와 caspase 단백질 발현은 농도의존적으로 유의하게 감소하

여 cleaved PARP와 caspase-9은 50 µg/mL 농도에서 각각 60%, 50% 이상 감소하였으며, 200 µg/mL 농도에서는 각각 70%, 68% 이상 감소하였다. 200 µg/mL 농도에서 cleaved caspase-3는 64%, cleaved caspase-7는 44% 이상 감소되어 Hepad S9-1에 의해 MPP+로 유도된 세포사멸이 효과적으로 억제되었음을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, Hepad S9-1은 신경세포에 대한 독성이 없는 농도에서 신경독성을 야기하는 독성물질인 MPP+로 유도된 세포사멸을 억제하였으며, 세포사멸을 억제하는 기전을 과학적으로 입증하였다. 이러한 Hepad S9-1이 신경세포를 보호함으로써 파킨슨병의 진행을 억제하거나 중단하는 효능이 있음을 객관적으로 확인할 수 있는 결과이며, 향후 동물실험을 통해 Hepad S9-1의 단일 투여 및 레보도파와 병용투여에 대한 연구 결과들이 필요하다. 본 연구 결과를 바탕으로 후속연구가 진행된다면 신경세포 손상 및 파킨슨병에 대한 한의학적 치료제가 개발될 수 있을 것이라 사료된다.

결론

본 연구는 세포사멸 관련 인자들의 변화를 분석하여 Hepad S9-1의 신경세포 보호능을 확인하고자 하였다. Hepad S9-1은 세포사멸을 유도하는 Bax의 유전자 및 단백질 발현, cytochrome C의 단백질 발현, caspase-9, caspase-7, caspase-3 및 PARP의 활성화를 억제하였으며, 세포사멸을 방지하는 Bcl-2와 Bcl-xl의 유전자 및 단백질 발현을 상향조절하여 신경세포보호능을 객관적으로 확인할 수 있었다. 향후 기타 한방처방 또는 기존에 사용되는 약물과의 신경세포 보호 효능의 비교 연구를 통해 본 처방의 우수성이 확인된다면, 증상을 완화시킬 뿐 아니라 질병의 경과를 변화시키는 효능도 가지는 신규 치료제의 개발도 가능할 것으로 전망된다.

References

1. Abbas MM, Xu Z, Tan LC. Epidemiology of Parkinson's disease—East versus West. *Movement disorders clinical practice*. 2018;5(1):14-28.
2. Raza C, Anjum R. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life sciences*. 2019;226:77-90.
3. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*. 2017;124:901-5.
4. Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review. *Neurology India*. 2018;66(7):26.
5. Duwa R, Jeong J-H, Yook S. Development of immunotherapy and nanoparticles-based strategies for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2021;51:465-81.
6. Li W-w. Botanical Therapeutics for Parkinson's Disease. *Chinese journal of integrative medicine*. 2020;26(6):405-11.
7. pments in the treatment of Parkinson's Disease. *F1000Research*. 2020;9.
8. Kalia LV, Kalia SK, Lang AE. Disease-modifying strategies for Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2015;30(11):1442-50.
9. Park S-m, Lee S-h, Yin C-s, Kang M-k, Chang D-i, Kang S-k, et al. Literature Review on Parkinson's disease in Oriental medicine. *Journal of Acupuncture Research*. 2004;21(1):202-10.
10. Lim SY, Kim HR, Choi YS, Lee I. Review of Current Clinical Studies for Herbal Medicine of Parkinson's Disease in Traditional Chinese Medicine. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2016;30(5):327-37.
11. Zheng M, Liu C, Fan Y, Shi D, Jian W. Total glucosides of paeony (TGP) extracted from Radix Paeoniae Alba

- exerts neuroprotective effects in MPTP-induced experimental parkinsonism by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;245:112182.
12. Shim JS, Kim HG, Ju MS, Choi JG, Jeong SY, Oh MS. Effects of the hook of *Uncaria rhynchophylla* on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;126(2):361-5.
 13. Park HR, Lee H, Lee J-J, Yim N-H, Gu M-J, Ma JY. Protective effects of *spatholobi caulis* extract on neuronal damage and focal ischemic stroke/reperfusion injury. *Molecular Neurobiology*. 2018;55:4650-66.
 14. González-Burgos E, Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP. Potential neuroprotective activity of Ginseng in Parkinson's disease: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2015;10:14-29.
 15. Park CH, Kim JH, Choi SH, Shin YS, Lee SW, Cho EJ. Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* Radix extract and its active compounds on H₂O₂-induced apoptosis of C6 glial cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2017;25(5):315-21.
 16. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2006;5(6):525-35.
 17. Davie CA. A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*. 2008;86(1):109-27.
 18. Monzón-Sandoval J, Poggiolini I, Ilmer T, Wade-Martins R, Webber C, Parkkinen L. Human-specific transcriptome of ventral and dorsal midbrain dopamine neurons. *Annals of Neurology*. 2020;87(6):853-68.
 19. Jazvinščak Jembrek M, Oršolić N, Mandić L, Sadžak A, Šegota S. Anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of flavonols: targeting Nrf2, NF- κ B and p53 pathways in neurodegeneration. *Antioxidants*. 2021;10(10):1628.
 20. Melamed E, Ziv I, Djaldetti R. Management of motor complications in advanced Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2007;22(S17):S379-S84.
 21. Thanvi B, Lo N, Robinson T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. *Postgraduate medical journal*. 2007;83(980):384-8.
 22. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407(6805):802-9.
 23. Qiao C, Zhang L-X, Sun X-Y, Ding J-H, Lu M, Hu G. Caspase-1 deficiency alleviates dopaminergic neuronal death via inhibiting caspase-7/AIF pathway in MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 2017;54:4292-302.
 24. Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9(8):1059-96.
 25. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
 26. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):49-63.
 27. Kim T-H, Kim P-H, Jeon B-K, Yoon J-R, Woo W-H, Mun Y-J, et al. Effect of *Anemarrhena Rhizoma* ethanol extract on apoptosis induction of HT-29 human colon cancer cells. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2011;24(1):16-24.
 28. Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. Exon Publications. 2018:65-82.
 29. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayiotidis P, Pilling D, Bofill M, et al. Interleukin-2 receptor common γ -chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: Selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *European journal of immunology*. 1996;26(2):294-9.