

## MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델에서 항염증효과를 통한 측백엽의 도파민신경보호 효과

박건혁<sup>1#</sup>, 김효근<sup>2</sup>, 주미선<sup>2</sup>, 김애정<sup>3</sup>, 오명숙<sup>1,2\*</sup>

1 : 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 2 : 경희대학교 약학대학 한약학과, 3 : 경기대학교 대체의학대학원

### *Thuja orientalis* leaves extract protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity via inhibiting inflammatory action

Gunhyuk Park<sup>1#</sup>, Hyo Geun Kim<sup>2</sup>, Mi Sun Ju<sup>2</sup>, Ae-Jung Kim<sup>3</sup>, Myung Sook Oh<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Graduates school, Kyung Hee University,

2 : Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy Kyung Hee University,

3 : The Graduate School of Alternative Medicine, Kyunggi University

### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study was to investigate the protective effect of extract of *Thuja orientalis* leaves (TOFE) against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity by inhibition of inflammation in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease (PD).

**Methods** : We evaluated the effect of TOFE against lipopolysaccharide (LPS)/1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) toxicity using nitric oxide (NO) assay, inducible NO synthase and cyclooxygenase 2 western blot, tyrosine hydroxylase and microglia activation immunohistochemistry (IHC) in BV2 cell, primary rat mesencephalic neurons, or C57BL/6 mice. We also evaluated the effect of TOFE in mice PD model induced by MPTP. C57BL/6 mice were treated with TOFE 50 mg/kg for 5 days and were injected intraperitoneally with four administrations of MPTP on the last day. We conducted behavioral tests and IHC analysis to see how TOFE affect MPTP-induced neuronal loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum (ST) of mice. To assess the anti-inflammation effects, we carried out glial fibrillary acidic protein and macrophage-1 antigen integrin alpha M in IHC in SNpc and ST of mice.

**Results** : In an *in vitro* system, TOFE decreased NO generations in BV2 cells, TOFE protected dopaminergic cells against LPS or MPP<sup>+</sup>-induced toxicity in primary mesencephalic dopaminergic neurons. *In vivo* system, TOFE at 50 mg/kg treated group showed improved motor deteriorations than the MPTP only treated group and TOFE significantly protected striatal dopaminergic damage from MPTP-induced neurotoxicity in mice. Moreover, TOFE inhibited activation of astrocyte and microglia in SNpc and ST of the mice.

**Conclusions** : We concluded that TOFE showed anti-parkinsonian effect by protection of dopaminergic neurons against MPTP toxicity through anti-inflammatory actions.

**Key words** : *Thuja orientalis* leaves, MPTP, Parkinson's disease, neuroinflammation

## 서론

최근 노인 인구의 급증과 더불어 다양한 신경퇴행성 뇌질

환 (neurodegenerative disorders) 환자의 증가로 이에 대한 치료와 예방에 관심이 고조되고 있다<sup>1)</sup>. 신경 퇴행성 뇌질환은

\*교신저자 : 오명숙, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 약학대학 한약학과 본초학교실 및 동서약학연구소  
· Tel : 02-961-9436 · E-mail : msohok@khu.ac.kr  
#제1저자 : 박건혁, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 약학대학 한약학과 본초학교실 및 동서약학연구소  
· Tel : 02-9611-2252 · E-mail : uranos5@khu.ac.kr  
· 접수 : 2014년 4월 25일 · 수정 : 2014년 5월 12일 · 채택 : 2014년 5월 14일

신경의 퇴행성 변화로 인해 운동, 기억, 인지장애 등 여러 가지 병증을 유발하는 질병들을 말하며, 이 중 파킨슨병은 뇌 흑질 치밀부 (substantia nigra pars compacta; SNpc)의 멜라닌 색소를 함유한 도파민 신경의 세포 사멸과 선조체 (striatum)의 도파민 결핍으로 인해 진전 (tremor), 운동완서 (bradykinesia), 근육경직 (rigidity), 비정상적 자세 (postural instability), 운동 불능 (akinesia) 등의 증상을 나타내는 질환으로 알려져 있다<sup>2-3)</sup>. 현재까지 파킨슨병의 치료 방법은 주로 도파민 전구물질인 L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)를 투여하여 도파민 전구체로부터 도파민을 보충하는 방법을 사용하였으나, 많은 임상 연구에서 지속적인 L-dopa의 사용이 심각한 부작용을 초래하는 것으로 알려져, 최근에는 파킨슨병의 발병원인과 도파민신경 세포의 사멸기전에 관련된 인자들에 대한 연구를 통하여 파킨슨병을 예방하고 병의 진행을 완화시킬 수 있는 새로운 치료법 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>3-4)</sup>. 파킨슨병에 관한 연구들은 신경독성을 사용하여 만든 모델에서 주로 수행되고 있는데 특히 catecholamine성 신경만을 선택적으로 파괴하는 것으로 알려진 6-hydroxydopamine (6-OHDA)과 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)이 널리 사용되며, MPTP의 대사물인 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)는 도파민 신경세포의 사멸을 유발하는 물질로 알려져 있다. 따라서 파킨슨병의 실험에서 신경 독성 물질로 주로 사용되고 있다<sup>5-6)</sup>.

측백엽 (Biotae Cacumen)은 측백과 (측백나무과; Cupressaceae)에 속하는 상록항목인 측백나무 (*Biota orientalis*(L.) ENDLE.)의 잎을 건조한 것으로 일반적으로 봄, 가을에 어린 가지와 잎을 채취하여 음건한 것을 약용으로 사용한다<sup>7-8)</sup>. 측백엽은 涼血止血, 止咳化痰, 生肌, 殺蟲, 烏鬚髮 等の 효능이 있어 예로부터 風冷歷節, 吐血, 衄血, 咯血, 便血, 肺熱咳嗽, 湯火傷, 凍傷, 鬚髮早白 등을 치료하는데 사용되어 왔다<sup>7-8)</sup>. 이러한 측백엽은 최근 항산화효과, 항염증효과, 항세포사멸효과, 멜라닌 세포억제작용, 탈모예방 및 치료효과 등 다양한 약리효능이 있는 것으로 보고되었다<sup>9-12)</sup>. 뿐만 아니라 측백엽의 pinusolide 관능기 성분의 cortical cells에 대한 보호 효과가 보고된 바 있으며, 본 연구진은 6-OHDA 독성으로 유도한 파킨슨병 모델을 이용하여 항세포사멸효과를 증명한 바 있다<sup>3)</sup>. 이번 연구에서는 MPTP 독성으로 유도한 파킨슨병 모델을 이용하여 항염증효과를 통한 도파민신경보호효과에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 측백엽 (이하 TOFE)의 경우 이전 연구에서 사용한 추출물과 같은 것을 사용하였다<sup>8)</sup>.

#### 2) 시약

Minimum essential medium (MEM)은 Gibco Industries Inc. (Auckland, NZ)에서 구입하였고, Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S)은 Hyclone (Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffer saline (PBS), collagen, glycine, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), paraformaldehyde (PFA), diaminobenzidine (DAB), poly-Lysine (PLL), lipopolysaccharide (LPS), MPTP, MPP<sup>+</sup> 등은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, CA, USA)에서 구입하였다. Biotinylated anti-rabbit antibody, ABC standard kit 등은 Vector (Burlingame, USA)에서 구입하였고, tyrosine hydroxylase (TH)-rabbit in goat primary antibody, macrophage-1 antigen integrin alpha M (Mac-1)-rat in goat primary antibody, glial fibrillary acidic protein (GFAP)-rabbit in goat primary antibody는 Merck Millipore (Billerica, USA)에서 구입하였다. 또한, nitric oxide synthase (iNOS)-rabbit in goat primary antibody, prostaglandin-endoperoxide synthase (Cox-2)-rabbit in goat primary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) *in vitro* system

(1) BV2 세포에서 LPS 독성에 대한 세포보호효과 및 NO 생성에 관한 영향 측정

BV2 세포는 가천대학교 약학대학 김선여교수님 연구실을 통해 분양받아 사용하였다. 37 °C의 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % air 조건에서 10 % FBS, 1 % P/S를 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였으며, 세포는 2~3 일마다 1:3의 비율로 계대하여 배양하였다. 96-well plate에 BV2 cell은 0.5 × 10<sup>4</sup>/well로 seeding하고 24 시간 배양한 후, 측백엽 추출물 1~100 µg/mL 농도별로 1 시간 동안 전처리 후 23 시간 LPS를 함께 처리하였다. 약물처리 후 상등액을 제거하고 MTT 1 mg/mL을 처리하여 2 시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer (Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 또한 위와 같은 조건으로 처리한 후 배양액을 회수하여 NO 생성량 측정에 사용하였다. 배양액에 griess reagent를 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 20~100 µM의 표준곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

(2) BV2 세포에서 LPS 독성에 대한 iNOS 및 Cox-2 관한 영향 측정

BV2 cell은 3 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 100 mm cell culture dish에 seeding하고, 24시간 배양하였다. 그 후 측백엽 추출물 1~100 µg/mL 농도별로 1 시간 동안 전처리 후 23시간 LPS를 함께 처리하여, 24시간 배양 한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해 준 후, lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을

bradford assay로 단백질 농도를 정량 한 후 10% SDS-PAGE를 시행하고, 전개된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시켰다. 이 membrane을 5% skim milk로 45분 동안 blocking하고, 1차 항체를 희석(1:500)하여 4°C에서 over night 한 다음, TBST로 10분 간격으로 3회 세척하고, 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST로 10분간 3회 세척 후 ECL용액으로 반응시켜 LAS 4000 chemiluminescence detection system (Fuji, Tokyo, Japan)을 이용하여 현상 및 정량을 하였다.

(3) Rat mesencephalic culture를 이용한 LPS 및 MPP<sup>+</sup>에 대한 세포보호효과

Sprague-Dawley rat 14 일 태아는 Orient Bio (Osan, Korea)에서 구입하였다. 흰쥐 태아 중뇌 조직을 얼음 위에서 박리하여 10 % FBS를 포함한 MEM에 모은 후, 파이펫을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. PLL로 미리 코팅한 coverslip에  $1.0 \times 10^5$ 으로 seeding 한 후 37 °C에서 6 일 동안 증식시켰다. 0.1, 1 µg/mL의 TOFE 처리 1 시간 후 LPS를 20 ng/mL 및 MPP<sup>+</sup>를 10 µM을 처리하여 23 시간을 더 배양하였고, 고정한 후 primary antibody (rabbit-anti-TH 1:2,000)를 반응시켰다. Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)을 이용하여 secondary antibody를 반응시킨 후, ABC solution 반응을 거쳐 DAB로 발색하였다. 각 과정 사이에 PBS 3회 세척을 행하였다. Gelatin coated slide에 coverslip을 mounting 용액을 이용해 덮어 보관하였다. 현미경 (Axioskop 2; Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany)을 사용하여 세포에 대한 영향을 관찰하였다.

## 2) *in vivo* system

### (1) 사육과 투여

ICR과 C57BL/6 생쥐 8 주령은 Orient Bio (Osan, Korea)에서 구입하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 ( $22 \pm 2$  °C), 습도 ( $53 \pm 3$  %) 및 명암주기 (12 시간)는 자동적으로 조절되도록 하였다. 생쥐는 5 마리씩 A3+B3 군으로 나누었다. 1 주일 적응시킨 후, 제1군 (대조군) 및 제2군 (LPS군 또는 MPTP군)은 식염수를 3 일간 1 일 1 회 경구 투여하였고, 제3군 (TOFE 50 mg/kg 투여군)은 식염수에 용해시킨 TOFE를 50 mg/kg으로 3 일간 1 일 1 회 경구 투여하였다. 3 일째 되는 날 제 A1군은 intracerebral (*i.c.v.*) injection에 생리식염수를 투여 하였으며, 제 A2군 및 제A3군은 2 µg의 LPS를 투여 하였다. 또한 MPTP acute 모델로 제B1a, B1b군은 생리식염수를 생쥐 체중 kg당 5 mL로 2 시간 간격으로 4 회 복강 내 투여하였으며, 제B2a, B2b군 및 제B3a, B3b군은 MPTP를 20 mg/kg 체중의 농도로 생리식염수 5 mL에 용해시켜 2 시간 간격으로 4 회 복강 내 투여하였다. 투여가 완료된 후 A군과 B1, 2, 3a군은 24 시간 후 치사시킨 후, microglia 활성을 알아보기 위해 뇌 조직을 분리 하였으며, B1, 2, 3b군은 7 일 후, 도파민 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 뇌 조직을 분리하였다. 관류한 생쥐의 뇌를 적출하여 4 % PFA에 하루 보관하여 고정시킨 후, 동결 시 생기는 조직의 손상을 막

기 위해 4 °C의 30 % sucrose에 하루 동안 두어, 뇌 조직을 cryostat (CM3000; Leica, Wetzlar, Germany)로 30 µm 동결박편 후, 4 °C storing solution에 보관하였다.

### (2) Pole test

TOFE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 pole test를 실시하였다. 5 일간의 투여 종료 다음날 및 셋째 날, 높이 55 cm, 지름 8 mm의 막대에서 pole test를 수행하였다. 막대 위에 C57BL/6 생쥐를 머리가 위로 향하게 놓고, 생쥐가 꼭대기를 180° 돌아서 생쥐의 머리가 완전히 아래로 내려오는 시간을 'time to turn', 생쥐가 꼭대기를 180° 돌아서 내려와 네 다리가 땅에 닿을 때까지 걸리는 시간을 'time for locomotion activity' (Time for LA)로 표기하였다. 각 실험은 30 초의 제한시간을 두고 시행하였으며, 각 생쥐를 3 회씩 연습시킨 후 5 회 본 실험을 행하였다.

### (3) Rotarod test

TOFE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 rotarod test를 실시하였다. 5 일간의 투여 종료 다음날 및 셋째 날, 직경 3 cm, 4 rpm 회전 전봉 위에 올려놓고 20 rpm까지 속도를 조절하여 연습시킨 3 시간 후, 25 rpm에서 본 실험을 시행하였으며 이 때 낙하 시간을 측정하였다. 연습은 회당 300 초의 제한 시간을 두고 5 분 간격으로 2 회 시행하였고, 본 실험은 3 회 실행하여 평균값을 사용하였다.

### (4) 면역조직화학분 석

고정한 태아중뇌세포와 뇌 조직의 선조체 및 흑질 부분을 골라 PBS로 3 회 세척한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위하여 과산화수소로 처리하여, 1차 항체 rabbit anti-TH (1:2000 dilution), rat anti-Mac-1 (1:1000 dilution), 또는 rabbit anti-GFAP (1:1000 dilution)을 하룻밤 반응시켰다. 2차 항체 biotinylated anti-rabbit 또는 anti-rat (1:200 dilution)을 사용하고, ABC 반응을 거쳐 DAB를 이용하여 3 분간 발색시켰다. 각 과정 사이에 PBS로 3 회 세척을 행하였다. 염색반응을 완료시킨 후 태아중뇌세포가 있는 커버슬라이드는 마운팅 용액을 이용해 덮어 건조 후 보관하였다. 뇌 조직은 gelatin coated slide에 마운팅 후 70-100 % 에탄올과 자일렌의 과정을 거치고 커버슬라이드로 조직을 덮어 보관하였다.

염색을 시행한 태아중뇌세포는 optical light microscope (Olympus Microscope System BX51; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 TOFE의 세포에 대한 영향을 관찰하였다. TH 양성 세포를 100 배율에서 세어서 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 뇌 조직의 흑질부는 TH 양성세포수를 100 배율에서 세어서 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 선조체는 40 배율에서 ImageJ software (Bethesda, MD, USA)를 사용하여 광학밀도 (optical density)를 측정하였으며, background를 제외한 결과 값을 사용하였다. 이미지는 optical light microscope를 이용해 촬영하였다. 또한 뇌 조직의 흑질부에서 Mac-1과 GFAP의 양성반응 정도를 관찰하였다.

### 3. 통계처리

모든 측정값은 mean  $\pm$  S.E.M으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 사용하였으며, one-way ANOVA를 이용하였으며, 사후검정은 Tukey test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

## 결 과

### 1. BV2 세포 및 뇌조직에서 TOFE의 LPS 독성에 대한 NO, iNOS, Cox-2 및 미세아교세포활성 억제 효과

TOFE의 LPS 독성에 대한 NO 생성 억제 효과 세포의 생존율에는 영향을 끼치지 않은 농도에서 측정된 결과 LPS군의 NO 생성율이 대조군 대비하여  $749.02 \pm 70.58$  %을 나타내어 NO를 유의하게 증가시켰으며 ( $p < 0.001$ ), TOFE 1-100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 대조군 대비하여 각각  $328.52 \pm 46.76 - 184.59 \pm 41.83$  %으로 통계적으로 유의하게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1A, B). 뿐만 아니라 iNOS와 Cox-2의 억제 효과를 확인하였다(Fig. 1C). 추가적으로, *i.c.v.*에 LPS를 주입하여 TOFE의 미세아교세포활성 억제 효과를 확인한 결과 LPS군의 활성화된 미세아교세포의 수는 대조군 대비하여  $74.59 \pm 6.59$  %을 나타내어 유의하게 증가되었으며 ( $p < 0.001$ ), TOFE 50 mg/kg 농도에서  $28.20 \pm 3.29$  %로 통계적으로 유의하게 미세아교세포 활성화를 억제시켰다(Fig. 1D).

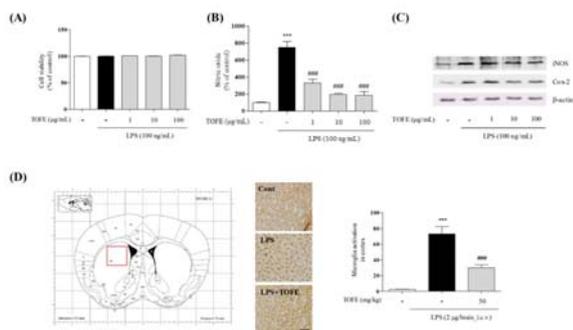


Fig. 1. Protective effects of TOFE on LPS-induced overproduction of NO in BV2 cells. The cells were treated with TOFE at 1-100  $\mu\text{g/mL}$  for 1 h and exposed to 100 ng/mL LPS for an additional 23 h. Cell viabilities are expressed as a percentage of the controls (A). NO was determined by colorimetric assay using Griess reagent (B). iNOS and Cox-2 levels (C) were assessed by Western blotting. Also, microglia activation (D) were measured by immunohistochemistry. Values are given as the mean  $\pm$  SEM.  $^{***} p < 0.001$  compared with the control group,  $^{###} p < 0.001$  compared with the LPS only treated group.

### 2. 태아중뇌세포에서 TOFE의 LPS 및 MPP<sup>+</sup> 독성에 대한 도파민 신경 보호 효과

TOFE의 LPS 독성에 대한 도파민 세포 보호 효과를 측정 한 결과 LPS군은 도파민 세포 수가 대조군 대비하여  $44.37$

$\pm 2.04$  %을 나타내어 도파민 세포의 수를 유의하게 감소시켰고( $p < 0.001$ ), TOFE과 LPS를 함께 처리한 결과 LPS의 세포독성에 대하여 TOFE 0.1 or 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 대조군 대비하여 각각  $60.40 \pm 6.52 - 69.06 \pm 4.85$  %으로 통계적으로 유의하게 도파민 세포를 증가시켰다(Fig. 2). 뿐만 아니라, TOFE의 MPP<sup>+</sup> 독성에 대한 도파민 세포 보호 효과를 측정 한 결과 MPP<sup>+</sup>군은 도파민 세포 수가 대조군 대비하여  $63.32 \pm 5.16$  %을 나타내어 도파민 세포의 수를 유의하게 감소시켰고 ( $p < 0.001$ ), TOFE과 MPP<sup>+</sup>를 함께 처리한 결과 MPP<sup>+</sup>의 세포독성에 대하여 TOFE 0.1 or 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 대조군 대비하여 각각  $78.65 \pm 6.13 - 89.42 \pm 3.15$  %으로 통계적으로 유의하게 도파민 세포를 증가시켰다(Fig. 2).

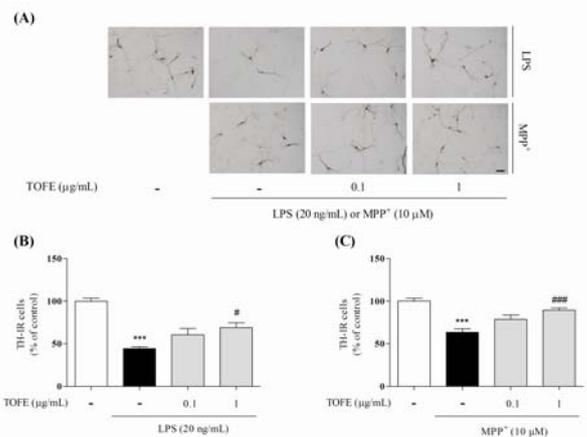


Fig. 2. Protective effects of TOFE on LPS or MPP<sup>+</sup>-induced neuronal damage in primary mesencephalic cell cultures. The cells were treated with TOFE at 0.1 and 1  $\mu\text{g/mL}$  for 1 h and exposed to 20 ng/mL LPS or 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for an additional 23 h. After fixation, cells were stained with anti-TH antibody and visualized with DAB. The number of TH-positive cells were measured (A and B). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . Values are given as the mean  $\pm$  SEM.  $^{***} p < 0.001$  compared with the control group,  $^{###} p < 0.001$ ,  $^{\#} p < 0.05$  compared with the LPS or MPP<sup>+</sup> only treated group.

### 3. MPTP 유발 파킨슨병 동물 모델에서 TOFE가 행동장애에 미치는 영향

TOFE의 MPTP 신경독성 유발 파킨슨병 동물 모델에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pole test와 rotarod test를 이용한 행동실험을 실시하였다. 또한, pole test 결과 MPTP군은 time to turn과 time for LA의 대조군 대비 독성투여 7 일째 날  $26.08 \pm 1.09$  and  $29.66 \pm 0.38$  초로 증가함으로써 서동이 야기됨을 알 수 있었다. TOFE를 50 mg/kg 투여한 경우  $14.96 \pm 2.79$  and  $22.85 \pm 1.31$  초로 통계적으로 유의한 행동장애 개선 효과를 보였다. Rotarod test 결과 독성 투여 7일째 날 MPTP군은  $3.21 \pm 0.98$  초로 회전속도를 건디는 운동능력이 감소한 반면, TOFE를 50 mg/kg 투여한 경우  $15.53 \pm 2.53$  초로 통계적으로 유의한 운동능력 개선 효과를 보였다(Fig 3).

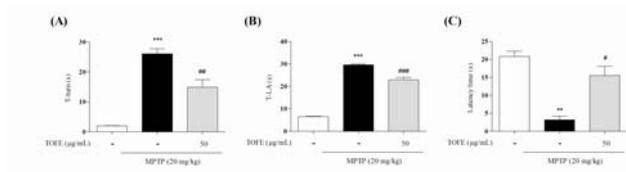


Fig. 3. Protective effect of TOFE on MPTP-induced behavioral impairment in a mouse Parkinson's disease model using the pole test and rotarod test. Mice were treated with TOFE 50 mg/kg for 3 days and with MPTP (four intraperitoneally injections of 20 mg/kg 2 h interval times) on the last day. Seven day of the last MPTP injection, we conducted the pole test and rotarod test. The time to turn completely down ward (A; time to turn) and to arrive at the floor (B; time for LA) were recorded. Also, the movement distances were recorded. Values are given as the mean  $\pm$  SEM.  $*** p < 0.001$ ,  $** p < 0.01$  compared with the control group,  $### p < 0.001$ ,  $## p < 0.01$ ,  $# p < 0.05$  compared with the MPTP only treated group.

#### 4. MPTP 유발 파킨슨병 동물 모델에서 TOFE가 도파민 세포 독성에 미치는 영향

TOFE가 C57BL/6 파킨슨병 모델의 도파민 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MPTP로 유도한 파킨슨병 모델 생쥐의 뇌를 적출하여 조직분석을 하였다. 도파민 세포 보호효과는 흑질 치밀부에서 TH 양성 세포 숫자를 세고, 선조체에서 광학밀도를 측정하여 확인하였다. TOFE를 투여한 경우 흑질 치밀부에서 TH 양성세포 수가 대조군 대비  $86.99 \pm 1.64\%$ 로, MPTP 투여로 인해  $64.18 \pm 3.30\%$ 로 감소한 TH 양성 세포 수를 유의적으로 증가시켜 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 선조체에서 TOFE 투여군의 광학밀도가 대조군 대비  $98.38 \pm 2.79\%$ 로서, MPTP 투여군  $78.05 \pm 2.79\%$ 에 비해 유의적으로 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이 결과로서 TOFE가 흑질 치밀부 및 선조체에서 우수한 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

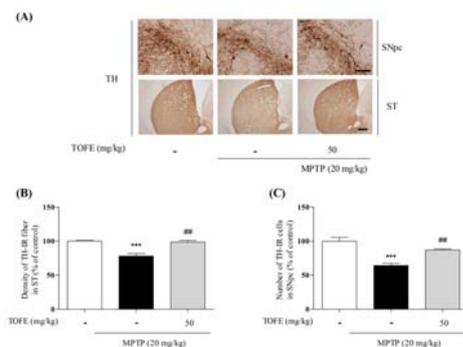


Fig. 4. Protective effect of TOFE on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage in a mouse Parkinson's disease model. Representative photomicrographs are shown (A). Quantification of the dopaminergic cells were performed and by measuring the optical density in the ST (B) and by counting the number of TH-immunoreactive (IR) cells in the SNpc (C). Scale bar = 200  $\mu$ m. Values are given as the mean  $\pm$  SEM.  $*** p < 0.001$  compared with the control group,  $### p < 0.01$  compared with the MPTP only treated group.

#### 5. MPTP 유발 파킨슨병 동물 모델에서 TOFE

#### 가 정상교세포 및 미세아교세포에 미치는 영향

TOFE가 파킨슨병 동물 모델의 도파민 세포가 밀집되어 있는 흑색질 주변 신경아교세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조직분석을 하였다. MPTP 투여군에서 정상교세포 및 미세아교세포가 활성화된 것을 확인할 수 있었으며, TOFE 투여에 의해 신경아교세포 활성화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 5).

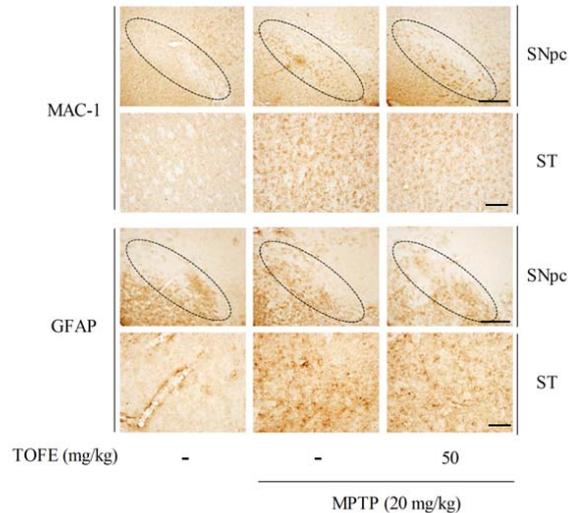


Fig. 5. Inhibitory effect of TOFE on MPTP-stimulated microglia activation in a mouse Parkinson's disease model. Representative photomicrographs are shown of the microglia using MAC-1 antibody and astrocyte using GFAP in SNpc and ST of each group. Scale bar = 200  $\mu$ m.

## 고찰

본 연구에서는 LPS 및 MPTP 신경독성에 대한 TOFE의 뇌염증 억제효과 및 항파킨슨병 효과를 알아보고자 하였다.

LPS는 그람음성균의 세포표면을 구성하는 물질로서 면역 조절 물질, 염증유발 물질 및 세포파괴 물질생산을 자극하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 이러한 LPS로부터 발생하는 NO는 작고 불안정하며 독성이 강한 자유 유리기로서, NO의 과량 생성으로 인한 산화적 스트레스는 신경아교세포(정상교세포 및 미세아교세포)를 활성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>13-14)</sup>. 신경아교세포는 뇌에 존재하는 대식세포이며 뇌 손상이나 감염에 대해 초기 반응을 나타내어 염증성 cytokine을 분비하여 생체를 보호하는 면역세포이다<sup>15)</sup>. 하지만 신경아교세포의 지나친 활성화는 만성염증을 유발하여 알츠하이머성 치매, 파킨슨병 등의 신경 퇴행성 뇌질환의 주요원인이 된다고 보고되었으며, 많은 연구에서 신경아교세포의 활성화를 감소시키는 것이 신경 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료에 이용하기 적절한 방법으로 평가된 바 있다<sup>15-16)</sup>. 본 실험에서는 미세아교세포에서 TOFE의 LPS에 대한 보호효과를 알아보기 위하여 NO, iNOS, Cox-2를 측정하였다. 그 결과 1-100  $\mu$ g/mL에서 농도 의존적으로 유의하게 NO가 감소되는 것을 확인 하였을 뿐만 아니라 iNOS, Cox-2 또한 억제되는 것을 확인하였다. 또한 LPS를 뇌에 주입한 마우스 실험을 통해 활성화된 미세아교세포가 TOFE에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하

였다.

또한 이러한 염증유발독성이 도파민세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 태아중뇌세포에서 TH로 면역조직화학을 한 후 도파민세포의 개수를 측정하였다. 도파민은 주로 중뇌의 흑질에서 합성되며, TH는 도파민생성의 속도제한효소로 도파민세포의 간접적 측정 척도로 사용된다. 태아중뇌세포에서 LPS로 유도한 독성에 대해 TOFE를 처리한 군은 0.1, 1 µg/mL 농도에서 LPS군에 대비하여 도파민 세포수를 통계적으로 유의하게 증가시킴으로 도파민 세포에 대한 보호효과를 확인하였다. 뿐만 아니라 파킨슨병 모델로 주로 사용하고 있는 도파민성 신경계 독성인 MPTP, MPP<sup>+</sup>에 대해서도 TOFE의 도파민 세포에 대한 보호효과를 확인하였다.

다음으로는 TOFE의 MPTP로 유도한 파킨슨병 마우스 모델에서 행동에 미치는 영향을 살펴보았다. TOFE가 파킨슨병과 관련된 운동기능의 이상에 나타내는 효과를 조사하기 위해 행동실험 (pole test와 rotarod test)을 실시하였다. Pole test와 rotarod test는 파킨슨병의 행동학적 특징으로 나타나는 근육조절 불능 및 밸런스 조절 불능을 간접적으로 판단할 수 있는 행동실험으로 알려져 있다<sup>17-18)</sup>. MPTP 투여군에서 time to turn과 time for LA의 증가를 확인함으로써 bradykinesia가 야기됨을 알 수 있었으며, TOFE를 50 mg/kg 투여한 경우 MPTP 투여군에 비해 bradykinesia를 회복시킴을 확인할 수 있었다. 다음으로는 조직학적 분석을 통해 TOFE가 흑질-선조체의 도파민세포에 미치는 영향을 확인하였다. 흑질에서 투사되는 도파민성 신경말단이 분포하는 선조체는 근육의 긴장을 조절하여 운동을 원활하게 하는데 관여하는데, 파킨슨병의 운동장애인 안정 시의 진전, 서동, 근경직의 증가 등은 흑질의 도파민 세포의 소실로 인한 선조체의 도파민 결핍으로 인해 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>17-18)</sup>. TH 항체를 이용한 면역조직화학과 조직분석 결과, TOFE의 투여가 흑질에서 MPTP 투여로 인해 감소한 TH 양성 도파민 세포의 손상을 억제해주었을 뿐만 아니라 선조체의 신경세포 손상을 줄여주는 것을 확인하였다. 이로 인해 TOFE가 흑질의 도파민 세포의 보호활성을 통해 흑질-선조체 도파민성 신경계의 손상을 효과적으로 보호함으로써 파킨슨병 모델의 행동실험에서 서동을 회복시킴을 확인할 수 있었다. 추가적으로 MPTP 투여 시 흑질 및 선조체의 염증관련세포인 미세아교세포 및 성상교세포의 활성화가 증가한다고 알려져 있으며, 이는 세포사멸로 이어진다고 알려져 있다<sup>15-16)</sup>. 따라서, 기존의 많은 연구들에서 신경염증반응을 억제하는 방법으로 항파킨슨 효과를 증명하고 있다<sup>15)</sup>. 본 연구에서도 면역조직화학을 통해 TOFE의 미세아교세포 및 성상교세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. 실험 결과 TOFE의 투여가 흑질 및 선조체에서 MPTP 투여로 인해 증가한 미세아교세포 및 성상교세포의 활성을 억제하였다.

본 연구에서는 TOFE를 이용하여 태아중뇌세포에서 LPS 및 MPP<sup>+</sup>에 대한 세포 보호 효과를 확인하였으며, 동물모델에서 면역조직화학을 통해 흑색질 주변 신경아교세포 및 소교세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. TOFE 전처리에 의해 NO의 과생성이 유의성 있게 억제되었을 뿐만 아니라 iNOS, Cox-2, 활성화된 미세아교세포가 억제되었다. 또한 MPTP 동물모델에서 도파민세포 또한 유의성 있게 보호되었으며, 뇌의 염증과 관련이 있는 미세아교세포 및 성상교세포

의 활성화가 억제되는 것을 통해 TOFE의 항염증효과를 증명하였으며, 이를 통해 행동장애가 개선된 것을 확인하였다. 이전의 본 연구진의 실험 결과 TOFE의 ROS와 라디칼 소거능을 통한 항세포사멸효과를 밝힌 바 있으며, 1.12 ± 0.05%의 pinusolide가 함유되어있음을 확인하였다<sup>8)</sup>. 또한 보고에 따르면 pinusolide의 유도체를 가진 성분이 미세아교세포에서 MAPK and NF-κB를 통해 항염증효과를 가진다는 연구가 보고된 바 있다<sup>18)</sup>. 뿐만 아니라 측백엽의 pinusolide 성분의 glutamate 신경독성에 대한 신경보호효과가 보고되었다<sup>19-20)</sup>. 따라서 많은 연구들을 통해서 TOFE의 pinusolide 성분은 항염증효과로 기인한 도파민 세포의 보호효과를 지니므로 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료 약물 후보가 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

본 연구에서는 측백엽추출물(TOFE)의 태아중뇌 도파민 세포 및 동물 모델에서 LPS/MPP<sup>+</sup>/MPTP 신경독성에 대한 도파민 세포 보호 효과 및 신경염증 억제 효과에 대한 연구를 수행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TOFE는 미세아교세포주에서 LPS 신경독성에 의해 유리된 NO 생성을 억제하였을 뿐만 아니라 iNOS, Cox-2의 억제를 보였다. 또한 TOFE는 동물모델에서 신경독성에 의해 활성화된 미세아교세포를 억제하였다.
2. TOFE는 태아중뇌 배양 세포 모델에서 LPS/MPP<sup>+</sup> 신경독성에 의한 도파민 세포 손상으로부터 보호 효과를 보였다. 또한 TOFE 투여는 동물 모델에서 MPTP 신경독성에 의한 흑질과 선조체의 도파민 세포 수와 신경말단 손상을 보호하였다.
3. TOFE 투여는 동물모델에서 MPTP로 유도한 파킨슨병 유사 행동장애의 회복을 보였다. 뿐만 아니라 흑질 및 선조체의 부위의 MPTP로 유도된 신경아교증을 억제하는 것이 관찰되었다.

이상의 결과에서 측백엽은 LPS 및 MPTP 신경독성에 의한 항염증 효과로 인해 파킨슨병의 주요 병태생리인 흑질의 도파민 세포의 손상으로부터 신경세포를 보호함으로써 서동 등의 운동장애를 억제하는 효과가 있음을 확인하였으며, 파킨슨병을 포함한 염증성 퇴행성 뇌질환의 치료약물소재로 이용될 수 있는 가능성을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원 "IPET(112105-02-1-HD040)"에 의해 이루어진 것임

## References

1. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013 ; 3 : 461-91.
2. Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA. What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog Brain Res*. 2010 ; 183 : 59-77.
3. Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA. The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal*. 2011 ; 14 : 1289-301.
4. Pogarell O, Gasser T, van Hilten JJ, Spieker S, Pollentier S, Meier D, Oertel WH. Pramipexole in patients with Parkinson's disease and marked drug resistant tremor: a randomised, double blind, placebo controlled multicentre study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 ; 72 : 713-20.
5. Oh H, Hur J, Park G, Kim HG, Kim YO, Oh MS. *Sanguisorbae radix* protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by regulating NADPH oxidase and NF-E2-related factor-2/heme oxygenase-1 expressions. *Phytother Res*. 2013 ; 27 : 1012-7.
6. 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 ; 148 : 322-8.
7. Pharmacology of Oriental Herbs textbook compilation committee. *Pharmacology of Oriental Herbs*. 8th rev. ed, Seoul : Shinilbooks, 2010 : 657-9.
8. Ju MS, Lee P, Kim HG, Lee KY, Hur J, Cho SH, Sung SH, Oh MS. Protective effects of standardized *Thuja orientalis* leaves against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Toxicol In Vitro*. 2010 ; 24 : 759-65.
9. Jung SH, Kim BJ, Lee EH, Osborne NN. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochem Int*. 2010 ; 57 : 713-21.
10. Kim JY, Kim HJ, Kim SM, Park KR, Jang HJ, Lee EH, Jung SH, Ahn KS. Methylene chloride fraction of the leaves of *Thuja orientalis* inhibits *in vitro* inflammatory biomarkers by blocking NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling and protects mice from lethal endotoxemia. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 27 : 687-95.
11. Lee YJ, Hwang SM, Yoon JJ, Lee SM, Kyung EH, Kim JS, Kang DG, Lee HS. Inhibitory effect of *Thuja orientalis* on TNF- $\alpha$ -induced vascular inflammation. *Phytother Res*. 2010 ; 24 : 1489-95.
12. Lee JY, Park SW. Isolation and Purification of Tyrosinase Inhibitors from the Seeds of *Thuja orientalis* L. *Korean J Food Preserv*. 2000 ; 7 : 409-13.
13. Wu CH, Chen TL, Chen TG, Ho WP, Chiu WT, Chen RM. Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J Trauma*. 2003 ; 55 : 540-5.
14. Mouton PR, Kelley-Bell B, Tweedie D, Spangler EL, Perez E, Carlson OD, Short RG, deCabo R, Chang J, Ingram DK, Li Y, Greig NH. The effects of age and lipopolysaccharide (LPS)-mediated peripheral inflammation on numbers of central catecholaminergic neurons. *Neurobiol Aging*. 2012 ; 33 : 423.e27-36.
15. Li XZ, Bai LM, Yang YP, Luo WF, Hu WD, Chen JP, Mao CJ, Liu CF. Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neurosci Res*. 2009 ; 65 : 252-8.
16. Park G, Kim HG, Ju MS, Ha SK, Park Y, Kim SY, Oh MS. 6-Shogaol, an active compound of ginger, protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via anti-neuroinflammation. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 ; 34 : 1131-9.
17. Kim HG, Park G, Piao Y, Kang MS, Pak YK, Hong SP, Oh MS. Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Food Chem Toxicol*. 2014 ; 65 : 293-300.
18. Koo KA, Kim SH, Lee MK, Kim YC. 15-Methoxypinusolidic acid from *Biota orientalis* attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. *Toxicol In Vitro*. 2006 ; 20 : 936-41.
19. Choi Y, Moon A, Kim YC. A pinusolide derivative, 15-methoxypinusolidic acid from *Biota orientalis* inhibits inducible nitric oxide synthase in microglial cells: implication for a potential anti-inflammatory effect. *Int Immunopharmacol*. 2008 ; 8 : 548-55.
20. Koo KA, Sung SH, Kim YC. A new neuroprotective pinusolide derivative from the leaves of *Biota orientalis*. *Chem Pharm Bull*. 2002 ; 50 : 834-6.