



Original Article / 원저

파킨슨병의 세포모델에서 진뇌산(鎭腦散)의 보호효과

한상태¹, 정지천^{2*}

¹(브레인)동의보감한의원, ²동국대학교 한의과대학 내과학교실

Protective effects of *Jinnoe-san*, a novel herbal formula in experimental *in vitro* models of Parkinson's disease

Sangtae Han¹, Ji Cheon Jeong^{2*}

¹(Brain) Donguibogam Korean Medicine, ²Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Jinnoe-san (JNS) is a novel herbal formula consisting of five oriental medicinal herbs including *Polygalae Radix*, *Prunellae Spica*, *Perillae Herba*, *Betulae Cortex*, and *Lonicerae Flos*. In this study, we investigated the effects and molecular mechanism of JNS on Parkinson's disease *in vitro* model.

Methods : The effects of JNS on 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced cell death in SH-SY5Y cells were evaluated with a cell viability assay, flow cytometry, and western blots analysis. The effects of JNS on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglia were determined with a nitric oxide (NO) assay, enzyme linked immunosorbent assays, and western blots analysis.

Result : MPP⁺-induced cell death in SH-SY5Y cells was significantly reduced by JNS pre-treatment in a dose-dependent manner. JNS inhibited the production of reactive oxygen species, mitochondria dysfunction, and apoptosis induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells. Furthermore, JNS significantly activated Akt and ERK in SH-SY5Y cells and the ability of JNS to prevent mitochondria dysfunction by MPP⁺ was antagonized by pre-treatment of LY294002 and PD98059, an Akt and ERK inhibitor, respectively. In addition, JNS inhibited LPS-induced NO and PGE₂ production as well as iNOS expression and secretion of TNF- α , pro-inflammatory cytokines without affecting the cell viability. JNS also suppressed LPS-induced ERK activation.

Conclusions : These results demonstrate that JNS has a protective effect on the dopaminergic neurons against MPP⁺-induced neurotoxicity and anti-inflammatory effect on the LPS-stimulated microglia. These findings provide

evidences for JNS to be considered as a new prescription for treating Parkinson's disease.

Key words : Parkinson's disease, Jinnoe-san, apoptosis, dopaminergic neurons, microglia, anti-inflammation

I. 서론

파킨슨병(Parkinson's disease)은 중뇌의 흑색질(substantia nigra) 부위에 존재하는 도파민 신경세포(dopaminergic neurons)가 점점 사멸해가면서 도파민이라는 신경전달물질이 감소하여 발생하며, 주로 진전(震顫, 떨림), 근육의 강직(剛直) 그리고 서동(徐動, 몸동작의 느려짐) 등의 운동장애가 나타나는 주요한 신경퇴행성질환중 하나이다^{1,2)}. 주로 40대 이후에 발생하며, 연령이 증가할수록 발병률이 높아지는 경향을 보이므로 평균수명이 길어질수록 환자 수가 점차 증가하는 추세이다³⁾.

파킨슨병의 발병 원인은 명확히 밝혀지지 않았지만, 유전적 요인, 환경적 요인, 각종 독성 물질, 단백질 기능의 이상, 노화 등으로 추정하고 있으며, 최근 많은 연구들에 의하여 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 증가로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress), 신경 염증(neuroinflammation), 및 미토콘드리아 기능장애(mitochondrial dysfunction) 등이 중요한 요인으로 알려졌다⁴⁾. 치료제로 레보도파 제제, 도파민 효능제, 항콜린성 약물, 콤프(COMT) 효소 억제제, 마오비(MAO-B) 효소 억제제, 아만타딘(amantadine) 등이 있으나, 낮은 치료효과와 장기 투여시 발생할 수 있는 내성 및 부작용으로 치료에 제한점이 많은 실정이다. 따라서, 표준치료법과 병행하여 신경독성 보호 작용의 보조약물 치료제의 개발에 대한 필요성이 대두되면서, 최근 전통의학 및 보완대체요법에서 이를 보완하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다⁵⁾.

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)은 도파민 신경세포를 선택적으로 파괴하여 심한 파킨슨증후군을 일으키므로 파킨슨병에 대한 실험 연구에 많이 사용된다⁶⁾. MPTP 자체는 독성이 없으나, 지질친화물질로 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier)

을 통과하여 뇌로 들어가 별아교세포(정상세포, astrocyte)에서 미토콘드리아의 모노아민산화효소B(monoamine oxidase-B)에 의해 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)으로 대사되어 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아내막의 complex I 기능 감소로 인하여 독성을 나타내므로 신경세포에 MPP⁺를 사용하면 인위적으로 파킨슨병과 유사한 상태를 유도할 수 있다⁷⁻¹¹⁾. 한편, 미세아교세포(microglia)는 신경아교세포(neuroglial cells)의 일종으로 중추신경계(central nervous system, CNS)의 대식세포(macrophage)로서 뇌에서 기본적인 면역방어체계의 역할을 수행하며, 중추신경계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹³⁾. Lipopolysaccharide (LPS)와 같은 내독소는 미세아교세포를 과다하게 활성화시켜 신경독소, 염증매개인자 및 염증성 사이토카인들의 분비가 증가하고, 결과적으로 파킨슨병이나 알츠하이머병 같은 신경퇴행성질환의 원인이 되기도 한다¹³⁻¹⁵⁾. 따라서 미세아교세포의 과도한 활성화의 억제는 파킨슨병의 예방과 치료를 위한 후보약물들의 중요한 표적(target)이 될 수 있다.

저자는 임상에서 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료 목적으로 사용 중인 한약재 중에 원지(遠志, Polygalae Radix), 하교초(夏枯草, Prunellae Spica), 자소엽(紫蘇葉, Perillae Herba), 화피(樺皮, Betulae Cortex), 금은화(金銀花, Lonicerae Flos) 등이 신경계에 작용하여 신경세포 손상으로부터 보호 효과를 나타낼 것으로 예상되어 새로운 처방을 구성하였다. 본 연구에서는 새 처방을 진뇌산(鎭腦散, Jinnoe-san, JNS)이라 명명하고, MPP⁺에 의해 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포와 LPS에 의해 염증반응이 유도된 BV2 생쥐 미세아교세포에서 신경독성 보호효능과 항염 효능을 각각 평가하고, 그 기전을 연구함으로써 파킨슨병의 예방, 개선 및 치료 후보제로서의 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

* Corresponding author : Ji-Cheon Jeong, Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.
Tel : +82-31-961-9001, E-mail: kyjic1931@daum.net

• Received : October 27, 2017 / Revised : November 10, 2017 / Accepted : November 10, 2017

II. 재료 및 방법

1. 시약

Anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-caspase-3 및 anti-Bcl2 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, anti-COX-2, anti-iNOS, anti-β-actin 항체, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 LPS (E.coli 055:B5), Griess reagent, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), MPP⁺, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), rhodamine123 (Rh123) 등 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 진뇌산 물추출물의 제조

본 연구에 사용된 遠志(Polygalae Radix), 夏枯草(Prunellae Spica), 紫蘇葉(Perillae Herba), 樺皮(Betulae Cortex), 金銀花(Lonicerae Flos)는 (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 선별하고 정선한 후 사용하였고, 처방의 구성 비율은 다음과 같다 (Table 1). 진뇌산의 약재 무게의 8배에 해당하는 증류수를 가하여 열탕 추출기(100℃)에서 4시간 동안 추출한 후, 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 두 번 여과하고, 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하고, 동결건조기(freeze dryer, EYELA)로 동결건조하여 분말화하였다. 추출물의 수율은 14.3%였으며, 분말을 멸균 증류수에 100 mg/ml의 농도로 녹이고, Minisart® Syringe filter (0.22 μm, Sartorius AG, Weender Landstr. Germany)로 여과 후, 실험에 따라 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Jinnoe-san.

Herbal Name	Latin Name	Scientific name (Family name)	Ratio	Dosage (g)
遠志	Polygalae Radix	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow (Polygalaceae)	8	23
夏枯草	Prunellae Spica	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi (Leguminosae)	8	23
紫蘇葉	Perillae Herba	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> Kudo (Labiatae)	7	20
樺皮	Betulae Cortex	<i>Betula platyphylla</i> Suk. var. <i>japonica</i> Hara (Betulaceae)	7	20
金銀花	Lonicerae Flos	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg (Caprifoliaceae)	6	17
Total amount				103

2. 세포 배양

실험에 사용된 인간 신경세포주인 SH-SY5Y 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 생쥐 신경소교세포주인 BV2 세포는 전남대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 사용하였으며, 세포의 배양을 위해 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, WELGENE, Daegu, Korea) 및 1%의 penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WELGENE) 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3. 세포 생존율 측정

진뇌산 추출물 처리가 세포생존율에 미치는 영향과 MPP⁺ 처리에 따른 세포 손상 보호효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 이를 위하여 세포 배양용 96 well plate에 해당 세포를 6×10³ cells/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 다양한 농도의 진뇌산 추출물을 1시간 전처리한 후 MPP⁺ 1 mM을 처리하였다. 24시간 배양 후, MTT 시약을 최종 농도 0.2 mg/ml로 처리하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 다음 배지를 제거하고 DMSO 100 μl를 첨가하여 각 well에 생성된 formazan crystals을 모두 녹인 후, GENios-basic microplate reader (Tecan

Austria GmbH, Grödig, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP) 측정

MPP⁺ 처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 미토콘드리아 기능 손상 및 진뇌산 추출물의 효과를 평가하기 위하여 MMP 값 변화 정도를 측정하고자 준비된 세포들에 막투과성 양이온 형광 dye인 Rh123을 0.05 µg/ml로 처리하여 30분 동안 염색하였다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 trypsin으로 세포를 회수한 후, 1% FBS가 함유된 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)에 적용시켜 MMP의 변화를 측정하였다.

5. ROS 측정

세포 내 ROS 생성 변화를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 1 mM의 MPP⁺를 단독으로 처리하거나, 100 µg/ml의 진뇌산 추출물을 1시간 전처리 후 MPP⁺를 재처리하였다. 30분후, 세포들을 모아 H₂DCF-DA 5 µM로 20분간 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음, CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter)에 적용시켜 ROS 값의 변화를 분석하였다.

6. NO 측정

BV2 세포에 진뇌산 추출물을 50~500 µg/ml 농도로 1시간동안 처리한 후, LPS 500 ng/ml를 처리하거나 무처리하여 18시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리하여 상층액 100 µl씩 취한 것에, Griess 용액(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 동량을 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시킨 후, GENios-basic microplate reader (Tecan Austria GmbH)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 효소면역측정법(Enzyme Linked Immunosorbent assay, ELISA)

BV2 세포에 진뇌산 추출물을 50~500 µg/ml 농도로 1시간동안 처리한 후, LPS 500 ng/ml를 처리하거나 무처리하여 18시간 배양하였다. 이후 배양 배

지를 원심분리하여 상층액 100 µl씩 취한 다음, PGE₂ parameter assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)와 TNF-α ELISA kits (Ab Frontier, Seoul, Korea)를 이용하여 PGE₂와 TNF-α의 양을 측정하였다.

8. 단백질의 분리, 전기영동 및 western blot analysis

단백질 발현 검출을 위하여 준비된 세포에 적당량의 RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 첨가하여 초음파 파쇄기(Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)로 세포를 균질화시킨 후, 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 단백질의 농도는 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific)를 이용하여 정량한 다음, Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 혼합하여, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전이시킨 다음, 5% skim milk를 1시간 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. PARP, caspase-3, Bcl2, iNOS, COX-2, ERK, JNK, p38에 대한 1차 항체들을 4°C에서 over night 반응시키고, PBST (PBS with Tween 20)로 3회 세척한 후, 뒤이어 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 다음 PBST로 3회 세척 후, 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

9. 통계분석

실험 결과들은 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈으며, 유의성을 검정하기 위하여 일원분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)을 실시한 후 p < 0.05 수준에서 Tukey's multiple comparison test를 실시하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. SH-SY5Y 세포의 생존율에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

SH-SY5Y에서 세포보호 효능 연구를 위해, 먼저 진뇌산 추출물의 농도 범위를 설정하고자 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정해 보았다. Figure 1에서 나타내는 바와 같이, 진뇌산 추출물을 0~500 µg/ml의 농도로 처리하였을 때, SH-SY5Y 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

Figure 1. Effects of JNS extract on SH-SY5Y cell viability. Cells were treated with various concentrations of JNS extract (10, 50, 100, 300, or 500 µg/ml) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Values were expressed as percentages of the non-treated control.

2. SH-SY5Y 세포에서 진뇌산 추출물의 MPP⁺ 매개 신경독성 보호효과

MPP⁺ 1 mM로 유도된 세포독성으로부터 진뇌산 추출물의 신경세포 보호 효과를 나타내는 농도를 결정하기 위하여 진뇌산 추출물을 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 1시간 동안 전처리하고, 1 mM의 MPP⁺를 처리하여 24시간 후 MTT 분석법으로 확인하였다. 측정

한 결과 1 mM의 MPP⁺를 처리한 대조군과 비교하였을 때, 진뇌산 추출물의 전처리 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하는 것을 알 수 있었다(Figure 2).

Figure 2. Effects of JNS extract against MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with JNS (10, 50, 100 µg/ml) in the absence or presence of 1 mM MPP⁺ for 24 h. The cell viability was measured using an MTT assay. (Significant vs. control, ###p < 0.001; significant vs. MPP⁺ treatment, **p < 0.01 and ***p < 0.001)

3. SH-SY5Y 세포에서 MPP⁺로 유도된 ROS 생성 및 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

진뇌산 추출물의 신경세포 보호효과가 산화적 스트레스 억제에 의한 것인지 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에서 활성산소의 생성 정도를 DCFH가 활성산소에 의해 산화되어 형광을 띄는 DCF로 전환되는 원리를 이용하여 flow cytometry로 측정하였다. 그 결과, 1 mM의 MPP⁺ 처리는 ROS의 생성이 현저히 증가된 반면, 진뇌산 100 µg/ml을 전처리한 경우는 MPP⁺로 유도되는 ROS 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 3).

Figure 3. Effect of JNS extract on MPP⁺-induced ROS generation in SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 100 µg/ml JNS for 1 h and then stimulated with or without 1 mM MPP⁺ for 24 h. After staining with 5 µM H₂DCF-DA, ROS production was monitored by measuring intensity of DCF fluorescence in cells using a flow cytometer. (Significant vs. control, ###p < 0.001; significant vs. MPP⁺ treatment, ***p < 0.001)

다음으로 진뇌산 추출물의 신경세포 보호효과가 산화적 스트레스로 인한 미토콘드리아 기능 손상의 방어와 연관이 있는지 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에서 미토콘드리아의 막전위 변화를 flow cytometry로 측정하였다. 그 결과, 1 mM의 MPP⁺ 처리군은 control군에 비해 형광의 강도가 현저하게 감소하여 미토콘드

리아의 기능이 손상된 세포가 38.93%로 관찰되었으나, 진뇌산(100 µg/ml) 전처리군은 16.5%를 나타내며 MPP⁺ 처리군에 비해 형광의 강도가 통계학적으로 유의하게 증가하였다(Figure 4). 이는 진뇌산 추출물이 MPP⁺로 인한 미토콘드리아 기능 손상으로부터 SH-SY5Y 세포를 보호한다는 것을 나타낸다.

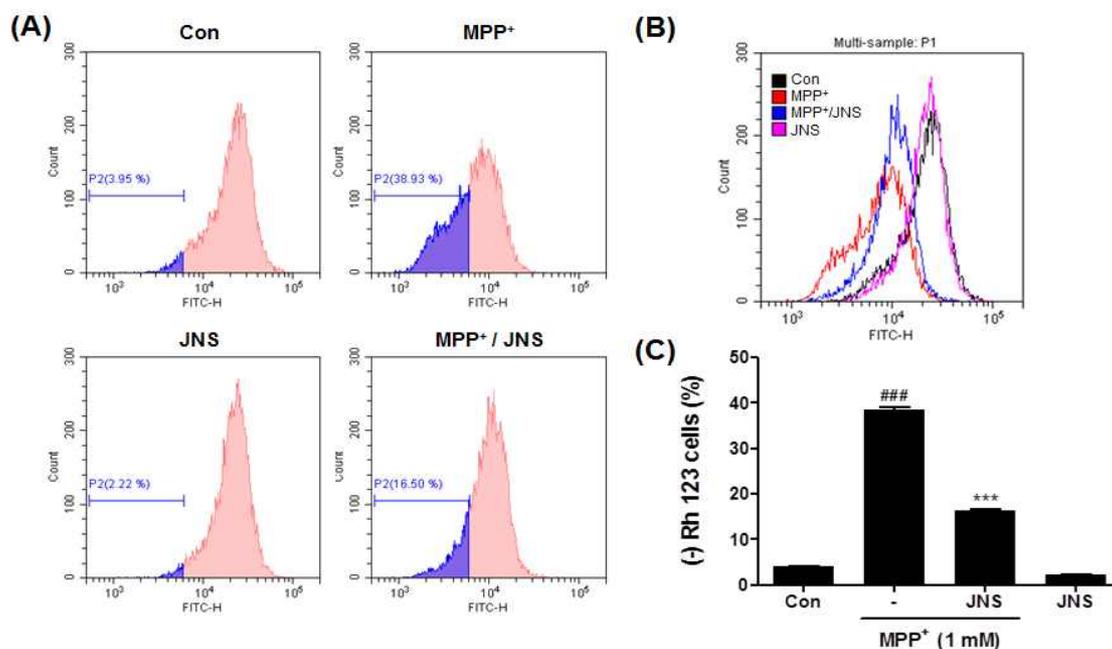


Figure 4. Effect of JNS extract on the MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 100 µg/ml JNS for 1 h and then stimulated with or without 1 mM MPP⁺ for 24 h. After staining with Rh123, cells were subjected on flow cytometer. (Significant vs. control, ###p < 0.001; significant vs. MPP⁺ treatment, ***p < 0.001)

4. SH-SY5Y 세포에서 MPP⁺로 유도된 apoptosis에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

SH-SY5Y 세포에 MPP⁺를 처리하였을 때, 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아내막의 complex I 기능 감소로 인하여 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다⁷⁻¹¹). 따라서 진뇌산 (100 µg/ml)의 전처리가 MPP⁺로 유발된 apoptosis를 억제하는지 apoptosis와 연관된 단백질인 PARP, caspase-3 및 Bcl2를 western blot을 통해 확인하였다. Control군과 비교하였을 때

MPP⁺를 처리한 경우, PARP와 caspase-3의 proform band가 현저히 줄어들었고, Bcl2 band 역시 희미해진 것으로 보아 apoptosis가 진행된 것을 알 수 있었다(Figure 5). 반면 진뇌산 100 µg/ml 전처리 후 MPP⁺를 처리하였을 때, PARP, caspase-3 및 Bcl2 모두 발현이 감소되지 않고 control군과 유사하게 강한 발현을 보였다(Figure 5). 따라서, 진뇌산 추출물의 전처리는 MPP⁺로 유발된 apoptosis로부터 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다.

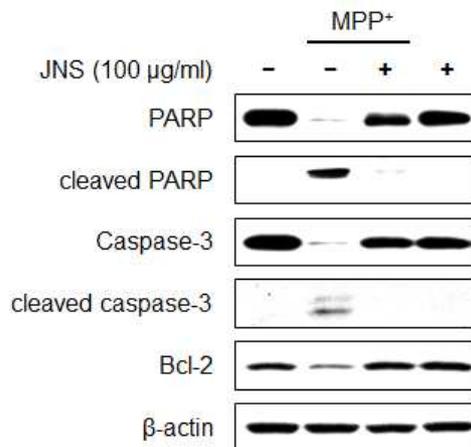


Figure 5. Effect of JNS on apoptosis in SH-SY5Y cells. The expression of apoptosis-related proteins was assayed by western blot in cells treated with 100 µg/ml JNS in the absence or presence of 1mM MPP⁺ for 24 h.

5. SH-SY5Y 세포에서 Akt와 ERK 세포신호전달 경로에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

진뇌산 추출물의 신경독성 보호 효과 기전을 살펴보기 위하여 세포 생존과 관련된 신호전달경로인 Akt와 ERK 신호경로를 western blot을 통하여 확인해보았다. SH-SY5Y 세포에 100 µg/ml 진뇌산을 10분에서 12시간까지 시간에 따라 처리해본 결과, 진뇌산 추출물은 Akt의 인산화가 10분부터 유도되어 1시간째 최고의 발현량에 달한 뒤, 서서히 감소하며 12시간까지 인산화가 강하게 유지되는 것을 확인하였다(Figure 6A). ERK의 인산화 역시 진뇌산 추출물의 처리에 의해 10분부터 유도되어 30분에서 3시간까지 강하게 유지되다가 6시간 후부터 서서히 감소하였다(Figure 6A). 다음으로 SH-SY5Y cell에 100 µg/ml 진뇌산을 전처리한 후, MPP⁺가 있거나 없는 상태에

서 인산화된 형태의 Akt 발현양상을 살펴보았다. Figure 6B에서 보여주는 바와 같이, 1 mM의 MPP⁺를 처리 시, Akt의 인산화는 현저하게 감소하였고, 진뇌산의 전처리는 MPP⁺로 인한 Akt 인산화의 감소를 억제하였다. 진뇌산 추출물 처리에 의한 Akt와 ERK 활성화가 MPP⁺로 인한 미토콘드리아 기능의 손상을 보호하는데 직접적으로 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Akt 억제제인 LY294002와 ERK 억제제인 PD98059를 전처리한 후, 미토콘드리아 막전위 변화를 관찰하였다. 그 결과, LY294002와 PD98059 각각의 전처리는 MPP⁺로 인한 미토콘드리아의 기능 손상을 억제하였던 진뇌산 추출물의 보호효능을 거의 완벽하게 막는 것을 확인하였다(Figure 6C). 이를 통하여 진뇌산의 신경세포 보호 효능에 Akt와 ERK의 활성화가 직접적으로 관여한다는 것을 알 수 있었다.

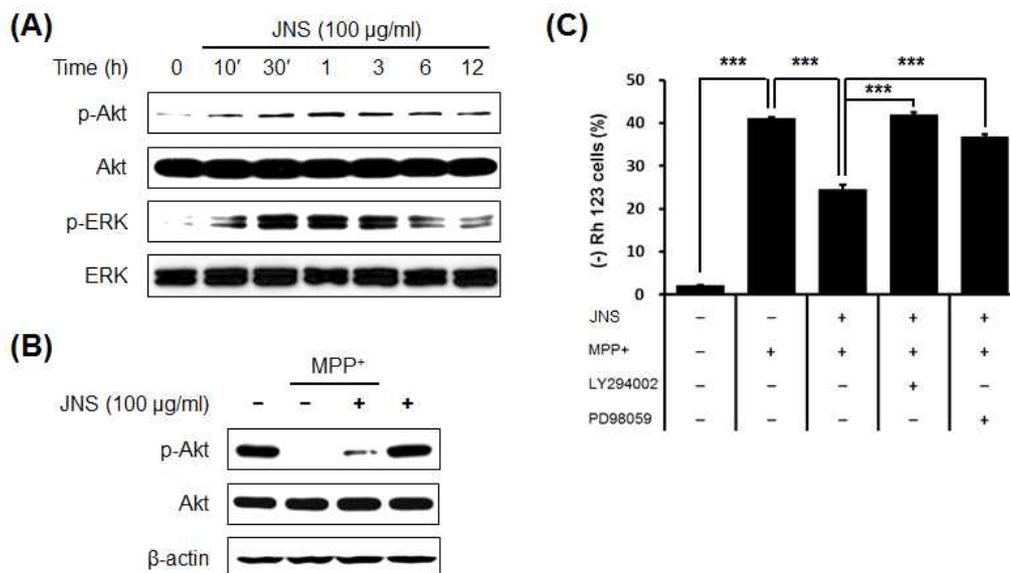


Figure 6. Effect of JNS on the Akt and ERK signaling in SH-SY5Y cells. (A) The expressions of Akt were assessed by western blotting in SH-SY5Y cells pretreated with 100 µg/ml JNS for 1 h and then treated with 1mM MPP⁺ for 24 h. (B) Akt and ERK activation by JNS. SH-SY5Y cells were treated with 100 µg/ml JNS for the indicated times. The protein levels of Akt and ERK and their phosphorylated forms were analyzed by western blot. (C) Role of Akt and ERK activation by JNS in mitochondrial function. After LY294002 and PD98059 pretreatment (10 µM, 1 h), cells were incubated with JNS for 1 h, and then treated with 1mM MPP⁺ for 24 h. (***)p < 0.001)

6. BV2 생쥐 미세아교세포 생존율에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

진뇌산 추출물이 BV2 생쥐 미세아교세포의 증식에 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 진뇌산 추출물을 0~500 µg/ml 농도의 범위로 처리하였을

때, BV2 생쥐 미세아교세포의 세포 생존율에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7). 따라서, 향후 실험에서는 진뇌산 추출물의 처리를 최고 500 µg/ml 농도까지 처리하는 것으로 실험을 진행하였다.

Figure 7. Effects of JNS extract on BV2 microglia viability. Cells were treated with various concentrations of JNS (50, 100, 300, or 500 µg/ml) for 24 h. Cell viability was determined by an MTT assay. Values were expressed as percentages of the non-treated control.

7. BV2 생쥐 미세아교세포에서 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

미세아교세포에서 진뇌산 추출물의 항염증 효능을 평가하기 위해, 먼저 LPS에 의해 유도되는 염증 매개 물질인 NO의 생성과 iNOS 단백질의 발현 증가에 영향을 미치는지 알아보았다. BV2 세포에 LPS의 처리는 NO의 생성을 현저히 증가시켰으나, 진뇌산의 전처리는 300 및 500 µg/ml의 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제시켰다(Figure 8A). NO의 생성을 유도하는 iNOS 단백질 역시 NO 생성 억제 양상과 유사하게, LPS 처리에 의해 iNOS의 발현이 증가되었으

나, 300 및 500 µg/ml 진뇌산 전처리에 의해 발현량이 억제되었다(Figure 8B). 대표적인 염증성 매개인자로 잘 알려져 염증 반응에서 발열 및 통증의 매개체로 작용하는 PGE₂의 합성에 관여하는 COX-2 단백질의 발현 또한 분석해 본 결과, 진뇌산 추출물의 전처리가 LPS로 유도된 COX-2 단백질의 발현 증가 양상에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Figure 8B). 따라서, 진뇌산 추출물은 LPS로 활성화된 microglia에서 iNOS 단백질의 발현 억제를 통하여 염증 반응에 중요한 매개체로 작용하는 NO의 생성을 효과적으로 차단하는 것을 확인하였다.

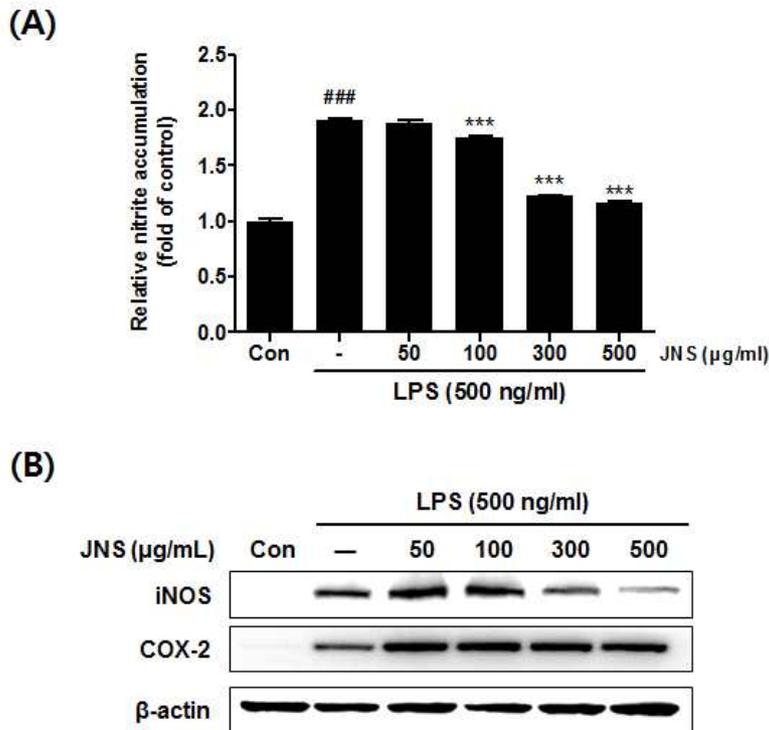


Figure 8. Effect of JNS extract on NO production and expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated BV2 microglia. BV2 cells were pretreated with JNS (50, 100, 300, or 500 µg/ml) for 1 h and then treated with LPS (500 ng/ml) for 18 h. (A) The NO production were measured using Griess reagents. (B) The expression of iNOS and COX-2 were assessed by western blotting. (Significant vs. control, ###p < 0.001; significant vs. LPS treatment, **p < 0.01 and ***p < 0.001)

8. BV2 생쥐 미세아교세포에서 PGE₂ 생성과 TNF-α 분비에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

진뇌산 추출물이 LPS로 자극된 BV2 세포로부터 생성되는 또 다른 염증매개 물질인 PGE₂와 염증성 사이토카인인 TNF-α에 영향을 미치는지 알아보기

위해 각각의 ELISA kit를 이용하여 분비량을 측정하였다. LPS 처리는 BV2 세포가 배양액 속으로 분비한 PGE₂의 양이 현저히 증가된 반면, 진뇌산 추출물을 100, 300 또는 500 µg/ml 농도로 전처리시, 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 현저하게 억제되었다

(Figure 9A). LPS에 의해 활성화된 BV2 세포는 TNF- α 의 분비량 역시 현저히 증가시켰으나, 진뇌산 추출물의 전처리는 최저농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터도

통계학적으로 유의하게 TNF- α 의 분비를 억제하기 시작하여 500 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적으로 감소시켰다(Figure 9B).

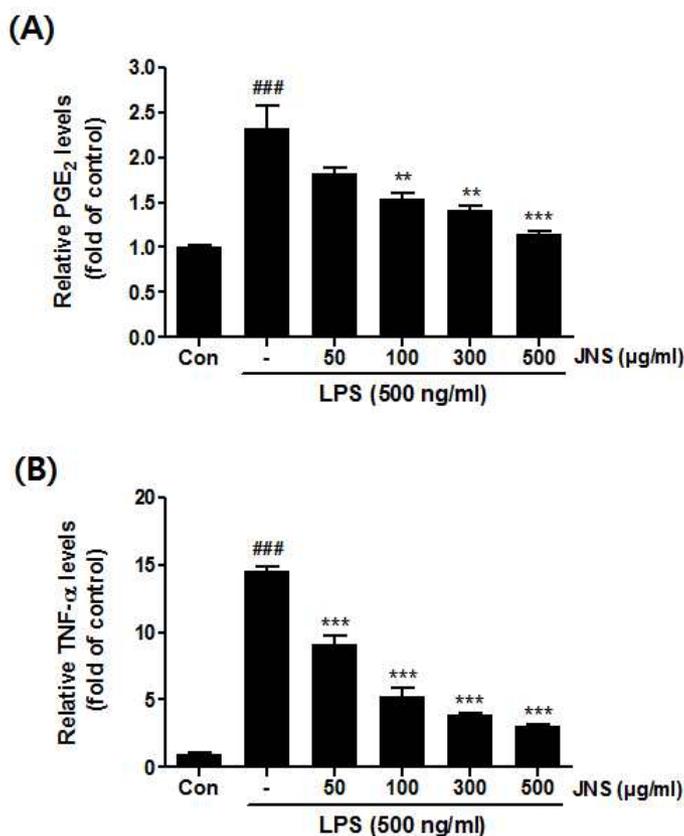


Figure 9. Effects of JNS on the production of PGE₂ (A) and TNF- α (B) in LPS-stimulated BV2 microglia. The cells were stimulated with 500 ng/ml LPS, in the absence or presence of various concentrations (50, 100, 300, or 500 $\mu\text{g/ml}$) of JNS for 18 h. (Significant vs. control, ### $p < 0.001$; significant vs. LPS treatment, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$)

9. BV2 생쥐 미세아교세포에서 MAPK 신호전달경로의 활성화에 미치는 진뇌산 추출물의 영향

Mitogen activated protein kinase (MAPK) 신호전달경로는 세포의 증식, 분화 및 다양한 면역반응을 조절하며, 특히 LPS (TLR4 ligand)와 같은 외부 세균이나 바이러스의 감염에 의해 대식세포의 TLR4 수용체에 의한 MAPK 활성화를 통하여 염증매개물질의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁶⁾. 따라서, LPS로 활성화된 BV2 세포의 염증반응

을 진뇌산 추출물이 MAPK 신호전달경로를 통하여 억제하는지 western blot을 통하여 확인해 보았다. 그 결과, MAPK의 주요 kinase인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK의 인산화가 LPS 처리에 의해 강하게 유도된 반면, 진뇌산 추출물의 전처리 100, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 ERK 인산화가 억제되고, JNK와 p38 MAPK의 인산화에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(Figure 10).

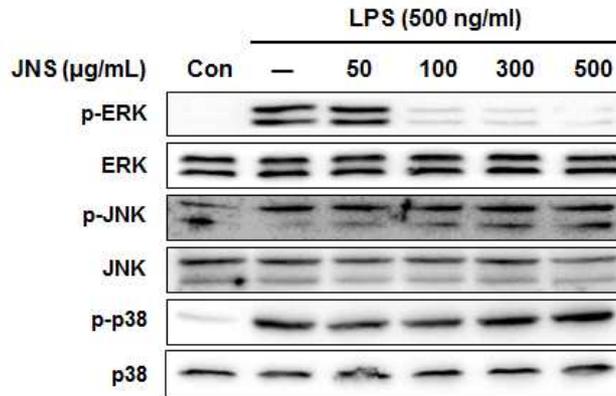


Figure 10. Effects of JNS on the MAPK signaling pathway activation in LPS-stimulated BV2 microglia. The activation of the ERK, JNK, and p38 MAPK was assessed by western blots.

IV. 고찰

고령화에 따라 파킨슨병과 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환이 전세계적으로 급증하고 있어 심각한 사회문제로 부상하고 있으며, 우리나라는 전세계에서 고령화 속도가 가장 빠르게 진행되고 있어, 향후 퇴행성 뇌질환의 치료제 수요가 급증할 것으로 전망이 되면서 최근 제약회사들이 치료제 개발에 주력하고 있다. 파킨슨병의 치료는 현재 약물요법과 수술로 증상을 완화하고 질병의 진행을 늦추는 수준으로 근본적인 치료제는 아직 없는 실정이므로, 새로운 치료법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 근래에는 예방 및 뇌기능 향상을 목적으로 또는 양방의 표준 치료법과 병행하여 치료의 상승작용 및 부작용 감소를 목표로 전통의학 및 보완대체요법에 근거를 둔 새로운 약물 치료제 개발 연구가 활발하다. 이러한 연구동향에 발맞추어 파킨슨병의 예방 및 치료를 위한 새로운 한약 처방 개발을 위해 신경세포 및 미세아교세포를 이용하여 진뇌산 추출물의 신경세포 보호 효과 및 미세아교세포의 염증 억제효과를 평가하였다.

진뇌산은 (브레인)동의보감 한의원에서 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료 목적으로 개발하여 임상에서 실제로 사용 중인 경험처방에서 중요 약제로만 구성하였다. 원지(遠志, *Polygalae Radix*)는 원지과(*Polygalaceae*)에 속한 다년생 초본인 원지(*Polygala tenuifolia* Willd.)의 뿌리를 건조한 것으로 뜻을 오래 간직한다는 이름의 의미에서 알 수 있듯이, 예로부터 머리와 관련된 증상, 주로 정신 신경계 질환 즉, 신경안정

및 기억력 향상, 불안, 불면 등을 치료하는데 사용하여왔으며, 총명탕의 주재료이기도 하다^{17,18}. 하고초(夏枯草, *Prunellae Spica*)는 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하는 다년생 초본인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai 또는 하고초 *Prunella vulgaris* Linne의 꽃대로 한의학에서는 해독산결(解毒散結), 청설간화(淸泄肝火), 소종(消腫) 등의 본초학적 효능을 가지고 있으며, 약리연구로 항염증, 항균, 혈당감소, 혈압 하강 작용 등이 보고되어 있다^{18,19}. 자소엽(紫蘇葉, *Perillae Herba*)은 꿀풀과(*Labiatae*)에 속한 일년생 초본인 차조기 *Perilla frutescens* L. Britt. var. *acuta* Kudo 또는 주름소엽 *Perilla frutescens* L. Britt. var. *crispa* Decaisne의 잎 및 끝가지를 건조한 것으로, 발표산한(發表散寒), 행기관중(行氣寬中), 해어해독(解魚蟹毒), 진정작용 및 지통(止痛) 등의 본초학적 효능을 가지며, 항암, 항알레르기, 뇌허혈 개선 효과 연구도 보고되었다^{18,20}. 화피(樺皮, *Betulae Cortex*)는 자작나무과(*Betulaceae*)에 속한 만주자작나무 *Betula platyphylla* Suk. 및 자작나무 *Betula platyphylla* Suk. var. *japonica* Hara의 나무껍질로 청열이습(淸熱利濕), 거담지해(祛痰止咳), 소종해독(消腫解毒) 등의 효능이 있어, 주로 염증성 질환이나 피부질환에 적용한다¹⁸. 금은화(金銀花, *Lonicerae Flos*)는 인동덩굴 *Lonicera japonica* Thunb.의 꽃봉오리를 건조한 것으로, 청열해독(淸熱解毒), 양산풍열(涼散風熱) 등의 효능이 있으며, 항산화, 항염증, 항균 및 항암 효과 등의 연구와 더불어 코카인 중독의 예방 및 치료 효과 연구도 보고되었다^{18,21}.

본 연구는 진뇌산의 신경세포 보호효과 및 그 기전

에 대한 연구로서 SH-SY5Y 세포에서 MPP⁺에 의하여 유발되는 신경독성으로부터 방어하는 효과를 보이는데, 주로 Akt와 ERK 신호전달경로를 통하여 세포를 보호한다는 사실을 처음으로 보여주고 있다.

파킨슨병과 관련된 연구들은 주로 도파민계 신경세포주인 SH-SY5Y 세포에 신경독성 물질로 잘 알려진 MPP⁺, 6-OHDA 또는 rotenone 등을 처리하여 파킨슨병의 시험관 모델로 흔히 사용하는데,^{1,22-24)} 본 연구는 SH-SY5Y 세포에 MPP⁺를 이용하여 신경독성을 유발하는 모델을 이용하였다. 예비실험으로 MPP⁺가 SH-SY5Y 세포에 미치는 독성을 확인하고자 MPP⁺를 0.5 ~ 2.5 mM로 24시간동안 처리한 후 MTT 분석법으로 세포생존율을 측정하였으며, 그 결과 MPP⁺에 의해 농도 의존적으로 SH-SY5Y 세포의 생존율을 감소시켰고, 특히 1 mM에서 약 60%의 세포생존율을 보여 신약개발과정의 후보약물 스크리닝 단계에서 신경세포 보호효능을 평가할 수 있는 적절한 농도로 결정하였다. 이를 이용하여 신처방 진뇌산 추출물의 신경세포 보호 효능을 평가해 본 결과, 10, 50, 100 µg/ml에서 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시켰고, 이보다 더 고농도(300 µg/ml)에서는 오히려 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 진뇌산 추출물이 신경세포를 보호하는 최적의 농도를 100 µg/ml로 결정하고, 향후 다양한 실험을 진행하였다.

MPP⁺는 MPTP가 생체 내에서 변환된 물질로, MPTP 자체는 독성이 없으나 체내에 흡수된 후, 혈액 뇌장벽을 통과하여 뇌로 들어가 중뇌 내에 있는 별아교세포에서 미토콘드리아의 Monoamine oxidase B (MAO-B) 효소에 의해 MPP⁺로 대사되어 도파민 운반체에 의해 신경세포 내로 들어가 미토콘드리아막의 에너지 생산 활성을 지닌 전자전달계의 complex 1을 손상시킨다. 이에 의해 신경세포는 에너지를 생산할 수 없게 되고, 세포 내 산화적 스트레스가 증가하여, 활성산소종이 증가하게 되고 결국 apoptosis를 유도하며 독성을 나타낸다^{7-11,25)}. Apoptosis는 미토콘드리아의 기능 이상이 중요한 작용을 하는데, 미토콘드리아 막투과성의 변화가 유발되면, 미토콘드리아 내에 존재하는 cytochrome C와 같은 apoptosis 유발 인자들을 세포질로 방출시키면서 apoptosis 과정을 개시한다²⁶⁾. 이를 바탕으로, MPP⁺가 세포내 미토콘드리아에 손상을 일으키는 지 또는 산화적 스트레스

를 유발하는지를 미토콘드리아의 막전위가 떨어지고 ROS 생성이 증가되는 것을 flow cytometry로 보여줌으로써 확인하였다. 반면, 100 µg/ml 농도의 진뇌산 추출물의 처리는 MPP⁺로 인한 미토콘드리아 막전위하강과 ROS 생성 증가를 유의하게 억제시키는 것을 확인함으로써 MPP⁺로 인한 미토콘드리아 기능이상 및 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호한다는 것을 알 수 있었다. Apoptosis 과정에서 caspases도 중요한 역할을 하는데, 세포의 정상 상태에서는 핵과 미토콘드리아 외막에 불활성 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하다가, 세포 내부 또는 외부의 다양한 자극에 의하여 분해됨으로써 활성화되어 caspase cascade의 순서대로 다양한 표적 단백질들을 활성화시켜 apoptosis를 유발한다²⁷⁾. 진뇌산 추출물이 MPP⁺로 유도된 apoptosis를 억제할 수 있는지 apoptosis와 관련된 단백질들을 western blot으로 분석한 결과, MPP⁺가 미토콘드리아 막에 존재하는 Bcl-2 family 중 anti-apoptotic protein인 Bcl-2를 감소시키고, caspase cascade 경로의 가장 하위단계인 caspase-3의 proform이 감소되고, 이것의 표적단백질인 PARP의 proform도 감소되는 것으로 보아 활성화가 일어나 미토콘드리아 의존적인 내인성 경로의 apoptosis가 잘 유도된 것을 알 수 있었다. 반면, 진뇌산 추출물의 처리는 MPP⁺에 의한 Bcl-2와 caspase-3 및 PARP의 proform들의 감소를 억제시켜 control군의 발현량과 거의 비슷한 것을 확인할 수 있었다.

세포의 증식(proliferation)과 생존(survival) 및 anti-apoptosis는 PI3K/Akt 신호전달과 MAP kinase 신호전달 경로 중 특히 ERK에 의해 매개되어진다²⁸⁻²⁹⁾. 따라서 진뇌산 추출물의 신경세포 보호 효능의 기전 연구를 위하여, Akt와 ERK 그리고 이들의 인산화된 형태의 단백질들을 western blot으로 확인해 본 결과, MPP⁺에 의해 감소되었던 Akt의 인산화가 진뇌산 추출물의 전처리에 의해 복구되는 것을 확인할 수 있었고, 진뇌산 추출물을 시간 의존적으로 100 µg/ml을 처리시, Akt와 ERK의 인산화가 잘 유도되는 것을 알 수 있었다. 또한, 미토콘드리아 막전위 변화를 통한 신경세포 독성측정에서 Akt와 ERK 억제제인 LY294002와 PD98059의 전처리로 진뇌산 추출물의 처리에 의한 Akt와 ERK 활성화를 미리 억제시킨 다음, 약물의 효능을 확인해 본 결과, LY294002와 PD98059의 처리에 의해 진뇌산 추출물의 미토콘드리아

아 기능손상에 대한 보호 효능이 없어지는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이 결과는 진뇌산 추출물이 MPP⁺의 신경독성으로부터 Akt와 ERK 신호전달경로를 통하여 신경보호효과가 있다는 기전을 뒷받침해 주었다. 최근 황백(黃柏, *Phellodendri Cortex*), 봉독약침액 및 소속명탕(小續命湯)과 같이 생약 또는 한약 처방들을 이용한 신경세포 보호효과에 대한 연구들이 보고되고 있으며, 한의학 고서에 나오는 처방과 한약제를 활용한 치료제 Hepad가 MPP⁺로 인한 SH-SY5Y 세포의 apoptosis를 억제하고, 6-OHDA로 유발된 파킨슨병 동물 모델에서도 치료 효과가 있다고 보고되었다³⁰⁻³³. 다른 여러 연구 결과들과 마찬가지로 본 연구에서도 진뇌산 추출물이 apoptosis로부터 신경세포 보호효과를 가진다는 것을 여러 실험 방법들을 통하여 증명하였고, 이 효과는 Akt와 ERK 신호전달경로를 통하여 MPP⁺에 의한 신경독성을 억제한다는 것을 확인하였으므로, 신경세포를 보호할 수 있는 새로운 처방 개발과 그 효능의 기전을 밝힌 것에 큰 의의가 있다.

뇌의 염증 반응은 알츠하이머, 파킨슨병 및 허혈성 뇌 손상과 연관되며, 미세아교세포는 중추신경계에 존재하는 대식세포로서 중추신경계의 초기 면역반응을 조절하는 기능 외에 뇌의 염증과 퇴행성 과정에 있어서 중요한 역할을 한다¹⁴. 뇌에서 항염증 효과는 퇴행성 뇌질환의 주요 원인이 되는 만성 신경계 염증을 억제함으로써 다양한 신경계 질환으로부터 신경을 보호할 것으로 예상되므로, 본 연구에서도 파킨슨병의 예방 및 치료를 위해 진뇌산의 신경보호 효과에 추가적으로 과학적인 증거를 제시하기 위하여 LPS로 자극된 BV2 생쥐 미세아교세포의 염증반응에서의 효능을 평가하였다. 본 연구 결과에 따르면, 진뇌산은 미세아교세포에 독성을 일으키지 않는 농도 범위에서 LPS로 인한 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개인자들의 생성을 억제하였으며, 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 생성도 억제하였다. NO를 합성하는 데 관여하는 NO 합성 효소(NOS, nitric oxide synthetase)에는 eNOS (endothelial NOS), nNOS (neural NOS), iNOS (inducible NOS) 세 종류가 있는데, 이들 중 eNOS와 nNOS는 내피세포와 신경세포에 존재하는 효소로 칼슘과 칼모듈린으로 NOS가 활성화 된 후 짧은 기간만 NO를 생성하며 평상시에도 발현되는 반면, iNOS는 대식세포에 주로 존재하는 효소로서 염

증성 사이토카인들에 의해 유도되어 많은 양의 NO를 장시간 생성한다³⁴. Prostaglandin은 염증이거나, 혈소판 응집, 신경전달물질의 분비 등에 관여하는 것으로, 특히 PGE₂는 혈관 확장, 부종, 발열, 동통 등을 매개하며, 염증 반응의 매개체로서 이미 잘 알려져 있다³⁵. PGE₂의 합성은 막 인지질(membrane phospholipid)에서 phospholipase A2에 의해 arachidonic acid가 만들어져 이를 기질로 하여 cyclooxygenase (COX)에 의해 촉진된다³⁵. COX는 지속적으로 발현하여 정상적인 생리적 기능을 담당하는 COX-1과 면역 및 염증 신호들에 반응하여 만들어지는 COX-2로 나뉘어진다³⁶. 본 연구에서는 LPS로 자극된 BV2 세포에서 iNOS의 발현 증가가 진뇌산 추출물 처리에 의해 감소되었으나, PGE₂의 생성과 연관이 있는 COX-2의 발현에는 영향을 미치지 않았다. PGE₂의 분비량은 COX-2 유래의 PGE₂ 합성과 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)에 의한 PGE₂ 분해의 정도에 따라 결정되는데^{35,36}, 진뇌산 추출물이 COX-2에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 15-PGDH의 활성화로 인해 PGE₂의 생성을 억제하는 것으로 사료된다. MAPK (Mitogen-activated protein kinases)는 ERK, JNK, p38 등의 세 종류가 포함되며, 이들은 면역 및 염증반응의 신호전달경로를 매개하거나, 세포 분화 및 세포 증식을 조절한다. 따라서, 진뇌산의 항염증 효능의 기전을 확인하고자 LPS로 자극된 BV2세포에서 ERK, JNK, p38을 western blot으로 분석해 본 결과, BV2 세포에서 LPS에 의해 ERK, JNK, p38 모두 인산화가 증가되었으나, 진뇌산 추출물의 전처리 ERK의 인산화는 억제되었으나, JNK와 p38에는 큰 영향을 미치지 못하였다. 따라서 미세아교세포에서 진뇌산이 LPS에 의한 ERK의 활성화를 억제시킴으로써 항염증 효능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

V. 결론

본 연구의 결과를 요약해보면, 진뇌산 추출물이 신경세포에서 Akt와 ERK 신호전달경로의 활성을 통하여 MPP⁺의 독성으로부터 보호 효능을 가지며, 미세아교세포에서는 LPS로 유도된 ERK 신호전달경로의 활성을 억제함으로써 강력한 항염증 효능을 보였다. 본 연구를 통하여 진뇌산의 파킨슨병 예방 및 치료제

로서의 가능성과 효용성을 두 가지 세포모형을 통하여 증명하였다.

References

1. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39: 889-909.
2. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5:525-35.
3. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29:1583-90.
4. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Lentile R, Stella AM, Butterfield DA. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol Biol.* 2010; 610:285-308.
5. Yacoubian TA and Standaert DC. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792(7):676-87.
6. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, et al. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci.* 2000;16:135-42.
7. Chuenkova MV, Pereira MA. PDNF, a human parasite-derived mimic of neurotrophic factors, prevents caspase activation, free radical formation, and death of dopaminergic cells exposed to the Parkinsonism inducing neurotoxin MPP+. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;119:50-61.
8. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53:S26-S38.
9. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007;12:913-22.
10. Storch A, Ludolph AC, Schwarz J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm* 2004;111:1267-86.
11. Lee CS, Kim YJ, Ko HH, Han ES. Modulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death by KATP channel block. *J Neural Transm* 2007; 114:297-305.
12. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 2010;129:154-69.
13. Arimoto T, Bing G: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2003; 12:35-45.
14. F. Gonzalez-Scarano, G. Baltuch. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience.* 1999; 22:219-40.
15. Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH: Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2003; 18:2731-42.
16. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):807-69.
17. Lee DS, Choi HG, Li B, Kim KS, Kim SA, Chon SK et al. Neuroprotective effect of the acid hydrolysis fraction of the roots of *Polygala tenuifolia*. *Korean J Orient Physiol Pathol* 2011;25(4):628-34.
18. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy.* Seoul: Yeong Lim's Publisher. 2000:329-30, 383-4, 399-40, 411-2, 646-7.
19. Kim YH. *Herbalogy.* Seoul:Hanol Publisher 2014:76
20. Yang GH, Kim HW, Cho SJ, Kim SD, Yoon KH, Kim BY et al. Effects of *Folium Perillae* on cytokine productions in ischemic rats. *Kor. J. Herbalogy.* 2007;22(3):93-9.
21. Kim Y, Yang SY, Oh YS, Lee JW, Lee YK, Park YC. Research trends of *Lonicera japonica* over

- the last 10 year. J Daejeon Orient Med. 2010;19:17-23.
22. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin Med J (Engl). 2010;123(8):1086-92.
 23. Lee HJ, Noh YH, Lee DY, Kim YS, Kim KY, Chung YH et al. Baicalein attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Eur J Cell Biol. 2005;84(11):897-905.
 24. Watabe M, Nakaki T. Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human dopaminergic SH-SY5Y cells. J Pharmacol Exp Ther. 2004;311(3):948-53.
 25. Fall CP, Bennett JP Jr. Characterization and time course of MPP+ -induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. J Neurosci Res. 1999;55(5):620-8.
 26. Martinou JC and Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Dev Cell 2011;21:92-101.
 27. Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. Immunol Cell Biol. 1999;77:272-8.
 28. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 2005;9(1):59-71.
 29. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 2001;410(6824):37-40.
 30. Jung YS, Jung HM, Seo UK. Neuroprotective effect of methanol extract of Phellodendri Cortex against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC-12 cells. Korean J Orient Int Med. 2009;30(1):51-63.
 31. Bae KR, Doo AR, Kim SN, Park JY, Park HJ, Lee HJ et al. Neuroprotective effects of bee venom, which removes high molecular elements against MPP+-induced human neuroblastoma SH-SY5Y cell death. Korean J Orient Int Med. 2010;31(2):66-75.
 32. Woo C, You JY, Jang CY, Kim HR, Shin YJ, Moon AJ et al. Protective effects of Sosokmyoung-tang against Parkinson's Model in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. J Int Korean Med. 2014;35(3):298-308.
 33. Baek SY, Lee NR, Kim DH, Gu A, Kim SY, Song DY et al. Protective effect of a novel herbmedicine, Hepad, on apoptosis of SH-SY5Y cells and a rat model of Parkinson's disease. Mol Cell Toxicol. 2015;11(2):223-30.
 34. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol. 1992;149:2736-41.
 35. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol. 2012;188(1):21-8.
 36. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. Annu Rev Med. 2002;53:35-57.