

MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)로 유도된 Parkinson's Disease 동물 모델을 이용한 향사양위탕의 신경 세포 보호 효과

고기연 · 김윤희 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질의학

Abstract

Neuroprotective Effects of Hyangsayangwi-tang in MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease

Ga-Yeon Go, Yun-Hee Kim, Taek-Won Ahn

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

Objectives

To evaluate the neuroprotective effects of Hyangsayangwi-tang (HY), a Korean traditional medicinal prescription in a Parkinson's disease mouse model.

Methods

Four groups(each of 10 mouse per group) were used in this study. The neuroprotective effect of HY was examined in a Parkinson's disease mouse model. C57BL/6 mouse treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 30mg/kg/day), intraperitoneal (i.p.) for 5 days. Slow behavioral responses and memory disorder is the major clinical symptoms of PD. In order to investigate the effect of HY on recovery of behavioral deficits and memory, we examined the motor function and memory by using Morris water maze and Forced swimming test. Ischemic mouse brain stained with TTC(2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride) in the MPTP-induced Parkinson's disease to find out ischemia and tissue damage in mouse. The convenient, simple, and accurate high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous determination of neurotransmitters in MPTP-HY group. To measure the amount of dopamine in mice brain, striatum-substantia nigra, was examined by Bradford assay. Immunohistochemistry was examined in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse to evaluate the neuroprotective effects of Hyangsayangwi-tang on hippocampal lesion, ST and SNpc.

Results and Conclusions

Hyangsayangwi-tang (HY) prevents MPTP-induced loss of serotonin, hippocampus and TH-ir cell.

Key Words: Hyangsayangwi-tang, Parkinson's disease, Serotonin, Hippocampus, TH-ir cell

Received June 12, 2014 Revised June 12, 2014 Accepted June 29, 2014

Corresponding Author Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Cheonan Oriental Hospital of Daejeon University
Doojeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan city, Chungcheongnamdo, 331-958, Korea
Tel: +82-41-521-7535 Fax: +82-41-521-7007 E-mail: twahn@dju.kr

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

I. 緒論

파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 대뇌 기저핵의 선조체(striatum, ST)-흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)의 dopamine 신경계(dopamine neuron)의 퇴행으로 인한 신경질환이다. 주요 병인에는 도파민 뉴런의 사멸, 유전자 기형(alpha-synuclein)의 축적으로 인한 lewy body 생성으로 나타나고 이런 원인의 발병 요소로 중금속/탄화수소 노출 등의 환경적 인자, 중추 노화 관련인자, 산화스트레스(oxidative stress), 유전인자(alpha-synuclein, parkins, PINK1, DJ-1 등) 등으로 보고되고 있다¹⁻⁴. 각종 산화스트레스는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성하고 생성된 ROS에 의하여 신경퇴행 질환인 PD, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)등의 염증 및 진행 과정과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다⁵. 지금까지 PD의 약물 요법은 일차적으로 dopamine 효능제 또는 dopamine의 전구체인 L-DOPA 요법이 주로 선택되어 시행되고 있다. 그러나 PD 동물모델에서 장기간의 L-DOPA 요법은 ROS 형성에 의하여 신경독성이 발생하고 있으며, 약물 효능의 감소, 이상운동증(dyskinesia), 운동동요(motor fluctuation) 및 다른 합병증을 유발한다^{6,8}. 그러므로 기존에 쓰이는 L-DOPA 요법 외에 다른 약물 치료제 및 한약 처방의 개발에 대한 필요성이 제시되고 있다. 역학 조사에 의하면 PD는 환경적인 요인과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 생활 환경 호르몬의 하나인 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 항정신성 의약품인 meperidine 유도체로서 이에 노출될 경우 평형 감각 상실, 손 떨림, 경직이나 자세의 불안정 등 파킨슨병과 유사한 증상이 나타나며 파킨슨병 모델이 필요할 때 많이 사용되고 있다⁹⁻¹¹.

본 연구에 사용한 처방인 少陰人 香砂養胃湯은 『東醫壽世保元·辛丑本』¹² 新定少陰人病 應用要藥 二十四方의 하나로 少陰人 胃受寒裏寒病의 太陰證에 사용하는 처방이다. 少陰人 脾胃病에 脾胃의 기운을 돕고 補脾和脾하고 健脾直脾하는

효과를 기대할 수 있으며 소화기계 문제, 특히 식욕부진, 흉통, 위염, 위허수, 위무력 등을 치료하기 위해 널리 응용된다¹³⁻¹⁵.

지금까지 파킨슨에 관련된 한약의 효능을 알아보는 연구에는 정 등¹⁶의 파킨슨병으로 유발된 진전이 한약 치료를 통하여 호전된 치험 1례, 배¹⁷의 파킨슨병 병태모델에서 自家 飮食作用 活性化를 통한 熱多 寒少湯 加減方의 뇌신경 보호 효과등이 있다. 이 연구를 통해 사상체질적 접근을 통한 파킨슨 질환 환자의 운동 능력 향상에 대한 효과와 MPTP가 유발한 독성으로부터 자가 탐식을 유도하고 세포 보호 및 증식의 효과를 가진 열다한소탕의 효능을 확인할 수 있었다. 하지만 아직 태음인 열다한소탕 처방 외에 MPTP 유발 파킨슨 질환의 소음인 처방에 대한 연구는 미미한 실정이다. PD 환자들은 무력이나 진전이 나타나는 부위에 체온 저하의 특징이 나타난다. 소음인 처방중 향사양위탕은 胃受寒裏寒病의 하복부 냉증에 다용하는 처방으로 이에 본 연구에서는 소음인 처방인 Hyangsayangwi-tang (HY)을 이용하여 이 처방의 뇌세포 및 신경 세포 보호 효과를 확인하여 파킨슨병의 치료 가능성을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

II. 研究材料 및 方法

1. 材料

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 천안한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. HY는 『東醫壽世保元·辛丑本』¹²에 근거하였으며, 그 구성비는 아래와 같은 방법으로 조제되었다 (Table 1).

2) 동물

숫컷 6 주령의 20-22 g C57bl/6 mouse(대한바이오링크, 대한민국)를 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항

Table 1. Prescription of HY^{*}

Herbs	Scientific name	Amount(g)
人蔘	Ginseng Radix	4
白朮	Atractylodes Macrocephalae Rbizoma	4
白芍藥	Paeonia Radix Alba	4
炙甘草	Glycyrrhiza Radix	4
半夏	Pinellia Rbizoma	4
香附子	Cyperi Rbizoma	4
陳皮	Citri Pericarpium	4
乾薑	Zingiberis Rbizoma	4
山查肉	Crataegii Fructus	4
砂仁	Amomi Fructus	4
白芫慈	Alpiniae Katsumadaiv Semen	4
生薑	Zingiberis Rbizoma Recenes	4
大棗	Jujubae Fructus	4
Total amount		52

* HY : Hyangsayangwi-tang

생체 무침가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였고, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC : Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

3) 기기

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

2. 方法

1) 한약 처방약 제조

본 실험에 사용한 한약 처방은 HY로 처방약 2첩

분량 (22 g)에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vacuum evaporator)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 한약처방약추출물을 냉동 보관 (-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. Mouse 경구 투여를 위한 HY의 용량은 60kg 성인이 하루 3회 탕약 복용하는 것을 기준으로 삼았다. 성인의 1회 복용 탕약 용량은 120cc이며 1첩 탕약 안의 약제는 11g이 사용된다. 이를 60kg 성인이 하루 3회 복용하였을 시 흡수되는 약제의 용량을 고려하여 Mouse 경구 투여량을 결정하였으며 그 결과 하루 생쥐 투여량은 550mg/kg 이다.

2) MPTP에 의한 파킨슨병 mouse 모델

약 25.3g의 숫컷 C57bl/6 mouse에 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, 30mg/kg, in saline) 1일 1회 5일간 복강에 투여하여 파킨슨병 유도 mouse를 제작한 후 2일간 방치하여 격리시켜 흡수 분해되지 않고 배출된 적출물을 제거한 후 사육실로 이동시켜, 14일간 HY와 마도파를 경구투여 하였다.

3) 실험군 구성 및 실험 설계

실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무게별로 균등

하게 10마리씩 4 group으로 나누고, 각 group 별로 다음과 같이 처치하였다.

- Control group : mouse received saline only.
- MPTP group : mouse received intraperitoneal(i.p.) injections of MPTP-HCL (30mg/kg of free base; Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in saline at 24h intervals for 5 days.
- 마도파 + MPTP group : MPTP 복강 주입한 Mouse에 14일간 마도파 (염산벤세라짓) 2mg/kg을 경구 투여하였다.
- HY + MPTP group : MPTP 복강 주입한 Mouse에 14일간 HY 550mg/kg을 경구 투여하였다.

4) Morris water maze 연구 방법

Morris water maze란 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 28°C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 mouse가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치한 것이다. 원형 수조의 중심을 지나면서 직교하는 두 개의 가상선을 그어 수조를 4개의 사분면으로 나누었다. 그 중 하나의 사분면 중앙에 아크릴로 만든 도파대, 즉 platform을 설치하였다. 수조에 40cm 깊이로 물을 담고 도파대가 보이지 않게 하기 위해서 1kg의 탈지분유를 풀었다. 수조의 위 천장에는 비디오 카메라를 설치하여 학습이 이루어지는 동안 동물의 움직임을 촬영하였다. 학습은 1일 1회 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 연습을 반복 하여 실시하였다. 선별된 mouse 10마리를 한 군으로 하여 정상군(C57bl/6-nr), 대조군(MPTP control), 양성대조군(MPTP-MD 2mg/kg)과 HY(MPTP-HY 550 mg/kg)으로 분류하였고, 14일간 1일 1회 약물 투여와 platform에 오르는 반복 훈련을 실시하였다.

5) Forced swimming test 방법

강제 수영 검사는 다른 말로 절망행동검사라고 불리며 약물 개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 이 실험은 총 2번에 걸쳐

진행된다. 윗면이 개방된 원통모양의 아크릴 실린더(지름 20cm, 높이 40cm)에 깨끗한 수돗물(수온 25±2°C)을 실린더 바닥에서부터 15cm까지 붓고 우울증 생쥐 모델을 15분 동안 강제로 수영시킨다. 그 후 물에서 건져 올려 마른 수건으로 닦고 사육 상자로 돌려보낸다 (pretest session). 24시간 후에 동물을 동일한 장비에 5분 동안 빠뜨려 쥐가 하는 행동을 측정한다. (test session). 처음 실험시 수분간은 이를 벗어나기 위해 심한 저항을 보이거나 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 두 번째 날 검사 시에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고 기어오르기, 수영, 부동행동 등의 자세를 측정한다. 전형적인 부동행동이란 동물이 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 뒤로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 단순 떠있는 상태이다. 사람에게 의한 오차를 줄이기 위해 캠코더(Figure 3) 등의 기록 장치를 이용하여 기록하고, 기록된 영상을 통하여 test session (5분) 동안 동물의 행동이 나타나는 시간을 측정하였다. 이번 검사에서는 동물이 발버둥치지 않고 물위에 가만히 떠있는 행동 상태를 부동성의 증가로 보고 절망 행동의 지표로 삼았다. (Immobility behavior). (Figure 4) 그 외 실린더 주위를 수평 방향으로 움직이는 행동으로 Immobility behavior보다도 더 적극적으로 움직이는 행동인 수영과 (Swimming behavior)과 벽을 향해 앞발을 물 밖으로 차올리는 다소 격렬하게 움직이는 행동인 기어오르기는 (Climbing behavior)는 측정하지 않았다.

6) 허혈의 크기 측정

Mouse를 마취한 후 후두부에서 전두부 방향으로 두개를 열어 그 안에 있는 뇌를 꺼낸다. 꺼낸 뇌를 생리식염수에 씻은 후 brain matrix를 이용하여 2mm의 두께로 자르고 2% TTC 용액을 가하여 20분간 염색한다. TTC 용액에 의하여 정상조직은 적색으로 염색이 되고, 허혈된 부분, 즉 혈액 공급이 되지 않아 뇌세포가 파괴된 곳은 콜라겐으로 채워지므로 하얗게 염색된다. 허혈 크기의 측정은 Brian의 방법으로 수행하였

다. 허혈의 크기(AT)는 $[(A1 / ST1) + (A2 / ST2) + (A3 / ST3) + (A4 / ST4)]$ 이고, A는 사진상(Figure 5)에 나타난 허혈 면적, ST는 각각 section(2mm)의 전체 면적. BH(brain Hipocampus)는 뇌의 hipocampus부분의 면적이며, risk에 대한 허혈 크기는 전체 면적의 percent로 표현하였다. 즉 BH 부위의 허혈 면적(LV)은 (AT of area at risk/ST of BH) x 100로 분석하였다¹⁸⁻¹⁹.

7) HPLC를 이용한 표준성분 분석

생쥐의 뇌(총4마리)를 적출하여 호모제나이저(homogenizer)로 균질화한 후 5ml 에탄올(Ethanol, Merck)을 가하여 6시간 이상 shaking water bath에서 배양한다. 그 후 3M filter로 모두 거른 다음 0.2ml로 가압 농축한다. 농축된 메탄올 추출액을 HPLC 분석을 통해 도파민(Dopamine), 세로토닌(Serotonine), 멜라토닌(Melatonin), 에피네프린(epinephrine), 노르에피네프린(norepinephrine)의 함량을 분석하였다. 뇌 에탄올 추출물 분석을 위한 HPLC(Waters Co. USA)는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오프의 온도는 25°C, 분석파장은 220nm, 유속은 1.0ml/min 이었고, 컬럼은 Luna C18 column (250mm x 4.6mm; particle size 5µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였다. 표준성분 시료는 Sigma USA사의 Serotonin과

Melatonin을 이용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수(0.1% TFA 함유), B 용매로 100% 아세토니트릴에 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였고 용매계는 용매기울기 용리로서 아래 표(Table 2)에 나타내었다.

8) 도파민양 측정 방법

Mouse의 뇌(총2마리)를 적출하여 -20°C에서 얼린 후 뇌시료(선조체-흑질 부위)부분을 분리하였다. 뇌시료(선조체-흑질 부위, 0.25g)부분에 200~500µl의 extraction buffer (0.3M sucrose, 0.15mM spermine, 0.5mM spermidine, 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.1% protease inhibitor, 0.1% phosphatase inhibitor, 0.5% NP 40)를 넣어 호모제나이저(homogenizer)로 균질화한 후 최종 부피가 0.2ml이 되도록 extraction buffer를 가해 잘 혼합한 뒤 2시간 동안 4°C에서 용해시켰다. 여기에 반응이 끝나면 시료를 1.5ml tube에 담아 3분씩 5번 동안 vortex하고 4°C, 15,000rpm에서 15분간 원심 분리 한 후 상등액(100µl)을 취하였다. 단백질 양은 Bio-Rad 단백질 분석 키트에 기술된 Bradford 방법(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 따라 측정하였다. Mouse/Rat Dopamine ELISA Assay Kit (DOU39-K01, Eagle Biosciences, Inc)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 100µl씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을

Table 2. Solvent Gradient Condition for HPLC-DAD

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

A^a Water with 0.1% formic acid.

B^b Acetonitrile with 0.1% formic acid.

100 μ l씩 넣었다. 그 후 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 200 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450nm로 측정하였다.

9) 뇌조직 검사

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

3. 통계

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었고, 비모수 검정방법인 KW방법(Kruskal-Wallis test)과 MW(Mann-Whitney U test) 방법을 사용하였다. p values가 5% 미만일 때를 "유의적인 차이가 있음"으로 판정하였다.

III. 研究結果

1. 기억력 측정 실험

PD의 대표 증상인 기억력 저하, 인지 장애를 연구하기 위하여 수중 미로 테스트 (Morris water maze)를 이용하였다. 연구에 사용된 mouse들을 마도과와 HY 경구 투여하면서 Morris water maze에서 1주 1회 반복 학습 훈련을 실시하여 선별된 mouse의 군을 나누어 실험을 진행하였다. 그 결과 MPTP group은 정상군에 비해 platform 까지 찾아가는데 걸리는 시간은 6배, 찾아가면서 헤맨 거리는 8배에 달해 기억력이 현저히

저하됨을 알 수 있다. MPTP와 HY을 병용 주입한 MPTP-HY group은 MPTP group에 비해 platform까지 찾아가는데 걸린 시간과 거리 모두 줄어들었지만 통계학적으로 유의성있는 단축을 보이진 못하였다 (Figure 1,2).

2. 행동 관찰 실험 (Forced swimming test)

PD의 또다른 증상으로 운동 능력 저하를 들 수 있다. 이에 대한 변화를 알아보기 위하여 강제 수영 검사 (Forced swimming test)를 실험하였다. 그 결과 MPTP group은 무동의 시간이 212초, MPTP-HY group은 무동 시간이 189.7로 HY를 처리한 군에서 약 22초 가량

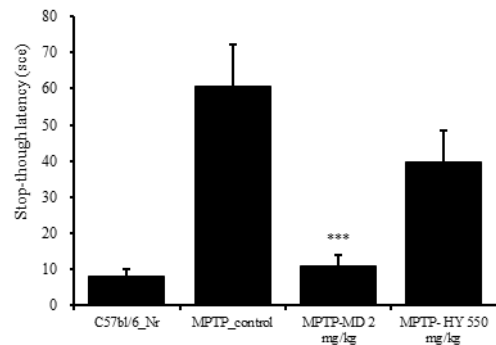


Figure 1. Effects of Hyangsayangwi-tang on the impairment of learning and memory of the stop-through type Morris water maze test in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse. C57BL/6 mice were orally administered of Hyangsayangwi-tang or MD and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. Lardist this is the total distance (in cm) was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (Hyangsayangwi-tang, 550mg/kg,p.o) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial and injected MPTP induced PD mice. Control, MPTP-induced PD mice; MD (마도과, 2mg/kg,p.o); HY extract (Hyangsayangwi-tang, 550mg/kg,p.o). Lardist this is the total distance (in cm) covered By the animal in large movement, and smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data (Lardist plus Smlidist) represent means \pm S.E (N=10). Data represent means \pm S.E (N=10). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (***) p <0.001.

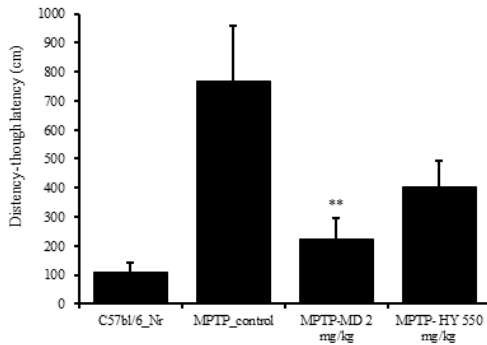


Figure 2. Effects of Hyangsayangwi-tang on the spatial working memory deficits of the distance movement-through type Morris water maze test in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse.

C57BL/6 mice were orally administered of Hyangsayangwi-tang or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. Lardist this is the total distance (in cm) was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550mg/kg,p.o) the retention trial was carried out after day 7 after the acquisition training trial and injected MPTP induced PD mice. Control, MPTP-induced PD mice; MD (마도과, 2mg/kg, p.o); HY extract (550mg/kg,p.o). o. Lardist this is the total distance (in cm) covered By the animal in large movement, and smldist this is total distance covered by the animal in small movement. Data (Lardist plus Smlldist) represent means±E (N=10). Data represent means±E (N=10). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (** $p < 0.01$)

무동의 시간이 단축된 것을 확인할 수 있다. 그러나 Figure 4에서 확인할 수 있듯이 시간 단축 외에 통계학 적인 의미를 가지지는 못하였다.

3. MPTP 처리 Mouse에서의 허혈 및 조직 손상

Mouse의 뇌를 TTC 용액 처리하여 허혈된 면적을 살펴보았다. 그 결과 MPTP group에서는 뇌혈관의 50%에 해당되는 부분이 허혈상태로 변할 것을 확인할 수 있다. 그에 반해 마도과는 뇌혈관의 20%, MPTP-HY group은 뇌혈관의 약 25% 정도가 허혈 상태로 변한 것을 확인할 수 있었다. MPTP-HY group은 MPTP group에 비해 콜라겐으로 채워진 허혈 부분이

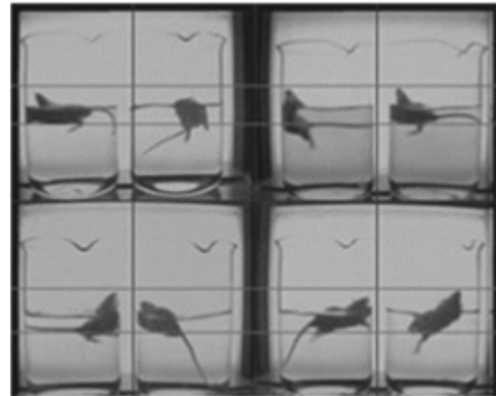


Figure 3. Forced swimming test

The forced swim test is a rodent behavioral test used for evaluation of antidepressant drugs, antidepressant efficacy of new compounds, and experimental manipulations that are aimed at rendering or preventing depressive-like states. Mouse are placed in an inescapable transparent tank that is filled with water and their escape related mobility behavior is measured.

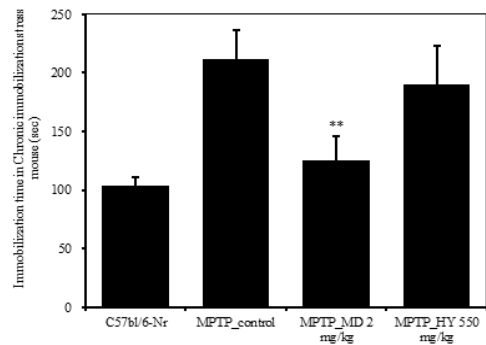


Figure 4. Effects of Hyangsayangwi-tang on the immobility time during the forced swim test in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse.

C57BL/6 mice were orally administered of Hyangsayangwi-tang or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. The FST behaviour was videotaped for later analysis and the periods of immobility were scored from videotapes. Control, MPTP-induced PD mouse; MD (마도과, 2mg/kg,p.o); Hyangsayangwi-tang extract (550mg/kg,p.o). Data represent means±E (N=10). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (** $p < 0.01$).

줄어들었으나 통계학적으로 유의성을 가지지는 못하

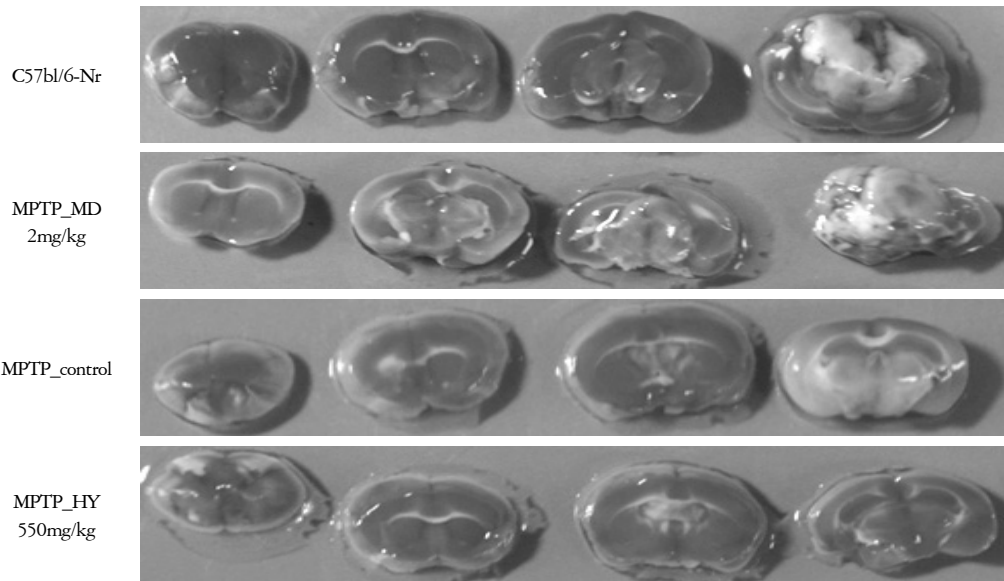


Figure 5. Infarction and brain edema coronal sections from ischemic rat brain stained with TTC in the MPTP -induced Parkinson's disease (PD) mouse.

C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. Brain cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H tetrazolium chloride. Control, MPTP-induced PD mouse; MD(마도과, 2mg/kg,p.o); HY extract (550mg/kg,p.o). Data represent means±E (N=10). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test

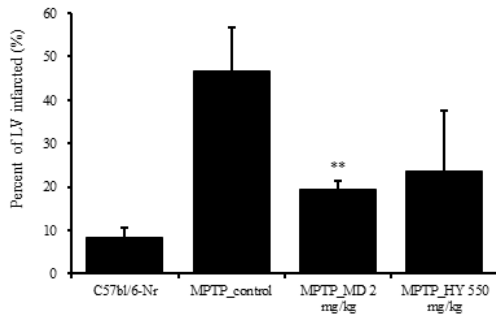


Figure 6. Effects of Hyangsayangwi-tang on the coronal section in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse.

C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days). Brain cerebral infarction is visualized by 2,3,5-triphenyl-2H tetrazolium chloride, and % LV using various BH(brain Hipocampus) imaging measurements. Control, MPTP-induced PD mice; MD (마도과 2mg/kg,p.o); HY extract (550 mg/kg,p.o). Data represent means±E (N=10). Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test (*p<0.001).

였다.

4. HPLC를 이용한 표준 성분 및 신경전달 물질 분석

HPLC를 이용한 표준 분석 및 신경 전달 물질 분석 결과 도파민, 세로토닌, 멜라토닌, 에피네프린, 노르에피네프린 중에서 세로토닌만 HPLC 분석에서 확인되는 것을 볼 수 있었다. 세로토닌은 저하시 우울증, 불안장애, 공격성, 자살 등과 관련이 있으며 PD 환자들에게서 세로토닌 작동성 신경의 장애와 퇴행이 나타난다. PD 환자의 우울 증상과 관련하여 각종 신경전달 물질의 변화를 알아보기 위하여 정상 쥐의 표준 물질 동정 외 우울증 생쥐의 뇌 성분에 함유된 serotonin, melatonin의 패턴을 확인하여 표준물질을 동정하였다. (Figure 7). 이 자료를 토대로 정상군과 MPTP group, 마도과, MPTP-HY group의 뇌의 세로토닌 함량을 비교해 보았을 때 정상군에 비하여 MPTP group의 세로

토닌 생성량이 감소를 나타내었다. 그리고 양성대조군인 마도과 ($p<0.001$)와 MPTP-HY group ($p<0.01$)을

투여한 실험군은 대조군에 비하여 세로토닌 생성량 통계학적으로 유의성 있게 증가를 나타내었다 (Figure 8).

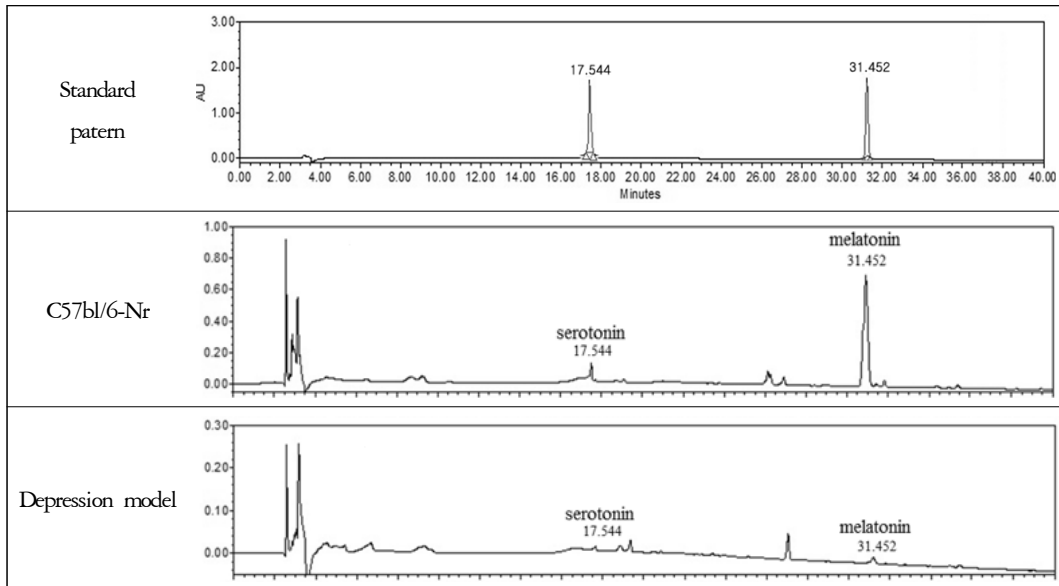


Figure 7. Using HPLC analysis of standard pattern and the neurotransmitter

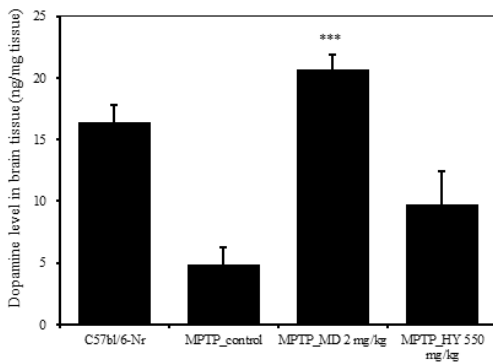


Figure 8. Effects of Hyangsayangwi-tang on the levels of serotonin in the brain tissue in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse. C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. The serotonin level was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550 mg/kg,p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent HY extract (550mg/kg,p.o). The brains were removed and the levels of serotonin were determined by an HPLC method. Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mouse group (control) data by T test ($*p<0.001$).

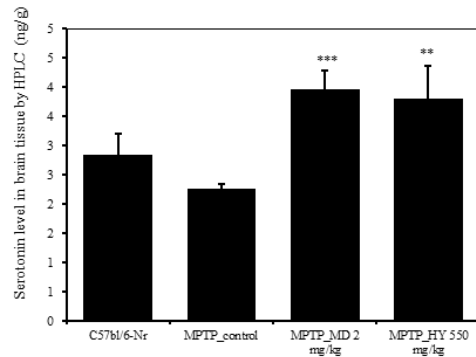


Figure 9. Effects of Hyangsayangwi-tang on the levels of dopamine in the brain tissue in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse. C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition taining trial continued once a day for 21 days. The dopamine level was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550mg/kg,p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means \pm E (N=10). Control, MPTP-induced PD mouse; MD (마도과 2mg/kg, p.o); HY extract (550mg/kg,p.o). The brains were removed and the levels of dopamine were determined by an ELISA method. Statistically significant value compared with MPTP-induced PD mice group (control) data by T test ($*p<0.001$).

5. Mouse 뇌 (선조체-흑질) 혼탁액에서 도파민 양 측정

Mouse 2마리의 뇌 선조체-흑질 부위를 이용하여 직접적으로 도파민의 양을 측정하였다. 그 결과 MPTP group의 도파민양에 비해 MPTP-HY group의 도파민 양이 약 2배 이상 증가한 것을 볼 수 있다. 양성 대조군인 마도파 처리군은 4배 넘게 증가한 것을 확인할 수 있다 (Figure 9). 그러나 마도파와는 달리 MPTP-HY group은 통계적으로 유의성을 가지지는 못하였다.

6. 뇌조직 손상 분석

이번 연구에서는 해마의 조직 검사를 위해 총 4마리의 Mouse가 실험에 이용되었으며 정상군보다 MPTP group에서 눈에 띄게 해마 부분이 줄어들 것을 확인할 수 있었다. 양성 대조군인 MPTP-MD group과 MPTP-HY group은 MPTP group에 비하여 사라졌던 해마 뉴런 등이 많이 회복된 것을 볼 수 있었다 (Figure 10). 또 Mouse의 선조체 (ST)와 흑질(SN)에서 TH 면역 반응 세포의 분포와 범위를 면역 염색을 통하여 알아

보았다 (Figure 11,12). 그림을 참고해보면 MPTP group에 비해 MPTP-HY group에서 TH 면역 반응 세포의 갯수와 밀집도가 더 높은 것을 확인할 수 있다.

IV. 考察 및 結論

파킨슨병은 뇌의 흑색질의 파괴로 인하여 신경전달물질인 도파민(dopamin)이 부족해져 생기는 질환으로 대표적인 퇴행성 뇌질환이다²⁰. 파킨슨병의 원인으로 다양한 기전이 알려져 있지만 최근에 와서는 환경 호르몬에 의한 질병 유발이 주된 원인으로 알려지고 있다. 파킨슨병을 유발하는 것1로 알려진 화학 물질로는 유기 농약제인 paraquat, rotenone, amphetamine, MPTP 등이 있다^{24,22}. MPTP는 생체내로 유입되면 뇌에서 몇 단계를 거친 후 MPP⁺로 변환되어 중뇌의 흑질 부위를 비가역적으로 파괴한다. 현재까지 MPTP의 신경 독성을 완화시킨다고 알려진 것은 Vitamine E, allopurinol, selenium, centrophenoxine 등이 있으며, 주로 활성 산소를 제거하여 도파민성 신경 세포의 파괴를

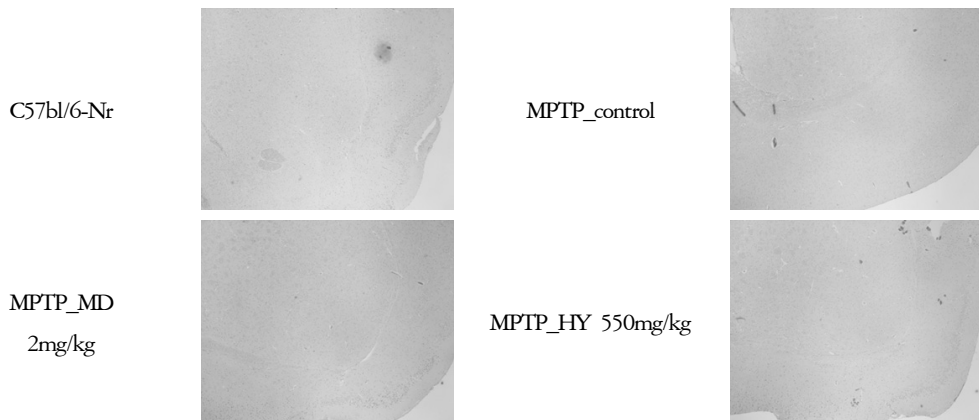


Figure 10. Effects of Hyangsayangwi-tang on the histological analysis of hippocampal lesion in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse.

C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The hippocampal lesion level was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550mg/kg,p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced PD mice; MD(마도파 2mg/kg,p.o); HY extract (550mg/kg,p.o). They were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon,×40).

완화하거나, 생체 내에서의 MAO-B inhibitor로 작용하여 MPTP 대사를 저해시키는 기전으로 파킨슨병의 치료에 활용되고 있다^{23,24}. 급증하는 노인인

퇴행성 뇌질환에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있는 가운데 퇴행성 뇌질환의 병태 생리적 원인과 밀접한 관련이 있는 산화 스트레스의 치료에 관심이 쏠리

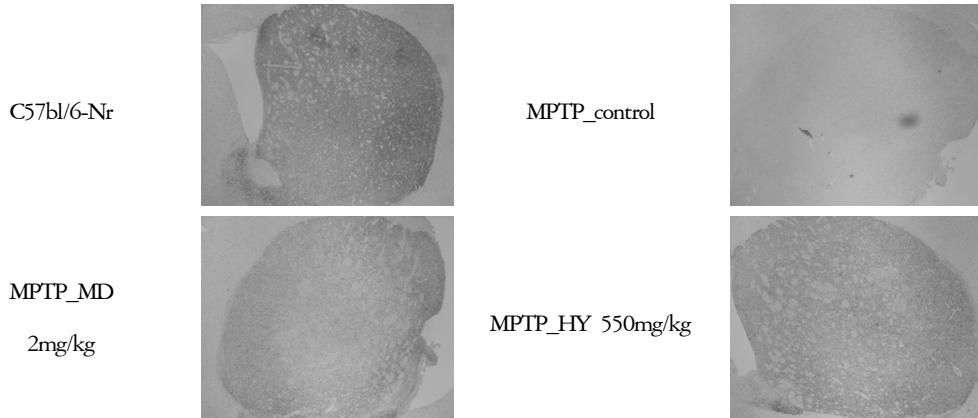


Figure 11. Effects of Hyangsayangwi-tang on the immunohistochemistry of TH-immunoresponsive (TH-IR) neurons in the striatum (ST) in the MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mice
 C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The hippocampal lesion level was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550mg/kg,p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced PD mice; MD(마도과 2mg/kg,p.o); HY extract (550mg/kg,p.oE). TH-IR cells in the ST of mouse were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody. Representative photomicrographs are shown of the ST from each group. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon,×40).

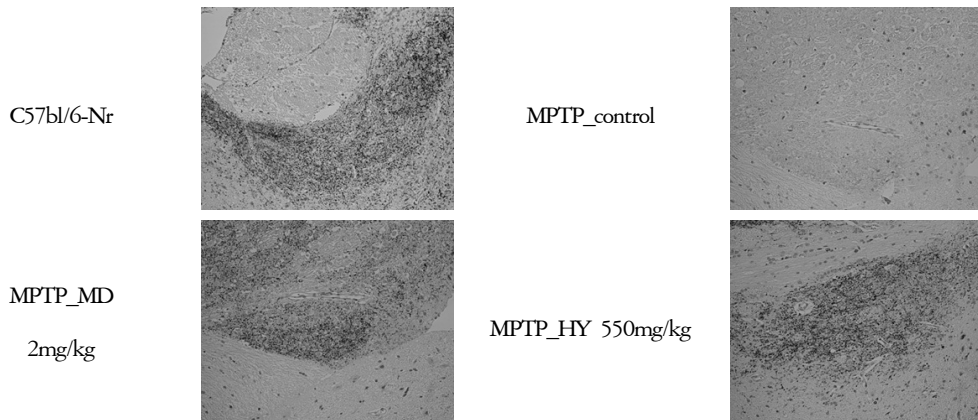


Figure 12. TH-IR cells in the SNpc of mice were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody in a subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease.
 C57BL/6 mice were orally administered of HY or MD and the acquisition training trial continued once a day for 21 days. The hippocampal lesion level was initiated at 3 weeks after orally administered of HY extract (550mg/kg,p.o) and injected MPTP induced PD mice. Data represent means±E (N=10). Control, MPTP-induced PD mouse; MD(마도과 2mg/kg,p.o); HY extract (550mg/kg,p.oE). TH-IR cells in the SNpc of mice were determined by an immunostaining assay with rabbit anti-TH antibody. Representative photomicrographs are shown of the SNpc from each group. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon,×40).

고 있다. 이에 본 저자는 MPTP을 이용하여 파킨슨병을 유발한 동물 모델을 이용하여 향사양위탕(HY)의 파킨슨 치료제로서의 가능성을 실험을 통해 규명하고자 하였다. 지금까지 파킨슨병의 한약 처방에 관한 연구로는 증례 논문이거나 배¹⁷의 파킨슨병 병태모델에서 自家 飮食作用 活性化를 통한 熱多寒少湯 加減方의 뇌신경 보호 효과에 관한 연구가 있다. 배¹⁷의 연구에서 언급된 自家 飮食은 에너지 결핍시 ATP 합성을 위해 오래된 단백질을 분해 또는 제거하는 일종의 세포 내 house-keeping 작용을 하는 것으로 세포 사멸이라는 의미를 넘어서 세포가 끊임없이 죽고 재생되는 과정을 조절하는 세포 항상성에 관여하는 중요 기작으로 주목받고 있다. 배¹⁷의 연구는 열다한소탕 가감방을 복용하였을 시 어떤 기전으로 자가 탐식 작용이 일어나는지 밝혀낸 연구이다. 그에 반해 열다한소탕 외의 다른 사상체질방을 이용한 PD 연구는 거의 전무한 상태이다. 따라서 이번 연구를 통해 PD 환자 치료에 소음인 처방이 효과를 나타낼 수 있을지 알아보고자 하였다. 또한 본 연구에서는 뇌 조직 분석, 도파민 양 측정, 표준 성분 분석과 허혈 상태인 뇌의 면적 측정과 같은 실험 외에 Mouse의 행동 상태와 우울 정도를 측정하는 행동 실험도 같이 진행하였다. 그동안 Morris water maze와 Forced swimming test를 이용한 Mouse의 실험은 다양하게 있었으나 파킨슨 행동 양상을 측정하는데 이용한 연구는 없었다. 따라서 이번 연구를 통해 지금까지 언급된 적 없는 소음인 HY 처방의 PD 치료 효과에 대한 근거를 마련하고자 하였다.

본 연구에서는 먼저 파킨슨 유발 Mouse (MPTP group)군과 양성 대조군인 MPTP - MD group, MPTP 후 HY 경구 투여한 군(MPTP - HY group)으로 나뉘며 각 group마다 실험 대상 쥐는 10마리로 책정하였다. PD 발생시 가장 보편적으로 사용하는 양약은 마도파정 125mg으로 Benserazide hydrochloride 28.5mg (benserazide로서 25mg), Levodopa 100mg을 성분으로 한다. 이 약은 말 그대로 도파민이 부족한 PD 환자들에게 직접적으로 도파민의 작용을 할 수 있는 성분을

흡수 시켜주는 약이다.

먼저 PD 질환의 주요 증상중 하나인 인지 장애, 기억력 저하에 대한 HY의 효과를 알아보기 위해 수중 미로 테스트 (Morris water maze)를 시행하였다. 수중 미로 테스트는 일정 기간 동안 Mouse를 Morris water maze내 platform에 찾아갈 수 있도록 훈련을 시킨 다음, 얼마간의 시간과 거리가 걸려서 platform까지 찾아가는지 해매는 시간과 거리를 측정하는 실험이다. 실험 결과 확인한 시간, 거리 단축을 보인 양성 대조군에 반해 MPTP-HY group은 시간, 거리 모두 다소 감소되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

파킨슨 병에 걸리게 되면 정신과적 증상이 흔히 동반된다는 것은 오래 전부터 알려져 있다. 특히 우울 증상이 대표적인 증상인데 대부분의 연구 결과에 따르면 파킨슨병에서 우울증상의 동반 빈도는 약 40~70%에 달한다. 그동안 발표된 연구들에 의하면, 파킨슨병의 운동 기능 장애가 발생하기 전에 우울증이 흔히 발견된다는 연구들이 있으며 파킨슨병 환자군과 신체장애의 정도가 비슷한 다른 질환의 환자군을 비교해보면 파킨슨병 환자군에서 우울증의 빈도가 더 높다고 보고되고 있다^{25,26,27}. 그렇지만 이렇게 많은 수의 환자군이 우울 증상을 겪고 있으나 겉으로 드러난 신체 강직이나 진전 등의 재활 치료에 밀려 우울 증상에 대한 관심이 상대적으로 적은 것이 사실이다. 이번 실험에서는 PD로 인한 무운동성과 우울 경향에 대해 알아보기 위해 강제 수영 검사(Forced swimming test)를 시행하였다. 강제 수영 검사는 윗면이 개방된 원통 모양의 아크릴 실린더에 물을 붓고 Mouse를 15분간 강제로 수영을 시킨 뒤 24시간 후 똑같은 아크릴 실린더에 5분 동안 다시 떨어뜨려 놓는 실험이다. 그럴 때 Mouse의 행동을 캠코더로 촬영하며 측정 값은 Mouse가 움직이고자 하는 의지 없이 무동 증상을 보이고 있는 시간이다. 그 결과 MPTP 투여로 파킨슨병 유발된 군에 비해 MPTP-HY group의 무동 시간은 약 30초 가량 줄어든 것을 볼 수 있다. 시간상으로는 소폭 감소하였으나 통계적인 유의성을 가지지 못해 HY의 우울 증상 감소 역할은 미미한 것으로 나타났다.

Mouse의 뇌를 후두부에서 전두부 방향으로 두 개를 열어 2mm 두께로 자른 후 TTC 용액을 가하게 되면 정상 조직은 적색, 허혈 상태로 인한 뇌세포 사멸 조직은 염색이 되지 않아 하얗게 표시가 된다. 이 염색법은 조직학적으로 뇌 신경 세포 파괴를 단기간에 알 수 있는 방법으로서 허혈 부분을 육안으로 쉽게 비교할 수 있는 장점이 있다. 앞서 첨부한 그림을 살펴보면 (Figure 5) MPTT group은 뇌세포 사멸 부분이 많이 군데 군데 하얗게 표시된 곳이 많고, MPTP-HY group은 상대적으로 허혈로 인한 하얀 부분의 면적이 좁았다. 그러나 육안으로 확인한 것과는 달리 허혈 면적의 비중을 이용하여 통계 처리 하였을 때는 유의성을 가지지 못했다.

모든 물질은 고유의 파장을 가지고 있으며 이미 연구를 통해 몇몇 물질에 대한 고유 파장을 알고 있다. 대표적인 뇌 신경 전달 물질인 도파민, 세로토닌, 노르에피네프린, 에피네프린, 멜라토닌의 표준품을 이용하여 실험에 사용된 Mouse의 뇌 에탄올 추출물을 HPLC를 사용하여 분석해보았다. 위에서 언급한 뇌 신경 전달 물질 5가지 종류 모두 추출 될 것으로 기대 하였으나 MPTP 처리한 뇌 시료에서 세로토닌 외에 다른 물질은 분석이 되지 않았다. 세로토닌은 신경세포의 발달, 운동, 기분, 공격성, 식욕, 수면, 인지 기능 등 고위 대뇌 기능에 중요한 역할을 하는 신경 전달 물질로서 인체의 생리 기능에 중요한 역할을 한다. HPLC를 이용하여 검출된 세로토닌 양을 Nr group, MPTT group, MPTP-MD group, MPTP-HY group으로 나누어 살펴보았다. 그 결과 Nr group에 비해 MPTP-HY group의 뇌 무게당 세로토닌 양이 유의성있게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 앞서 설명하였듯이 직접적으로 도파민을 채워 넣어주는 마도파와 비교했을 때 도 크게 차이 나지 않는 유의성을 보여줬는데, 이는 한약이 양약 못지 않게 PD 치료에 큰 효과를 낼 수 있음을 보여주는 예이다.

또 다른 실험은 파킨슨 병 유발의 중요한 원인이 되는 도파민 양을 측정하는 실험이다. 파킨슨 병은 여러 가지 원인에 의해 중뇌 선조체-흑질 부위의 도파

민이 사멸하여 발생하는 질환이다. 따라서 Mouse 뇌의 선조체-흑질 혼탁액에서 도파민 양을 측정한다면 직접적이면서도 중요한 뇌의 변화를 알 수 있는 방법이 될 것이다. 이 실험 역시 MPTT group에 비해 MPTP-HY group에서 도파민 양이 늘어난 것을 볼 수 있었다. 그러나 향사양위탕이 파킨슨 환자의 도파민 양을 직접적으로 늘리게 한다는 통계적 유의성을 가지지는 못하였다.

마지막으로 Mouse의 뇌를 조직 검사하여 면역 기능의 변화와 기억력을 담당하는 해마의 손상 정도를 살펴보았다. 파킨슨 병에 걸리게 되면 해마의 위축이 일어나게 되고 그로 인해인지 장애 및 기억력 저하 더 나아가서 치매로 발전하는 경우가 많이 있다. 따라서 조직 검사를 통해 MPTP로 파킨슨 병 유발한 Mouse의 해마 위축 정도와 함께 향사양위탕 투여군에서는 어느 정도 해마의 위축이 회복되는지 확인하였다. 또한 TH-IR CELL의 증가, 감소까지 함께 알아보았다. Figure 10-12를 보면 해마의 위축 정도가 MPTT group에 비해 MPTP-HY group에서 많이 회복된 것을 볼 수 있다. TH-IR CELL 역시 MPTT group보다 MPTP-HY group에서 더 많이 분포하였다. 이는 HY가 파킨슨병으로 인해 인지 장애를 겪고 면역 기능이 저하된 환자의 증상 개선에 도움을 줄 수 있다는 것을 뜻한다.

이상의 연구결과는 HY가 MPTP로 유도된 Parkinson's disease 동물 모델에 대해 일정 부분 신경 보호 효과가 있음을 나타내고 있다. 뇌의 기억력 담당 기관인 해마와 면역 양성 세포, 그리고 몸의 고급 생리 기능을 담당하는 신경 전달 물질인 세로토닌의 증가에 도움을 줄 뿐만 아니라 기억력이 증대하여 행동이 빨라지고 우울 증상의 경감이 나타나는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 HY가 파킨슨병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 효과가 있을 것으로 예상할 수 있다. 그러나 실험을 진행한 Mouse의 수가 많지 않았다는 한계가 있다. 따라서 in vitro 실험 결과를 바탕으로 하는 임상 시험으로의 연계를 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. Acknowledgement

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

VI. References

1. Imaki T, Katsumata H, Miyata M, Naruse M, Imaki J, Minami S. Expression of corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in paraventricular nucleus after acute stress. *Neuroendocrinology*. 2001;73(5):293-301.
2. Bae NY, Yang HO, Ahn TW. Protection effect of New-Yeolda-Hanso tang against β -Amyloid Induced Cytotoxicity in NGF-differentiated PC12 Cells. *J Sasang Constitut Med*. 2009;21:138-153. (Korean)
3. Bae NY, Ahn TK, Chung SK, Oh MS, Ko HS, Oh HG et al. The neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134:313-322. (Korean)
4. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39:889-909.
5. Seo JH, Shin MS, Kim CJ, Lee KS, lim BB. The influence of treadmill exercise in hot environments about serotonin expression in the rat brain, generating neurons and short-term memory. *Korean Journal of Sport Science*. 2009;20(4):744. (Korean)
6. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice displayed decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*. 1998;20(6):1093-102.
7. Porsolt RD, Anton G, Blavet N et al. Behavioral despair in rats : A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379-391.
8. Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine* 1979;30:139-140.
9. Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B., Forno, L.S. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science* 225(4669):1460-1462, 1984.
10. Arai N, Isaji M, Kojima M, Mizuta E, Kuno S. Combined effects of cabergoline and L-dopa on parkinsonism in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *J Neural Transmission* 103(11):1037-1316, 1996.
11. Lau, Y.S., Meredith, G.E. From drugs of abuse to parkinsonism: The MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Methods in Molecular Medicine* 79(1): 103-116, 2003.
12. Lee JM. Dongeuisoosobowonsasangbonchokwon. Seoul: Eulyumoonhwasa. 2002:27-278. (Korean)
13. The National College of Oriental Medicine Sasangeuihakclassroom Sasangeuihak. Seoul: Jipmundang. 2004: 260,265,276,394-5,442-80. (Korean)
14. Song IB et all. Sasangeuihak. Seoul:Jipmundang. 2004:343,366. (Korean)
15. Lee JC. Sinsasangeuihakron II. Seoul:Mokkwato. 2001:79-83. (Korean)
16. Jeong BJ, Kim JW, Kim BC, Woo SH, Na YJ, Shin HJ et al. A case of tremor in Parkinson's disease treated with Korean medicine. *Korean J. Orient.int.Med*. 2006;27(4):954-961. (Korean)
17. Bae NY. Neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement on Parkinsonian model. Dae-jeon National University. 2013;25(3):208-217. (Korean)
18. Brian R. Perri, Douglas H. Smith, Hisayuki Murai, Grant Sinson, Kathryn E. Saatman, Ramesh Raghupathl, Raymond T. Bartus, Tracy K. Mcintosh. Metabolic Quantification of Lesion Volume following Experimental Traumatic Brain Injury in the Rat. *Journal of Neurotrauma*. 1997;14:15-22.
19. Vosselera M., N. Abegunewardene, N. Hoffmannb,

- S.E. Petersene, D. Beckera, D. Cleppienb, P. Kunzc, K.-F. Kreitnerc, M. Lauterbacha, B. Bierbachd, C. Düberc, T. Goría, T. Münzela, L.M. Schreiberb, G. Horsticka. Area at Risk and Viability after Myocardial Ischemia and Reperfusion Can Be Determined by Contrast-Enhanced Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Eur Surg Res.* 2009;43:13-23.
20. Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson. *Harrison's Principles of Internal medicine.* 16th edition. Seoul: MIP. 2006:2631-2638.
21. Widdowson, P.S., Farnworth, M.J., Upton, R., Simpson, M.G. No changes in behavior, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rat. *Human and Experimental Toxicology.* 1996; 15(7):583-591.
22. Ferger, B., Teismann, P., Earl, C.D., Kuschinsky, K., Oertel, W.H. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65(3): 425-431.
23. Westm B.D., Sheghrue, P.J., Vanko, A.E.H., Ransom, R.W. Kinney, G.G. Amphetamine-induced locomotor activity is reduced in mice following MPTP treatment but not following selegiline/MPTP treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav* 2006;84(1):158-161.
24. Sun, L., Xu, S., Zhou, M., Wang, C., Wu, Y., Chan, P. Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice. *Brain Research.* 2010;1335:74-82.
25. Cummings JL. Depression in Parkinson's disease : a review. *Am J Psychiatry* 1992;149:443-454.
26. Fetoni V, Soliveri P, Monza D, Testa D, Girotti F. Affective symptoms in multiple system atrophy and Parkinson's disease : response to levodopa therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;66:541-544.
27. Burn DJ. Depression in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 9. 2002:44-54.