파킨슨병 동물 모델을 이용한 양릉천(GB34)의 선조체 내 도파민성신경세포 보호 기전 연구

전형준^{1*} · 유태원^{1*} · 김동수¹ · 권선오² · 김승태¹

¹부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, ²노스웨스턴대학교 의과대학 정신행동과학교실

Neuroprotective Mechanism of Acupuncture at GB34 for Dopaminergic Neurons in the Striatum of a Parkinson's Disease Mouse Model

Hyongjun Jeon^{1*}, Tae-Won Yoo^{1*}, Dongsoo Kim¹, Sunoh Kwon², Seungtae Kim¹

¹Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,

²Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Northwestern University Feinberg School of Medicine

Objectives : Acupuncture is frequently used as an alternative therapy for Parkinson's disease(PD) in Korea. Using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced Parkinson's disease mouse model, the present study investigated a possible role of acupuncture stimulation at GB34 in suppressing dopaminergic neuronal death and regulating the phosphorylation of protein kinase B(Akt) in substantia nigra(SN) and striatum(ST). **Methods :** Eight-week-old male C57BL/6 mice were administered intraperitoneally with 30 mg/kg of MPTP at 24-h intervals for 5 days. Acupuncture stimulation at GB34 or SI3 was performed once a day for 12 days consecutively from the first MPTP injection. After the last acupuncture stimulation, pole test was performed to assess the effect of the acupuncture stimulations. Dopaminergic neuronal survival in the SN and the ST, dopamine transporter(DAT) and caspase-3 expression in the ST were evaluated by immunohistochemistry. The phosphorylations of Akt in the SN and the ST were measured by Western blotting. **Results :** MPTP administration caused behavioral impairment and dopaminergic neuronal death in the SN and the ST. It also decreased DAT expression and increased caspase-3 expression in the ST. Acupuncture stimulation at GB34 alleviated these MPTP-induced impairments. Moreover, MPTP suppressed Akt phosphorylation in the SN and the ST, whereas acupuncture stimulation at GB34 alleviated the phosphorylation in the SN. **Conclusions :** These results indicate that acupuncture stimulation at GB34 can inhibit MPTP-induced dopaminergic neuronal death and alleviate the Akt phosphorylation in the SN, suggesting a possible role for acupuncture in the treatment of PD.

Key words : acupuncture, acupoint, parkinson's disease, protein Kinase B(Akt), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)

Received August 21, 2015, Revised September 1, 2015, Accepted September 8, 2015

Corresponding author: **Seungtae Kim**

Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49 busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea

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

This work was supported by the National Research Foundation of Korea grant funded by the Korea government(MSIP)(No. NRF-2013R1A1A1005580).

*The first two authors were equally contributed to this work.

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

서론

파킨슨병은 뇌의 흑질에 있는 도파민성신경세포가 파괴됨으로 인해 진전, 관절 경화, 평형감각 상실, 서동증 등의 증상이 나타나는 퇴행성 뇌질환이다¹⁾. 흑질에 있는 신경세포들은 운동의 시작 및 형태를 제어하는 신경전달물질인 도파민을 만들어내는데, 파킨슨병의 증상은 이러한 도파민성신경세포의 60~80%가 파괴되고, 이로 인해 도파민이 부족해짐으로써 나타나게 된다^{2,3)}.

서양의학에서는 파킨슨병을 치료하는 방법으로 주로 약물요법 및 수술요법을 사용하고 있으며²⁾. 최근에는 줄기세포를 이용하여 치료방법까지 연구 되고 있으나 아직 만족할만한 성과를 나타내지 못하고 있다. 또한 서양의학적 치료를 받더라도 약물 투여량의 증가로 인한 운동장애 등의 부작용이 상당수 발생하기에 환자들은 부작용이 적으면서도 효과적인 치료법을 원하고 있다³⁾. 그렇기에 미국에서도 파킨슨병 환자의 40%가 침치료 등 보완대체의학을 이용해 본 경험이 있는 것으로 조사되었다.

한의학에서도 파킨슨병과 유사한 증상을 여러 문헌에서 기술하였다. 『素問 至真要大論』의 病機十九條에서 “諸風掉眩 皆屬於肝”, “諸暴強直 皆屬於風”이라 하여 파킨슨병의 주요 증상 중 하나인 진전, 관절 경화, 서동증을 기술한 이래로, 파킨슨병과 유사한 증상을 震顫, 痙, 瘓, 瘰癧, 攣, 中風 등 다양한 표현으로 서술하였으며⁴⁾ 그 병인(病因)을 肝腎陰虛, 氣血兩虛, 積熱痰火, 氣滯血瘀, 肝風內動 등으로 파악하였다.

양릉천(GB34)은 전통적으로 膝伸不得屈, 髀樞膝骨冷痺, 脚氣, 膝股內外廉不仁, 偏風半身不遂, 脚冷無血色, 苦中介然, 頭面腫, 足筋攣 증상을 치료하는 효과가 있다고 알려진 경혈로⁵⁾, 족소양담경의 합토혈(合土穴)이자 팔회혈(八會穴) 중 근회(筋會)이기에 운동 기능과 관련이 있다고 알려져 있다. 양릉천의 운동 기능 개선 효과에 대한 연구들을 살펴보면, 양릉천 자침이 뇌졸중 환자의 운동 기능을 향상시키며⁶⁾, 운동 기능 장애가 대표적인 증상인 파킨슨병 동물 모델의 운동 기능을 개선하고 도파민성신경세포를 보호하는 것으로 나타났다^{7,8)}. 이러한 연구 결과들을 종합해 볼 때, 양릉천 자침이 파킨슨병으로 인한 운동 장애를 개선시킬 가능성이 높은 것으로 판단되지만, 어떠한 기전을 통해 도파민성신경세포를 보호하고 운동 기능을 회복시키는가는 아직까지 밝혀진 바가 없다.

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)는 도파민성신경세포에 작용하는 신경독 중 하나로, 동물에 투여하면 oxidative stress 증가 및 미토콘드리아 내 complex I의 억제(inhibition)로 인해 도파민 및 도파민 대사, 도파민 수송체(dopamine transporter, DAT)의 감소, caspase-3 등 세포사멸 관련 인자의

증가 및 흑질 및 선조체 내 도파민성신경세포의 파괴가 유발된다고 알려져있다³⁾. 이 동물 모델을 이용한 최근 연구에서 양릉천 자침이 흑질에서 protein kinase B(Akt)의 인산화(phosphorylation)를 증가시킴으로써 신경 보호 효과가 나타난다는 보고가 있었으나⁹⁾, 선조체에서도 Akt의 발현 조절을 통해 도파민성신경세포가 보호되는지는 아직까지 명확하지 않다.

이에 저자들은 MPTP로 파킨슨병을 유도한 생쥐를 이용하여 양릉천 자침의 운동 기능 개선 효과, 흑질 및 선조체의 도파민성 신경세포 보호 효과, DAT, caspase-3 및 Akt의 발현 정도를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후 진행되었다. 실험동물은 체중 20~22 g의 8주령 C57BL/6계 수컷 검정 생쥐(오리엔트바이오, 한국)를 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 실험기간 동안 사육실(온도 22±2°C)에서 물과 먹이를 자유로이 섭취하도록 하여 실험기간 동안 스트레스 및 환경의 변화에 따른 영향인자를 최소화 하였다.

2. 분류 및 파킨슨병 유발

총 48마리의 동물을 무작위로 정상군(Saline group), MPTP군(MPTP group), 후계군(MPTP+SI3), 양릉천군(MPTP+GB34)의 4가지 군에 군당 12마리씩 배정하였다. 정상군은 5일간 1일 1회 같은 시간에 생리식염수 0.1 ml을 복강 내 주입 하였고, 나머지 군들은 파킨슨병을 유발하기 위해서 MPTP(Sigma, St. Louis, MO, USA) 30 mg/kg의 양을 5일간 1일 1회 24시간 간격으로 복강 내 주입하였다.

3. 자침

첫 MPTP 투여 후 2시간 뒤에 첫 자침을 실시하였고, 그 후 24시간 간격으로 1일 1회 총 12회 자침을 실시하였다. 자침 경혈은 후계군의 경우 수태양소장경의 후계(SI3)에 자침하였으며, 양릉천군의 경우 족소양담경의 양릉천(GB34)에 자침하였다. 침은 0.18 mm×8 mm 규격의 수지침(동방침구사, 보령, 한국)을 사용하였고, 보조자가 동물이 움직이지 않도록 고정시킨 후에 시술자가 2 mm 깊이로 자침 후 1초에 2회씩 총 60회 염전하고 신속하게 빼내었으며, 좌측 경혈에 먼저 자침한 후 우측 경혈에 자침하였다(Fig. 1). 정상

Fig. 1. Locations of SI3(left) and GB34(right) acupoints.

Acupuncture needles were inserted to a depth of 2 mm at SI3 or GB34 bilaterally, turned at a rate of two spins per second for 30 sec.

군과 MPTP군에도 침 시술을 받은 군과 동일한 스트레스를 주기 위해 보조자가 침 시술 시간과 같은 시간 동안 움직이지 않도록 고정시킨 후 풀어주었다.

4. 행동측정실험

행동 측정실험으로는 파킨슨병 생쥐 모델에 가장 적합하다고 알려진 Abe 등이 제시한 pole test를 사용 하였다¹⁰⁾. 1×1×50 cm 나무로 제작된 pole에 생쥐를 꼭대기에 올려두고 내려오는 시간을 그룹별로 2차례에 걸쳐(실험 시작 직전, 12일째 마지막 자침 후 2시간 뒤) 실시하였다.

5. 면역조직염색화학법

12일째 pole test 직후 군 당 6마리 씩 생쥐의 뇌를 적출한 후 면역조직염색화학법을 실시하였다. 생쥐들을 포란액(isoflurane, 중의 제약)으로 마취시킨 후, phosphate buffered saline(PBS)으로 관류를 하여 체내의 혈액을 모두 제거하고, 바로 4% paraformaldehyde(PFA) 용액을 관류 시켜 조직을 고정시키고 생쥐의 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌를 24시간동안 PFA에 담궈 완전히 고정시키고, 30% sucrose 용액에 담근 후 조직을 절편할 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 뇌 조직을 cryotome(Leica Microsystems, Wetzlar, 독일)을 이용하여 35 μm의 두께로 절편을 하였고, 흑질과 선조체를 선별하여 면역조직염색화학법을 실시하였다. 조직을 50 mM의 PBS로 5분간 3회 세척을 한 후, 50 mM PBS에 H₂O₂를 1% 농도로 넣고 15분간 반응을 시켰다. 그 후 일차 항체를 50 mM PBS에 1 : 1000의 비율로 희석한 용액에 조직을 넣은 후 상온에서 하루 동안 반응시켰다. 일차 항체로는 anti-tyrosine hydroxylase(TH) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 미국), anti-DAT antibody(Abcam, Cambridge, 영국), anti-caspase-3 antibody(Santa Cruz Biotechnology)를 각각 사용하였다. 그 후 이차항체(goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories Inc., Burlin-

game, CA, 미국)를 조직과 상온에서 1시간 동안 반응시키고, Avidin Biotin Complex(Vector Laboratories Inc.)를 만들어 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 마지막으로 diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc.)으로 발색한 후 slide glass에 mounting을 시키고, Axio Scope.A1 microscope(ZEISS, Germany)와 AxioCam ICc3 camera (ZEISS)를 이용하여 조직의 사진을 촬영하였다. 흑질의 도파민성신경세포의 수는 별도의 연구자가 어느 군인지 알지 못하게 한 상태에서 직접 세었으며, 선조체의 TH, DAT 및 caspase-3의 발현은 Image-Pro Plus 6.0(Media Cybernetics, Silver Spring, 미국) 프로그램을 이용하여 발현 정도를 측정하였다.

6. Western Blot

12일째 pole test 직후 군 당 6마리 씩 생쥐의 뇌를 적출하여 Western blotting을 실시하였다. 생쥐들을 CO₂를 이용하여 희생시킨 후, 생쥐의 흑질 및 선조체를 각각 채취하고, 이 조직에 RIPA buffer(LPS solution, 대전, 한국)와 phenylmethylsulfonylfluoride (Sigma, St. Louis, 미국) 용액을 넣어 분쇄기로 분쇄한 후, 원심분리를 이용하여 12,000 rpm에서 4°C를 유지하고 20분간 원심분리를 실시하였다. 그 후 상층액을 불순물이 섞이지 않게 채취하고, Bradford 방법을 이용하여 단백질의 양을 정량한 뒤, 샘플 당 30 μg의 단백질을 12% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하여 분리하고, 이를 nitrocellulose membrane(GE healthcare, Pittsburgh, 미국)에 옮겨 붙였다. Membrane을 tris-buffered saline(TBS)에 5% bovine serum albumin(Bovogen, Essendon, 호주)을 첨가한 용액에 담근 상태로 상온에서 1시간동안 blocking 한 후, 5% BSA가 함유된 TBS 용액에 일차항체를 1 : 1000으로 희석한 후 membrane을 넣고 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 일차항체로는 anti-phospho-Akt antibody(Cell Signaling, Danvers, 미국), anti-Akt-antibody(Cell signaling) 및 anti-β-

actin antibody(Santa Cruz Biotechnology)를 이용하였다. 그 후 membrane을 0.1% Tween-20이 함유된 TBS에 2차 항체를 1 : 2000으로 희석시킨 용액에 다시 담근 후 상온에서 1시간 반응시키고 enhanced chemiluminescence kit(Thermo Scientific, Rockford, 미국)를 이용하여 단백질의 발현을 확인하였다.

7. 자료분석

모든 자료는 평균±표준오차로 나타내었고, 모든 통계는 the Prism 5 for Windows(GraphPad Software Inc., La Jolla, 미국) 프로그램을 사용하였으며, 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 시행한 후 Neuman-Keuls post-hoc test를 사용해 그룹 간 사후 검정을 시행하였다. 유의수준은 p 값이 0.05 보다 적은 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 운동 능력 평가

Pole test를 이용하여 생쥐의 운동 능력을 평가하였다. MPTP 투여 전에 막대기 끝에서 바닥까지 내려오는 시간을 측정하고 결과 정상군은 13.29 ± 1.16 초, MPTP군은 13.04 ± 1.87 초, 후계군은

Fig. 2. Results of time spent in the pole test. The time elapsed before mice arrived on the ground from the 50 cm-high pole was measured.

Saline, saline-administrated group : MPTP, MPTP-administrated group : MPTP+SI3, MPTP-administrated group with acupuncture stimulation at SI3 : MPTP+GB34, MPTP-administrated group with acupuncture stimulation at GB34. Data shown are means±SEM. * $p < 0.05$ versus saline group, *** $p < 0.001$ versus MPTP group.

13.79 ± 3.62 초, 양릉천군은 13.04 ± 1.67 초가 소요되었으며, 군 간의 통계적 유의성은 없었다. 하지만 MPTP 투여 및 12번의 침 치료 후 다시 측정한 결과 정상군은 15.33 ± 1.87 초가 소요되었는데, MPTP군의 경우 32.75 ± 5.74 초가 소요되어 유의하게($p < 0.05$) 내려오는 시간이 증가하였다. 후계군도 23.14 ± 4.33 초가 소요되어 내려오는 시간이 정상군에 비해 느려졌지만 통계적 유의성은 없었으며, 양릉천군은 11.96 ± 0.86 초가 소요되어 MPTP군에 비해 유의하게($p < 0.001$) 빠르게 내려왔다(Fig. 2).

2. 흑질 및 선조체의 도파민성신경세포의 소실

MPTP 투여를 시작한지 12일 후에 흑질 내 도파민성신경세포의 수를 측정한 결과, 정상군($100 \pm 11.7\%$)에 비해 MPTP군의 도파민성신경세포가 유의하게 감소되었으며($44.72 \pm 7.63\%$, $p < 0.01$), 후계군 또한 정상군에 비해 도파민성신경세포가 유의하게 감소하였다($51.93 \pm 7.36\%$, $p < 0.01$). 하지만 양릉천군의 경우 정상군에

Fig. 3. Neuroprotective effects of acupuncture stimulation at GB34 in the substantia nigra.

Acupuncture stimulation at GB34 protected dopahydroxylase. Data shown are means±SEM. ** $p < 0.01$ versus saline group, # $p < 0.05$ versus MPTP group, † $p < 0.05$ versus MPTP+SI3 group.

비해 $90.22 \pm 10.71\%$ 의 도파민성신경세포가 생존해 있었는데, 이는 MPTP군($p < 0.05$) 및 후계군($p < 0.05$)에 비해 유의하게 신경세포의 파괴가 적었음을 나타낸다(Fig. 3).

TH의 발현 정도를 통한 선조체에서의 도파민성신경세포의 파괴 정도를 측정한 결과 또한 흑질과 유사한 결과를 보여주었다. 정상군($100 \pm 10.96\%$)에 비해 MPTP군($64.3 \pm 7.26\%$)의 TH 발현이 유의하게($p < 0.05$) 감소되었으며, 후계군 또한 발현이 감소되었으나(80.19 ± 8.87) 통계적 유의성은 없었고, 양릉천군은 MPTP군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 발현이 증가되었다($95.96 \pm 4.23\%$, Fig. 4).

3. 선조체 내 도파민수송체의 발현

MPTP 투여를 시작한지 12일 후 DAT의 발현을 조사한 결과, 정상군($100 \pm 4.40\%$)에 비해 MPTP군에서 DAT의 발현이 유의하게 감소되었음을 확인하였다($73.09 \pm 8.81\%$, $p < 0.05$). 후계군은 정상군에 비해 발현이 감소되었으나 통계적 유의성은 없었으나

($85.81 \pm 5.22\%$), 양릉천군의 경우 DAT의 발현이 $108.8 \pm 5.07\%$ 로 MPTP군($p < 0.01$) 및 후계군($p < 0.05$)에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

4. 선조체 내 caspase-3의 발현

MPTP 투여를 시작한지 12일 후 caspase-3의 발현을 조사한 결과, MPTP군의 경우 정상군($100 \pm 6.21\%$)에 비해 발현이 유의하게($121 \pm 4.66\%$, $p < 0.05$) 증가하였고, 후계군의 경우 발현이 약간 증가하였지만($115.9 \pm 2.94\%$) 유의하지는 않았다. 반면 양릉천군의 경우 caspase-3의 발현($103.2 \pm 3.55\%$)이 MPTP군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 6).

5. 흑질 및 선조체 내 Akt의 변화

MPTP 투여를 시작한 지 5일 후(마지막 MPTP 투여 후)와 12일 후의 흑질 및 선조체의 Akt의 변화 및 인산화 정도를 Western blotting으로 분석하였다. 흑질의 경우 MPTP 투여 5일 후 및 12일

Fig. 4. Neuroprotective effects of acupuncture stimulation at GB34 in the striatum.

Acupuncture stimulation at GB34 showed the neuroprotective effect significantly. Data shown are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ versus saline group, # $p < 0.05$ versus MPTP group.

Fig. 5. Dopamine transporter(DAT) expression in the striatum. Acupuncture stimulation at GB34 suppressed MPTP-induced destruction of DAT. Data shown are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ versus saline group, ## $p < 0.01$ versus MPTP group, † $p < 0.05$ versus MPTP+SI3 group.

Fig. 6. Caspase-3 expressions in the striatum. Acupuncture stimulation suppressed MPTP-induced increase of caspase 3. Data shown are means $\pm$ SEM, * p < 0.05 versus saline group, # p < 0.05 versus MPTP group.

후에 MPTP를 투여한 모든 동물의 Akt 인산화가 유의하게 감소되었으나, 양릉천군의 경우 MPTP 투여 12일 후에 흑질에서 MPTP군 및 후계군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다(p < 0.05). 선조체의 경우 MPTP를 투여한 모든 군에서 MPTP 투여 5일째에 Akt 인산화의 감소가 관찰되었으나 MPTP군에서만 유의하였으며(p < 0.05), MPTP 투여 12일 후에는 MPTP가 투여된 모든 군의 Akt 인산화가 감소되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 7).

고찰

본 연구는 양릉천 자침이 파킨슨병 동물 모델에서 동물들의 운동 기능을 회복시키고, 도파민성신경세포의 파괴를 억제하며, 흑질 내 Akt의 인산화를 증가시킨다는 것을 확인하였다.

『素問 至真要大論』의 病機十九條에서 “諸風掉眩 皆屬於肝”, “諸暴強直 皆屬於風”이라 하여 파킨슨병과 유사한 증상에 관하여 최초로 서술한 이래로, 巢元方은 『諸病源候論』에서 “筋得風熱則弛

Fig. 7. Changes of Akt activation by acupuncture stimulation at GB34 in the substantia nigra and striatum.

(A) Western blot analysis of phosphorylated Akt and total Akt. (B) Bar graph of quantitative and integrated Akt phosphorylation ratio (phosphorylated Akt/total Akt). Data shown are mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 versus saline group, # p < 0.05 versus MPTP group, † p < 0.05 versus MPTP+SI3 group.

縱得風冷則攣急”¹¹⁾이라 하였으며, 王肯堂은 『六科准繩』에서 “顫, 搖也. 振, 動也. 筋脈約束, 不住而莫能任物, 風之象也.”¹²⁾라 하였고, 기타 많은 문헌에서 파킨슨병과 유사한 증상들을 震顫, 痙, 瘓, 瘰, 瘰, 攣, 中風의 偏枯, 中膈症 등으로 표현하였는데⁴⁾, 이들은 모두 筋病 또는 風病의 범주에 속한다고 볼 수 있다. 따라서 역대 의가들은 파킨슨병의 증상이 風邪로 인한 筋의 문제로 발생하게 되었다고 인식한 것으로 판단되며, 그렇기에 본 연구에서는 팔회혈 중 筋會인 양릉천을 파킨슨병 치료 경혈로 선정하여 사용하였다.

실제로 행동실험 결과 양릉천에 침 치료를 받은 동물들은 침 치료를 받지 않은 동물들에 비해 유의하게 운동 기능을 유지하고 있는 것으로 나타났으며, 흑질 및 선조체의 도파민성신경세포의 파괴 정도를 확인한 결과 또한 양릉천 자침이 도파민성신경세포의 파괴

를 유의하게 억제하는 것으로 나타났다. 파킨슨병의 증상은 흑질 및 선조체의 도파민성신경세포의 파괴로 나타나기에, 양릉천 자침이 MPTP 투여로 인한 도파민성신경세포의 파괴를 억제함으로써 동물의 운동 기능을 유지시키는 것으로 사료된다. 이러한 양릉천 자침의 도파민성신경세포 보호 효과는 임상에서도 파킨슨병의 증상을 개선하거나 증상을 완화하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

도파민수송체는 축색돌기에서 방출된 도파민을 다시 신경세포 내로 재흡수하는 역할을 하는 구조물로, 발현량이 감소하게 되면 도파민의 재흡수가 어려워짐으로 인해 도파민성신경전달의 장애가 발생하게 된다. 또한 Kim 등의 연구에서는 양릉천 자침이 선조체의 도파민 대사를 활성화하고 도파민의 분비를 촉진함으로써 운동 기능을 회복시킨다고 보고하였는데¹³⁾, 신경세포 내 도파민의 양은 한정되어있으므로 지속적인 분비를 위해서는 도파민의 재흡수가 필수적이다. 본 연구에서는 MPTP를 투여하는 경우 도파민수송체의 발현이 감소되었으나, 양릉천에 자침하는 경우 도파민수송체의 발현량이 회복되는 것으로 나타났다. 이는 양릉천 자침이 MPTP로 인한 선조체 내 축색돌기의 파괴를 억제하고, 아울러 도파민의 재흡수를 정상화함으로써 도파민성신경세포의 기능을 유지시키고 운동 기능을 회복시키는 것으로 판단된다.

Caspase-3는 세포사멸에 직접적으로 영향을 주는 단백질이다¹⁴⁾. 본 연구에서는 MPTP 투여 시 선조체에서 caspase-3의 발현이 유의하게 증가되며, 양릉천 자침이 이를 유의하게 억제함을 확인하였다. 이는 양릉천 자침이 MPTP 투여로 인한 도파민성신경세포의 사멸을 억제하는 효과가 있음을 암시한다. 다만 caspase-3의 경우 활성화되어야 세포의 사멸을 유도하게 되는데, 본 연구에서는 caspase-3의 양을 측정하였을 뿐 그 활성화 정도는 확인하지 못했다. 이에 대해서는 추후 심도 있는 연구를 통해 확인할 것이다.

Akt는 세포 내에서 포도당 대사, 세포 사멸, 세포 분화, 전사, 세포 이주 등 다양한 세포의 기능에 관여하는 물질이다¹⁵⁾. 이 물질은 양릉천 자침 시 파킨슨병 동물 모델의 뇌 내 흑질에서 유의하게 증가하여 도파민성신경세포의 보호에 관여하는 것으로 알려져 있으나⁹⁾, 선조체에서도 변화가 있는가는 아직까지 밝혀진 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 선조체에서도 Akt의 발현이 유의하게 증가하는가를 확인하였다. 그 결과 Kim 등의 연구 결과처럼 MPTP 투여로 인한 흑질의 Akt 인산화의 감소 및 양릉천 자침으로 인한 Akt 인산화의 회복을 확인하였으나, 선조체의 경우 MPTP 투여 5 일째의 MPTP군을 제외하고는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이는 Akt의 인산화가 선조체보다 흑질에서 더욱 활발하게 일어나는 것을 의미하며, 또한 양릉천 자침이 Akt 이외의 다른 세포 보호 기전을 활성화 할 가능성이 있음을 암시한다. 이에 대하여 추가 연

구를 통한 증명이 필요하다고 판단된다.

결론

MPTP로 유도한 파킨슨병 동물 모델을 사용하여, 양릉천 및 후계 자침에 따른 파킨슨병의 치료 효과 및 기전을 비교하고 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MPTP로 유도된 생쥐의 파킨슨병 발병 정도를 pole test를 이용하여 비교, 평가한 결과 양릉천 자침이 MPTP로 인한 운동 장애를 유의하게 감소시켰다.
2. MPTP 투여는 흑질과 선조체의 도파민성신경세포를 유의하게 파괴시켰으나, 양릉천을 자침하는 경우 이 파괴가 유의하게 억제되었다.
3. MPTP 투여는 선조체 내 도파민수송체의 발현을 억제하였으나, 양릉천 자침이 도파민수송체의 발현을 회복시켰다.
4. MPTP 투여는 선조체 내 caspase-3의 발현을 증가시켰으나, 양릉천 자침이 이를 유의하게 억제하였다.
5. MPTP 투여는 흑질 및 선조체 내 Akt 인산화를 억제하였으나, 양릉천 자침이 흑질의 Akt 인산화를 회복시켰다.

이상을 종합해 볼 때, 양릉천 자침은 Akt 인산화를 촉진시킴으로써 MPTP로 유발된 파킨슨병 모델에서 나타나는 흑질 및 선조체의 도파민성신경세포 파괴를 억제하는 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 양릉천 자침이 실제 임상에서도 파킨슨병의 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 판단되나, 이에 대해서는 추가적인 연구가 더 필요하다.

감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea grant funded by the Korea government (MSIP)(No. NRF-2013R1A1A1005580).

References

1. Sian J, Gerlach M, Youdim MBH, Riederer P. Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. J Neural Transm. 1999; 106: 443-76.

2. Marjama-Lyons JM, Koller WC. Parkinson's disease. Update in diagnosis and symptom management. *Geriatrics*. 2001 ; 56 : 24-55, 29-30, 33-5.
3. Kim ST, Park HJ, Chae YB, Kim YJ, Kang MJ, Jung MY et al. Acupuncture at liver meridian Protects the dopaminergic neuronal damage in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mouse model. *Korean Journal of Acupuncture*. 2006 ; 23(4) : 169-76.
4. Park SM, Lee SH, Yin CS, Kang MG, Jang DI, Kang SG et al. Literature review on Parkinson's disease in Oriental medicine. *Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine*. 2004 ; 21(1) : 202-10.
5. Yim YK. Details of Meridians & Acupoints(Volume II); A guide-book for College Students. Daejeon : Jongryeonamu Publishing Co. 2012 ; 864.
6. Bai L, Cui F, Zou Y, Lao L. Acupuncture de qi in stable somatosensory stroke patients: relations with effective brain network for motor recovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013 ; 197-238.
7. Park HJ, Lim S, Joo WS, Yin CS, Lee HS, Lee HJ et al. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in therat Parkinson's disease model. *Experimental Neurology*. 2003 ; 180 : 93-8.
8. Liang XB, Liu XY, Li FQ, Luo Y, Lu J, Zhang WM, et al. Long-term high-frequency electro-acupuncture stimulation prevents neuronal degeneration and up-regulates BDNF mRNA in the substantia nigra and ventral tegmental area following medial forebrain bundle axotomy. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 2002 ; 108 : 51-9.
9. Kim SN, Kim ST, Doo AR, Park JY, Moon W, Chae Y et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acupuncture-induced dopaminergic neuron protection and motor function improvement in a mouse model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*. 2011 ; 121(10) : 562-9.
10. Abe K, Taguchi K, Wasai T, Ren J, Utsunomiya I, Shinohara T et al. Biochemical and pathological study of endogenous 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-induced Parkinsonism in the mouse. *Brain Research*. 2001 ; 907 : 134-8.
11. Chao Y. Treatise on the pathogenesis and manifestations of all diseases. Beijing : People's medical publishing house. 1982 ; 124.
12. Wang K. Standards of diagnosis and treatment of six branches of medicine. Seoul : Hansungsa. 1982 : 255-6.
13. Kim SN, Doo AR, Park JY, Bae H, Chae Y, Shim I et al. Acupuncture enhances the synaptic dopamine availability to improve motor function in a mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011 ; 6(11) : e27566.
14. Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 ; 272(41) : 25719-23.
15. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signalling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005 ; 9(1) : 59-71.