



SH-SY5Y 세포에서 MPTP로 유발된 파킨슨 질환의 세포 사멸에 대한 국산 프로폴리스 추출물의 저해 효과 및 분자 기전 탐색

김성국, 김효영, 김세건, 한상미, 유 식, 우순옥*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 양봉생태과

The Effect of Korean Propolis for Apoptosis by MPTP-mediated Parkinson's Disease and Its Molecular Mechanism in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

Sung-Kuk Kim, Hyo Young Kim, Se-Gun Kim, Sang Mi Han, Sik Ryu and Soon Ok Woo*

Department of Apiculture, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract

Parkinson's disease is representative neurodegenerative disorder in recent century. We investigated that the improvement effect of Korean propolis extracts on Parkinson's disease and its protein signal transduction in SH-SY5Y neuroblastoma cells. To apply MPTP in which caused Parkinson's disease and propolis extracts, we evaluated the optimal concentration by cell viability assay. MPTP and propolis extracts concentration is 1 mM and 10 µg/mL for SH-SY5Y, respectively. 1 mM of MPTP were triggered aggregation of α -synuclein and apoptosis. However, simultaneously treatment of propolis extracts with MPTP was inhibited aggregation of α -synuclein and apoptosis signaling. By Western blotting analysis, propolis extracts decreased the ubiquitination, PARP and caspase-3 activation. And propolis extracts prevented the releasing of cytochrome C from mitochondria to cytosol fraction and Inhibited Bak fragmentation. Especially, although phosphorylation of ERK, SAPK/JNK and p38 was strongly increased by MPTP, propolis extracts was inhibition phosphorylation of ERK and SAPK/JNK. In this study, we verified that the novel function of propolis extracts in Parkinson's disease improvement. Furthermore, we clarified the signaling molecule change of Parkinson's disease-related apoptosis by MPTP and propolis extracts. Therefore, we suggested that propolis extracts is a useful substance with functional components for improvement of neurodegenerative disease.

Keywords

Propolis extracts, MPTP, Parkinson's disease, α -synuclein, Phosphorylation

서론

파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)은 알츠하이머 (Alzheimer's disease, AD)에 이어 두 번째로 흔히 발병되는 신경퇴행성 질환으로서 임상적으로 경직, 떨림 그리고 비정상적인 자세가 특징이다(Fearnley and Lees, 1991). PD

는 뇌의 흑질 부위에 존재하는 도파민 분비 신경세포가 소실되는 것이 원인으로 현재 알려진 기전은 tyrosine hydroxylase (TH)의 생성 저해로 인한 도파민 결핍이다 (Zhu *et al.*, 2012). 그러나 PD에서 뉴런의 사멸에 대한 구체적 원인과 기전은 아직 알려져 있지 않고, 현재 가장 많이 보고된 원인으로서는 세포 내 활성 산소 증가에 따

른 산화 스트레스 증가와 미토콘드리아 기능 장애이다 (Pieczenik and Neustadt, 2007). 따라서 PD의 질환 치료를 목적으로 결핍된 도파민의 보충 및 항산화제를 사용하여 질환에 대한 개선 효과를 이끌어내는 방법이 많이 연구되고 있다(Zhou *et al.*, 2018). 하지만 아직까지 PD의 치료에 대한 근본적인 치료법은 소개되어 있지 않고 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

PD 환자들에게서 공통적으로 발견되는 조직학적 특징으로는 루이소체(Lewy body)이다. 루이소체는 세포 내 α -synuclein 단백질이 고밀도로 축적된 비정상적 세포 내 구조물로서(Langston *et al.*, 1998; Giasson *et al.*, 1999; Clayton and George, 1999; Luking and Brice, 2000), PD 환자들뿐만 아니라 AD 환자들에게서도 나타나는 특징 중의 하나이다. AD 환자들의 경우 아밀로이드 β 단백질이 응집된 플라크가 원인으로 보고되는데, 플라크 내의 아밀로이드 β 단백질 부위를 제외한 부분에서 α -synuclein이 발견되고 있다(Ueda *et al.*, 1993). 그러나 현상학적으로 α -synuclein의 과밀이 보고되었을 뿐, 현재 α -synuclein의 세포 내 생리학적 역할과 신경퇴화에 대한 관련성은 알려져 있지 않다. 현재 알려져 있는 α -synuclein의 역할은 다음의 세 가지 정도로 알려져 있다. ① Phospholipase D의 저해제(Jenco *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2000), ② 도파민 수송체와 상호작용(Lee *et al.*, 2001), ③ 세포 골격 단백질과의 상호작용(Crowther *et al.*, 2000)이다. 특히 세포 골격 단백질과의 상호작용은 protein kinase A에 의한 tau 인산화를 자극하고, 이로 인해 미세소관에 tau 단백질이 결합하지 못하도록 억제하게 된다. AD 발병 원인 중의 하나인 tau의 과인산화에 α -synuclein이 기여하는 것이다. 또한 세포 자살과 관련하여 α -synuclein은 extracellular signal-regulated kinase (ERK)2/MAPK (mitogen-activated protein kinase)에 결합하고 ERK2 활성화 인자와 복합체를 형성하여, MAPK 경로에 영향을 끼치게 된다. 특히 ERK/MAPK, stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 kinase의 세 요소들은 수많은 신경퇴행성 질환의 진행에 있어 세포 자살에 대한 기능을 담당하고 있다(Bhat and Zhang, 1999; Oh-hashii *et al.*, 1999; Mielke and Herdegen, 2000).

PD 질병 모델에서 가장 널리 사용되는 신경독소 모델은 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)를

사용한 것이다(Cui *et al.*, 2013; Jantas *et al.*, 2014). MPTP는 잘 알려진 신경 독성 물질로서 세포에 처리하면 대사 산물로서 1-methyl-4-phenylpyridium (MPP⁺)가 생성되는데, MPP⁺는 도파민 전달체를 통해 뉴런으로 들어가고 막 전위에 의해 미토콘드리아로 운반된다(Chiba *et al.*, 1985). 그 결과로 세포 내 산화 스트레스를 유발하고 세포 자살을 일으킨다(Pyszko and Strosznajder, 2014; Wang *et al.*, 2014). 이와 같은 과정들의 구체적인 관계는 아직 확립되지 않았지만, 단백질의 변형과 관련된 세포 내 전이 기전이 MPP⁺에 의해 유도된다는 사실을 시사하고 있다.

프로폴리스는 꿀벌이 밀원에서 수집한 식물의 삼출물과 꿀벌 자신의 타액을 혼합시켜 만든 수지성 물질로서, 곤충 또는 미생물과 같은 외부 침입자들로부터 벌집을 보호한다(Burdock, 1998). 인류 역시 프로폴리스의 항산화 및 항균 특성을 이용하여 고대부터 사용해왔다(Cavalaro *et al.*, 2019; Duca *et al.*, 2019). 프로폴리스는 다양한 플라보노이드와 폴리페놀 성분을 함유하고 있으며(de Groot, 2013), 이들 성분은 다양한 생리적 활성을 나타내고 있다(de Freitas *et al.*, 2017). 최근 들어, 프로폴리스의 생물학적 특성을 나타내는 성분들에 대한 연구가 이루어졌으며 그 결과, 프로폴리스에는 항균(Fernandes Junior *et al.*, 2005), 항산화(Zhang *et al.*, 2013), 항염증(Kim *et al.*, 2018) 그리고 항종양(Sforzin, 2007) 활성을 보임이 밝혀졌다. 이와 더불어 최근 플라보노이드 성분의 꾸준한 섭취로 인한 인지 기능 장애 질환 발병을 늦출 수 있음이 보고되었으며(Yeh *et al.*, 2021), 프로폴리스로 인한 tau의 과인산화 저해에 따른 인지 기능 개선에 대한 효과가 보고되었다(Kim *et al.*, 2021). 그러나 프로폴리스를 이용한 파킨슨 질환에 대한 연구는 프로폴리스의 항산화능에 의한 산화적 스트레스 효과 정도만 보고되었을 뿐, 구체적인 세포 내 신호 전달 기전 및 파킨슨 질환 표적 마커에 대한 효과는 알려진 바가 없다.

이에 본 연구에서는 대표적인 신경퇴행성 질환인 PD에 대한 프로폴리스의 기능적 효과를 확인하고자 하였다. 도파민성 뉴런과 유사한 인간 신경아세포종 SH-SY5Y 세포주에 MPTP와 프로폴리스를 처리하여 프로폴리스의 PD 질환 개선 가능성을 입증하고, 신경 독성 물질에 의한 세포 사멸을 저해할 수 있음을 세포 내 단백질 변화를 통해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Media & Reagents

SH-SY5Y 세포를 배양하기 위한 배지는 Gibco (U.S.A.)사의 minimal essential medium (MEM) 배지를 사용하였으며, 배지에 첨가하기 위한 penicillin-streptomycin 역시 Gibco사에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 GenDEPOT (Korea)사에서 구입하였으며, PD 세포 모델 적용을 위한 MPTP는 Sigma (U.S.A.)사에서 구입하였다. 프로폴리스 추출물과 MPTP의 세포 독성 평가를 위한 EZ-cytox solution은 두젠바이오 (Korea)의 제품을 사용하였다. Western blotting에 사용된 α -synuclein, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-SAPK/JNK, SAPK/JNK, phospho-p38, p38, ubiquitination, PARP 그리고 caspase-3는 Cell Signaling (U.S.A.)에서 구입하였으며, Bak 항체는 Abcam (U.S.A.)에서 구입하였다. Cytochrome C와 GAPDH는 Santacruz (U.S.A.)의 제품을 사용하였다.

2. 세포주 배양

실험에 사용된 인간 신경아세포종 SH-SY5Y 세포주는 한국 세포주은행에서 보관 중인 세포를 구입하였다. 세포 배양용 배지는 MEM 기본 배지에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10%의 FBS를 첨가하여 사용하였다. 세포는 37°C로 유지되고 5%의 CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다.

3. 프로폴리스와 MPTP의 세포 독성 측정

세포에 처리하기 위한 프로폴리스와 MPTP의 농도를 결정하기 위해 각 시약의 농도에 따른 세포 독성 효과를 검증하였다. 세포 독성 평가는 EZ-cytox MTT 평가법을 이용하였는데, SH-SY5Y 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주한 뒤, 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 세포에 프로폴리스 추출물은 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 그리고 100 μ g/mL의 농도 의존적으로, MPTP는 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 그리고 10 mM의 농도 의존적으로 처리하였다. 대조군으로서는 배지만 처리한 그룹과 프로폴리스 추출물을 용해한 에탄올을 처리한 그룹으로 설정하였으며, MPTP는 멸균 증류수에 용해하였기 때문에 배지만 처리한 그룹을 설정하고, 별도의 용매 대조군 그룹은 설정하지

않았다. 프로폴리스 추출물과 MPTP를 처리하고 24시간 후에 EZ-cytox 용액을 배지 부피의 1/10로 처리하여 2시간 동안 배양기에서 반응시켰고, microplate reader에서 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. Western blotting

SH-SY5Y 세포주에서 프로폴리스 추출물과 MPTP에 의한 세포 내 단백질 신호 변화를 확인하기 위해, 6-well plate에 2×10^5 /well의 세포를 접종하고, 24시간 후에 10 μ g/mL의 프로폴리스 추출물과 1 mM의 MPTP를 세포에 처리하였다. 이때 설정한 실험구는 다음과 같다.

①	Media
②	EtOH
③	1 mM of MPTP
④	10 μ g/mL of propolis extracts
⑤	1 mM of MPTP + 10 μ g/mL of propolis extracts

세포에 프로폴리스 추출물과 MPTP를 처리하고 단백질을 추출하기 전에 세포의 형태 변화 및 생존율을 측정하였다. 세포 형태 확인은 EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 현미경으로 촬영하였고, 세포 생존율은 EZ-cytox로 측정하였다. 측정 후 세포의 형태와 생존율을 비교하였다.

세포 단백질 추출은 1× PBS 용액으로 2회 수세한 후, 200 μ L의 NP-40 lysis buffer (Invitrogen, U.S.A.)를 첨가하여 cell scraper로 단백질을 추출하였다. 이후 17,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. Bicinchronic acid (BCA) 단백질 정량법으로 농도를 측정한 뒤, 20 μ g의 단백질을 Western blotting에 사용하였다. 5× SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% 2-Mercaptoethanol, 10% SDS, 0.5% Bromophenol blue, 50% Glycerol)를 1×의 농도가 되도록 첨가한 뒤, 100°C에서 10분간 끓여 단백질을 변성시키고 목적하는 단백질의 분자량에 따라 polyacrylamide gel에 전기영동하였다. 전기영동된 단백질은 transblot (Bio-Rad, U.S.A.) 장치를 이용하여 12 voltage에서 7분간 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하였고, 1× tris-buffered saline-tween 20 (TBS-T)에 2% non-fat dry milk (with 0.02% sodium azide)를 첨가한 용액으로 실온에서 1시간

반응시켜 단백질의 비특이적 반응을 차단하였다. 1차 항체로 사용된 α -synuclein, ubiquitination, PARP, caspase-3, phospho-ERK, ERK, phospho-SAPK/JNK, SAPK/JNK, phospho-p38, p38 항체는 1 : 1,000으로, cytochrome C, Bak 항체는 1 : 3,000으로, 그리고 GAPDH는 1 : 5,000으로 2% non-fat dry milk (with 0.02% sodium azide, in 1 × TBS-T)에 희석하여 실온에서 16시간 동안 반응시켰다. 항체 반응 후 1 × TBS-T 용액으로 membrane을 washing한 다음, 1차 항체의 host에 따라 2차 항체인 goat anti-mouse-HRP 또는 goat anti-rabbit-HRP를 5% non-fat dry milk (without sodium azide, in 1 × TBS-T)에 1 : 2,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후, 1 × TBS-T 용액으로 membrane을 washing하고 ECL pico detection system (GenDEPOT, Korea)으로 발색 후, ChemiDOC (Bio-Rad, U.S.A.)으로 단백질 변화를 검출하였다.

5. 통계 처리

실험을 통해 얻어진 결과의 통계 유의성은 R (3.4.1 version, NewZealand) 통계 프로그램을 이용하였으며, 실험상의 평균 유의성은 ANOVA 검정으로 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 프로폴리스 추출물과 MPTP의 세포 독성 평가

Fig. 1에서는 SH-SY5Y 세포주에 대한 프로폴리스 추출물 및 MPTP의 세포 독성에 대한 결과를 나타내었다. Fig. 1A에서는 프로폴리스 추출물에 대한 결과를 보여주고 있는데, SH-SY5Y 세포주에서 프로폴리스 추출물은 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 60%의 세포 생존을, 그리고 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 30%의 세포 생존을 나타냈다. 프로폴리스 추출물의 lethal dose (LD)는 두 농도 사이에서 나타나지만, 본 실험에서는 MPTP 독성에 대한 프로폴리스의 효과를 확인해야 하기 때문에, 프로폴리스 추출물은 세포에 독성을 나타내지 않는 농도로 설정해야 한다. 따라서 프로폴리스 추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 결정하였다. Fig. 2B는 MPTP에 대한 세포 독성을 평가한 것이다. MPTP의 경우 매우 높은 500 μM 의 농도에서 60%의 세포 생존을 나타냈고, 1 mM에서

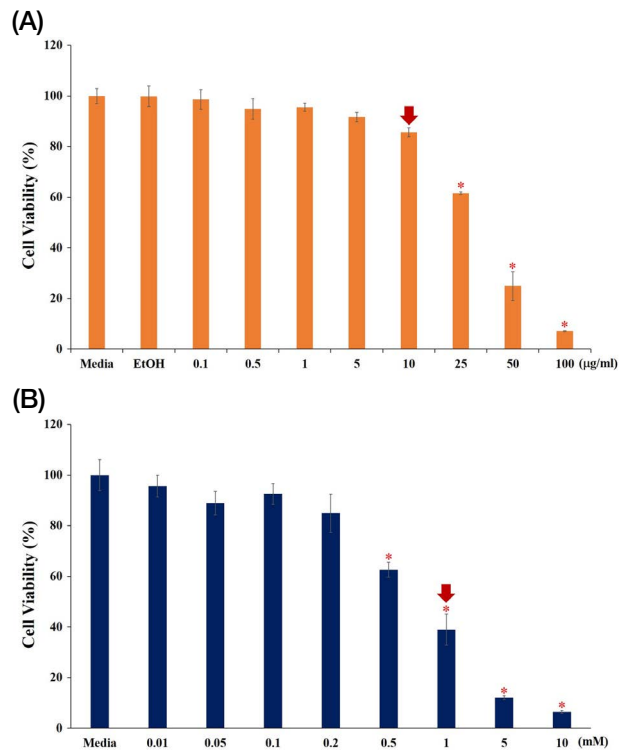


Fig. 1. Cytotoxicity of propolis extracts (A) and MPTP (B). MPTP and propolis extracts were treated on dose-dependent manner. 2×10^4 cells/well cells seeded on to 96-well plate. MPTP and propolis extracts incubated for 24 hr. Each experiment group repeats for 3-times.

는 40%의 세포 생존을 나타냈다. MPTP가 파킨슨을 유발하여 세포 사멸을 일으키는 신경 독성 물질이기 때문에 MPTP의 경우, 1 mM의 농도로 처리하여 세포에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

2. 프로폴리스 추출물과 MPTP 처리에 따른 세포 형태 및 생존 평가

프로폴리스 추출물과 MPTP의 세포 처리 농도를 결정한 다음, 세포에 MPTP와 프로폴리스를 동시에 처리하여 세포에 나타나는 변화를 확인하였다. 재료 및 방법의 Western blotting에서 설정한 조건에 따라 세포에 처리하고 나타나는 세포의 형태적 변화를 EVOS-XL-core 현미경으로 촬영하였다(Fig 2A). 세포의 형태적 변화를 촬영한 후, 세포의 생존율을 EZ-cytox solution으로 확인하였다(Fig 2B). Fig. 2A에서 확인된 것과 같이 프로폴리스만을 처리한 실험군에서는 세포의 독성이 일어나지 않고, 오히려 세포의 분화가 발생한 것과 같은 효과를 나타냈다. 1 mM의 MPTP를 처리한 세포군에서는 대부분의 세포가 사멸되

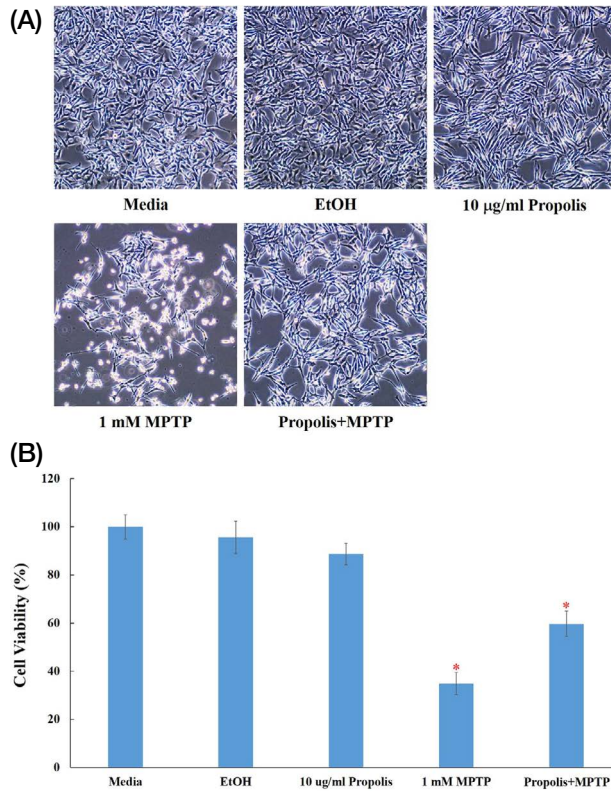


Fig. 2. Propolis extracts protect the SH-SY5Y cells from MPTP-induced apoptosis. 10 µg/mL of propolis extracts and 1 mM of MPTP was treated for 24 hr. Cell morphology observed with EVOS-XL core microscopy (A) and cell viability assay performed with EZ-cytox (B).

었으며, MPTP와 프로폴리스 추출물을 함께 처리한 세포에서는 MPTP만을 처리한 세포군에 비해 생존한 세포들이 더 많은 것으로 나타났다. Fig. 2B에서는 세포 형태 변화를 촬영한 후, 세포 독성 평가를 확인한 것인데, 1 mM의 MPTP를 처리한 세포군은 약 40%의 생존율을 나타냈고, MPTP와 프로폴리스를 동시에 처리한 실험군에서는 최대 60~70%의 생존율을 나타냈다. 이는 프로폴리스 추출물을 함께 처리함에 따라 MPTP의 세포 사멸 효과가 감소된 것을 의미하며, 프로폴리스가 파킨슨 유발 약제로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 나타낸다.

3. 프로폴리스 추출물에 의한 α -synuclein 및 ubiquitination의 감소

MPTP는 파킨슨 유발 신경 독성 물질로서 세포의 도파민 분비를 억제하는데, 주된 단백질 인자가 신경 세포 내 α -synuclein의 축적이다. Fig. 3A에서는 프로폴리스 추출

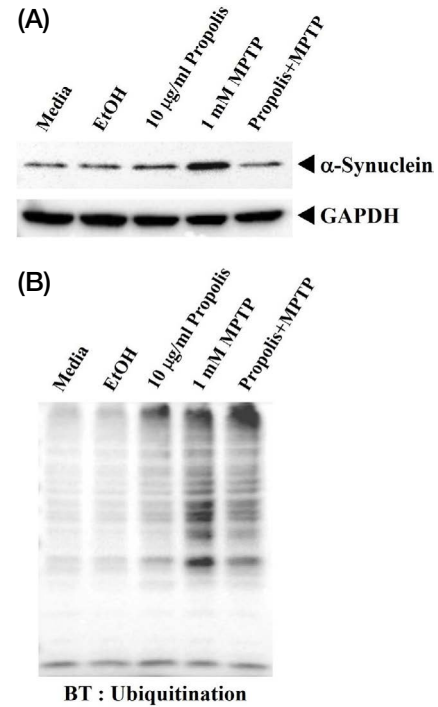


Fig. 3. Propolis extracts inhibits aggregation of α -synuclein by MPTP and ubiquitination by apoptosis. 20 µg of protein lysates were used in this experiments. Primary antibody were diluted in 2% non-fat dry milk at 1:1,000 and incubated for 16 hr at room temperature.

물과 MPTP 처리에 따른 α -synuclein의 Western blotting 결과이다. Housekeeping 단백질인 GAPDH의 양이 동일한 반면, α -synuclein 단백질의 양은 MPTP만을 처리한 실험군에서 증가했으며, 프로폴리스 추출물을 MPTP와 동시에 처리한 실험군에서는 α -synuclein의 양이 정상군과 동일한 수준으로 감소되었다. 즉, MPTP로 인한 α -synuclein의 발현 증가 및 축적을 프로폴리스 추출물이 저해하고 있는 것을 보여주고 있는 것이다. Fig. 3B에서는 세포 사멸에서 특징적으로 나타나는 ubiquitination의 결과를 나타낸 것이다. MPTP로 인해 α -synuclein의 증가는 결국 세포 사멸로 이어지는데, ubiquitination 역시 증가되었다. 그러나 프로폴리스 추출물을 처리함으로써 인해 α -synuclein의 발현이 감소되고, 동시에 세포 사멸을 저해함으로써 ubiquitination 역시 감소된 것으로 나타났다.

4. MPTP와 프로폴리스 추출물에 의한 세포 사멸 단백질의 발현 변화

α -Synuclein 및 ubiquitination의 단백질 발현 변화가

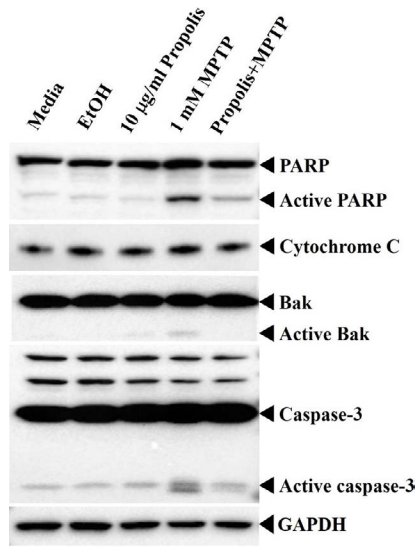


Fig. 4. Propolis extracts inhibits the apoptosis-related protein expression and protein modification by MPTP. 20 µg of protein lysates were used in this experiments. PARP and caspase-3 were diluted at 1 : 1,000 and cytochrome C and Bak were diluted at 1 : 3,000. Dilution solvent of all primary antibody was 2% non-fat dry milk and incubation time was 16 hr.

MPTP와 프로폴리스 추출물에 의해 변화됨을 확인하였는데, 세포 사멸과 관련된 세포 내 단백질의 변화에도 영향을 끼치는지 확인하고자 하였다. Fig. 4에서는 MPTP와 프로폴리스 추출물을 처리한 후 세포 사멸에 관련된 단백질의 변화를 Western blotting으로 확인한 것이다. 대표적인 사멸 단백질인 PARP, cytochrome C, Bak 그리고 caspase-3의 변화를 확인하였다. PARP의 경우 세포 사멸 신호가 발생할 경우 본래 110 kDa의 분자량을 가진 단백질에서 85 kDa의 크기를 가진 단백질 단편을 생성하면서 활성화되게 된다. MPTP 처리에 의해 PARP의 단편이 증가되었으며, 프로폴리스 추출물을 함께 처리한 결과 PARP의 단편이 감소되었다. Cytochrome C의 경우 세포 사멸 현상이 발생할 경우 미토콘드리아에 존재하던 단백질이 세포질로 방출되면서 양이 증가하게 된다. MPTP 처리로 인해 cytochrome C의 단백질이 세포질 부분에 약하게나마 늘어났으며, 프로폴리스 추출물로 인해 감소된 것으로 나타났다. 또한 cytochrome C의 방출에 영향을 끼치는 단백질이 Bak 단백질인데, Bak의 경우 세포 사멸이 발생할 경우 대표적으로 발현량이 증가하게 된다. 그러나 최근 연구 문헌에서 Bak의 발현뿐만 아니라 Bak의 단편화 역시 세포 사멸과 밀접하게 관련되어 있음이 보고되었다. MPTP의 처리에서도 Bak의 단편 현상이 나타났으며, 프로폴리스 추

출물을 처리한 결과 Bak의 단편화가 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다. 세포 사멸에서 대표적인 마커로 알려진 caspase-3의 경우, 세포 사멸이 발생할 시 PARP와 마찬가지로 fragmentation이 일어난 것이 특징이다. 활성화된 caspase-3는 17, 19 kDa의 작은 단편을 생성함으로써 세포 사멸이 촉진됨을 나타낸다. MPTP를 처리한 실험군에서는 caspase-3가 활성화되어 단편 생성이 증가하였다. 그러나 프로폴리스 추출물을 함께 처리했을 경우에는 caspase-3 단편의 생성이 감소한 것을 나타낸다.

이러한 일련의 세포 사멸 단백질 분자를 확인한 결과, MPTP로 인해 신경세포의 사멸 현상이 촉진되고, 프로폴리스 추출물이 이를 저해하여 세포 사멸을 억제하고 있음을 알 수 있다. 파킨슨 유발로 인한 α -synuclein의 발현 증가로 인한 세포 사멸 촉진이 프로폴리스 추출물로 인해 저해되며, 이는 프로폴리스 추출물이 파킨슨을 유발하는 신경 독성 물질로부터 세포를 보호함을 단백질의 분자 변화를 통해 입증한 것이다.

5. 세포 사멸 현상과 관련된 세포 내 신호 전달 추적

ERK, SAPK/JNK 그리고 p38 단백질은 세포 신호 전달 과정에 관련된 대표적인 MAPK로서 파킨슨 질병의 발병 및 진행에 중요한 역할을 담당하는 단백질 신호 분자이다. 이들 분자들은 세포 분열과 세포 사멸 양쪽에 관여하면서 세포의 항상성 유지에 밀접한 관련이 있다. Fig. 5에서는 MPTP와 프로폴리스 추출물을 처리한 세포에서 이들 단백질의 변화를 확인한 결과이다. 신호 전달과 관련된 단백질들은 대표적으로 단백질의 인산화를 통해 신호를 전달하며, 이 실험 결과에서도 세포 사멸과 관련된 주요 신호 변화가 나타났다.

특히 SAPK/JNK의 경우 스트레스로 매개된 신호가 전달되었을 때 인산화가 진행되는데, MPTP를 처리한 실험구에서는 단백질의 인산화가 크게 증가되어 있다. 프로폴리스 추출물을 함께 처리한 실험구에서는 이 단백질의 인산화가 감소되었는데, 이는 세포 사멸을 프로폴리스 추출물이 저해하는 결과와 일치한다. ERK 역시 MPTP로 인한 인산화가 크게 증가되었으나, 프로폴리스 추출물에 의해 인산화가 정상군의 수준으로 유지되고 있다. 그러나 p38의 경우 MPTP로 인한 인산화 증가에 대해 프로폴리스 추출물이 큰 영향을 끼치지 못하고 있는 결과로 나타났다. 이는 MPTP와 프로폴리스 추출물 간의 신호 전달 과정이

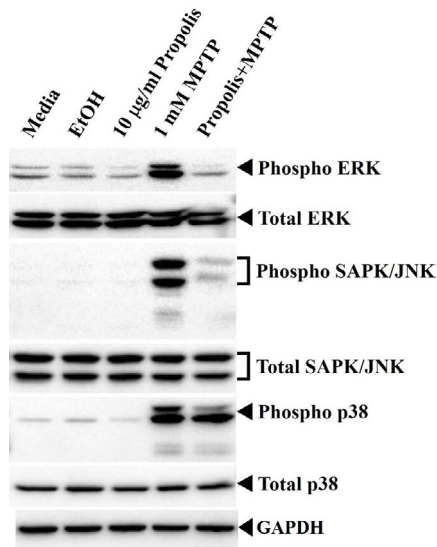


Fig. 5. Propolis extracts regulated the phosphorylation of cell signaling protein by MPTP. 20 µg of cell lysates were used in this blotting. All primary antibody were diluted in 2% non-fat dry milk at 1 : 1,000. Primary antibody incubation time is 16 hr at room temperature.

p38은 매개하지 않고, ERK와 SAPK/JNK 신호 경로를 통해 조절되고 있음을 의미하고 있다. 세 단백질 모두 단백질 자체의 양적 변화는 발생하지 않았으며, 인산화만을 조절하고 있었다. 즉, 신호 경로의 조절을 통해 세포 사멸 현상을 저해하는 프로폴리스 추출물의 효과를 나타낸다.

파킨슨 질병은 AD와 더불어 주된 신경퇴행성 질환으로서 완전한 치료가 어려운 질병 중의 하나이다. 특히 현대 사회가 고령화 사회로 접어들면서 파킨슨과 AD는 앞으로도 인류에게 있어 주된 질환이 될 것이다. 그러나 아직까지도 질병을 완전히 치료할 수 있는 약제는 개발되지 않은 실정이며, 그와 관련된 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서는 대표적인 양봉산물인 프로폴리스 추출물을 이용하여 파킨슨 질환을 억제할 수 있는 가능성을 확인하였다. 특히, 파킨슨과 관련된 세포 내 단백질 신호 경로를 추적함으로써 파킨슨 예방에 대해 주된 단백질 표지자를 함께 확인하였다. 이것으로 프로폴리스 추출물이 파킨슨을 예방하는 데 활용할 수 있는 근거가 됨을 보여주고 있다. 특히 파킨슨과 AD는 서로 밀접한 연관성을 가지고 있는 만큼 프로폴리스 추출물을 통해 퇴행성 신경질환을 예방할 수 있는 분자생물학적 근거를 마련하였다. 또한 인위적으로 합성한 약제가 아닌 천연물을 이용함으로써 보다 안전하게 활용할 수 있음을 나타내고 있다. 본 연구 결과를 통해 향후 신경질환과 관련된 프로폴리스 추출물의 주된 지

표 물질 선정과 형광 현미경을 통한 세포의 단백질에 대한 현상학적 연구 및 분자 기전을 구명하여 확실한 예방 기준을 마련해야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다연구사업 (과제번호: PJ 01512905)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Bhat, N. R. and P. Zhang. 1999. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* 72: 112-119.

Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.

Cavalaro, R. I., R. G. D. Cruz, S. Dupont, J. N. L. N. de Moura Bell and T. M. F. S. Vieira. 2019. In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chem.* 17: 4:100054. DOI: 10.1016/j.fochx.2019.100054.

Chiba, K., A. J. Trevor and N. Castagnoli. 1985. Active uptake of MPP⁺, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 1228-1232.

Clayton, D. F. and J. M. George. 1999. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58: 120-129.

Crowther, R. A., S. E. Daniel and M. Goedert. 2000. Characterisation of isolated α -synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurosci. Lett.* 292: 128-130.

Cui, W., Z. Zhang, W. Li, S. Hu, S. Mak, H. Zhang, R. Han, S. Yuan, S. Li, F. Sa, D. Xu, Z. Lin, Z. Zuo, J. Rong, E. D. -L. Ma, T. C. Choi, S. M. Lee and Y. Han. 2013. The anti-cancer agent SU4312 unexpectedly protects against MPP⁺-induced neurotoxicity via selective and direct inhibition of neuronal NOS. *Br. J. Pharmacol.* 168: 1201-1214.

de Freitas, M. C. D., M. B. de Miranda, D. T. de Oliveira, S. A. Vieira-Filho, R. B. Caligiome and S. M. de Figueiredo. 2017. Biological activities of red propolis: A review. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 11: 3-12.

de Groot, A. C. 2013. Propolis: a review of properties, applica-

- tions, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis* 24: 263-282.
- Duca, A., A. Sturza, E. A. Moacă, M. Negrea, V. D. Lalescu, D. Lungeanu, C. A. Dehelean, D. M. Muntean and E. Alexa. 2019. Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts. *Molecules* 24(18): 3368. DOI: 10.3390/molecules24183368.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees. 1991. Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301.
- Fernandes Junior, A., E. C. Balestrin, J. E. Betoni, O. Orsi Rde, L. da Cunha Mde and A. C. Montelli. 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 563-566.
- Giasson, B. I., K. Uryu, J. Q. Trojanowski and V. M. Y. Lee. 1999. Mutant and wild type human α -synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 274: 7619-7622.
- Jantas, D., A. Greda, S. Golda, M. Korostynski, B. Grygier, A. Roman, A. Pilc and W. Lason. 2014. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP⁺-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: The impact of cell differentiation state. *Neuropharmacology* 83: 36-53.
- Jenco, J. M., A. Rawlingson, B. Daniels and A. J. Morris. 1998. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synucleins. *Biochemistry* 37: 4901-4909.
- Kim, S.-K., S. M. Han, S. G. Kim, H. Y. Kim, S. Ryu and S. O. Woo. 2021. Inhibition of tau hyperphosphorylation and its molecular mechanism by Korean propolis extracts. *J. Apic.* 36: 169-176.
- Kim, S.-K., S. O. Woo, S. M. Han, S. G. Kim, K. W. Bang, H. R. Jang, H. J. Moon and H. J. Kim. 2018. Anti-inflammatory effects of Korean propolis extracts on Raw264.7 macrophage cells. *J. Apic.* 33: 187-194.
- Langston, J. W., S. Sastry, P. Chan, L. S. Forno, L. M. Bolin and D. A. Di Monte. 1998. Novel α -synuclein-immunoreactive proteins in brain samples from the Contursi kindred Parkinson's, and Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* 154: 684-690.
- Lee, F. J. S., F. Liu, Z. B. Pristupa and H. B. Niznik. 2001. Direct binding and functional coupling of α -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* 15: 916-926.
- Luking, C. B. and A. Brice. 2000. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1894-1908.
- Mielke, K. and T. Herdegen. 2000. JNK and p38 stress kinases - degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61: 45-60.
- Oh-hashii, K., W. Maruyama, H. Yi, T. Takahashi, M. Naoi and K. Isobe. 1999. Mitogen-activated protein kinase pathways mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 504-509.
- Oh, S.-O., J.-H. Hong, Y.-R. Kim, H.-S. Yoo, S.-H. Lee, K. Lim, B.-D. Hwang, J.H. Exton and S.-K. Park. 2000. Regulation of phospholipase D2 by H₂O₂ in PC12 cells. *J. Neurochem.* 75: 2445-2454.
- Piecznik, S. R. and J. Neustadt. 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol.* 83: 84-92.
- Pyszko, J. and J. B. Strosznajder. 2014. Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate in oxidative stress evoked by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in human dopaminergic neuronal cells. *Mol. Neurobiol.* 50: 38-48.
- Sforzin, J. M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113: 1-14.
- Ueda, K., H. Fukushima, E. Masliah, Y. Xia, A. Iwai, M. Yoshimoto, D.A.C. Otero, J. Kondo, Y. Ihara and T. Saitoh. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11282-11286.
- Wang, Y., J. Gao, Y. Miao, Q. Cui, W. Zhao, J. Zhang and H. Wang. 2014. Pinocembrin protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced neurotoxicity through the mitochondrial apoptotic pathway. *J. Mol. Neurosci.* 53: 537-545.
- Yeh, T.-S., C. Yuan, A. Ascherio, B. Rosner, W. Willett and D. Blacker. 2021. Long-term dietary flavonoid intake and subjective cognitive decline in US men and women. *Neurology* 97(10): e1041-e1056. DOI: 10.1212/WNL/000000000012454.
- Zhang, J. L., K. Wang and F. L. Hu. 2013. Advance in studies on antioxidant activity of propolis and its molecular mechanism. *China Journal of Chinese Materia Medica* 38: 2645-2652.
- Zhou, F., J. Ju, Y. Fang, X. Fan, S. Yan, Q. Wang, P. Wei, F. Duan, F. Miao, Z. Hu and M. Wang. 2018. Salidroside protected against MPP⁺-induced Parkinson's disease in PC12 cells by inhibiting inflammation, oxidative stress and cell apoptosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66(2): 247-253. DOI: 10.1002/bab.1719.
- Zhu, Y., J. Zhang and Y. Zeng. 2012. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease, CNS. *Neurol. Disord. Drug Targets* 11: 350-358.