

## MPTP 투여 파킨슨병 마우스 모델에서 유전자 및 DNA methylation 변화 관찰

강소희 연구원<sup>1</sup>, 김종선 교수<sup>1</sup>, 이지혜 교수<sup>2</sup>, 문창종 교수<sup>1</sup>, 김철 책임연구원<sup>3\*</sup>

1. 전남대학교 수의과대학
2. 세명대학교 한의과대학
3. 한국한의학연구원 한의약데이터부

### Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in MPTP-induced Parkinson's diseases mouse model

Sohi Kang<sup>1</sup>, Joong-Sun Kim<sup>1</sup>, Jihye Lee<sup>2</sup>, Changjong Moon<sup>1</sup>, Chul Kim<sup>3\*</sup>

1. College of Veterinary Medicine and BK21 Plus Project Team, Chonnam National University
2. College of Korean Medicine, Semyung University
3. KM Data Division, Korea Institute of Oriental Medicine

#### Abstract

This study aimed to establish an integrated network of DNA methylation and RNA expression in an 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease (PD) model and investigate epigenetically-regulated genes involved in PD development. In this model, MPTP impaired motor coordination as demonstrated by the rota-rod behavioral test. MPTP also decreased the expression of tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons in the substantia nigra (SN) of mice. We conducted genome-wide CpG-DNA methylation profiling through methylated DNA immunoprecipitation microarray and RNA sequencing using two substantia nigra samples from mice with MPTP-induced Parkinson's disease. We profiled genome-wide DNA methylation using Methyl-Seq and measured the transcriptome using RNA-Seq in murine SN in the following groups: vehicle-treated mice and MPTP-induced PD mice. In total, 280 differentially expressed genes were identified in association with the PD effect of

#### Correspondence: 김철(Chul Kim)

KM Data Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea

Tel: +82-42-868-9582, E-mail: chulnice@kiom.re.kr

Received 2021-10-14, revised 2021-11-26, accepted 2021-12-02, available online 2021-12-07

doi:10.22674/KHMI-9-2-10



MPTP. Among them, 201 were positively correlated, and 79 were negatively correlated downregulated genes. A total of 1,773 differentially methylated regions (DMRs) were identified between mice with control and MPTP-induced PD mice. Of these, 474 were hypermethylated, and 398 were hypomethylated DMR. A total of three interconnected genes, autophagy related 7 (atg7), tumor necrosis factor ligand superfamily member 12 (tnfsf12), and diglyceride kinase eta (dgkh), were identified from the integrated DNA methylation and gene expression networks involved Parkinson's disease development. These results indicate that modulating just three genes can effectively control the development of Parkinson's disease.

**Keywords:** Parkinson's disease, Animal disease model, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, DNA methylation

## 서론

파킨슨병(Parkinson's disease)은 노령인구에서 흔히 발병하는 신경 퇴행성 질환으로, 운동 장애를 특징으로 한다. 파킨슨병 환자에서 관찰되는 임상 증상은 떨림(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 운동 불능증(akinesia) 및 자세 불안정(postural instability)이 보고되고 있다<sup>1)</sup>. 파킨슨병의 특징적인 임상증상은 震顫, 痙攣, 痲痺, 攣 등의 한의학적 병증과 유사하며, 주로 肝腎陰虛, 氣血兩虛, 氣滯血瘀, 痰熱內阻로 변증되어 각각의 원인에 맞추어 치료하고 있다<sup>2)</sup>. 국내 파킨슨병 환자 중 76%가 기존의 약물치료 외의 치료법을 경험하였으며, 그 중 76.6%의 환자는 한의학에 기반한 치료를 받았다고 응답하는 등 파킨슨에 대한 한의학적 치료에 대한 관심이 높아지는 추세이다<sup>3,4)</sup>. 이에 다양한 임상 증례가 보고되고<sup>5,6)</sup>, 침치료 및 한약치료에 대한 임상연구의 체계적 고찰이 출판되는 등<sup>7-9)</sup> 파킨슨병에 대한 한의학 치료의 효능을 검증하기 위한 시도가 이어지고 있다.

한의학의 치료 기전의 객관적 규명에 대한 요구가 증가하면서, 전임상 모델을 활용한 치료기전 탐색 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>10,11)</sup>. 기전 탐색을 위한 전임상 연구에 사용하는 파킨슨병 동물 모델은 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 및 일부 농약과 같은 신경독성 유발이 있다. 이 동물 모델들은 신경독성 물질에 의한 뇌의 선조체에서 도파민의 감소와 흑색질에서 신경세포의 소실에 의한 파킨슨병 질환의 발병을 중점으로 두고 있다<sup>12)</sup>. MPTP에 의한 파킨슨병 동물 모델은 가장 흔하게 채택되고 있는 실험동물 모델로, MPTP가 혈액-뇌 장벽을 통과하면서 monoamine oxidase B (MAO-B)에 의해 MPP+로 대사된다. MPP+는 dopaminergic transporter (DAT)에 친화성이 높아 도파민성 세포 내로 침투하여 도파민 생성 세포를 파괴하거나 도파민 생성기전을 변화시켜 선조체에 도파민 함량을 감소시킴으로써 퇴행성 신경질환을 유발한다<sup>13,14)</sup>.

파킨슨병은 유전자 변형과 환경-유전자 상호작용의 결과로 표현된다. 후생유전적 변형은 노화와 관련되어 있으며 환경 자극에 의해 변화될 수 있다. 후생유전적 변화, 특히 DNA 메틸화는 아직 밝혀지지 않은 환자별 감수성과 파킨슨병 발병의 변수에 대해 설명 가능하며, 새로운 치료제 개발에 실마리를 제공할 수 있다.  $\alpha$ -synuclein (SNCA)의 메틸화와 미세섬유 관련 단백질인 tau 유전자의



발현은 후생유전-메틸화 연구에서 중요하며, 파킨슨병에 대한 환자 감수성에 대한 후보 유전자로서 연구되고 있다<sup>15)</sup>. 또한, MPTP 유발 파킨슨병 모델에서 치료제 개발을 위해, 후생유전자와 파킨슨병의 발생기전의 연관성을 파악하기 위한 선행연구가 진행되고 있지만, MPTP 유발 파킨슨병 모델에서 DNA 메틸화와 관련 유전자 발현의 연관성을 밝혀낸 연구는 아직 부족하다. 따라서, 본 연구는 MPTP 유도 파킨슨병 모델에서 DNA 메틸화 및 RNA 발현의 상관관계를 밝히고, 파킨슨병 발병에 매개하는 후생유전 조절 유전자를 조사하는 것을 목표로 한다.

## 본론

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

8주령, 무게 20~25 g의 수컷 C57BL/6 마우스 10마리를 오리엔트바이오에서 구입하여 사용하였다. 1주일 동안 동물 사육실에서 격리하여 순화과정을 거친 후, 실험을 진행하였다. 사육 환경은 온도 23±3℃, 습도 50±10%, 환기횟수 10-20회/h, 조도 150~300 Lux, 12시간 간격으로 명암 주기를 조절하였다. 모든 동물은 고품사료와 물을 자유 섭취시켜 사육하였고 모든 사육 기자재는 멸균하여 사육하였다. 모든 실험은 미국국립보건원(National Institutes of Health)의 규정에 따라 수행하였고, 국제동물복지법에 근거한 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인(Approval number: CNU IACUC-YB-2018-69)을 받아 실험을 진행하였다. 실험군은 대조군(CON)과 파킨슨병 마우스 모델군(MPTP)으로 분류하여 각 군마다 5마리씩 2개 군으로 나누어 실험하였다. 파킨슨병 임상증상 발현 확인 후, 마우스를 희생시켜 각 군의 3마리는 파킨슨병 발현 확인을 위해 면역블로팅과 면역조직화학염색을 수행하였고, 각 군의 2마리는 RNA 및 Methyl-seq을 수행하였다.

#### 2) MPTP에 의한 파킨슨병 마우스 모델

MPTP(30 mg/kg, in saline)를 1일 1회 8일간 복강에 투여하여 파킨슨병 유도 마우스 모델을 유발하였다. 실험동물은 MPTP 최종 투여 7일 후 행동학적으로 파킨슨병 임상증상 발현이 관찰되었다(Fig. 1a).

#### 3) 행동학적 검사

Open field test 행동검사는 MPTP에 의한 파킨슨병 마우스 모델에서 행동과 일반 활성을 측정하기 위한 가장 흔한 행동학적 검사법이며<sup>13)</sup>, TruScan Photo Beam Activity System (Coulbourn Instruments, Pennsylvania, U.S.A.)으로 측정하였다. Rota-rod test는 Open field test 직후에 측정되었으며, 회전하는 실린더 위에서 걷는 행동과 균형을 요구하기 때문에 사지 협응능력과 균형 능력을 측정할 수 있어, MPTP에 의한 파킨슨병 마우스 모델의 행동검사 지표로 활용되고 있다<sup>13)</sup>. Ugo Basile Rota-rod (Ugo Basile, Gemonio, Italy)로 Rota-rod 행동검사가 수행되었으며, 본 실험 3일 전에 하루 1회 적응기를 가졌다. 본 실험 수행시 회전축 속도는 5~20 rpm으로 서서히 높혀 2분간 측정하였다. 회전하는 실린더 위에서 걷는 시간을 지표로 하였으며 3회 반복검사 결과 값의 평균을 개체값으로 하였다.

#### 4) Tyrosine hydroxylase 발현 분석

행동학적 검사 후, 모든 실험동물은 85 mg/kg 알파산(Alfaxan; Careside, 경기도, 대한민국)과 10 mg/kg 자일라진(Rompun, 바이엘코리아, 서울, 대한민국) 합제로 마취 후 방혈을 통해 안락사 하였고, 대뇌 반구는 tyrosine hydroxylase (TH)의 단백질 발현양을 확인하기 위해 흑색질을 적출하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 이후, 선행연구와 같은 방법으로 면역블로팅을 수행하였다<sup>16)</sup>. 나머지 대뇌 반구는 조직병리학적 분석을 위해 뇌조직을 10% 중성 포르말린으로 고정하였으며, 포매 후  $4\ \mu\text{m}$  두께로 박절하였고, 도파민성 신경변화를 확인하기 위해 TH항체로 면역조직화학염색을 진행하였다.

#### 5) RNA-Seq 분석

대조군과 MPTP에 의한 파킨슨병 마우스는 안락사되어 뇌조직에서 흑색질을 적출했다. RNA-Seq 분석은 흑색질에서 추출한 total RNA를 사용하였다. RNA-Seq 분석은 선행연구와 같은 방법으로 진행하였다<sup>17)</sup>.

#### 6) Methyl-Seq 분석

대조군과 MPTP에 의한 파킨슨병 마우스 간에 후생유전학적 변화를 확인하기 위해 SureSelect Mouse Methyl-Seq kit (Agilent, California, U.S.A.)를 사용하여 Methyl-Seq 분석이 수행되었다. DNA library는 SureSelectXT Methyl-Seq Target Enrichment System Protocol (Agilent, California, U.S.A.)에 따라 준비되었고, Novaseq 6000 (Illumina, California, U.S.A.)로 시퀀싱 되었다. Methyl-Seq 분석은 선행연구와 같은 방법으로 진행하였다<sup>17)</sup>.

#### 7) 유전자 발현과 DNA 메틸화의 상관관계 분석

유전자 발현과 DNA 메틸화 사이에 반비례 관계가 있는 유전자를 식별하기 위해, 메틸화를 위해 유전자 발현 수준을 0~1로 조정하였다. 또한, 유전자 발현과 CpG 메틸화 사이의 상관관계를 평가하기 위하여 Spearman's correlation analysis를 시행하였다.

#### 8) 발현 단백질 간 상관관계 분석

필수 유전자 및 도파민성 유전자 후보군 데이터베이스는 STRING data base (PMID: 27924014; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924014>)에 입력하였다. STRING에서 최소 신뢰점수 0.4 이상인 결과값을 interaction source로 채택하였다.

#### 9) 통계처리

모든 실험의 결과는 평균값  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었으며, 대조군 대비 실험군간의 비교는 Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(\*p < 0.05).

## 2. 결과

### 1) 행동학적 검사

정상군과 MPTP 투여군 간의 행동학적 차이를 확인하기 위해 open field test 와 rota-rod test



를 실시하였다(Fig. 1). Open field test에서 정상군과 MPTP 투여군에서 이동거리 차이는 없었으며(CON:  $778.96 \pm 62.52$  cm, MPTP:  $649.40 \pm 91.09$  cm,  $p=0.27$ ; Fig. 1b), 이는 MPTP가 마우스의 기본행동에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. rota-rod test에서는 정상군에 비교하여 MPTP 투여군에서 회전하는 실린더에서 견디는 시간이 유의성 있게 짧게 관찰되었다(CON:  $120.20 \pm 17.94$  sec, MPTP:  $54.68 \pm 9.43$  sec,  $p<0.05$ ; Fig. 1c). 이러한 행동학적 변화는 기존의 MPTP-유발 행동학적 변화와 일치한다.

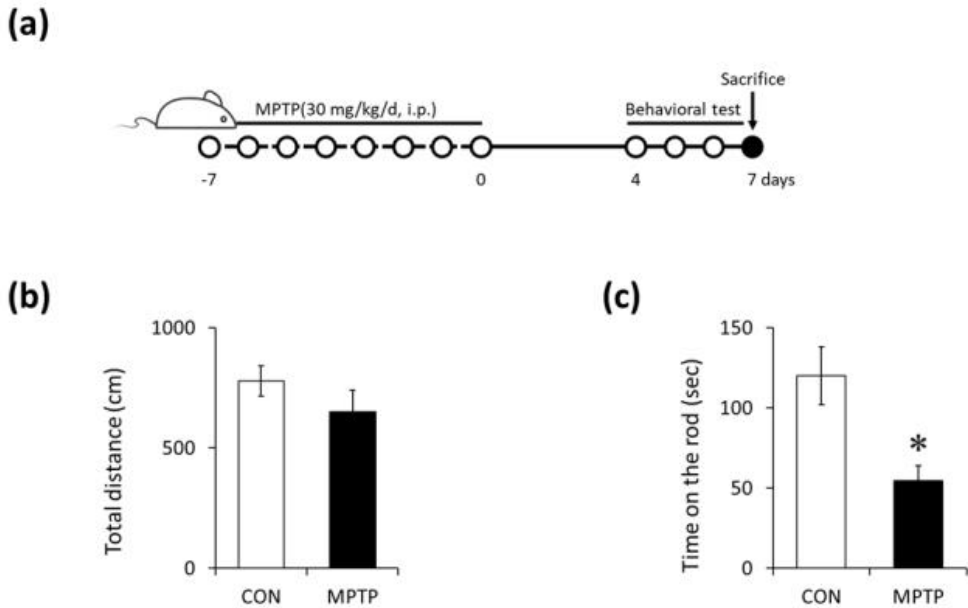


Figure 1. Neurotoxic effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in Parkinson's disease murine model. (a) Schematic diagram of drug treatment, tissue preparation, and behavioral test. (b) MPTP treatment showed no difference the total movement distance in the open field test behavior (n = 5 mice per group). (c) MPTP-induced PD model mice showed significantly decreased compared to saline-treated mice in the rota-rod test (n = 5 mice per group). Values are reported as mean  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$  vs. non-treated controls.

## 2) TH 발현 분석

MPTP에 의한 신경독성으로 유발되는 흑색질에서 TH의 발현에 대한 변화를 확인하기 위해 면역블로팅 및 면역조직화학염색 분석을 수행하였다. 면역블로팅으로 TH 단백질 발현 관찰 결과, TH 단백질 발현이 유의성있게 감소함을 확인하였다(CON:  $1.00 \pm 0.01$ , MPTP:  $0.49 \pm 0.08$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 2a). 조직학적으로 확인하기 위해 TH 염색 결과, 흑색질에서 TH가 유의성 있게 감소하는 것이 관찰되었다(CON:  $1.00 \pm 0.02$ , MPTP:  $0.74 \pm 0.05$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 2c). 이를 통해 MPTP에 의해 도파민성 신경세포가 감소하는 것을 확인하였다.

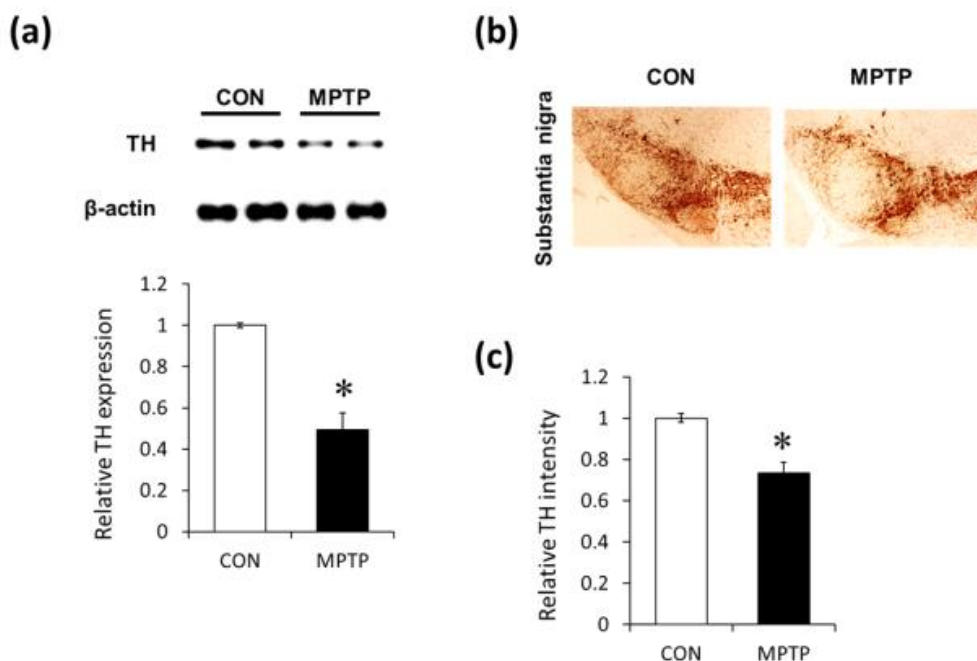


Figure 2. Expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra after MPTP treatment. (a) Immunoblotting for TH in the substantia nigra (n = 3 mice per group). (b) Immunostaining for TH-positive dopaminergic neurons in the substantia nigra. (c) histogram representing TH-positive cells in the substantia nigra (n = 3 mice per group). Values are reported as mean  $\pm$  SE, \* p < 0.05 vs. non-treated controls.

### 3) MPTP 유도 파킨슨 마우스 모델의 흑질에서의 mRNA 유전자 발현 프로파일

정상군과 MPTP 투여군 간의 유전자 발현을 비교하여 유의성있게 변화한 유전자는 280개가 관찰되었다. 이들 중 상대적으로 유의성있게 유전자의 발현이 상승한 유전자 201개, 감소한 유전자 79개가 확인되었다(Fig. 3). Gene ontology 분석을 통해 array 데이터 분석 결과 유의 유전자로 분석된 유전자들의 유의미한 정보를 제공하였다. Gene ontology 분석 결과 유전자 간의 상관관계를 검토한 결과 발현이 상승한 유전자는 (GO:0071679) commissural neuron axon guidance, (GO:0032436) positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, (GO:0006351) transcription, DNA-templated, (GO:0006355) regulation of transcription, DNA-templated, (GO:0031065) positive regulation of histone deacetylation, (GO:2001237) negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, (GO:0007266) Rho protein signal transduction, (GO:0050918) positive chemotaxis, (GO:0051056) regulation of small GTPase mediated signal transduction 및 (GO:0007268) chemical synaptic transmission과 관련되어 있었다. 반면, 발현이 감소한 유전자는 (GO:0032543) mitochondrial translation, (GO:0033157) regulation of intracellular protein transport, (GO:0000187) activation of MAPK activity, (GO:0016477) cell migration, (GO:0007399) nervous system development, (GO:0035556) intracellular signal transduction, (GO:0006882) cellular zinc ion homeostasis, (GO:0061512) protein local-

ization to cilium, (GO:0001764) neuron migration 및 (GO:0007575) respiratory gaseus exchange와 관련되어 있었다.

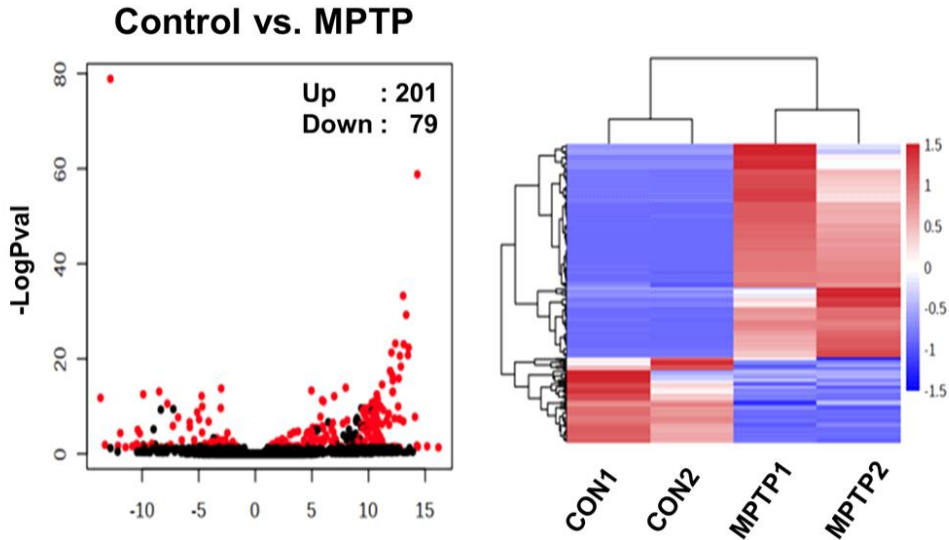


Figure 3. RNA-seq correlation analysis. Heatmap of differentially expressed genes between control and MPTP-induced Parkinson's disease groups (n = 2 mice per group).

4) MPTP 유도 파킨슨 마우스 모델의 흑질에서 DNA 메틸화 발현 프로파일

정상군과 MPTP 투여군 간의 DNA 메틸화 발현을 비교하여 q-value가 0.01 미만 수준으로 차이가 있는 hypermethylation이 474개, hypomethylation이 397개로 관찰되었다(Fig. 4a). 특히 Y염색체에서 다른 염색체에 비해 메틸화 영역이 많았고, hypomethylation이 3배 가량 높게 관찰되었다. Gene ontology 분석을 통해 methylation array 데이터 분석 결과 hypermethylation 영역은 (GO:0007275) multicellular organism development, (GO:0035904) aorta development, (GO:0016567) protein ubiquitination, (GO:0090090) negative regulation of canonical Wnt signaling pathway, (GO:0060976) coronary vasculature development, (GO:0060707) trophoblast giant cell differentiation, (GO:0043132) NAD transport, (GO:0007165) signal transduction, (GO:0048266) behavioral response to pain 및 (GO:0009968) negative regulation of signal transduction과 관련되어 있었다. 반면, hypomethylation된 영역은 (GO:0050680) negative regulation of epithelial cell proliferation, (GO:0007275) multicellular organism development, (GO:0030178) negative regulation of Wnt signaling pathway, (GO:0009952) anterior/posterior pattern specification, (GO:0008284) positive regulation of cell proliferation, (GO:0048008) platelet-derived growth factor receptor signaling pathway, (GO:003154) cell differentiation, (GO:0048013) ephrin receptor signaling pathway, (GO:0008285) negative regulation of cell proliferation, 및 (GO:0060048) cardiac muscle contraction과 관련이 있었다.



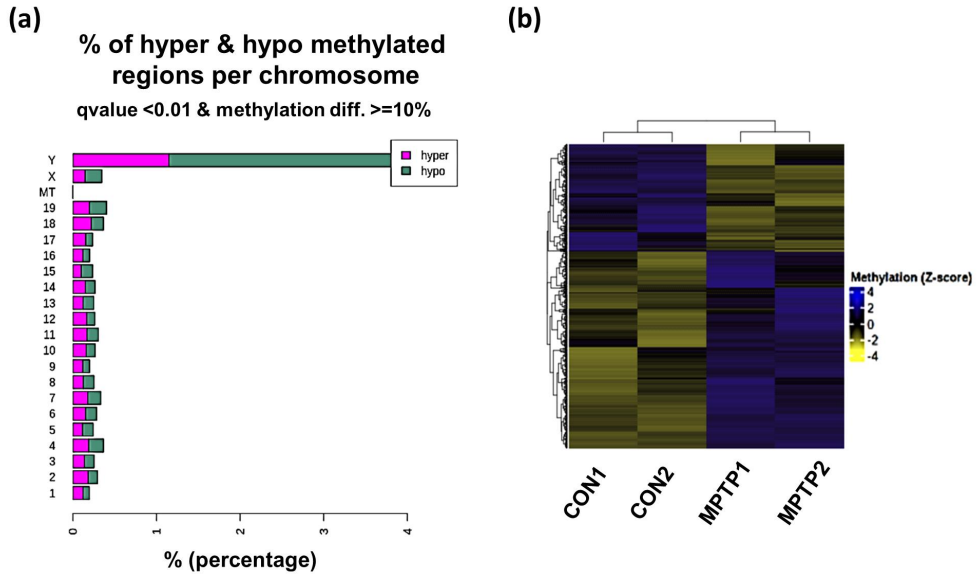


Figure 4. Methylation-seq correlation analysis. (a) Stacking bar graph showing percentage of hypermethylated and hypomethylated CpGs for each chromosome. (b) Heatmap of differentially methylated DNA between control and MPTP-induced Parkinson's disease groups (n = 2 mice per group).

5) Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes 비교  
 RNA-Seq 결과와 Methyl-Seq 결과를 비교하여 서로 같은 경향성을 보이고, 유의성 있게 변화된 유전자는 autophagy related 7 (atg7), tumor necrosis factor ligand superfamily member 12 (tnfsf12), and diglyceride kinase eta (dgkh)로 선별되었다(Table 1).

Table 1. Intersection of DNA hypomethylation changes with gene expression changes

	Gene	Transcript name	DMR_diff	fc
1	Atg7	NM_028835.4	-19.50	12.03
2	Tnfsf12	NM_011614.3	-25.65	10.05
3	Dgkh	NM_001081336.1	-44.61	5.32

### 3. 고찰

#### 1) MPTP-파킨슨병 동물모델의 유발

본 연구에서는 파킨슨병의 동물실험모델에서 관찰되는 후생유전적 변화를 확인하기 위해 가장 대표적인 MPTP 투여를 통해 질병을 유발하였다. MPTP 투여는 흑색질을 포함한 도파민 신경세포의 변성을 초래하여 파킨슨 유사 행동장애를 일으킨다<sup>13)</sup>. MPTP에 의한 행동학적 변화를 관찰하기 위해 open field test와 rota-rod test를 수행하였다. open field test에서 마우스의 총 이동거리는 변화하지 않았고, rota-rod에서 실린더 위에서 걷는 시간이 감소하였음을 확인하였다. 이를





통해 본 실험에서 MPTP는 보행활동에는 영향을 미치지 않지만, 파킨슨병 특유의 사지 협응능력과 균형능력이 감소하였으므로, 이는 파킨슨병 환자에서 보이는 임상적 증상이 유발되었음을 확인하였다. 또한, 파킨슨병 환자의 중추신경계에서 도파민은 매우 중요한 지표이므로, 실험동물 모델에서 중추신경계에서 도파민 합성에 중요한 효소인 TH 발현량을 확인하였다. MPTP-유발 파킨슨병 실험동물 모델에서 흑색질에서 TH 발현량이 현저하게 감소함을 확인하였다. 본 실험 조건 하에서 MPTP-유발 신경독성에 의해 파킨슨병 동물모델이 유발되었음을 확인하였다.

## 2) MPTP-파킨슨병 동물모델에서 후생유전적 변화

MPTP-유발 파킨슨병 동물모델에서 흑색질에서 RNA 및 DNA 메틸화 변화를 관찰하였다. RNA 발현이 변화된 유전자의 상관관계를 GOTERM\_BP\_DIRECT를 활용하여 검토한 여러 신호전달 경로 중, Rho GTPase의 과발현은 파킨슨병 발병과 관련되어 있다고 보고되어 있으며<sup>18)</sup>, Rho-GTPase를 조절하는 것이 파킨슨병 치료제 개발의 한 축이 되어 활발히 연구가 진행되고 있다<sup>19,20)</sup>.

후생유전학적인 연구는 다양한 질환에서 진행되고 있다. 파킨슨병 역시 다양한 후생유전학적인 기전에 따른 유전자의 발현 조절이 보고되어 왔다<sup>22)</sup>. 특히, DNA 메틸화는 아직 규명되지 않은 환자별 민감성과 파킨슨병 진행과정의 변수에 대해 설명할 수 있으며 새로운 치료법 개발에 실마리를 제공할 수 있다. 이번 연구 결과에서 DNA 메틸화 발현이 변화된 결과 871개 중, Y염색체에서 그 변화가 많이 관찰되었으나, 파킨슨병에서 Y염색체의 메틸화에 대해서는 더욱 많은 후속 연구가 필요하다. DNA hypermethylation의 상관관계를 GOTERM\_BP\_DIRECT를 활용하여 검토한 여러 경로 중, Wnt pathway의 억제제는 파킨슨병 발병과 관련되어 있다고 보고되어 있으며 세포에 MPP+ 투여했을 때 Wnt signaling이 억제되는 것이 본 연구와 맥락을 같이 한다<sup>22)</sup>. 또한, Wnt signaling은 도파민성 뉴런의 성장에 중요한 경로로 작용되고 있기 때문에, 파킨슨병 치료제의 실마리가 되어 여러 연구가 진행되고 있다<sup>23)</sup>.

mRNA sequencing 및 DNA 메틸화 분석된 유전자 가운데 DNA CpG region이 hypomethylation 되면서, mRNA 발현 수준이 유의성 있게 높아진 유전자를 확인한 결과 atg7, tnfsf12, dgkh 유전자가 선별되었다.

atg7 유전자는 autophagy related gene의 아형 중 하나로, 단백질 응집체나 세포기관을 제거하는 능력을 가진 자가식이 조절 기능을 하는 autophagic-lysosomal pathway에 관여한다<sup>24)</sup>. atg7 유전자의 발현이 감소하거나 억제되었을 때, 도파민성 뉴런의 감소,  $\alpha$ -synuclein의 축적과 같이 파킨슨병 유사증상이 관찰되고 있다<sup>25)</sup>.

tnfsf12 유전자는 tumor necrosis factor (ligand) superfamily 아형 중 하나로, 염증이거나 감염 환경에서 조직 및 혈청에서 두드러지게 증가하는 전염증성 사이토카인에 속한다<sup>26)</sup>. tnfsf12 유전자의 발현이 감소하거나 억제되었을 때, MPTP-유발 도파민성 뉴런의 손상 및 신경염증성 반응을 동반한 파킨슨병 유사증상이 관찰된다<sup>27)</sup>.

dgkh(DGK $\eta$ ) 유전자는 diacylglycerol kinase (DGK)의 아형 중 하나로, 성장인자/사이토카인 매개 세포증식 및 운동성, 발작, 면역반응, 심혈관계 반응, 포도당 대사 등 다양한 생물학적 event에서 중요한 역할을 하고 있어 다양한 질병 발현에 관여하고 있다<sup>28)</sup>. DGK의 아형 중, DGK $\theta$ 가 파킨슨병 발병과 관련있는 유전자로 연구되어 있지만, 파킨슨병 환자 사후 뇌조직에서 DGK $\eta$ 의 유의성 있는 발현차이가 관찰되었으며<sup>29)</sup> DGK $\eta$ 와 파킨슨병 발병의 연관성에 대한 후속 연구가 필요하다.

이상으로, MPTP 투여된 마우스의 흑색질에서 파킨슨과 관련된 다양한 유전자는 DNA 메틸화를

통해 유전자의 변화를 유도하고 있다. 특히 atg7, tnfsf12, dgkh 유전자에서 DNA 메틸화 조절에 따라 유전자 발현 조절이 이루어졌음을 확인하였지만, 이들 유전자 상호관계에 대한 연구가 아직 부족한 실정이다. 각 유전자 발현 조절에 따른 파킨슨병 발병 기전을 규명하기 위해서 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 결론

震顛, 痲痺, 痲痺, 攣 등의 한의학적 병증과 유사한 파킨슨병의 연구에 가장 널리 사용되는 동물모델인 MPTP에 노출된 동물모델에서 mRNA 및 DNA methylation의 변화를 확인하고자 하였다.

1. MPTP 투여는 마우스에서 사지 협응능 실조 등 행동증상 및 뇌내 도파민성 뉴런의 감소를 나타내기 때문에 파킨슨병 동물모델로 적합하다.
2. MPTP 투여군에서 파킨슨병 유발과 관계가 있는 Rho-GTPase pathway 관련 유전자의 활성이 확인되었다.
3. DNA의 메틸화 조절에 따라 atg8, tnfsf12, dgkh 유전자의 발현이 조절되었으며, 이 유전자는 파킨슨병 발병과 관련이 있음을 확인하였다.

추후, 유전자 발현조절 치료제 개발을 위한 기초연구로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 「동의보감 충부약재 활용기반 구축」 과제(KSN1812410) 및 한약표준자원활용기술 개발(KSN2012320)의 지원으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Balestrino R, Schapira A. Parkinson disease. *European journal of neurology*. 2020;27(1):27-42.
2. Park SM, Lee SH, Yin CS, Kang MK, Chang DI, Kang SK, et al. Literature Review on Parkinson's disease in Oriental medicine. *Journal of Acupuncture Research*. 2004;21(1):202-10.
3. Kim SR, Lee TY, Kim MS, Lee MC, Chung SJ. Use of complementary and alternative medicine by Korean patients with Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2009;111(2):156-60.
4. Lim SY, Kim HR, Choi YS, Lee I. Review of Current Clinical Studies for Herbal Medicine of Parkinson's Disease in Traditional Chinese Medicine. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2016;30(5):327-37.
5. Han IS, Sun SH. Effect of Acupuncture and Moxibustion Treatment in a Patient with Parkinson's Disease-A Case Study. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;3



- 9(2):286-91.
6. Lee SJ, Ha JB, Lew JH. A Case Study of Parkinson's Disease Patient with Anorexia and Nausea Treated with Korean-medicine Treatment including Hyangsayukgunja-tang. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2020;41(5):717-23.
  7. Lee MS, Shin BC, Kong JC, Ernst E. Effectiveness of acupuncture for Parkinson's disease: a systematic review. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2008;23(11):1505-15.
  8. Lee HS, Park HL, Lee SJ, Shin BC, Choi JY, Lee MS. Scalp acupuncture for Parkinson's disease: a systematic review of randomized controlled trials. *Chinese journal of integrative medicine*. 2013;19(4):297-306.
  9. Kim WK, Kim LH, Jang IS. A Review Study of Scalp Acupuncture for Parkinson's Disease in China. *Journal of oriental neuropsychiatry*. 2011;22(4):11-20.
  10. Kim HG, Sim Y, Oh MS. Anti-parkinsonian effect of Cyperi Rhizoma via inhibition of neuroinflammatory action. *The Korea journal of herbology*. 2013;28(5):21-8.
  11. Heo H, Han J, Jeong M, Kim H, Jang I. A Review of the Neuroprotective Effects of Cinnamon in Experimental Studies on Parkinson's Disease. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2020;41(6):1089-99.
  12. Kin K, Yasuhara T, Kameda M. Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(21):5402.
  13. Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 2001;125(1-2):109-25.
  14. Kim TE, Yoon YM, Park YI, Kim YS, Jeon BH, Kim MD. Screening of the Biological Activity from Water Extracts of the Medicinal Plants and the Protective Effect of *R. palmatum* on MPTP-induced Neurotoxicity. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2004;18(6):1666-85.
  15. Wüllner U, Kaut O, deBoni L, Piston D, Schmitt I. DNA methylation in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2016;139:108-20.
  16. Lim HS, Kim JS, Moon BC, Choi G, Ryu SM, Lee J, et al. Cicadidae Periostracum, the Cast-Off Skin of Cicada, Protects Dopaminergic Neurons in a Model of Parkinson's Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
  17. Kim JS, Shin IS, Shin NR, Nam JY, Kim C. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in an ovalbumin-induced asthma mouse model. *Molecular medicine reports*. 2020;22(3):1709-16.
  18. Iyer M, Subramaniam MD, Venkatesan D, Cho S-G, Ryding M, Meyer M, et al. Role of RhoA-ROCK signaling in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*. 2020;173815.
  19. Zhou Z, Kim J, Insolera R, Peng X, Fink DJ, Mata M. Rho GTPase regulation of  $\alpha$ -synuclein and VMAT2: Implications for pathogenesis of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2011;48(1):29-37.
  20. Musilli M, Ciotti MT, Pieri M, Martino A, Borrelli S, Dinallo V, et al. Therapeutic



- effects of the Rho GTPase modulator CNF1 in a model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2016;109:357-65.
21. Kwok JB. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics*. 2010;2(5):671-82.
  22. Zhang L, Deng J, Pan Q, Zhan Y, Fan J-B, Zhang K, et al. Targeted methylation sequencing reveals dysregulated Wnt signaling in Parkinson disease. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(10):587-92.
  23. Parish CL, Thompson LH. Modulating Wnt signaling to improve cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Journal of molecular cell biology*. 2014;6(1):54-63.
  24. Pitcairn C, Wani WY, Mazzulli JR. Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in Gaucher and Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2019;122:72-82.
  25. Ahmed I, Liang Y, Schools S, Dawson VL, Dawson TM, Savitt JM. Development and characterization of a new Parkinson's disease model resulting from impaired autophagy. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(46):16503-9.
  26. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2008;214(2):149-60.
  27. Machado V, Zöller T, Attaai A, Spittau B. Microglia-mediated neuroinflammation and neurotrophic factor-induced protection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease-lessons from transgenic mice. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):151.
  28. Sakane F, Mizuno S, Komenoi S. Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases: an update. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4:82.
  29. Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, Van Dongen JW, Kruse CG, Swaab DF, et al. Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. *Brain pathology*. 2009;19(1):91-107.

