



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

A53T 돌연변이 파킨슨병 백서모델에서
그래핀 양자점 투여에 따른 치료효과

Therapeutic effects of injections of Graphene quantum dots
in a A53T overexpressed Parkinson's disease rat model

울산대학교 대학원

의 학 과

서 동 광

A53T 돌연변이 파킨슨병 백서모델에서
그래핀 양자점 투여에 따른 치료효과

지도교수 전 상 용

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원

의 학 과

서 동 광

서동광의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원 김 정 훈 (인)

심사위원 전 상 용 (인)

심사위원 박 진 훈 (인)

심사위원 정 상 준 (인)

심사위원 최 일 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 2월

국문요약

노령화사회가 되면서 그에 따라 파킨슨병의 유병율이 높아지고 있으나, 치료법은 아직까지 레보도파, 뇌심부 자극술과 같이 위험성과 부작용이 있는 치료에 국한되어 있다. 병태생리적 접근을 통한, 보다 안전한 새로운 치료에 대한 필요성이 요구되며, 이와 관련하여 그래핀 양자점 투여를 통한 파킨슨병 치료를 시도하였다.

본 실험은 파킨슨병의 병태생리 중 하나인 a-synucleinopathy 을 유발시키기 위해 21 마리의 백서를 대상으로 a-synuclein 을 과발현하는 돌연변이 유전자를 탑재한 바이러스(AAV-A53T)를 우측 중뇌 흑색질(substantia nigra)에 정위적으로 주입한 파킨슨병 동물 모델을 만들었다. AAV-A53T 를 주입한 2 주 후부터 일부의 백서들에게 그래핀 양자점을 다른 2 가지 용량(1mg/day 또는 0.5mg/day)으로 10 일간 매일 복강내 투여했으며, 이를 3 개의 그룹(파킨슨병 대조군(PD control, n=8), 고용량 그래핀 양자점 투여군(HD graphene group, n=7), 저용량 그래핀 양자점 투여군(LD graphene group, n=6))으로 분류하였다. 기저상태와 파킨슨병 동물 모델로 제조된 후의 상태확인 및 투여된 그래핀 양자점의 치료효과를 확인하기 위해 행동검사(adjusting stepping test)를 AAV-A53T 주입 전 과 주입 후 2,3,4 주차에 각각 시행하였다. 주입한 31 일째 사후조직학적 평가를 통하여 치료효과를 검증하였으며, 3 종류의 면역형광염색(tyrosine hydroxylase(TH, dopaminergic neuron marker), Iba-1(inflammatory microglia marker), a-Syn(a-synuclein))을 이용하였다.

행동검사는 세 그룹 모두 AAV-A53T 주입한 후 2 주차에 기저상태보다 병변 반대측의 step 수가 감소하였으며, 그래핀 양자점을 투여한 2 그룹(HD graphene, LD graphene)은 모두 PD control 그룹보다 3 주차, 4 주차에 병변 반대측의 step 수가 점차 개선됨이 통계적으로 유의하였다 (*p<0.05).

사후 면역형광염색에선 a-Syn 으로 염색 시 PD control 그룹의 병변 측은 건 측에 비해 발현이 증가되어 있으나, 그래핀 양자점을 투여한 2 그룹은 PD control 그룹보다 감소되어서 그래핀 양자점의 a-synuclein 에 대한 효과를 확인할 수 있었다(*p<0.05). TH 염색에선 그래핀 양자점을 투여한 2 그룹 모두에서 PD control 그룹보다 병변 측에서 발현이 증가하였고(*p<0.05), Iba-1 염색에선 세 그룹 모두의 병변 측에서 유의미한 변화

를 확인하진 못했다.

본 연구는 도파민 분비 신경세포의 neuroinflammation 을 일으키는 주 원인인 α -synuclein 단백을 과발현하는 돌연변이 바이러스를 중뇌 흑색질에 정위적으로 주입하여 만든 파킨슨병 백서 모델을 통하여 복강내 투여한 그래핀 양자점이 파킨슨병에 치료 효과가 있음을 행동검사와 사후 면역형광염색 검사를 통해 확인하였다.

차 례

| | |
|-----------------------|----|
| 국문 요약 | i |
| 그림 목차 | iv |
| 서론 | 1 |
| 재료 및 연구방법 | 3 |
| 1. 실험동물 | 3 |
| 2. 파킨슨병 동물 모델 제조 | 3 |
| 3. 실험 그룹과 그래핀 양자점의 주입 | 4 |
| 4. 행동검사 | 4 |
| 5. 면역형광염색 | 5 |
| 6. 통계분석 | 6 |
| 결과 | 7 |
| 1. 행동검사 | 7 |
| 2. 면역형광염색 | 7 |
| 고찰 | 9 |
| 결론 | 12 |
| 참고문헌 | 19 |
| Abstract | 22 |

그림 목차

| | |
|---|----|
| Figure 1. Animal preparation for a PD rat model | 13 |
| Figure 2. Intraperitoneal injection of graphene quantum dots | 14 |
| Figure 3. Subjects and experimental timeline | 15 |
| Figure 4. Adjusting stepping test | 16 |
| Figure 5. Immunofluorescent staining of TH, Iba-1 and a-Syn | 17 |
| Figure 6. Immunofluorescent staining and analysis | 18 |

서론

우리나라는 2000 년에 노인인구가 전체인구의 7%를 넘어서며 고령사회에 진입했으며, 2017 년에 노인인구 14.2%를 기록하며 고령사회로 진입했다. 그리고 2026 년경엔 20%를 넘어 초고령사회에 도달할 것으로 예측되고 있다[1]. 국내에 보고된 바로는, 파킨슨병은 60 세 이상 노령인구에서 1%, 70 세 이상 노령인구에서는 3.4%의 높은 발병률을 보이며, 노인 인구의 비율이 증가하면서 파킨슨병의 발병률이 증가하였다. 파킨슨병의 국내 총 환자수는 2010 년에 10,606 명에서 2015 년에는 15,838 명으로 증가하여 5 년 동안 40%이상 증가하였으며, 파킨슨병의 유병률은 2010 년에 10 만명당 115.9 명의 환자가 2015 년에는 139.8 명으로 증가하여 5 년 동안 15%이상 증가하였다[2]. 따라서 파킨슨병과 관련한 의료 산업의 규모는 전 세계적으로 급속히 증가하고 있어서 이에 따른 학문적인 관심 뿐 아니라, 경제 사회적 중요성도 점차 증대되고 있다[3].

파킨슨병 치료에 있어서 최적표준(gold standard) 치료방법은 레보도파 복용으로써 1960 년대부터 사용하고 있으며 현재까지 거의 대다수의 환자들이 도파민 치료에 의존하고 있다[4]. 하지만 파킨슨병이 점차 진행됨에 따라 도파민 신경이 소실되면서 레보도파에 의한 도파민 분비량을 조절하기 어렵기 때문에 레보도파 복용에 따른 부작용(운동동요와 운동이상 등)이 나타나는 현실이다[5, 6]. 이러한 레보도파의 단점을 보완하기 위해 전기적 뇌 심부 자극술(Deep brain stimulation)이 실시되어 왔지만, 치료 효과가 나타나지 않는 경우가 있고 부작용이 나타나는 경우가 있었다[7]. 무엇보다 질병의 근본적인 원인에 관한 치료방법은 현재까지 존재하지 않았다. 따라서 도파민의 공급측면이 아닌 파킨슨병 병리 생리학에 의거한 새로운 치료법의 도입이 필요하다[8].

지난 수십 년간 수행한 병인생리학 연구에 의하면 파킨슨병 진행에 있어 가장 중요한 인자는 α -synuclein 의 응집과 oxidative stress 등에 의한 neuroinflammation 이다[9]. 그래핀 양자점은 α -synuclein 의 응집을 억제하고 inflammation 에 치료효과가 있는 물질로써 최근 여러 분야에서 보고되었다[10-12]. 따라서, 본 연구에선 그래핀 양자점이 파킨슨병에 다양한 측면에서 치료효과가 있는지 동물 실험을 통하여 입증하려 한다.

파킨슨병 동물모델을 제작하는 알려진 방법으로는 6-hydrodopamine 유발 파킨슨병 백서모델[13]과 α -synuclein 과발현 파킨슨병 백서모델이 있다[14]. 본 연구에서는

A53T 돌연변이 a-synuclein 과발현 바이러스를 투여하여 제작한 파킨슨병 백서모델을 이용하여 실험을 진행했다. 파킨슨병을 일으키는 유전자 가운데 가장 잘 알려진 것 중 하나인 a-synuclein 는 파킨슨병의 병리소견인 루이소체를 일으키는 주요 축적물이며, 몇 가지 돌연변이를 나타낼 때 더욱 응집이 잘 되어 독소로써 작용하게 된다[15]. 그 가운데에 가장 잘 알려진 돌연변이인 A53T 유전자를 CAG 프로모터 하에 발현시킬 수 있는 Adeno associated virus (AAV-A53T)를 제작하여 생쥐의 중뇌 흑색질(Substantia nigra pars compacta, SNpc)에 정위적으로 주입하면, 중뇌 흑색질에 A53T 유전자변이 a-synuclein 이 과발현하게 된다. 이 바이러스를 주입 후 1달 정도가 지나면 주입한 편측의 중뇌 흑색질 도파민성 신경세포의 광범위한 퇴화가 나타나게 되고, 이와 함께 바이러스 주입한 병변의 반대측 발에서 파킨슨병 운동증상이 나타나게 된다[16].

본 연구는 A53T 돌연변이 a-synuclein 과발현 파킨슨병 백서모델을 제조하여, 파킨슨병의 치료방법으로 그래핀 양자점을 복강내 주입하여 a-synuclein 의 toxicity 에 효과가 있는지 확인하고, neuroinflammation 을 감소시키는지 행동검사와 면역형광검사와 같은 사후검사를 통하여 치료효과를 검증하였다. 이는 지난 50년 이상 도파민 치료에만 의존했던 파킨슨병 치료에 보다 본질적인, 새로운 패러다임을 제시할 것이다.

재료 및 연구방법

1. 실험동물

본 연구에서는 실험 시작 시 300~350g의 Wistar male 백서(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)를 총 21 마리 사용하였으며, 사육실의 조명은 12시간을 주기로 명암이 반복조절 되게 하였고, 실험 동물용 케이지 당 3마리씩 사육하였으며, 사료와 물은 충분히 공급하여 자유 섭식하도록 하였다. 모든 실험 절차는 아산생명과학 연구소 (Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea)의 동물취급 지침(Institutional Animal Care and Use Committee)에 따르고 승인된 연구계획서에 맞추어 실험을 진행하였다.

2. 파킨슨병 동물 모델 제조

본 연구에서의 α -synuclein 과발현 파킨슨병 백서모델을 제조하기 위해, A53T-mutated α -synuclein 를 CAG 프로모터를 이용하여 과발현 시킬 수 있는 벡터를 Adeno associated virus(AAV)로 transplanted 시킨 바이러스(AAV-A53T)를 한국과학기술연구원 virus facility (Seoul, Korea)에 제작 의뢰하여 사용하였다. α -synuclein 의 발현을 형광현미경으로 확인할 수 있도록 하는 보고 유전자(reporter gene)로써 GFP(Green fluorescent protein)가 벡터에 포함되었다.

모든 외과적인 처치는 전신마취 하에 35 mg/kg zoletil (Virbac S.A., Carros, France)과 5 mg/kg rompun(Bayer, Leverkusen, Germany)을 섞은 혼합용액을 복강 내로 주입하여 실시하였다. 충분한 마취 상태를 확인 후 바이러스 입자가 최소 1.0×10^{10} /mL 포함된 농축바이러스 패키지로 제작 의뢰된 AAV-A53T 용액(2.0 μ L)을 도파민성 신경의 주요 경로인 중뇌의 오른쪽 흑색질(SNpc)에 정위적으로 주입하여 21 마리의 일측성 파킨슨병 백서 모델을 만들었다. 오른쪽 흑색질의 좌표는 bregma 로 부터 AP -5.4mm, L +2.0 mm, dura 로부터 V -7.5 mm 지점을 타겟으로 하여 해밀턴 시린지와 자동 미세바늘 펌프를 이용하여 정위적인 방법으로 0.2 μ L/min 속도로 주입하였다(Fig. 1).

3. 실험 그룹 과 그래핀 양자점의 주입

AAV-A53T 를 정위적으로 주입한 21 마리의 백서는 그래핀 양자점의 주입 여부 및 투여 용량에 따라 세 그룹으로 나누었다. 실험그룹은 AAV-A53T 만을 주입한 파킨슨병 대조군 그룹(PD control, n=8)과 AAV-A53T 를 주입한 후 2 주뒤부터 10 일간 매일 고용량의 그래핀 양자점을 투여한 그룹(HD graphene, n=7), 동일한 기간에 저용량의 그래핀 양자점을 투여한 그룹(LD graphene, n=6)으로 실험하였다. 본 연구에서는 서울대학교 수의과대학 강경선 교수 팀으로부터 그래핀 양자점을 제공받았으며, 투여한 농도는 3mg/ml 였고 복강내 투여를 하였다(Fig. 2). 고용량의 그래핀 양자점을 투여한 그룹은 1 마리 당 매일 1 mg 으로 10 일간 투여하여 총 10mg 을 주입하였으며, 저용량의 그래핀 양자점을 투여한 그룹은 1 마리 당 매일 0.5mg 으로 10 일간 투여하여 총 5mg 을 주입하였다. AAV-A53T 를 주입하기 전 7 일, 주입 후 2 주차, 3 주차, 4 주차에 행동검사 (Adjusting stepping test)를 실시하였고, 주입한 31 일째 사후 조직학적 검사를 위해 처리 하였다 (Fig. 3).

4. 행동검사

정상의 기저상태를 확인하기 위해 AAV-A53T 를 주입하기 전 1 주차에 Adjusting stepping test 를 시행하였다. 편 측의 중뇌 흑색질에 AAV-A53T 를 주입한 후 2 주차에 Adjusting stepping test 를 다시 시행하여 파킨슨병 백서모델로 제조되었는지 상태를 확인하였으며, 병변의 반대측 앞발에 명확하게 파킨슨병 증상이 발현됨을 확인 후 그룹을 구분하여 그래핀 양자점을 투여하였다. 이로 인한 파킨슨병의 치료효과를 판정하기 위해 3 주차, 4 주차에 재차 시행하였다. 수행방법은 양 뒷발을 실험자가 한 손으로 고정 한 후 각각의 앞발을 다른 한 손으로 고정 한 후 왼발, 오른발을 번갈아 가며 트레드밀(Jeung Do Bio & Plant Co., Seoul, Korea) 위에 위치하면서 stepping 을 유발하였다 (Fig.4A)[17]. 이 때 트레드밀은 1.8 m/10 s 로 셋팅되어 있었다. 모든 실험은 비디오 녹화하였으며, 트레드밀 위에서 짚는 step 수를 세서 수치화 하였다. 각각의 Adjusting stepping test 는 회당 2 번 실시하였으며, 수치는 평균으로 사용했다.

5. 면역 형광 염색

5.1 조직처리

조직고정을 위하여 모든 실험이 종료되면 모든 동물은 전신 마취 후 관류바늘을 대동맥 방향으로 심장을 관통하게 하고, 우심방 끝쪽을 잘라 연동 펌프를 이용하여 10,000 IU 헤파린(Hanlim Pharm, Seoul, Korea)을 포함한 생리식염수와 4% paraformaldehyde 를 차례로 관류시켰다. 머리를 제거한 후 뇌를 신속히 꺼낸 다음, 4% paraformaldehyde PBS 용액에 12 시간이상 고정시킨 후 조직의 탈수를 위해 30% sucrose 용액에 가라앉을 때까지 정치하였고, 이후에는 deep freezer 에 보관하였다.

흑색질 조직(AP -6.0 to -4.8 mm)은 40 μ m 두께로 동결조직절편기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 자른 후, free-floating 상태로 0.08% sodium azide (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) PBS 용액에 보관하였다.

5.2 면역염색

조직 처리된 흑색질 coronal section 을 washing buffer(0.5% bovine serum albumin (BSA; Bioworld, Dublin, OH, USA) in PBS (pH 7.4))에 3 차례 세척하고, BSA, sodium azide, Triton X-100(Sigma Aldrich, St. Louis, USA)을 포함하는 blocking solution 에 조직을 정치시킨 후 다시 washing buffer 에 3 차례 세척했다. 항체 처리를 하기 전에 형광이미지를 획득하여 GFP 를 통한 a-synuclein 발현을 확인하였다.

1 차 항체용액은 3 가지 항체를 포함했는데, 파킨슨병 백서모델의 병태생리적 확인과 그래핀의 치료 효과를 판정하기 위해 a-synuclein 의 항체를 사용했으며, 도파민 분비 신경 표지자(Dopaminergic neuron marker)로써 TH(tyrosine hydroxylase)의 항체, 미세교세포의 염증성 표지자(inflammatory microglia marker)로써 Iba-1 의 항체를 포함했다. 조직은 1 차 항체 용액에 12 시간이상 반응시킨다. (Mouse, rabbit anti-TH antibody (1:2,000; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), mouse anti-Iba-1 antibody (1:500; Abcam,

Cambridge, UK), mouse alpha-synuclein antibody (1:300; Abcam, Cambridge, UK))

다음날 다시 washing buffer 에 3 차례 세척하고, 조직은 2 차 항체 용액 (Alexa Fluor 555, 647 donkey anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 2 시간동안 반응시킨다. 다시 washing buffer 에 3 차례 세척하고, 조직은 fluorescent mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark)를 공급하고 커버 슬라이드를 씌운다.

형광 이미지는 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the ZEN microscope software (Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하여 획득했다.

6. 통계분석

모든 데이터는 mean \pm standard error 로 표기하였으며, 모든 통계분석은 Prism Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Adjusting stepping test 를 통해 얻은 반복실험한 결과는 two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni post hoc test 를 이용하여 분석하였고, p value 값이 0.05 미만일 때만 유의성을 인정하였다. 세포 수 분석은 student's t -test 와 ImageJ program (National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin)) 을 이용하였다.

결과

1. 행동검사

파킨슨병 모델로 만들기위해 AAV-A53T 주입한 후 2주차에는 모든 실험 그룹에서 주입전의 기저상태에 비해 병변의 반대측 앞발의 step 수가 현저히 감소되어 있었다 (PD control($30.9 \pm 1.3 \rightarrow 6.6 \pm 0.7$), HD graphene($29.1 \pm 0.9 \rightarrow 7.1 \pm 0.6$), LD graphene($32.0 \pm 0.9 \rightarrow 7.5 \pm 1.0$)). 그래핀 양자점을 각각 고용량과 저용량으로 투여한 두 실험 그룹에선 그래핀 양자점을 투여한 후 1, 2주차(AAV-A53T 주입한 후 3,4주차)에 병변의 반대측 앞발의 step 수가 기저상태에 근접한 정도로 회복되었다(HD graphene($7.1 \pm 0.6 \rightarrow 26.6 \pm 2.4 \rightarrow 28.4 \pm 1.7$), LD graphene($7.5 \pm 1.0 \rightarrow 28.4 \pm 1.0 \rightarrow 30.3 \pm 1.6$)). 이는 계속 감소된 상태를 유지하고 있는 파킨슨병 대조군 그룹(PD control($6.6 \pm 0.7 \rightarrow 5.4 \pm 0.7 \rightarrow 6.6 \pm 1.0$))에 비해 통계적으로 유의하게 증가됨을 알 수 있었다 (* $p < 0.05$, Fig.4B). 그러나 그래핀의 용량으로 구분한 두 실험 그룹 간의 차이는 유의하지 않았다. 병변의 동측 앞발의 step 수는 세 실험 그룹에서 AAV-A53T 주입한 전후와 그래핀 양자점의 투여 전후에 모두 변화없이 비슷한 상태로 확인되었으며 통계적 유의성은 없었다(Fig.4C). 병변의 양측 앞발의 step 수의 총합에서 병변의 반대측 앞발 step 수의 비율도 그래핀 양자점을 투여한 두 실험 그룹에서 투여한 후 1, 2주차(AAV-A53T 주입한 후 3,4주차)에 파킨슨병 대조군 그룹에 비해 통계적으로 유의하게 증가되었다(PD control($10.7 \pm 1.1\% \rightarrow 8.4 \pm 1.0\% \rightarrow 9.8 \pm 1.2\%$), HD graphene($11.4 \pm 0.8\% \rightarrow 41.2 \pm 2.2\% \rightarrow 45.1 \pm 0.8\%$), LD graphene($10.9 \pm 1.5\% \rightarrow 42.5 \pm 1.8\% \rightarrow 44.7 \pm 1.8\%$)) (* $p < 0.05$, Fig.4D). 그러나 그래핀의 용량으로 구분한 두 실험 그룹 간의 차이는 유의하지 않았다.

2. 면역 형광 염색

본 연구에서는 3 가지 항체를 가지고 면역형광염색을 수행하였는데, 도파민 분비신경의 표지자로 알려진 TH 항체의 경우 PD control 그룹에서 병변 측에서 건 측에 비해 발현이 감소해 있는 것이 확인되었으나, 그래핀 양자점을 투여한 두 실험 그룹의 병변

측에서는 건 측과 비슷할 정도로 PD control 그룹에 비해서 유의미하게 확연히 많이 발견되어 있었다(* $p < 0.05$, Fig.6A). 그리고 건 측과 비교한 병변 측의 TH 발현 신경세포의 생존율도 PD control 군에 비해서 그래핀 양자점을 투여한 두 실험 그룹에서 유의미하게 높았다(* $p < 0.05$, Fig.6B). 그러나 투여한 그래핀 양자점의 용량으로 구분한 두 실험 그룹 간의 차이는 HD graphene 그룹에 좀 더 뚜렷하게 많이 발견되었으나, TH 발현 신경세포 수로 산정하였을 때 통계적으로 유의미하진 않았다(Fig. 4).

미세 교세포의 염증성 표지자로 알려진 Iba-1의 항체의 경우는 PD control 그룹에서 병변 측에서 건 측에 비해 약간 증가된 발현이 확인되며, 그래핀 양자점을 투여한 두 실험 그룹들의 병변 측에서도 건 측보다 약간 발현이 된 것처럼 보이며, 이는 PD control 그룹에 비해 명확하진 않았다. 투여한 그래핀 양자점의 용량으로 구분한 두 실험 그룹 간의 차이도 뚜렷하게 구분되진 않았다(Fig.5, 6C).

파킨슨병의 병태생리적 원인인 a-synucleinopathy의 확인과 그래핀의 치료 효과를 판정하기 위해 사용한 a-synuclein의 항체를 이용한 면역염색(a-Syn)의 경우는 PD control 그룹에서 병변 측에서 건 측에 비해 발현이 확연히 증가되었으며, 그래핀 양자점을 투여한 두 그룹의 병변 측에서는 건 측보다 발현이 증가하였으나, PD control 그룹의 병변 측에 비해서 많이 감소된 발현이 확인되었다(Fig.5). 그러나 투여한 그래핀의 용량과 관련한 두 실험 그룹 간의 차이는 뚜렷하게 구분되진 않았다(Fig. 6D). 항체들을 이용한 면역 형광 염색 전에 획득한 형광 이미지에서 GFP를 통하여 표지된 a-synuclein(tagged a-Syn)도 a-synuclein 항체로 발현된 면역 염색(a-Syn)의 결과들과 비슷하게 확인되었다(Fig.5, 6D).

고찰

본 연구는 A53T 돌연변이 α -synuclein 과발현 파킨슨병 백서모델을 제조하여, 파킨슨병의 치료방법으로써 그래핀 양자점을 복강내 주입하였다. 파킨슨병 백서 모델 중에서 본 연구와 같이 일측성 중뇌 흑색질에 주입한 바이러스 벡터를 이용한 A53T 돌연변이 α -synuclein 과발현은 파킨슨병의 병태생리 중의 한 부분인 α -synucleinopathy 를 유발하는 방법이다[14, 16]. 이러한 동물 모델에서 알려진 바로는, 바이러스 주입 후 10 주 내에 도파민성 신경세포의 퇴행 및 도파민성 신경 섬유 손실, 줄무늬체(Striatum)로의 도파민성 신경전달 물질의 감소를 일으킨다[18]. 또한 이러한 흑색줄무늬체(nigrostriatal tract)의 퇴행은 5 주내에 조기 운동기능 손상을 나타내는데, 이는 흑색질의 도파민성 신경세포내에 α -synuclein 이 모여서 접힘 이상(misfolding) 및 과인산화(hyperphosphorylation)되어 루이소체와 비슷한 형태를 이워서 신경 축삭 및 신경말단에 축적된다[19]. 이는 도파민성 신경전달의 기능적 억제 및 변성을 일으켜서 이러한 변화가 30% 이상 이뤄졌을 때 파킨슨병의 운동 증상을 유발하는 것으로 알려져 있는데[14, 20], 그래핀 양자점은 이런 부분에서 작용하여 파킨슨병에 치료 효과를 가지는 것으로 보인다.

그래핀 양자점의 치료적 원리는 anti-fibrilization 작용을 통해서 도파민성 신경말단에 축적된 루이소체와 같은 α -synuclein 을 녹여주는 효과가 있어서 도파민성 신경세포의 기능적 억제가 해소되어, 그의 신경전달 기능이 활성화되는 원리로 생각하는데[10, 21], 이를 본 실험에서 확인할 수 있는 부분은 그래핀 양자점을 투여한 두 실험 그룹에서 PD control 그룹보다 사후 면역형광검사 상 α -synuclein 항체에 의한 염색도 많이 감소되었고, 도파민 분비신경세포의 활성표지자인 TH 가 많이 증가되는 것을 통해서이다. 또한, α -synuclein 단백질의 축적과 그로 인한 이상 산물 및 세포 소기관들을 그래핀 양자점이 자가 포식(autophagy)과정을 유발시켜 제거함으로써 치료 효과를 가지는 것으로 보인다. 자가 포식은 세포질의 노폐물, 퇴행성 단백질이나 수명이 다하거나 변성되어 기능이 저하된 세포소기관들이 제거하는 작용으로, 세포의 국소적 항상성을 유지하여 세포사멸(apoptosis)이나 괴사(necrosis)를 저지하는 것이 궁극적 목적으로 세포생존에 큰 중요성을 가진다[22-25]. 다른 신경퇴행질환의 하나인 알츠하이머병

(Alzheimer's disease)에서도 이와 비슷하게 그래핀 양자점이 자가 포식작용을 유발하여 개선 효과를 갖게 되는데, 알츠하이머병의 주 병인으로 알려진 과도하게 축적된 β -amyloid를 그래핀 양자점이 AMPK/mTOR 경로로 유발시킨 자가 포식작용으로 청소를 촉진하여 미세교세포 및 신경세포들을 보호한다는 연구가 이를 뒷받침한다[26].

그래핀 양자점의 파킨슨병 치료에 관여할 것으로 생각되는 또 다른 가설로는 아직 명확히 알려지지 않은 부분이지만, 그래핀 양자점의 미토콘드리아에 대한 작용과 관련된 것이다. 보고된 바[10]에서 α -synuclein preformed fibrils 로 유발된 파킨슨병 모델의 신경세포내의 미토콘드리아 손상과 관련한 지표(수축, 감소된 산소 소비율, 증가된 활성화산소)들이 그래핀 양자점을 투여함으로써 개선되는 것으로 보아 이런 가능성도 생각해 볼 수 있다. 미토콘드리아 DNA의 변이, 미토콘드리아와 연결된 세포핵 DNA의 변이, 미토콘드리아의 형태, 크기, 분할 등의 동적변화, 미토콘드리아내 물질운반 및 수송과정의 이상, 미토콘드리아와 관련된 단백질의 돌연변이와 같이 여러가지 미토콘드리아의 기능이상인 파킨슨병의 병인과 관련된 것으로 최근에 보고되었다[27, 28]. 손상된 미토콘드리아를 특정하여 소멸시키는 mitophagy[29]에 그래핀 양자점이 작용하여 파킨슨병의 치료에 영향을 미칠 것으로 생각했으나, 보고된 바에 의하면, 아연-철 산화물 등의 초상자성 금속성 나노 입자(superparamagnetic iron nanoparticles, SPIONs)들은 PINK1/PARKIN 경로를 활성화시키고, 미토콘드리아 막전위 손실과 미토콘드리아 내활성화 산소(reactive oxygen species)와 칼슘(Ca^{2+})을 증가시켜 mitophagy 과정을 유발했지만, 비금속 나노 물질인 그래핀 양자점과 관련해서 mitophagy는 잘 유발되지 않았다[30]. mitophagy 외의 어떤 기전으로 미토콘드리아의 기능 이상에 영향을 주는지 아직 밝혀지지 않았으나, 그래핀 양자점의 미토콘드리아 손상에 대한 개선효과도 파킨슨병에 치료에 도움이 되는 한 요소로 보이며, 이와 관련된 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점은 그래핀 양자점의 투여용량, 경로 및 주입방법, 시기를 명확하게 세분화하지 못한 것이다. 우선, 투여용량에 대해서는 본 실험에서 규정한 그래핀 양자점의 고용량 및 저용량 투여 그룹에서 각각 큰 차이가 없는 비슷한 치료효과를 보였다. 또한, 용량의 차이에 대한 독성작용도 나타나지 않았다. 이에 대해 저용량 투여그룹보다 좀 더 희석된 용량을 투여하는 추가적 실험설계를 통해 그래핀 양자점의 치료적인

최소의 적정용량을 정립해야 할 것이며, 그로 인하여 명확하게 드러나지 않은 용량에 따른 독성 및 부작용과 관련한 위험성도 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그래핀 양자점의 투여 경로 및 방법으로 본 실험에선 복강내 투여로 10일간 분할 주입하였으나, 정위적 병변내 투여 나 정맥 투여 등과 같은, 다른 투여 경로와 비교한 치료효과의 차이점도 규명해야 하며, 복강내 10일 분할 투여 외의 다른 용법에 관련한 후속 연구도 필요하다. 그래핀 양자점의 투여시기에 관해서 본 실험에서는 AAV-A53T 를 주입한 2주차부터 그래핀 양자점을 투여하였는데, 이는 AAV-A53T 를 주입한 2주차에 시행한 행동검사에서 파킨슨병의 이상운동 증상이 명확히 확인되어 파킨슨병 백서모델로써 사용 가능한 시점이었으며, 그래핀 양자점의 a-synuclein 축적물에 대한 단백질분해 (proteolysis)를 충분히 증명할 수 있을 시점으로 판단하여 그래핀 양자점을 투여한 것이다. 그러나 더 세분화한 다른 투여 가능 시점에 대해서도 확인이 필요할 것이며, 흑색줄무늬체가 완전히 망가져버린 진행된 상태에선 루이소체와 비슷한 a-synuclein 축적물을 해소해도 사멸된 신경기능이 회복되지 않아서 파킨슨병의 적절한 치료가 되지 않을 가능성도 있는데, 적절한 치료 및 투여의 한계시점에 관해서도 추가적 연구가 필요할 것이다.

또 다른 제한점으로는 면역형광검사서 명확하지 않은 Iba-1 항체에 의한 염색 결과인데, 그래핀 양자점을 투여한 그룹의 병변 측에서 PD control 그룹의 병변 측보다 Iba-1 항체에 대한 발현은 감소되지 않았고, 유의미한 결과가 없었다. 이는 그래핀 양자점의 작용이 미세교세포의 항염증 효과에 대해선 미약했을 수 있으며, PD control 그룹 내의 병변 측에서도 Iba-1 발현이 건 측과 비교하여 크게 증가되지 않았으므로, 이로 보아, A53T 돌연변이 α -synuclein 과발현 백서모델에서 파킨슨병 증상이 발현되더라도 neuroinflammation 이 많이 일어나지 않거나, 아님 AAV-53T 주입으로 만든 파킨슨병 동물 모델에서의 neuroinflammation 은 그 증상의 발현에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각할 수 있으나, 추가적 연구가 필요하다.

본 연구를 통해 파킨슨병의 주요 병인물질 중 하나인 a-synuclein 의 독성으로 유발된 무운동증을 확인하였고, 이에 대해 그래핀 양자점이 a-synuclein 의 완전한 억제를 통해 치료효과를 가지는 것을 확인하였다. 이 결과를 토대로 하여 근본적인 병인을 제거하여 파킨슨병을 완치할 수 있는 혁신적인 치료법으로 적용 가능할 것으로 판단한다.

결론

본 연구는 A53T 돌연변이 α -synuclein 과발현 파킨슨병 백서모델을 제조하여, 파킨슨병의 치료방법으로써 그래핀 양자점을 복강내 주입하였다. α -synuclein 의 toxicity로 인한 무운동증과 같은 파킨슨병의 증상이 유발됨을 확인하였고, 이를 그래핀 양자점의 투여로 α -synuclein 의 완전한 억제를 시켜, 이전의 치료법보다 근본적으로 병인을 제거하여 파킨슨병을 치료할 수 있음을 행동검사 및 사후 면역형광염색을 통하여 검증하였다. 이를 토대로 향후 임상에서 파킨슨병의 치료기술로 적용시킬 수 있도록 하는 것이 최종 목표이다.



Fig. 1. Animal preparation for a PD rat model

The Stereotactic injection of AAV containing human mutated A53T-aSyn into the unilateral substantia nigra for a PD rat model

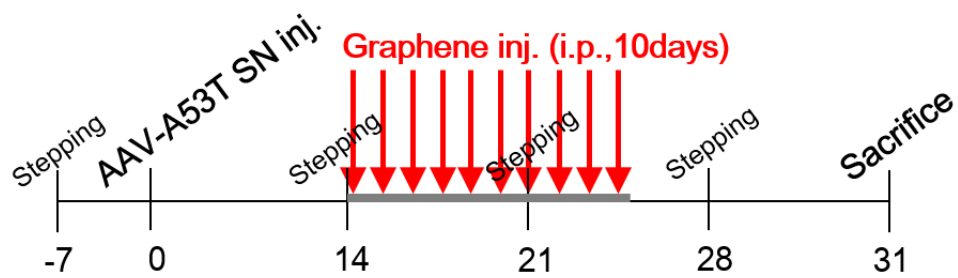
AAV= Adeno associated virus; PD= Parkinson's disease



Fig. 2. Intraperitoneal injection of graphene quantum dots

PD rat models were injected, intraperitoneally, graphene quantum dots by two different volumes (high dose or low dose) for 10 days after stereotactic AAV-A53T injection.

AAV-A53T= Adeno associated virus which is containing human mutated A53T-aSyn



- Group1: AAV-A53T only (PD control, n=8)
- Group2: AAV-A53T + HD graphene (HD graphene, n=7)
- Group3: AAV-A53T + LD graphene (LD graphene, n=6)

Fig. 3. Subjects and experimental timeline

Rats were divided into three groups. Group 1(PD control) is defined a group of rats without an injection of graphene quantum dots. Group 2(HD graphene) is defined a group of rats that were injected by high dose-graphene quantum dots at 2weeks after AAV-A53T injection. Group 3(LD graphene) is defined a group of rats, which were injected by low dose graphene quantum dots at 2 weeks after AAV-A53T injection. All the groups were performed the adjusting stepping test at pre- and 2,3,4 weeks after AAV-A53T injection.

PD= Parkinson’s disease; HD= High dose; LD= Low dose

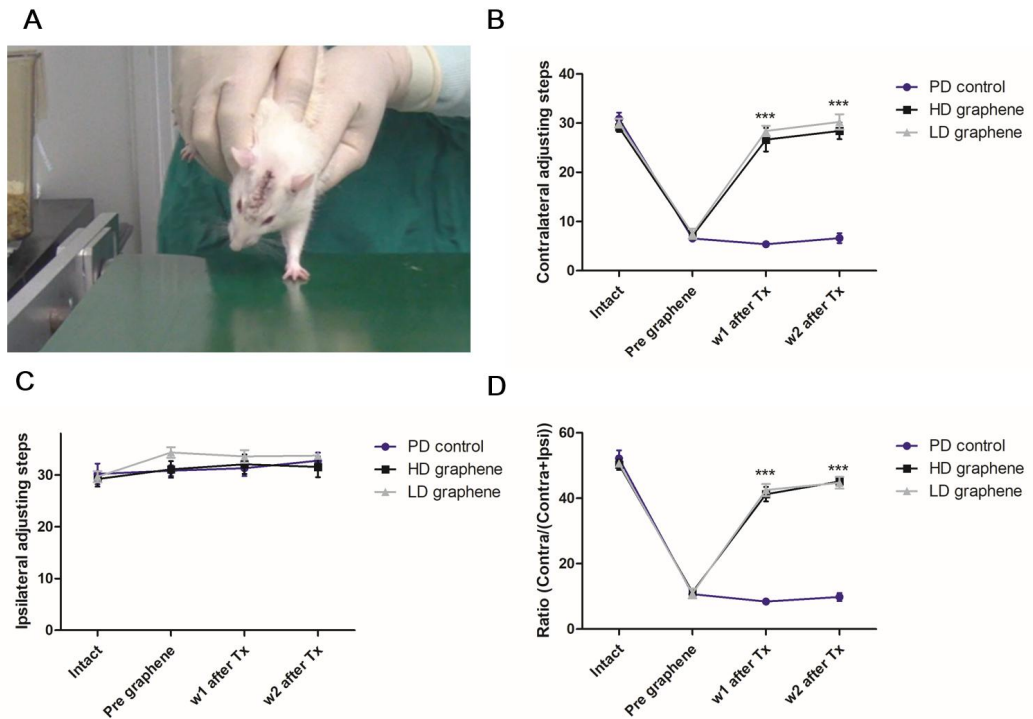


Fig. 4. Adjusting stepping test

A rat of groups was performing the adjusting stepping test after AAV- A53T injection (A)
 The scores of the contralateral adjusting steps were significantly higher in HD graphene and LD graphene group than in PD control group at 1,2 weeks after graphene treatment (3,4 weeks after AAV-A53T injection) (B, * $p < 0.05$). The scores of the ipsilateral adjusting steps were not distinct among the groups (C), compared with contralateral steps and its ratio(D).

AAV-A53T= Adeno associated virus which is containing human mutated A53T-aSyn

PD= Parkinson's disease; HD= High dose; LD= Low dose

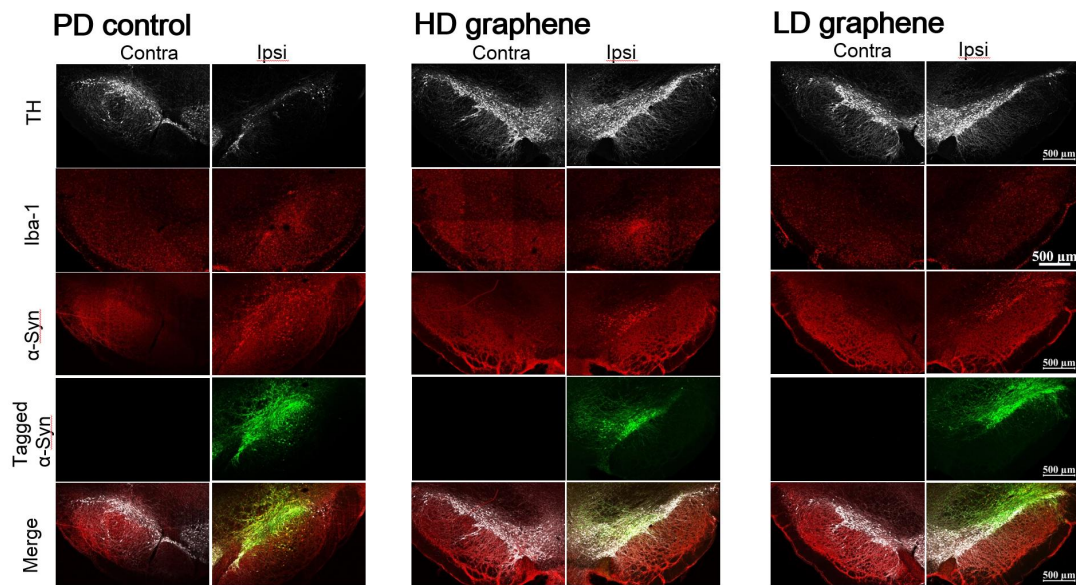


Fig. 5. Immunofluorescent staining (1)

All groups of rats underwent post-mortem immunofluorescent staining at 31 days after AAV-A53T injection. Three anti-bodies were used for immunofluorescent staining and they were viewed through the confocal microscope. (Magnification 200X)

*TH represents a dopaminergic neuronal marker.

*Iba-1 represents an inflammatory microglia marker.

*a-Syn represents antibody for a-synuclein, which is a main pathogenetic factor of Parkinson's disease

*Tagged a-Syn; Overexpressed a-synuclein was strongly detected by GFP, which was induced in the presence of AAV-promoter-A53T-GFP viral vector, before immunofluorescent staining was performed.

AAV-A53T= Adeno associated virus which is containing human mutated A53T-aSyn

TH= tyrosine hydroxylase; a-Syn= a-synuclein; GFP= green fluorescent protein

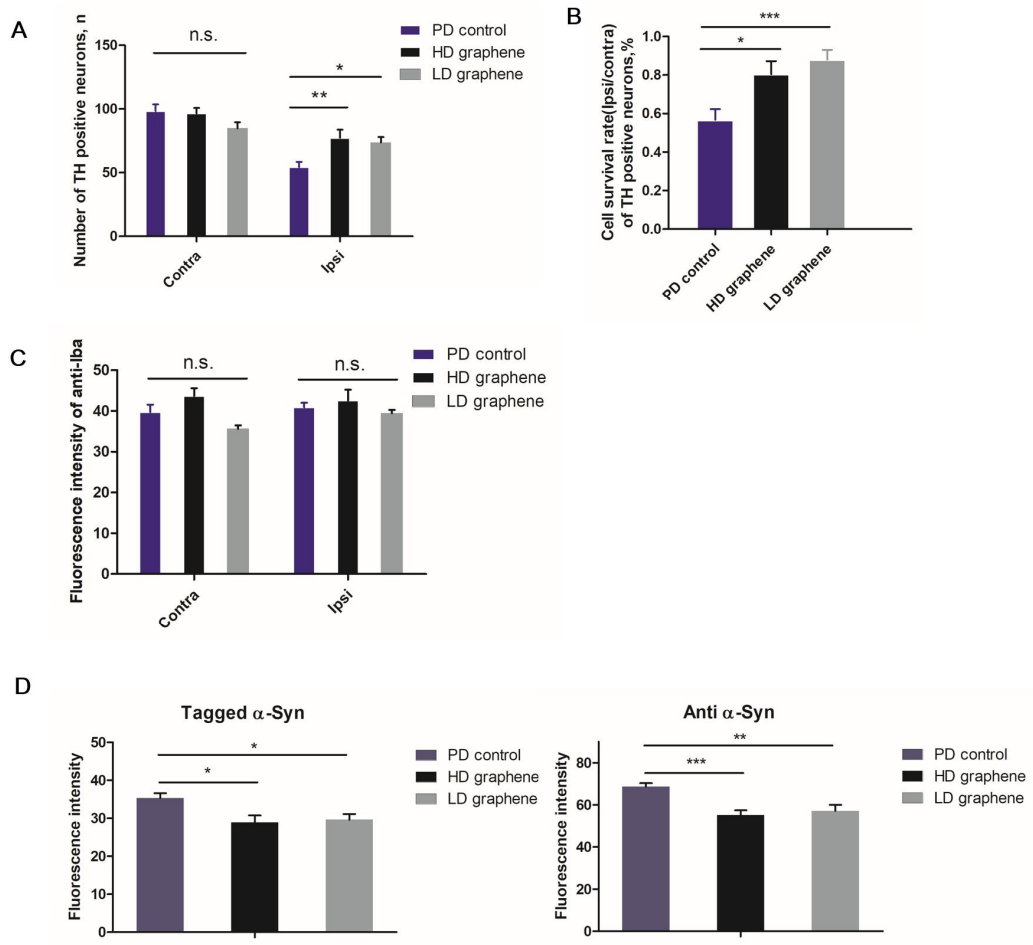


Fig. 6. Immunofluorescent staining (2)

Immunofluorescent staining of TH of ipsilateral side showed greater staining in the HD graphene & LD graphene groups than in PD control group. The number & cell survival rate of TH positive neurons were significantly higher values in the both graphene groups than in PD control group (Fig. 5, 6-A, B) (* $p < 0.05$). In contrast, immunofluorescent staining of α -Syn of ipsilateral side showed lesser staining in the HD graphene & LD graphene groups than in PD control group. The similar pattern of results was presented by tagged α -Syn, which was detected by GFP (Fig. 5, 6-D) (* $p < 0.05$). Immunofluorescent staining of Iba-1 was not distinct among the groups (Fig. 5, 6-C).

TH= tyrosine hydroxylase; PD= Parkinson's disease; HD= High dose; LD= Low dose; α -Syn= α -synuclein; Iba-1= inflammatory microglia marker; GFP= green fluorescent protein

참고문헌

1. Korea, S., *Statistics Korea*. 2020 [cited 2020 Feb 8]. Available from: <http://kosis.kr>.
2. Park, J.H., et al., *Trends in the incidence and prevalence of Parkinson's disease in Korea: a nationwide, population-based study*. BMC Geriatr, 2019. **19**(1): p. 320.
3. Dowding CH, S.C., Salek SS, *A review of the health-related quality of life and economic impact of Parkinson's disease*. Drugs Aging. **23**(9): p. 693–721.
4. LeWitt, P.A. and S. Fahn, *Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward*. Neurology, 2016. **86**(14 Suppl 1): p. S3-12.
5. Olanow, C.W., J.A. Obeso, and F. Stocchi, *Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications*. Lancet Neurol, 2006. **5**(8): p. 677-87.
6. Cenci, M.A., *Presynaptic Mechanisms of l-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications*. Front Neurol, 2014. **5**: p. 242.
7. Malek, N., *Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease*. Neurol India, 2019. **67**(4): p. 968-978.
8. Charvin, D., et al., *Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs*. Nature Reviews Drug Discovery, 2018. **17**(11): p. 804-822.
9. Charvin, D., et al., *Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(11): p. 804-822.
10. Kim, D., et al., *Graphene quantum dots prevent alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease*. Nat Nanotechnol, 2018. **13**(9): p. 812-818.
11. Zheng, P. and N. Wu, *Fluorescence and Sensing Applications of Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots: A Review*. Chem Asian J, 2017. **12**(18): p. 2343-2353.
12. Lee, B.C., et al., *Graphene quantum dots as anti-inflammatory therapy for colitis*. Sci Adv, 2020. **6**(18): p. eaaz2630.
13. Simola, N., M. Morelli, and A.R. Carta, *The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. Neurotox Res, 2007. **11**(3-4): p. 151-67.

14. Ip, C.W., et al., *AAV1/2-induced overexpression of A53T-alpha-synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2017. **5**(1): p. 11.
15. Lee, V.M. and J.Q. Trojanowski, *Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 33-8.
16. Kirik, D., et al., *Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2884-9.
17. Hyung Ho Yoon, J.K.M., Chong Sik Lee, Seong Who Kim, Onyou Hwang, Sang Ryong Jeon, *The Study on Parkinson's Disease Model by Stereotactic drug Injection in Rats*. J Korean Ster Func Neurosurg, 2011. **7**(1): p. 6-11.
18. Kordower, J.H., et al., *Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease*. Brain, 2013. **136**(Pt 8): p. 2419-31.
19. Fujiwara, H., et al., *alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 160-4.
20. Neumann, M., et al., *Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1429-39.
21. Yang, Z., et al., *Destruction of amyloid fibrils by graphene through penetration and extraction of peptides*. Nanoscale, 2015. **7**(44): p. 18725-37.
22. Djavaheri-Mergny, M., et al., *NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30373-82.
23. Sasnauskiene, A., et al., *Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 743-4.
24. Colell, A., et al., *GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic*

- cytochrome c release in the absence of caspase activation*. Cell, 2007. **129**(5): p. 983-97.
25. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
 26. Li, X., et al., *Graphene oxide enhances beta-amyloid clearance by inducing autophagy of microglia and neurons*. Chem Biol Interact, 2020. **325**: p. 109126.
 27. Bose, A. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2016. **139 Suppl 1**: p. 216-231.
 28. Ammal Kaidery, N. and B. Thomas, *Current perspective of mitochondrial biology in Parkinson's disease*. Neurochem Int, 2018. **117**: p. 91-113.
 29. Yao, Z. and D.J. Klionsky, *An unconventional pathway for mitochondrial protein degradation*. Autophagy, 2016. **12**(11): p. 1971-1972.
 30. He, C., et al., *High-content analysis for mitophagy response to nanoparticles: A potential sensitive biomarker for nanosafety assessment*. Nanomedicine, 2019. **15**(1): p. 59-69.
 31. Paille, V., et al., *Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias*. Mov Disord, 2007. **22**(4): p. 533-9.
 32. Yoon, H.H., et al., *Are human dental papilla-derived stem cell and human brain-derived neural stem cell transplantations suitable for treatment of Parkinson's disease?* Neural Regen Res, 2013. **8**(13): p. 1190-200.

Abstract

Accordingly with the aging society, the prevalence of Parkinson's disease is increasing for the previous decades. However, the treatment is still limited to levodopa and deep brain stimulation, which have risks and side effects. There is a need for a safer new treatment through a pathophysiological approach, and in this regard, the new treatment of Parkinson's disease was attempted through administration of graphene quantum dots(GQDs).

This study induced animal models of Parkinson's disease in 21 rats, which were injected the mutant virus (AAV-A53T) overexpressing α -synuclein, ipsilaterally into the right midbrain substantia nigra to induce α -synucleinopathy, as a main pathophysiology of Parkinson's disease. At two weeks after stereotactic AAV-A53T injection, GQDs was administered into the intraperitoneal space of rats by different doses (1mg/day or 0.5mg/day or none) for 10 days. They were divided into three groups (Parkinson's disease control(PD control, n=8), high-dose graphene quantum dots(HD graphene, n=7), and low-dose graphene quantum dots(LD graphene, n=6)). The behavioral test was performed at pre- and 2, 3, 4 weeks after AAV-A53T injection, respectively, to confirm the underlying condition and to evaluate the animal model of Parkinson's disease and the therapeutic effect of GQDs. The therapeutic effect was verified through post-mortem immunofluorescent staining at 31 days after AAV-A53T injection, and three types of anti-bodies were used for immunofluorescent staining; tyrosine hydroxylase(TH, dopaminergic neuronal marker), Iba-1(inflammatory microglia marker) & α -Syn(α -synuclein).

In the behavioral test, all groups showed a reduced number of contralateral steps of the lesion at 2 weeks after AAV-A53T injection, compared with the underlying state. HD & LD graphene groups showed the statistically significant improvement of contralateral steps of the lesion at 3,4 weeks after AAV-A53T injection(=1,2 weeks after graphene injection), compared with that of PD control group (* p <0.05).

In immunofluorescent staining, the lesions of the PD control group were more expressed by α -Syn than that of the opposite side. However, the lesions of HD & LD graphene groups

showed a reduced a-syn expression than that of PD control group, to reveal therapeutic effect to a-synuclein (* $p < 0.05$). In TH staining, the lesions of HD & LD graphene groups showed an increased expression than that of the PD control group (* $p < 0.05$), and in Iba-1 staining, no significant change was confirmed on the lesions in all three groups.

This study confirmed that GQDs was effective in treating Parkinson's disease through a rat model of Parkinson's disease, which was made by injection of the A53T mutant virus (AAV-A53T) overexpressing a-synuclein protein, the main cause of neuroinflammation of dopamine-secreted neurons, into the substantia nigra.