

# 木天蓼子가 LPS로 유도된 Mouse BV2 Microglial cells의 염증반응에 미치는 영향

김기태\*

세명대학교 부속 제천한방병원 내과학교실

## Effect of *Actinidia polygama* on LPS-induced Inflammation in Mouse BV2 Microglial cells

Kitae Kim\*

Department of Internal Medicine of Clinical Korean Medicine, Semyung University

*Actinidia polygama* has long been used in traditional Korean medicine to treat rheumatoid arthritis and gout. Although numerous chemical compounds in the fruit extracts of *A. polygama* have been characterized and their role in inhibiting nitric oxide (NO) production has been reported, the anti-inflammatory properties of *A. polygama* extracts remain to be explored. In this study, we investigated the in-vivo effect of *A. polygama* extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in BV-2 microglial cell lines. We discovered that 100% ethyl alcohol extract of *A. polygama* effectively attenuates the release of NO and is superior to both water extract and 50% ethanol extract. Using MTT assay, western blot, and ELISA on LPS-induced BV-2 microglial cells lines, we established the ability of *A. polygama* extract to markedly suppress the expressions of inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. These results reveal that the anti-inflammatory property of *A. polygama* in BV-2 microglial cells is due to the downregulation of iNOS, COX-2, MAPK protein, and pro-inflammatory cytokines.

keywords : *Actinidia polygama*, BV2 microglial cells, Anti-inflammatory, MAPK, Cytokine

### 서론

개다래나무는 한국 각지에 분포되어있으며 개다래나무의 열매인 목천료는 류마티스 관절염과 통풍, 알레르기, 이뇨제, 고혈압 등의 치료에 사용되어 왔다고 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 현재까지 보고된 개다래나무 활성에 관한 연구로는 개다래나무 열매의 항염 및 항천식 효능<sup>3)</sup>이 보고되었고, 성분연구로는 ursolic acid, 3-O-acetylursolic acid, umbelliferone 등 triterpenoid 계열과 phenylpropanoid 계열 및 여러 phenolic 화합물이 함유되어 있다고 보고 되었다<sup>4,5)</sup>. 개다래나무에 관한 최근 연구에 따르면 목천료에서 분리한 트리테르펜이 LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포 두 세포주 모델에서 일산화질소 생성을 억제한다고 보고하고 있으며<sup>2)</sup>, 염증 억제에 관한 연구는 미비한 실정이다.

염증 반응은 우리 몸의 면역계가 외부 자극에 대한 생체의 정상적인 방어 기작이며, 천식이나 염증성 장질환, 동맥경화 및 관절염 등처럼 여러 질병의 유발 원인이 된다고 알려져 있다<sup>6-8)</sup>. 특히 중추신경계(central Nervous system, CNS)의 염증은 뇌에 존재하는 세포나 말초로부터 면역세포의 침윤에 의해 유발되며, microglia는 이러한 중추신경계의 염증반응에 관여하는 세포이다. 특히, microglia는 형태학적으로 대식세포와 유사하여 탐식능이 있고, 노폐물처리를 담당하는 기능이 있으며 신경성장 인자를 분비하여 신경세포 보호 및 CNS의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다<sup>9,10)</sup>. 그러나 microglia의 활성화는 본질적으로 긍정적인 치유 과정이지만 활성화 상태가 장기간 지속되거나 과도하게 활성화가 유도될 때에는 진행성 염증반응을 일으켜 nitric oxide (NO), prostaglandin E2(PGE2) 염증성 매개 인자 및 tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 및 interleukin-6 (IL-6) 등과 같은 염증성 cytokine과 reactive oxygen species (ROS) 등을 분비함으로써 신경 독성을 유발하고 뇌실질 조직을 손상시킴으로써<sup>11-13)</sup>, 알츠하이머 치매, 파킨슨씨병 같은 신경퇴행성 질환의 원인이 된다고 보고되고 있다<sup>14-16)</sup>. 염증성

매개인자인 NO와 PGE2는 각각 inducible NO synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 생산되므로 이들 염증성 유전자와 함께 그 산물을 효과적으로 조절할 수 있는 시료에 관한 연구는 신경염증 조절뿐만 아니라 신경퇴행성 질환의 치료에 관한 기본 연구가 될 수 있다. 특히 NO 생성을 억제할 수 있는 연구 방법은 항염증 시료의 시험법의 기본으로 인정되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 mouse microglia BV2 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 microglia의 활성화를 통하여 염증반응을 유도한 후 목천료 추출물이 염증 저해 활성을 보이는지 확인하였다. 그 결과 목천료 추출물이 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현과 MAPK 기전을 통하여 그 최종 산물을 억제하였으므로 신경염증 반응을 효과적으로 억제할 수 있을 가능성을 확인하였기에 이를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시약

시험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), fetal bovine serum(FBS)는 Gibco Laboratorie사에서 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS)와 3'-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. Tissue culture dish와 plate는 SPL사 제품을 이용하였다.

#### 2. 시료의 추출

시험에 사용한 목천료는 경북 영천시에서 재배된 것을 삼흥건 제약업사(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

#### 3. 세포배양

BV-2 세포는 5% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

Kitae Kim, Department of Internal Medicine of Clinical Korean Medicine, Semyung University, 65, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea

E-mail : onehorn@daum.net Tel : +82-43-649-1813

Received : 2022/01/22 Revised : 2022/04/24 Accepted : 2022/06/28

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2022.08.36.4.120

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

4. MTT assay

목천료 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 BV-2 세포를 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 약 24시간 동안 배양하였다. 목천료 추출물을 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT 용액을 추가하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 더 배양하였다. 배지를 버리고 보라색으로 생성된 formazan에 DMSO를 넣어 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 무처리 군을 100%로 계산하여 세포 생존율을 측정하였다.

5. Nitric oxide (NO) assay

BV-2 세포에 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. BV-2 세포는  $5 \times 10^4$  cells/well로 24-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 목천료 추출물을 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 1시간 전처리한 후에 200 ng/mL의 농도가 되도록 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상등액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 100  $\mu\text{L}$ 를 반응시킨 후 spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 sodium nitrate ( $\text{NaNO}_2$ )를 기준으로 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

6. ELISA 방법에 이용한 IL-6, TNF- $\alpha$  측정

BV-2 세포는  $3.5 \times 10^5$  cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 목천료 에탄올 추출물을 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 1시간 전처리한 후에 200 ng/mL의 LPS를 처리하여 20시간 더 배양하였다. 그 후 배양액을 회수하여 배양액으로 분비된 IL-6와 TNF- $\alpha$ 를 ELISA kit (Thermo Fisher, Waltham, MA)를 이용하여 측정하였다. 450nm에서 흡광도를 측정하여 cytokine을 정량하였다.

7. Western blot analysis

시료를 1시간 전처리한 후 LPS 처리하고 18시간 후 lysis하여 단백질을 회수하였으며 이 단백질을 이용하여 iNOS와 COX-2 발현을 측정하였으며, LPS 처리 후 30분 뒤 세포를 lysis하여 모든 단백질을 이용하여 MAPKs 발현 변화를 측정하였으며 단백질 회수 방법은 다음과 같다. BV-2 세포를 harvest 한 후 원심 분리하여 그 상등액을 버리고 cell pellet을 모았다. PRO-PREP Protein Extraction Reagent (iNtRON)를 이용하여 세포를 lysis 시킨 후 원심분리 (13,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 취하였다. 단백질량은 Bradford assay 방법으로 정량하였으며, 정량된 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, PVDF membrane으로 transfer하였다. 멤브레인을 5% skim milk로 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 1차 항체는  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 시킨 후 tris-buffered saline Tween-20(TBST) buffer로 10분간 3회 washing 하였다. Horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체로 1시간 반응시켰다. TBST buffer로 10분간 3회 세척한 멤브레인에 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 처리하여 LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. 단백질 band의 intensity는 Image J (version, 1.52) 프로그램을 이용하여 측정하였다.

8. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하고, 결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 각 군 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 프로그램을 이용하여 Student t-test 및 ANOVA방법으로 검증하여  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 수율

목천료의 용매별 수율을 분석한 결과, 물 추출물은 13.46%(w/w), 50% 에탄올 추출물은 20.85%(w/w), 100% 에탄올 추출물은 0.784%(W/W)로 50% 에탄올로 추출 했을 때의 수율이

가장 높게 나타났다.

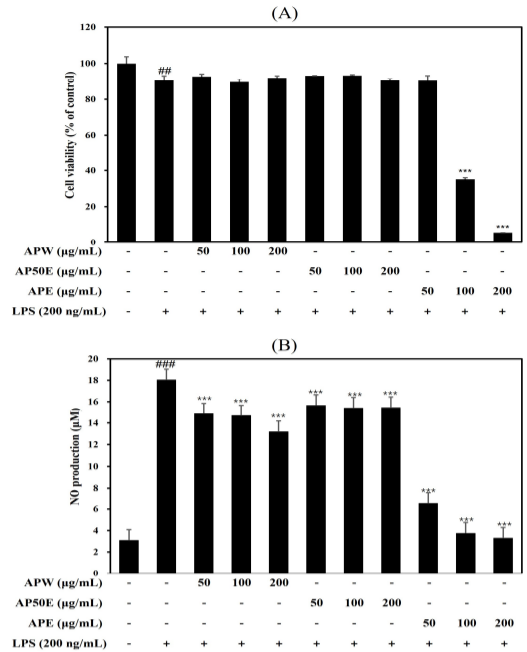


Fig. 1. Effects of *A. polygama* extract on the cell viability (A) and on the release of NO (B) in LPS-stimulated BV2 cells. Cells were pre-treated with or without *A. polygama* extract at indicated concentrations (50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h before LPS treatment (200 ng/mL). After 24 h of stimulation with or without LPS, cell viability was measured by MTT assay and NO was measured by Griess's reagent assay. The data is presented as a mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. ## $p < 0.01$  compared with the control group; \*\*\* $p < 0.001$  compared with the LPS-stimulated group. APW: water extract of *A. polygama*, AP50E: 50% ethanol extract of *A. polygama*, APE: 100% ethanol extract of *A. polygama*

2. 세포 독성 평가

MTT assay를 이용하여 BV2 세포에서 목천료 물추출물과 50% 에탄올 추출물 및 100% 에탄올 추출물의 세포 독성을 확인하였다(Fig. 1A). 목천료 물추출물과 50%에탄올 및 100% 에탄올 추출물을 농도별(0, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리한 결과, 물 추출물과 50%에탄올 추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 모두 독성을 나타내지 않았다. 그러나, 100% 에탄올 추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도와 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 세포생존율이 각각 35.13%와 5.54%로 매우 높은 세포 독성을 나타내었다. 그러나 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 전혀 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 2A).

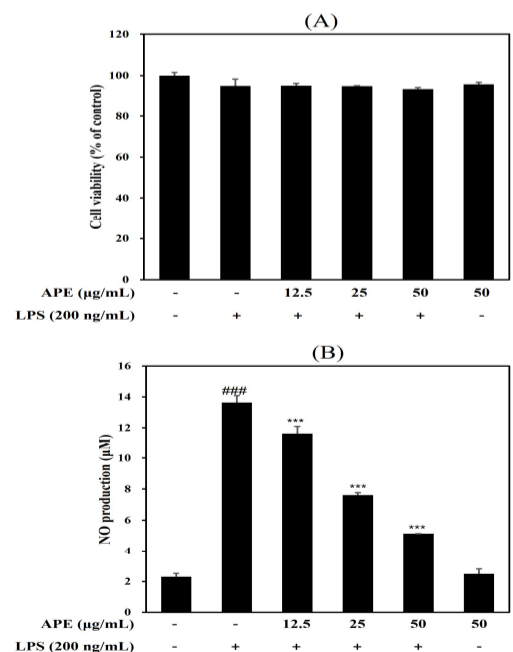


Fig. 2. Effects of APE on the cell viability (A) and on the release of NO (B) in LPS-stimulated BV2 cells. Cells were pre-treated with or without APE at indicated concentrations (12.5, 25 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h before LPS treatment (200 ng/mL). After 24 h of stimulation with or without LPS, cell viability was measured by MTT assay and NO was measured by Griess's reagent assay. The data is presented as a mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. ### $p < 0.001$  compared with the control group; \*\*\* $p < 0.001$  compared with the LPS-stimulated group.

3. Nitric oxide 생성 저해 효과

BV2 세포에 LPS (200 ng/mL)를 처리하였을 때, 생성된 NO의 함량이 18 μM로 무처리군에 비해 7배 가까이 증가하였다. 또한 목천료 물추출물을 농도별로 (50, 100, 200 μg/mL) 처리하였을 때는 14.84, 14.66, 13.17 μM로 LPS 처리 대조군에 비해 줄어드는 경향이 있었다(Fig. 1B). 그러나 50% 에탄올 추출물을 농도별 (50, 100, 200 μg/mL)로 처리하였을 때는 15.66, 15.41, 15.44 μM로 NO의 양이 조금 감소되긴 하였지만 물추출물이나 100%에탄올 추출물에 비해서는 NO의 생성량이 많이 줄지는 않았다. 또한, 목천료 100% 에탄올 추출물을 농도별 (50, 100, 200 μg/mL)로 처리하였을 때는 6.51, 3.74, 3.28 μM로 NO 생성량을 가장 억제하는 것을 확인하였다. 100% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 NO의 생성량이 매우 적은 것은 세포 독성에 의한 것으로 판단 된다. 특히 100 μg/mL 이상의 농도에서는 세포 독성이 뚜렷하게 나타났다. 따라서, NO의 생성억제가 가장 우수하면서 세포 독성이 없는 100%에탄올 추출물을 50 μg/mL의 농도를 최고 농도로 하여 NO assay를 재수행 하였다. 그 결과, 목천료 100%에탄올 추출물은 LPS로 유도된 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인하였다 (Fig. 2B). 이후 실험은 목천료 100%에탄올 추출물만을 이용하여 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 수행하였다.

4. 염증 관련 단백질 발현 측정

목천료 추출물이 NO 생성과 관련 있는 단백질인 iNOS와 염증 관련 단백질인 COX-2의 단백질 발현 변화에 미치는 영향을 측정하였다 (Fig. 3A, 3B). LPS를 처리하였을 때 증가된 iNOS 단백질 발현이 목천료 100%에탄올 추출물을 전처리하였을 때 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다. 또한 COX-2 단백질도 목천료 추출물을 50 μg/mL 농도로 처리하였을 때 유의적으로 감소되었다.

목천료 추출물이 MAPK 신호전달과 관련이 있는지 알아보기 위하여 western blot 방법을 이용하여 MAPK 단백질을 측정하였다. LPS를 처리하였을 때 인산화된 p38, ERK, JNK의 발현량이 증가하였고, 목천료 추출물을 전처리하였을 때 p-ERK를 제외한 p-p38과 p-JNK가 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였으며 특히 p-p38의 발현량이 가장 억제 되었다 (Fig. 4A, 4B).

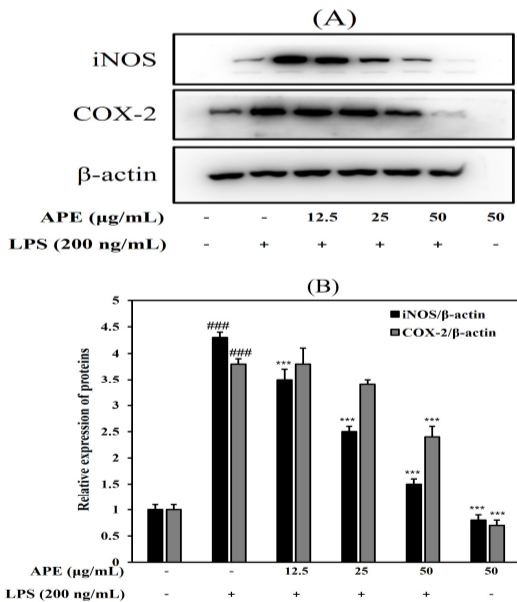


Fig. 3. Effect of APE on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with APE for 1 h and stimulated with LPS for 18 h. Cell lysates were prepared and analyzed by western blotting with anti-iNOS and anti-COX-2 antibodies as described in Materials and Methods. β-Actin was used for normalization of iNOS and COX-2. ###p<0.001 compared with the control group; \*\*\*\*p<0.001 compared with the LPS-stimulated group.

5. 염증 관련 cytokine 측정

BV2 세포에 목천료 100%에탄올 추출물을 12.5, 25, 50 μg/mL의 농도로 1시간 전처리하고 LPS를 처리하여 18시간 동안 배양한 후 배양액을 이용하여 염증 반응에서 생성되는 cytokine인 IL-6와 TNF-α의 변화량 측정하였다. 목천료 에탄올 추출물은 LPS로 유도하여 생성되는 IL-6와 TNF-α의 생성량을 농도 의존적으로

감소시켰다 (Fig. 5A, 5B)

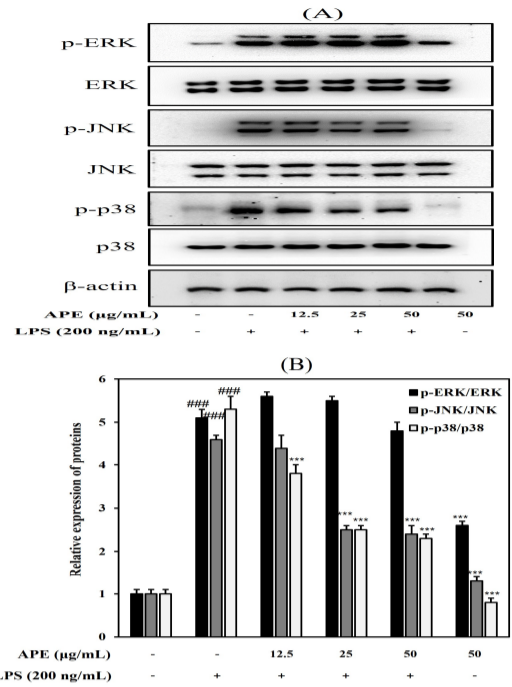


Fig. 4. Effect of APE on MAPKs expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with APE for 1 h and stimulated with LPS for 30 min. ###p < 0.001 compared with the control group; \*\*\*p < 0.001 compared with the LPS-stimulated group.

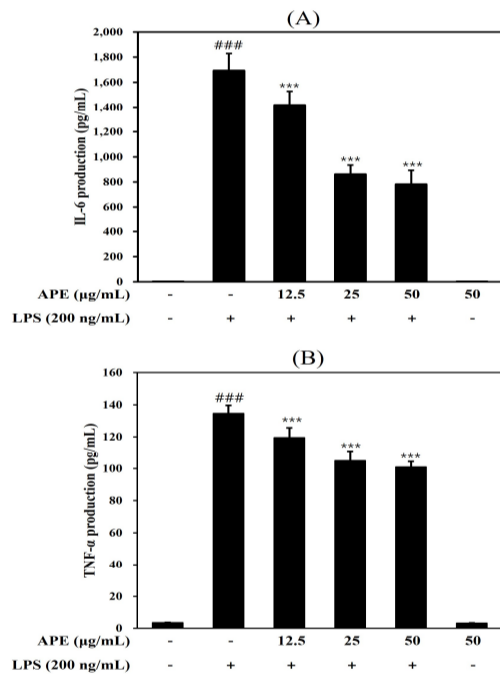


Fig.5. Effect of APE on production of pro-inflammatory cytokine in BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with APE for 1 h and stimulated with LPS for 18 h. Culture media were analyzed for IL-6(A) and TNF-α(B) levels as described in Material and methods.

고찰

신경교세포 또는 신경아교세포(glial cell)는 신경계를 구성하는 세포 중 신경세포가 아닌 세포들을 일컫는다. 신경퇴행성질환에서 신경교세포가 정상기능을 잃거나 독성을 띠는 이상기능을 나타내는 것이 전반적인 신경세포의 퇴행에 영향을 미친다<sup>17)</sup>. 뇌졸중에서도 신경교세포와 관련하여 병변 부위의 염증반응이 활성화되고 이러한 기전이 부종을 유발하고 신경학적 증상을 가중시키므로, 신경교세포와 관련한 다양한 염증 부산물을 줄이고 연쇄반응을 막아서 그로 인한 증상을 경감시키고 손상을 막을수 있는 치료 방안에 대한 연구가 필요하다. 이에 대하여 임상에서 활용되고 있는 한약 복합처방과 한약 단미를 활용한 연구 뿐만 아니라, 추출물로부터 분리된 다양한 분획물을 이용한 신경교세포에서의 염증반응 억제효과를 확인하는 연구가 진행되었다<sup>18)</sup>.

목천료자(木天蓼子)는 개다래나무 열매로, 개다래나무는 다래나무과(Actinidiaceae)에 속하는 낙엽덩굴이고, 열매는 종종 개다래나무 진딧물(Aspidyliamatatabi)의 알이 부착하여 성장하여 불규

칙한 별레주머니 모양처럼 보인다. 목천료에는 triterpene류가 함유되어 있고, 열매에는 ceramide인 actinidiamide와 불포화지방산인 alpha-linolenic acid가 함유되어 있으며, 비만, 알레르기, 염증 및 천식 등을 조절하는 효과가 보고되었다<sup>19)</sup>.

중추신경의 퇴행성 질환과 뇌졸중 등 각종 노인성 질환 치료 및 예방에 있어서 신경교세포와 관련한 염증기전에 대한 연구가 주요할 것으로 판단하여, 항염증, 항알레르기, 항천식 작용이 있는 것으로 알려진 목천료자를 이용하여 mouse BV2 cell에서 산화물질의 발현, 염증반응 매개체들의 반응을 관찰하였다.

본 연구에 앞서 세포의 독성을 평가하기 위해 목천료를 3가지 방법 (물, 50%에탄올, 100%에탄올)으로 추출하여 이 중 BV2 세포를 사용하여 독성이 없는 농도에서 신경염증 활성 억제에 관한 효과를 확인하였다.

NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine로부터 합성되는 라디칼로서, 세포 신호전달에 중요한 물질이며 생체 내 고농도로 NO가 생성되면 염증반응에 의한 조직의 상해, 패혈증 및 자가 면역 질환을 초래할 수도 있다<sup>20,21)</sup>.

BV2 세포에 LPS를 처리하였을 때 NO 함량은 무처리군에 비해 7배 증가하는 것을 확인하였고, BV2 세포에 목천료 물추출물을 농도별로 처리한 결과 LPS 처리 대조군에 비해 NO 함량이 감소하였다. 특히 100% 에탄올 추출물에서 목천료추출물 농도가 높을수록 NO 생성량을 억제하는 결과가 나타났으나, 이는 세포 독성과 관련한 것으로 판단하였으며, NO 생성억제 효과가 양호하면서 세포 독성이 없는 적정 용량을 찾고자 하였다. 따라서, 100%에탄올 추출물 50 µg/mL의 농도를 최고 농도로 하여 NO assay를 재수행 하였고 그 결과 목천료 100%에탄올 추출물은 LPS로 유도된 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인하였다. 이후 실험에서는 100%에탄올 추출물을 이용하여 독성이 없는 농도인 50 µg/mL을 최고 농도로 하여 진행하였다.

iNOS는 Ca<sup>2+</sup> 비의존성 경로를 통하여 다량의 NO를 생성하며, iNOS의 발현은 macrophage, 내피세포, 심근세포, 평활근세포 등 여러 세포에서 발견되고 있다<sup>22)</sup>. iNOS는 면역 관련된 역할을 수행하는 단백질로 염증성 cytokine들이나 LPS등에 의해 세포가 자극되면 발현되며, 과도한 iNOS의 발현은 NO의 생성량을 증가시켜 염증반응을 유도한다.

다수의 항염증 약물들의 작용기전이 되는 COX-2 생성억제를 살펴본 결과, 목천료 100%에탄올 추출물은 LPS에 의해 발현되는 COX-2 단백질을 50 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 억제하였음을 확인할 수 있었다.

MAPK(mitogen-activated protein kinase)는 LPS 등 다양한 자극에 대해 활성화되고 세포 핵내에서 전사인자로 역할하며 특히 세포의 성장, 사멸 및 분열에 중요한 역할을 한다<sup>23)</sup>. MAPK family에는 대표적으로 Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38) 세 가지 효소가 있다<sup>24)</sup>.

LPS는 gram-negative 세균의 세포벽 구성성분으로 강한 염증반응을 일으키며 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 하부 세포신호 전달경로인 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성화를 유도하며 활성화된 신호전달경로는 pro-inflammatory cytokines, NO, prostaglandin (PG)s와 같은 여러 가지 염증성 매개 인자들을 발현시킴으로써 면역계 기능의 장애를 초래하게 된다.

목천료 추출물이 MAPK 신호전달과 관련이 있는지 알아보기 위하여 western blot 방법을 이용하여 MAPK 단백질의 발현을 비교해 본 결과, BV2 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도하였을 때, 인산화된 p38, JNK, ERK가 대조군에 비해 증가 되었으며 목천료 에탄올 추출물을 전처리하였을 때는 p-p38, p-JNK가 농도 의존적으로 억제되었다. 이와 같은 결과는 목천료 에탄올 추출물이 MAPK 신호전달 경로를 통하여 염증을 감소시키고 있다고 해석할 수 있다.

염증은 주요 매개자인 염증성 사이토카인(Inflammatory cytokine)을 분비하여 염증반응의 증폭과 지속을 조절하는데, IL-6는 대표적인 염증성 사이토카인으로서 다양한 요인에 의해 합성되어 분비되면서 급성 혹은 만성 염증질환의 발생 및 진행 과정에서 중요한 역할을 하며, TNF-α는 염증반응 초기에 해당 부위로 호중

구를 유도하며, 급성 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자이다<sup>25)</sup>.

염증과 관련된 대표적인 사이토카인인 IL-6와 TNF-α를 측정 한 결과도 목천료 에탄올 추출물을 전처리하였을 때 농도 의존적으로 사이토카인의 방출량이 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 항염증 물질의 연구에 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

위의 결과를 종합하여 볼 때, 목천료 추출물은 과도한 염증반응 억제에 효능이 있으며 이는 목천료 추출물이 신경염증 억제에 관한 시료로 연구 가능성이 있을 것으로 판단 된다. 이후 후속 연구를 통하여 목천료 에탄올 추출물의 신경염증 억제 효능의 중심 성분 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

## 결 론

본 연구는 mouse microglia BV2 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 microglia의 활성화를 통해 염증반응을 유도 한 후, 목천료 추출물을 처리하여 산화 물질의 발현 및 신경염증 활성 억제 효과가 있는지 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

목천료 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였고, LPS에 의해 발현되는 COX-2 단백질을 목천료 에탄올 추출물 50 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 억제하였다. MAPK 단백질의 발현을 비교해 본 결과, 목천료 에탄올 추출물을 전처리하였을 때는 p-p38, p-JNK가 농도 의존적으로 억제되었다. 염증과 관련된 사이토카인 IL-6와 TNF-α를 측정 한 결과도 목천료 에탄올 추출물을 전처리하였을 때 농도 의존적으로 사이토카인의 방출량이 줄어들었다.

이상의 결과를 미루어 보아 목천료 추출물은 신경염증 억제 효과 있는 것으로 사료되고 향후 신경염증을 기전으로 발생하는 각종 질환에 응용가능한지 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2021학년도 세명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

## References

- Kim H, Song MJ, Daniel Potter. Medicinal efficacy of plants utilized as temple food in traditional Korean Buddhism. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;104(1-2): 32-46.
- Li XJ, Kim KW, Ko WM, Kim DC, Yoon CS, Liu XQ, Oh HC, Kim YC. Triterpenes with Inhibitory Effects of Nitric Oxide Production from the Fruit Galls of *Actinidia polygama* on LPS-Induced RAW264.7 and BV2 Cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 2017;48(2):108-12.
- Lee YC, Kim SH, Seo YB, Roh SS, Lee JC. Inhibitory effects of *Actinidia polygama* extract and cyclosporine A on OVA-induced eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology.* 2006;6(4):703-13.
- Yutaka Sashida, Kazunori Ogawa, Tsuyoshi Yamanouchi, Hiroyuki Tanaka, Yukihiko Shoyama, Itsuo Nishioka. Triterpenoids from callus tissue of *Actinidia polygama*. *Phytochemistry.* 1994;35(2):377-80.
- Y Sashida, K Ogawa, N Mori, T Yamanouchi. Triterpenoids from the fruit galls of *Actinidia polygama*. *Phytochemistry.* 1992;31(8):2801-4.
- Göran K Hansson, Anna-Karin L Robertson, Cecilia Söderberg-Nauclér, Inflammation and atherosclerosis. *Annual Review of Pathology.* 2006;1:297-329.
- Guzik TJ, R. Korbout, T. Adamek-Guzik. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003;43:469-48.

8. Taral N Patal, Mehdi H Shishehbor, Deepak L. Bhatt. 2007. A review of high-dose statin therapy: targeting cholesterol and inflammation in atherosclerosis. *European Heart Journal*. 2007;28:664-72.
9. F. González-Scarano, Gordon Baltuch. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*. 1999;22:219-40.
10. Kim YS, Tong H. Joh. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental and molecular medicine*, 2006;38(4):333-47.
11. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999;179:294-304.
12. Jianrong Li, Olivier Baud, Timothy Vartanian, Joseph J Volpe, Paul A Rosenberg. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:9936-94.
13. PL McGeer, T Kawamata, DG Walker, H Akiyama, I Tooyama, EG McGeer. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993;7:84-92.
14. Gonzalez-Scarano FG. Baltuch. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu.Rev. Neurosci*. 1999;22:219-40.
15. Tingting Zheng, Zhengxiang Zhang. Activated microglia facilitate the transmission of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*. 2021;148, 105094.
16. J Wegiel, HM Wisniewski. The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta Neuropathologica*. 1990;81:116-24.
17. KM Lee. Neuroglial Cells : An Overview of Their Physiological Roles and Abnormalities in Mental Disorders. *Korean J Biol Psychiatry* 2015;22(2):29-33.
18. HY Son, YK Park. Anti-inflammatory Effects of Different Fractions Isolated from Modified Boyanghwano-tang Extract in LPS-stimulated Microglial Cells. *Kor. J. Herbology* 2009;24(4):173-9.
19. Xiao Jun Li, KW Kim, WM Ko, DC Kim, CS Yoon, Xiang Qian Liu, HC Oh, YC Kim. Triterpenes with Inhibitory Effects of Nitric Oxide Production from the Fruit Galls of *Actinidia polygama* on LPS-Induced RAW264.7 and BV2 Cells. *Kor. J. Pharmacogn*. 2017;48(2):108-12.
20. C Nathan and QW Xie, Regulation of biosynthesis of nitric oxide, *J. Biol. Chem*. 1994;269:13725-8.
21. RW Ganster, BS Taylor, L Shao, D A Geller. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat1 and NF-KB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001;98:8638-43.
22. J Marcinkiewicz, A Grabowska, B Chain. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *European Journal of Immunology*. 1995;25:947-51.
23. Bozena Kaminska. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2005;1754:253-62.
24. B S Berlett, E R Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:20313-6.
25. Matthay MA, GA Zimmerman, C Esmon, J Bhattacharya, B Coller, CM Doerschuk, J Floros, MAJ Gimbrone, E Hoffman, RD Hubmayr, M Leppert, S Matalon, R Munford, P Parsons, AS Slutsky, KJ Tracey, P Ward, DB Gail, AL Harabin. Future research directions in acute lung injury: Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2003;167:1027-35.