생쥐 소교세포(BV-2)에서 우르소데옥시콜린산에 의한 iNOS 발현억제

중앙대학교 약학대학 면역학교실

주성수 · 원태준 · 황광우 · 이도익

Inhibition of iNOS Expression Via Ursodeoxycholic Acid in Murine Microglial Cell, BV-2 Cell Line

Seong-Soo Joo, Tae-Joon Won, Kwang-Woo Hwang and Do-Ik Lee

Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Inflammation in the brain has known to be associated with the development of a various neurological diseases. The hallmark of neuro-inflammation is the activation of microglia, brain macrophage. Pro-inflammatory compounds including nitric oxide (NO) are the main cause of neuro-degenerative disease such as Alzheimer's disease (AD) which is resulted in cell death. Among those pro-inflammatory compounds, NO contributes to the cell death by directly or indirectly. **Methods:** In the study, we examined whether ursodeoxycholic acid (UDCA), a non-toxic hydrophilic bile acid, inhibits the NO production by a direct method using Griess reagent and by RT-PCR in the gene expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS). In signal transduction, we also examined the NF-κB (p65/p50), IKK, and IκB, which are associated with the expression of iNOS gene using western blots. **Results:** In the present study, we found that UDCA effectively inhibited NO production in BV-2 microglial cell, and NF-κB activation was reduced by suppressing IKK gene expression and by increasing the IκB in cytosol comparing those to the positive control LPS. **Conclusion:** Taken together, these data suggested that UDCA may play a crucial role in inhibiting the NO production and the results imply that UDCA suppresses a cue signal of the microglial activation via stimulators, such as β-amyloid peptides which are known to stimulate microglia in AD pathogenesis. **(Immune Network 2005;5(1):45-49)**

Key Words: Nitric oxide, iNOS, NF-κB, ursodeoxycholic acid, Alzheimer's disease

서 론

Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 혈관 평활근 확장, 병원균 제거, 신경전달물질로서의 기능을 가지는 분자로(1) 이식 거부 반응에서도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(2). 이와 같은 NO는 병원균 제거 및 면역계와 관련하여 macrophage가 염증활성 상태에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 다량 생산함으로 arginine으로부터 NO를 생성, 염증 반응을 촉진하며, pro-inflammatory인자로서 작용을 하게 된다(3). 특히 bacteria와 같은 세균감염 시 방출된 lipopolysaccharide (LPS)가 host receptor와 결합하여 세포 내 신호 전달이 일어나는데, 이 때 IκB kinase (IKK) complex가 활성화되어 IκB의 phosphorylation 및 degradation이 유발된다(4). 이 때 IκB에서 분리되어 자유로워진 NF-κB dimmer (p65/p50)는 세포질에서 핵으로 전위하여 면역 및 염증 관련 유전자들의 promoter 영역에 결합하여 전사를 증가시키므로 iNOS 발현 및 NO 생성을 포함하는 다양한 염증 반응이 일어난다(5). 이러한 과정은 뇌에서도 일어날 수 있으며 이와 같은 과정에 중요하게 관여하는 세포로서 microglia가 알려져 있다. Microglia는 뇌에 존재하는 대식세포로

책임저자 : 이도익, 중앙대학교 약학대학 면역학교실
㉾ 156-756, 서울시 동작구 흑석동 221
Tel: 02-820-5608, Fax: 02-820-5608
E-mail: leedi@cau.ac.kr

본 연구는 2004년도 보건장학회 지원으로 수행되었음.

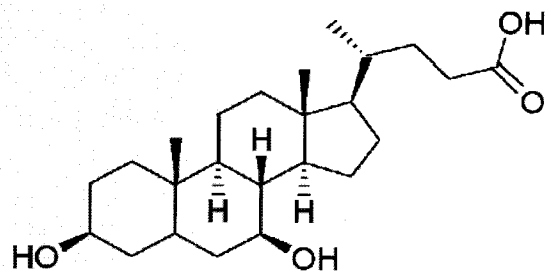

Figure 1. Chemical structure of UDCA.

서 monocyte에서 분화되어 중추신경계에 산재하는 비신경세포로(6) 뇌 손상이나 감염에 대해 초기 반응을 나타내어 염증성 cytokine, 단백질 분해 효소, 활성 산소 등을 방출하여 생체를 보호하는 면역세포이다(7). 그러나 microglia의 지나친 활성화는 만성 염증을 유발하여 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)과 같은 퇴행성뇌질환의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다(8). 특히 최근 많은 연구가 진행 중인 AD의 경우, 뇌 내 amyloid β (Aβ) 펩타이드가 비정상적으로 다량 만들어져 뇌 조직에 노인반이라고 불리는 senile plaque이 형성되면 microglia가 이를 항원으로 인식하여 활성화되고 염증을 일으키는 proinflammatory cytokines 및 NO를 방출하여 염증 반응을 유발하는데, 이 때 뇌 조직의 산화적 손상 및 세포사를 유발하여 신경 세포의 기능 손실이 발생한다고 알려져 있다(9). 따라서 microglia 활성화 억제는 AD를 비롯한 다수의 신경퇴행성질환의 경과를 경감시키는 효과적인 접근법이라 할 수 있다(10). 본 연구에서 사용된 우르소데옥시콜린산(ursodeoxycholic acid, UDCA) (Fig. 1)은 손상된 간에서 나타나는 담즙성 간질환, 고빌리루빈혈증 등의 개선에 임상적으로 사용되는 친수성 담즙산으로(11,12) 세포보호 작용과 관련하여 미토콘드리아의 cytochrome *c* 방출, caspase 활성화, 핵 내 효소 PARP의 분열 등을 포함하는 apoptosis 경과를 억제할 수 있다는 연구가 보고되었고(13) 최근 항염증 효과와 관련하여 proinflammatory cytokine의 생성을 억제한다는 연구도 보고되었다(14). 본 연구에서는 LPS로 활성화시켜 염증 반응을 유도한 BV-2 microglial cell line에 UDCA 농도 별 처리 시 발생하는 NO 생성, iNOS 단백질 및 유전자 발현, NF-κB signal transduction의 추이를 관찰하여 UDCA에 의한 NO억제작용을 확인하였다.

재료 및 방법

UDCA (Sigma, U.S.A.), LPS (lipopolysaccharide) (Sigma, U.S.A.) 원액은 마이크로필터(0.2 μm)를 통과한 배지에 녹여 준비했다. UDCA는 2.5, 5, 7.5, 10 μg/ml, LPS는 5 μg/ml의 농도가 되도록 했다. 이 원액들은 이 후의 사용을 위해 −20°C에서 보관하거나 세포 배양 실험을 위해 1~5% FBS αMEM 배지에 직접 희석했다. 본 실험에서 사용된 BV-2 cell line은 primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogen을 감염시켜 만들어진 세포주이며 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary cell과 같다(15,16). 동결된 BV-2 세포를 해동하여 10% FBS αMEM (Cellgro, U.S.A.) 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS αMEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV-2 세포의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS αMEM 배지에서 안정화시킨 BV-2 세포를 *in vitro* 모델로 사용하였다.

NO 측정. NO는 Griess reagent system (Promega, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 즉, NO 측정을 위해 각 군의 상징액 50 μl를 취하여 96 well plate로 옮긴 후 sulfanilamide 용액 50 μl를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 이어서 N-1-napthylethylene diamine dihydrochloride (NED) 용액 50 μl를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 30분 내에 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 표준검량곡선을 통해 계산하였다.

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). 각 군의 1×10^7 개/ml의 세포로부터 Trizol Reagent (Life Technologies, U.S.A.)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Trizol reagent 1 ml를 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 5분 동안 방치 후 chloroform 200 μl를 첨가하여 13500 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 투명한 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 13500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 RNA를 침강시켰다. RNA 침전을 75% EtOH in DEPC 1 ml로 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. RT-PCR 반응 용량은 20 μl가 되도록 하였고 ethidium bromide로 염색된 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다.

Western Blot. 각 군 별로 세포질과 핵에서 각각 단백질 sample을 분리해낸 후 25 μg을 SDS loading buffer와 함께 90°C에서 5분 동안 가열하고 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하였다. Gel에서 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk/TBS-T로 1시간 동안 blocking 한 후 TBS-T에 희석된 anti-NF-κB p65 (Delta Biolabs, U.S.A), anti-NF-κB p50 (Delta Biolabs, U.S.A.), anti-IκBα (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)를 1시간 동안 incubation후 anti-rabbit Ig-horse radish peroxidase (Zymed, U.S.A.) 2차 항체를 붙여 ECL (enhanced chemiluminescence luminogram) reagent (Amersham, U.S.A.)로 반응시킨 후 x-ray film에 exposure 하였다.

통계처리. 결과분석은 GraphPad Prizm 4 software를 이용

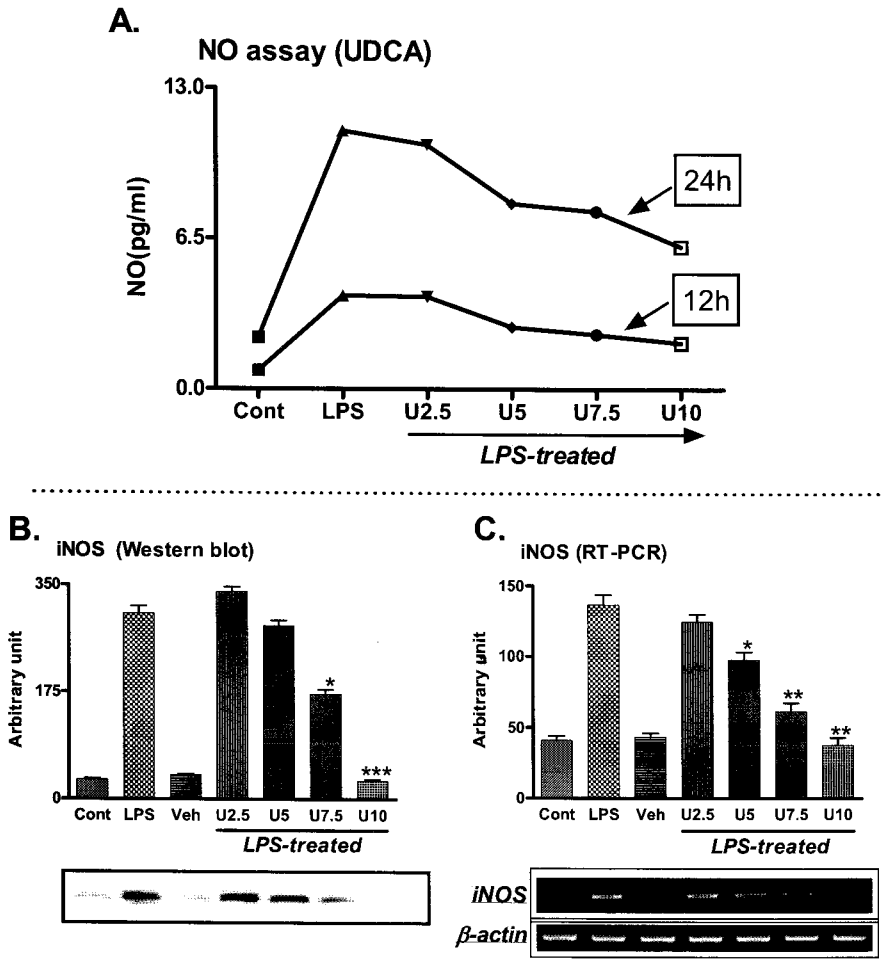

Figure 2. Comparison of nitric oxide and iNOS expression. A. NO concentration was examined under Griess reagent system by taking media at 12 h and 24 h. B. Western blot results of iNOS at 24 h. C. RT-PCR was used to identify the iNOS gene expression at 24 h and the intensity was analyzed by gel doc (UVIDocMw program). Cont; control (culture media), LPS; lipopolysaccharide (5 μg/ml), Veh: vehicle (methanol), U2.5; 2.5 μg/ml UDCA, U5: 5 μg/ml UDCA, U7.5; 7.5 μg/ml UDCA, U10: 10 μg/ml UDCA. Data are presented as mean $\pm$ SD values (n=3). *p $<$ 0.05, **p $<$ 0.01, ***p $<$ 0.0001 (vs LPS).

하여 $p<0.05$일 때 통계적 유의성이 있음을 인정하였고, PCR및 western blot 결과의 분석은 gel/membrane band scanning 후 UVIDocMW program을 통해 band intensity의 상대비교 분석을 실시하였다.

결 과

UDCA의 NO 생성 및 iNOS 발현 억제 효과. Pro-inflammatory cytokines와 더불어 NO는 신경계 염증 및 퇴행 과정의 주요 매개 인자로 iNOS에 의해 양적 증가가 일어나며, 고농도의 NO가 존재할 때 만성염증 및 신경세포 파괴가 일어나게 된다. 따라서 AD와 같은 질환에서 microglia에 의한 NO의 억제가 요구된다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, UDCA 처리군에서 NO의 억제가 dose-dependent 하게 나타났으며, 농도의 차이는 있었으나, 12h 및 24h에서 dose별 유사한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 gene expression및 protein analysis에서 보다 구체적인 비교를 실시하였으며, 결과적으로 Fig. 2B-C에서와 같이 iNOS 및 iNOS gene expression은 UDCA에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다. 특히 UDCA 10 μg/ml에서 가장 효과적인 억제가 관찰되었으며, 5 μg/ml 미만의 저 농도에서 iNOS의 up-regulation이 관찰되어 UDCA의 biphagic effect의 가능성이 기대되었다.

UDCA의 NF-κB 신호 전달 조절. NF-κB는 IκB와 분리된 상태에서 활성화되어 핵 내로 이동하고 IκB의 분해는 LPS 등의 외부자극을 통해 IKK에 의한 인산화에 의해 시작된다(5). Figure 3A-B는 UDCA 처리 후 1시간 내 나타나는 signal transduction을 관찰한 결과이며, 동일한 cell lysate에서 추출되는 cytosolic/nuclear protein을 검량하였다. DNA-binding subunit인 p65는 cytosol과 nuclear간 농도 비가 현격히 차이가 나 positive control인 LPS와 UDCA에 의한 NF-κB의 translocation을 예측할 수 있었다. LPS의 경우 LPS 처리 후 1 시간 이내에 신속한 반응이 일어나 nuclear내 p65의 농도가 높게 나타나는 것으로 생각되며, UDCA 농도가 고농도로 갈수록 LPS와 반대의 경향을 보여 결국 UDCA가 NF-κB의 활성을 억제하고 있는 것으로 판단된다(Fig. 3A). 반면, p50은 cytosol/nuclear내 농도변화의 유의성은 발견할 수 없었으나, UDCA 최고농도인 10 μg/ml에서 nuclear내 p50의 농도가 낮게 관찰되어 translocation이 되는 p50의 농도가 상대적으로 적음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 또한 이와 같은 신호를 주

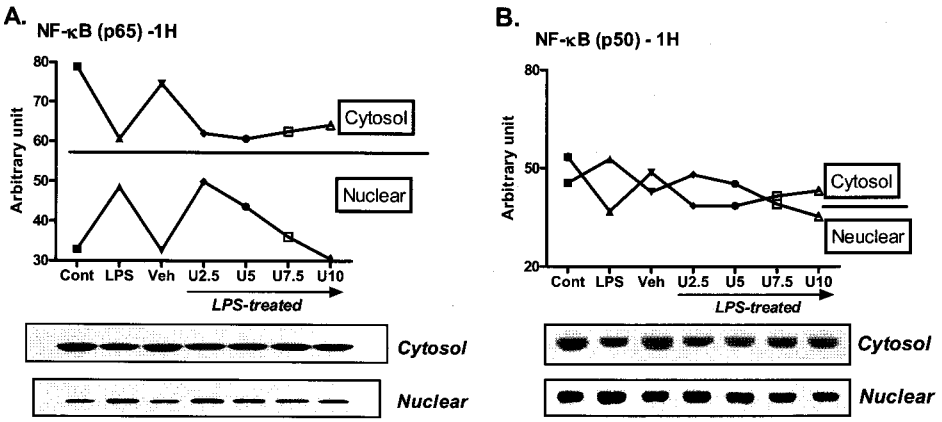

Figure 3. Regulation of NF-κB in cytosol and nucleus at 1 h. Equal amounts of protein (25 μg) was loaded for the detection of p65 and p50 in both status and the blot intensity was compared between cytosol and nucleus. Cont: control (culture media), LPS: lipopolysaccharide (5 μg/ml), Veh: vehicle (methanol), U2.5: 2.5 μg/ml UDCA, U5: 5 μg/ml UDCA, U7.5: 7.5 μg/ml UDCA, U10: 10 μg/ml UDCA.

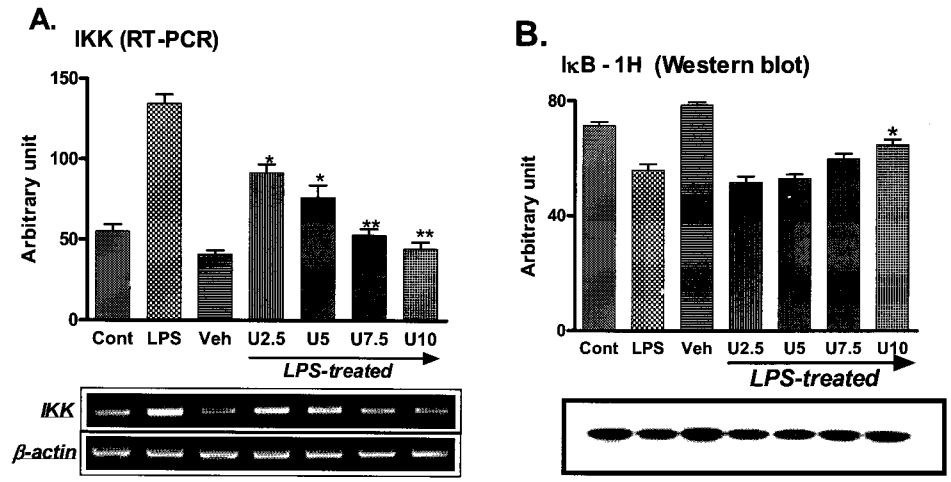

Figure 4. Regulation of IKK (RT-PCR) and IκB (western blot) expression. Cells were treated with UDCA (ranged from 2.5 to 10 μg/ml) after the pretreatment of LPS. A. RT-PCR for IKK gene expression. B. Western blots for relative IκB concentration in cytosol at the same condition of IKK preparation. Cont: control (culture media), LPS: lipopolysaccharide (5 μg/ml), Veh: vehicle (methanol), U2.5: 2.5 μg/ml UDCA, U5: 5 μg/ml UDCA, U7.5: 7.5 μg/ml UDCA, U10: 10 μg/ml UDCA. Data are presented as mean±SD arbitrary units (n=3). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (vs LPS)

는 IκB degradation은 IKK에 의한 작용이 주요하며, 따라서 본 연구의 consistency를 확인하기 위해 Fig. 4A-B와 같이 IKK mRNA expression 측정 및 cytosol 내 IκB농도를 비교하였다. 그림에서 보는 바와 같이 IKK의 gene expression은 UDCA 농도 의존적으로 감소하였으며(Fig. 4A), IκB의 농도변화는 유의한 차이는 없었으나 positive control인 LPS와 비교하여 비교적 높은 농도를 유지하여 IκB에 의한 NF-κB의 활성이 억제되고 있음이 관찰되었다.

결 론

NO는 host defense를 위해 생체 내 및 면역계에서 중요한 역할을 담당하지만 NO의 지나친 생성은 세포사를 유발하고 조직에 손상을 주는 퇴행성 기능을 동반하기도 한다(17). 특히 중추신경계에서 microglia의 만성 염증 반응에 의한 NO 생성은 신경세포의 기능 손실 및 사멸을 유도하여 AD를 비롯한 신경퇴행성 질환을 유발시킨다(18). 특히 다량의 NO 생성은 inducible NOS의 경로로 만들어지게 되는데, 이들은 대부분 면역학적 자극이나 염증성 자극에 의한다. 따라서 microglia와 같은 macrophage에서 NO의 증가는 그 의미가 크며, 이러한 NO 생성에 대한 신호전달과정 억제는 세포손상 및 세포사를 차단하는 중요한 단계이다. 본 연구에서 LPS 처리시 활성화되는 microglia로부터 발현되는 iNOS를 측정하여 NO 농도 변화에 대한 validation을 수행하였고, 이러한 iNOS의 발현을 촉진하는 신호전달과정인 NF-κB, IκB 및 IKK의 작용 및 활성여부를 관찰하여 UDCA의 강력한 NO억제효과를 확인하였다. Fig. 2에서 NO의 농도와 iNOS의 발현은 상호 일치하는 결과가 인정되었고 특히 UDCA 10 μg/ml에서 가장 효과적으로 억제됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 NF-κB 활성억제에서 확인되었다. 즉, NF-κB의 upstream과정인 IκB degradation과 이들을 인산화시키는 IκB 인산화효소(IKK)의 일련의 과정에서 UDCA는 positive control에 비해 IKK발현억제, IκB 농도유지(UDCA 고농도에서 증가) 및 NF-κB (p65/p50)의 translocation의 억제가 관찰되어 IκB degradation에 의한 NF-κB 활성이 조절되고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 UDCA의 항염효과와 NO에 의한 세포손상 보호효과가 가능함을 제시하고 있으며, 특히, 이와 같은 결과

가 microglia로부터 얻어진 결과임을 고려할 때 AD와 같이 만성염증이 질병의 원인이 되는 퇴행성뇌질환을 예방 및 치료할 수 있는 후보물질로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann Intern Med 120;227-237, 1994
2. Tsoulfas G, Geller DA: NF-kappaB in transplantation: friend or foe. Transpl Infect Dis 3;212-219, 2001
3. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39;191-220, 1999
4. Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR, Kim Y: Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. FEBS Lett 571;50-54, 2004
5. Yamamoto Y, Gaynor RB: IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. Trends Biochem Sci 29;72-79, 2004
6. Kreutzberg GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19;312-318, 1996
7. Kim HS, Whang SY, Woo MS, Park JS, Kim WK, Han IO: Sodium butyrate suppresses interferon-gamma-, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia. J Neuroimmunol 151;85-93, 2004
8. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos LJr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F: Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. Nature 374; 647-650, 1995
9. Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev 81;741-766, 2001
10. Kim WK, Jang PG, Woo MS, Han IO, Piao HZ, Lee K, Lee H, Joh TH, Kim HS: A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in activated microglia. Neuropharmacology 47;243-252, 2004
11. Czaja AJ, Carpenter HA, Lindor KD: Ursodeoxycholic acid as adjunctive therapy for problematic type 1 autoimmune hepatitis: a randomized placebo-controlled treatment trial. Hepatology 30;1381-1386, 1999
12. Funaoka M, Komatsu M, Toyoshima I, Mikami K, Ono T, Hoshino T, Kato J, Kuramitsu T, Ishii T, Masamune O: Tauroursodeoxycholic acid enhances phagocytosis of the cultured rat Kupffer cell. J Gastroenterol Hepatol 14; 652-658, 1999
13. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ: Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. Cell Death Differ 6;842-854, 1999
14. Joo SS, Kang HC, Won TJ, Lee DI: Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 beta and nitric oxide in rat microglia. Arch Pharm Res 26;1067-1073, 2003
15. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F: Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol 27;229-237, 1990
16. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H: An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. J Neurosci Res 31;616-621, 1992
17. Furge LL, Fields PR, Goode WE, Konwinski RR, Tressler MC, Stevens-Truss R: Oltipraz inhibits inducible nitric oxide synthase in vitro and inhibits nitric oxide production in activated microglial cells. Arch Biochem Biophys 424;163-170, 2004
18. Joo SS, Won TJ, Lee DI: Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). Arch Pharm Res 27;954-960, 2004