

# 오령산가온비탕의 BV2에서 LPS로 유도된 nitric oxide 및 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

손혜영, 김상운, 정선주, 정효원, 윤철호, 박용기\*\*

동국대학교 한의과대학 본초학교실

## Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF- $\alpha$ in LPS-stimulated microglia by On-Bi-Tang

Hye Young Son, Sang Woon Kim, Sun Ju Jung, Hyo Won Jung, Cheol-Ho Yoon, Yong-Ki Park\*

Department of Herbology, Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : On-Bi-Tang(OB) has been prescribed in Chinese traditional medicine for the treatment of inflammatory disease such as chronic renal failure. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of OB extract in the BV2 murine microglial cells.

**Methods** : After the water extract of OB was treated in BV2 cells, murine microglial line, the cell viability was measured by MTT assay. The production of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  was determined based on Griess reagent and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- $\alpha$  was analyzed by RT-PCR.

**Results** : OB extract significantly inhibited the LPS-induced production of NO and TNF- $\alpha$  in BV2 cells. OB extract also suppressed the mRNA expression of iNOS and TNF- $\alpha$  in BV2 cells activated with LPS.

**Conclusion** : These data suggests that OB extract may have the anti-inflammatory effect through the modulation of NO production and inflammatory cytokine such as TNF- $\alpha$ .

**Key words** : Anti-inflammation, BV2(microglial cell), iNOS, NO, On-Bi-Tang, TNF- $\alpha$

---

\* #제1저자, 교신저자: 박용기, 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실  
E-mail: yongki@dongguk.ac.kr, phone: 054-770-2661; fax: 054-770-2661.  
· 접수 : 2006년 5월 4일 · 수정 : 2006년 5월 25일 · 채택 : 2006년 6월 25일

## 서론

Microglia는 중추신경계(central nervous system: CNS)에서 발견되는 면역세포로서 CNS의 재생(regeneration)과 발달(development)에 매우 중요한 역할을 하며, 허혈(ischemia), 외상(truma), 감염(infection) 및 알츠하이머(Alzheimer's disease)나 파킨슨병(Parkinson's disease)과 같이 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease)과 밀접하게 연관되어 있다<sup>1)</sup>. 즉, 이들 질환이 발생하면 microglia는 손상된 조직 안으로 이동하여 활성화됨으로써 interleukin-1(IL-1), IL-3, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인(cytokine)이나 FGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, nerve growth factor(NGF) 등의 성장인자 및 brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), NT-4/5 등의 분비를 유도하여 항원을 제거(scavengers)하고, 신경세포 사이의 상호작용을 매개하며 손상 부위에 염증반응을 유발하는 등 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9)</sup>.

Bacterial lipopolysaccharide(LPS)는 뇌에 염증을 유발하는 주요 inflammagen으로서<sup>10)</sup>, LPS에 의해 활성화된 microglia는 nitric oxide(NO) 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage inflammatory peptide-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ), IL-6, IL-8, IL-18, macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등의 염증반응 매개물질(mediator)을 분비하게 되며<sup>11,12,13)</sup>, 특히 활성화된 microglia로부터 생성되는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 등의 염증 사이토카인이나 NO와 같은 세포독성물질은 뇌의 염증반응을 촉진시킴으로써 병 발달에 기여하게 된다<sup>14,15)</sup>. 따라서 최근에는 만성 염증성 질환을 대상으로 염증반응 매개물질의 활성 또는 생성을 저해할 수 있는 억제제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며<sup>16,17,18,19,20)</sup>, 특히 한약에서 이런 염증 매개물질의 조절제를 찾기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>21-24)</sup>. 현대 산업화 사회는 나날이 증가되고 있는 뇌질환의 치료를 위해 뇌조직의 손상을 막거나 예방할 수 있는 치료제 개발이 절실히 요구되고 있으며 이에 따라 부종, 신경염, 만성 신부전증 등의 염증질환치료제로 사용하고 있는 전통 한방처방을 기초로 뇌의 퇴행성질환에서 발생하는 염증을 개선시킬 수 있는 새로운 치료제를 개발하고자 본 연구를 계획하게 되었다.

온비탕(溫脾湯)은 중국의 孫思邈(AD 581-682)에 의하여 만들어진 처방으로서 만성신부전증(chronic renal failure disease) 환자를 치료하기 위해 중국에서 전통적으로 사용해오고 있는 처방으로서<sup>25)</sup> 신장의

사구체 경화(glomerular sclerosis)와 혈관세포 확장(mesangial matrix expansion)을 막아주고 TGF- $\beta$ 의 상승을 억제시키는 등 염증개선을 통해 신장질환을 완화시키는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>25,26,27)</sup>. 한편, 오령산(五苓散)은 장중경의 상한론에 기재된 대황, 인삼, 감초, 건장, 부자로 이루어진 처방으로서 수종, 설사, 소변불리, 두통, 발열, 번갈, 제하동계, 락란토사 등을 치료하거나 비신양허로 인한 수액대사이상을 치료하는데 사용한다. 따라서 본 논문에서 사용된 오령산가온비탕(五苓散加溫脾湯, On-Bi-Tang)은 임상에서 만성신부전증 환자의 요독증 증상이 비신양허(脾腎陽虛)로 탁음(濁陰)이 상역(上逆)하여 발생하는 것을 기초로, 이수제(利水劑)인 오령산에 비신양허를 도와주는 온비탕을 가감(加減)하여 본 교실에서 처방한 것이다.

따라서 본 연구는 오령산가온비탕(On-Bi-Tang(OB)) 추출액이 퇴행성 뇌질환시 발생하는 염증상태에서 뇌소교세포(microglia)의 변화에 미치는 영향을 보기 위하여 microglia의 세포를 이용하여 LPS 자극으로 유도되는 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 추출물 제조

오령산가온비탕은 澤瀉, 白茯苓, 白朮, 豬苓, 桂枝, 茵陳, 半夏, 蘇葉, 蔓藜, 大黃, 甘草, 淫羊藿, 丹參, 川黃連, 吳茱萸 등 15가지 약재의 특정 조성 비율로 구성하였다(표1).

약재명	학명(분량)
蔓藜	radices of <i>Codonopsis pilosula</i> (FR.) NANNF: 150g
丹參	radices of <i>Salvia miltiorrhiza</i> BGE: 150g
半夏	rhizome of <i>Pinellia ternata</i> (THUNB.) BREIT.: 100g
川黃連	rhizome of <i>Coptis chinensis</i> FRANCH.: 60g
吳茱萸	semen of <i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth.: 60g
黃	
淫羊藿	leaves of <i>Epimedium koreanum</i> NAKAI : 150g
大黃	rhizome of <i>Rheum palmatum</i> L.:100g
蘇葉	leaves of <i>Perilla frutescens</i> (L.)BRITT.:100g
甘草	radices of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH: 50g
茵陳	leaves of <i>Artemisia capillaris</i> THUNB.: 300g
澤瀉	rhizome of <i>Alisma plantago-aquatica</i> var. <i>orientale</i> SAMUELS : 200g
白茯苓	whole fungi of <i>Poria cocos</i> (SCHW.): 80g
白朮	rhizome of <i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ.:80g
豬苓	whole fungi of <i>Polyporus umbellatus</i> (PERS.) FRIES :80g
桂枝	branches of <i>Cinnamomum cassia</i> PRESL:40g

표 1. 加減溫脾湯合五苓

총 한약재 1.7kg을 5시간 동안 가스약탕기로 추출 하였으며, 그 여액을 2겹 여과지로 여과하고 rotary evaporator로 감압농축한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결건조 하였다. 추출된 오형산가온비탕액기스(OB extract)는 총 314.6g(yields of 18.5%)이었으며,  $4^{\circ}\text{C}$  냉장보관하면서 차후 세포에 처리하기 전 3차 증류수로 희석하여 사용하였다(OB extract).

## 2. 세포배양

BV2 cells(murine microglia line)을 10% fetal bovine serum(FBS, Mediatech), 100U/mL penicillin(GibcoBRL) 및 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 DMEM(Mediatech) 배지를 배양액으로 하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다.

## 3. MTT assay

BV2 cells( $5 \times 10^4$  cells/well)을 96-well plate에 100 $\mu\text{l}$  배양액으로 24시간 배양한( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 후, 다양한 농도(0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml)의 OB extract를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 5mg/ml 농도의 MTT(cell proliferation kit, Roche)용액 50 $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, formazan 결정을 용해하기 위해 100 $\mu\text{l}$ 의 solubilization 용액 첨가하였다. 이를 overnight 배양한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 550-600nm에서 흡광도를 측정하여 상대적인 cell viability를 계산하였다.

## 4. Nitric oxide 측정

BV2 cells로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉, BV2 cells( $1 \times 10^6$  cells/1 ml)에 OB extract를 처리한 후 30분간 배양하고 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS를 처리한 다음 24시간 다시 배양 하였다. 세포로부터의 NO 생성은 Griess reagent 반응을 이용하여 배양액에서 측정하였다. 즉, 세포배양액 50 $\mu\text{l}$ 에 100 $\mu\text{l}$  Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )을 96 well plate에서 10분간 암반응 시킨 후 microplate reader(Molecular device)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는  $\text{NaNO}_2$  표준액을 기준으로 측정된 NO의 양을 기준으로 계산되었다.

## 5. TNF- $\alpha$ 측정

BV2 cells로부터 생성되는 TNF- $\alpha$ 의 양은 세포배

양액으로부터 Ready-Set-Go mouse TNF- $\alpha$  CytoSets<sup>TM</sup> Biosource ELISA kit(eBioscience)를 이용하여 측정하였다. 먼저,  $1 \times$  coating solution에 희석한 capture Ab( $\times 250$ ) 100 $\mu\text{l}$ 를 96-well plate(Nunc ELISA plate)의 각 well에 넣은 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 반응을 시켰다. Plate를 0.05% Tween-20 이 포함된 PBS-T로 3회 세척한 다음, 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 assay solution을 넣어 실온에서 1시간동안 blocking 하였다. Assay 용액을 제거한 다음 세포 배양액과 TNF- $\alpha$  표준액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 5회 PBS-T로 세척한 후 detection antibody( $\times 250$ ) 100 $\mu\text{l}$ 를 넣고 1시간 실온에서 반응시켰다. Plate를 PBS-T로 3회 세척하고 Avidin-HRP solution을 넣은 다음 30분간 실온에서 암반응 시켰다. 이후 각 well을 3회 세척하였다. 여기에 substrate solution을 넣고 15분간 암반응 시킨 후 반응정지액 50 $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF- $\alpha$ 의 농도는 표준액의 표준정량곡선을 기준으로 계산하였다.

## 6. iNOS 및 TNF- $\alpha$ mRNA 발현 조사

Inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 TNF- $\alpha$  유전자의 발현을 조사하기 위해 BV2 cells( $1 \times 10^6$  cells/ml)을 6-well plate에 배양하여 OB extract 및 LPS( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리한 후 3시간 동안 배양 하였다. BV2 cells로부터 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리한 다음, oligo-(dT) primer와 Improm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다( $25^{\circ}\text{C}$ , 10min;  $42^{\circ}\text{C}$ , 60min;  $70^{\circ}\text{C}$ , 15min). 또한 PCR 반응을 위해 합성된 cDNA 1 $\mu\text{g}$ 에 iNOS primers[Fw; 5'-GACCAGTATAAGGCAAGCAC-3', Rv; 5'-CTTGTCTTTGACCCAGTAGC-3'] 및 TNF- $\alpha$ 의 primers[Fw; 5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3', Rv; 5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'], 10 $\times$  buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 $\mu\text{M}$  dNTP, 1U Tag polymerase(Takara)를 혼합한 후  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30초(denaturation),  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 30초(annealing),  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 60초(extension) 조건으로 30 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs[Fw; 5'-CTCGTGGAGTCTACTGGTGT-3', Rv; 5'-GTCATCATACTTGGCAGGTT-3']를 사용하였다.

### 7. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균±평균표준오차 (standard error mean; SEM)로 나타내었으며 통계학적 분석은 Student t-test로 검정하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. OB의 독성검정

OB extract의 독성(cytotoxicity)을 조사하기 위해서 BV2 cells에 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1mg/ml 농도의 OB extract를 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. BV cells의 생존도(cell viability)는 무처리구를 기준으로 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1mg/ml OB extract 농도에서 각각 97.44±3.57%(mean±SD), 95.31±0.12%, 94.97±0.23%, 92.31±1.72% 및 67.15 ±8.62%로 측정되었다. 즉, OB extract는 0.5mg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

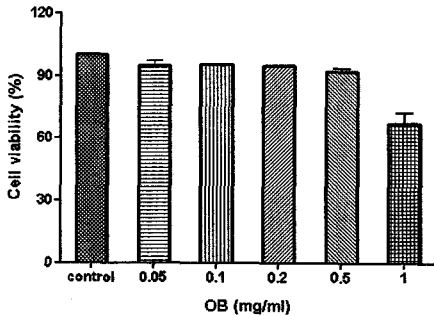


Fig. 1. Cytotoxic effect of OB extract in BV2 cells. After BV2 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were cultured with various concentrations of OB extract for 24h, the cell viability was measured in the culture supernatant by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars).

### 2. OB의 NO 생성 억제효과

OB extract의 LPS로 유도된 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 OB extract와 LPS를 처리한 BV2 cell로부터 생성되는 NO의 양을 Griess reagent로 측정하였다. 무처리구 ( $1.55 \pm 0.04 \mu\text{M}$ )의 경우 NO의 생성이 거의 검출되지 않은 반면, LPS 단독 처리구 ( $23.38 \pm 0.71 \mu\text{M}$ )에서는 NO의 생성이 현저히 증가하였다(Fig. 2). 또한 OB extract를 처리한 경우, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1mg/ml 농도에서 각각  $22.25 \pm 0.47 \mu\text{M}$ ,  $21.33 \pm 0.33 \mu\text{M}$ ,  $15.46 \pm 0.23 \mu\text{M}$ ,  $13.12 \pm 0.57 \mu\text{M}$  및  $11.01 \pm 0.31 \mu\text{M}$ 의 NO가 검출되어 LPS로 유도된 NO가

OB extract 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 0.5mg/ml의 OB extract 농도가 가장 효과적으로 NO의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

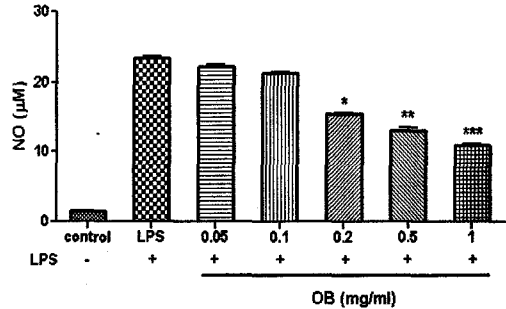


Fig. 2. Inhibitory effect of OB extract on the production of nitric oxide in LPS- activated BV2 cells. BV2 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with various concentrations of OB extract in the presence of LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24h. NO production from BV2 cells was determined by Griess reagent. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001 vs. LPS-treated group, N=3.

### 3. OB의 TNF-α 생성 억제효과

OB extract가 LPS에 의해 유도되어지는 TNF-α 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 OB extract와 LPS를 처리한 BV2 cells로부터 생성되는 TNF-α의 양을 ELISA 방법으로 측정하였다. 무처리의 경우 ( $1.21 \pm 0.19 \text{pg/ml}$ )는 BV2 cells에서 TNF-α가 거의 생성되지 않은 반면, LPS 처리 시 현저히 증가 ( $35.66 \pm 0.84 \text{pg/ml}$ )되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 LPS 처리에 의해 증가된 TNF-α는 OB extract의 0.05mg/ml 농도에서  $34.39 \pm 0.17 \text{pg/ml}$ , 0.1mg/ml 농도에서  $31.24 \pm 1.58 \text{pg/ml}$ , 0.2mg/ml 농도에서  $28.17 \pm 0.09 \text{pg/ml}$ , 0.5mg/ml 농도에서  $23.73 \pm 0.72 \text{pg/ml}$  및 1mg/ml 농도에서  $22.54 \pm 0.44 \text{pg/ml}$ 로 농도의존적으로 감소하였다. 따라서 0.5mg/ml의 OB extract 농도가 가장 효과적으로 NO 및 TNF-α 생성을 억제시키는 것으로 나타났다.

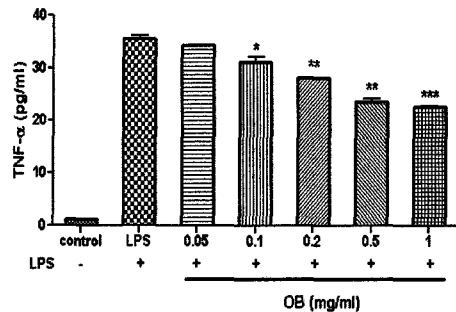


Fig. 3. Inhibitory effect of OB extract on the production of TNF- $\alpha$  in LPS-activated BV2 cells. BV2 cells( $5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with various concentrations of OB extract in the presence of LPS(1 $\mu$ g/ml) for 24h. TNF- $\alpha$  production from BV2 cells was determined by ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS-treated group, N=3.

#### 4. OB의 iNOS 및 TNF- $\alpha$ mRNA 발현 억제효과

OB extract의 LPS로 유도된 iNOS 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA에서의 발현 억제효과를 조사하기 위해 OB extract 0.5mg/ml과 LPS가 처리된 BV2 cells로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저, iNOS 유전자의 발현은 무처리구 및 OB extract 단독 처리구의 경우 관찰되지 않았으며, LPS 단독처리 시 현저히 증가하였고 이는 OB extract 처리에 의해 감소되었다(Fig. 4). TNF- $\alpha$  유전자의 발현은 iNOS에서와 마찬가지로 무처리구 및 OB extract 단독처리구에서 나타나지 않았으며, LPS에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현이 OB extract에 의해 감소되었다.

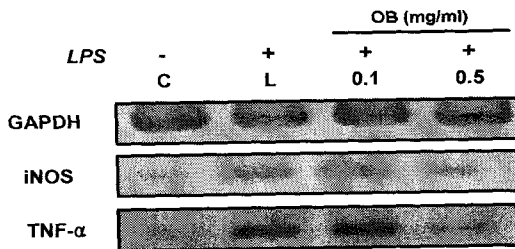


Fig. 4. Inhibitory effect of OB extract on mRNA expression of iNOS and TNF- $\alpha$  in BV2 cells. BV2 cells were incubated with OB extracts in the presence of LPS for 3h. mRNA expression of iNOS and TNF- $\alpha$  was determined by RT-PCR.

### 고찰

뇌의 대식세포인 microglia는 중추신경계(central nervous system; CNS)에 존재하는 phagocytic cell로서 CNS의 면역반응을 조절하는 역할을 한다<sup>1,4,28</sup>. Microglia는 죽은 세포를 제거하거나 trophic factors를 분비하는 대식세포로서의 고전적인 기능 외에 염증사이토카인이나 eicosanoids, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS), nitric oxide (NO), superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 등을 분비함으로써 질환의 발달에도 기여하게 된다<sup>5,9,29</sup>. 최근에는 microglia의 활성화와 염증반응 사이의 연관성에 대한 연구가 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌허혈증 및 헌팅톤병 등의 다양

한 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease)을 대상으로 많이 이루어지고 있으며<sup>23,30</sup>, 특히 활성화된 microglia로부터의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 같은 염증사이토카인 및 NO의 과도한 분비가 neuronal degeneration을 유도하는 것으로 알려지면서 이들의 분비를 억제할 수 있는 다양한 항염증제(NSAIDs, minocyclin)의 개발에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다<sup>16,18,31</sup>.

또한 천연 한방 약재추출물이 염증반응을 효과적으로 억제함으로써 신경세포의 퇴행을 막는데 도움을 줄 수 있으며 새로운 질병 질병치료제로서의 가능성이 부각되고 있다<sup>21,22,23</sup>. 따라서 본 연구에서는 BV2 cells을 이용하여 오령산가온비탕에 의한 LPS로부터 유도되어지는 NO 및 TNF- $\alpha$  생성의 억제효과를 조사함으로써 오령산가온비탕의 항염증효과를 확인하였다. BV2 cells에서 오령산가온비탕은 1mg/ml 농도 처리 시 세포독성을 나타내었으며(Fig. 1), LPS에 의해 유도된 NO 생성이 0.05mg/ml에서 1mg/ml 농도까지 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 2). 또한 NO의 합성 효소인 iNOS의 유전자발현을 RT-PCR로 조사한 결과, LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자발현 역시 오령산가온비탕 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 오령산가온비탕은 BV2 cells에서 LPS 처리에 의해 유도되는 NO 및 iNOS의 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다.

ROS의 일종인 NO는 L-arginine으로부터 NO synthase(NOSs) pathway를 통하여 생성되는 short-lived free radical로서 homeostasis, neurotransmission, tumor activity, cytotoxicity 등 세포내 신호전달자로서 매우 중요한 역할을 한다<sup>32,33</sup>. NOSs는 inducible NOS(iNOS)와 constitutively expressed NOS(cNOS)로 나누어지는데 iNOS는 high output isoform으로 LPS 또는 사이토카인이나  $\beta$ -amyloid와 같은 immunogen의 자극에 의한 염증 반응 시 대량으로 생성되는 반면, cNOS는 저농도에서 생리적으로 반응하여 세포내 다량의 NO 합성을 유도하게 된다<sup>33</sup>. NO는 전염증성(pro-inflammation) 또는 항염증성(anti-inflammation)의 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 생체 내 NO의 과도한 생성은 오히려 숙주세포를 파괴시키고 shock에 의한 혈관확장이나 염증반응을 유발하여 조직을 손상시키는 등 독성을 보이게 되는데 특히 CNS에서의 NO 생성은 신경세포를 포함한 여러 형태의 세포에 독성을 보인다<sup>34</sup>. 따라서 iNOS 발현을 차단하여 NO의 생성을 억제시키는 것은 퇴행성 뇌질환을 포함하여 다양한 염증질환 치료를 위해 매우 유용한 수단이 될 수 있다. 본연구결과에서도 오령산가온비탕이 LPS에 의해 유도된 iNOS의 유전자수준

에서의 발현을 억제시킴으로써 NO 생성이 조절되어 질 수 있는 것으로 나타났다.

LPS는 TNF-관련 염증반응을 강력하게 유도하는 물질로서 최근에는 염증질환을 치료하기 위하여 단핵구나 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되어지는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발 및 사이토카인에 대한 단클론항체(TNF antibody therapy), TNF receptor fused IgG, MAP kinase inhibitors 등을 이용하는 면역치료요법 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>37)</sup>. 본 연구결과에서 오령산가온비탕은 BV2 cells에서 LPS 처리에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의적으로 감소시키며 (Fig. 3), TNF- $\alpha$ 의 유전자발현 역시 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). LPS와 연관된 염증반응은 macrophage나 microglia와 같은 면역세포들의 활성화와 이에 따른 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO 등의 염증반응매개자들(pro-inflammatory mediators)의 상호작용에 의해 유발되어진다. 특히TNF- $\alpha$ 는 대표적인 전염증성 사이토카인으로서 강력한 cell stimulator이자 iNOS 유전자발현의 co-stimulator이며 MAPKs, NF- $\kappa$ B 신호전달경로 및 iNOS 발현을 활성화시키는데<sup>14,29,35)</sup>, microglia와 같은 대식세포로부터 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 특히 만성염증성반응과 밀접하게 연관되어 신경세포에 NO-dependent 또는 NO-independent cytotoxicity 를 나타내게 됨으로써 뇌질환 유발에 관여하게 된다<sup>36)</sup>. 특정약물에 의한 NO 생성 억제효과는 주로 ROS의 제거와 연관되어 있는데, ROS는 중요한 biomolecules에 치명적인 손상을 입히며, MAPK 및 nuclear transcription factors c-Jun 및 NF- $\kappa$ B 등을 활성화시킨다<sup>37)</sup>. 또한 ROS 신호전달경로는 대식세포 활성화의 일반적인 경로로서 cytotoxic mediator 및 signaling molecule의 두 가지 기능을 모두 나타낸다. 본 연구를 통해 항염증효과가 확인된 오령산가온비탕 역시, 항염증효과가 LPS로 자극받은 microglia의 ROS 및 p38 MAPK/ NF- $\kappa$ B의 signal pathway를 차단함으로써 iNOS/NO의 gene translation/transcription이 억제되어 나타나는 것과 연관되어 있을 것으로 생각되고 있다. 그러나 이에 대한 연구는 차후 좀 더 자세히 진행할 예정이다.

## 결 론

본 연구에서는 퇴행성뇌질환 치료제를 개발하기 위해서 창방한 오령산가온비탕의 항염증효과를 뇌의 대식세포주인 BV2 microglial cells을 이용하여 조사하였다. 오령산가온비탕의 세포독성은 1mg/ml 농도에서 나타났으며, LPS에 의해 유도된 NO 및 TNF- $\alpha$ 는

오령산가온비탕의 처리 농도에 의존적이며 유의적으로 억제되었다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 및 TNF- $\alpha$  유전자 발현 역시 오령산가온비탕 처리에 의해 현저히 감소되었다.

따라서 본 교실에서 창방한 오령산가온비탕은 NO 및 염증사이토카인 생성을 효과적으로 차단시킴으로써 항염증효과를 가지고 있는 것으로 나타났으며, 이에 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌허혈증 및 헌팅톤병 등의 다양한 퇴행성뇌질환 치료에 이용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비(과제번호 B050024) 및 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development of microglia cells. *Cell Tissue Res.* 1982;225:469-485.
2. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience.* 2002;112:7-11.
3. Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7:148-155.
4. Vaca K, Wendt E. Divergent effects of astroglia and microglia secretions on neuronal growth and survival. *Exp. Neurol.* 1992;118:62-72.
5. Sawada M, Kondo N. Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture. *Neurosci. Lett.* 1993;155:175-178.
6. Merrill JE. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev. Neurosci.* 1992;14:1-10.
7. Kamegai M, Nijima K. Interleukin-3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Neuron* 1990;2:429-436.
8. Sawada M, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by microglia and

- astrocytes in culture. *Brain Res.* 1989;491:394-397.
9. Heese K, Hock C, Otten U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* 1998;70:699-707.
  10. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8514-9.
  11. Magnus T, Chan A, Linker RA, Toyka KV, Gold R. Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:760-6.
  12. Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J.* 2006;20:494-6.
  13. Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM Jr, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001;35:72-9.
  14. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$ . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-44.
  15. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992;587:250-6.
  16. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005;142:481-9.
  17. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN- $\gamma$  is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol.* 1999;163:8278-86.
  18. Nitsch RM. Immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2004;18:185-9.
  19. Martino G, Adorini L, Rieckmann P, Hillert J, Kallmann B, Comi G, Filippi M. *Lancet Neurol.* 2002;1:499-509.
  20. Kanwar JR. Anti-inflammatory immunotherapy for multiple sclerosis/ experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) disease. *Curr Med Chem.* 2005;12:2947-62.
  21. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-9.
  22. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35:21-8.
  23. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:59-64.
  24. Kamiyama H, Takano S, Ishikawa E, Tsuboi K, Matsumura A. Anti-angiogenic and immunomodulatory effect of the herbal medicine "Juzen-taiho-to" on malignant glioma. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:2111-6.
  25. 대한병리학회. 2001. 병리학. 서울. 고문사. pp88, 96-97.
  26. Mitsuma T, Yokozawa T, Oura H, Terasawa K, Narita M. Clinical evaluation of kampo medication, mainly with wen-pi-tang, on the progression of chronic renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1999;41:769-77.
  27. Yokozawa T, Dong E, Chen CP. Protection of the kidney by Wen-Pi-Tang against

- ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine*. 2000;7:185-9. *Vet Q.* 2000;22:11-6.
28. Yokozawa T, Satoh A, Nakagawa T, Yamabe N. Attenuating effects of wen-pi-tang treatment in rats with diabetic nephropathy. *Am J Chin Med*. 2006;34:307-21.
  29. Gonzalez-Scarano F, Baultuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:219-40.
  30. Wang T, Qin L, Liu B, Liu Y, Wilson B, Eling TE, Langenbach R, Taniura S, Hong JS. Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *J Neurochem*. 2004;88:939-47.
  31. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:39-46.
  32. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-6.
  33. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051-3064.
  34. Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*. 1994;13:487-94.
  35. Filipov NM, Seegal RF, Lawrence DA. Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicol Sci*. 2005;84:139-48.
  36. Bronstein, D. M., Perez-Otano, I., Sun, V., Mullis Sawin, S. B., Chan, J., Wu, G. C., Hudson, P. M., Kong, L. Y., Hong, J. S., and McMillian, M. K. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res*. 1995;704: 112 - 116.
  37. Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res*. 2004;77: 540-51.
  38. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review.