

大薊가 LPS로 유도된 Mouse BV2 Microglial cells의 염증반응에 미치는 영향

김영선, 이성근, 이기상
원광대학교 산본한방병원 내과

Effect of *Cirsii Japonici Herba* on LPS-induced Inflammation in Mouse BV2 Microglial cells

Young-sun Kim, Seoung-geun Lee, Key-sang Lee

Dept. of International Medicine of Oriental Medicine Hospital, Wonkwang Univ.

ABSTRACT

Cirsii Japonici Herba (CJ) is a wild perennial herb found in many areas of Korea as well as China and Japan, which has been used to treat bleeding and inflammation. Silibinin is the main flavonoid extracted from milk thistle (*Cirsii Japonici Herba*). It exhibits potent antioxidant activity and anti-inflammatory effect. In this study, the effect of CJ and silibinin extract on lipopolysaccharide-induced inflammation was investigated using MTS assay, RT-PCR, western blot, and nitric oxide detection on mouse BV2 microglial cell lines. In the present results, CJ and silibinin extract suppressed nitric oxide production by inhibiting the lipopolysaccharide-stimulated enhancement of COX-2 and iNOS gene expression in BV2 cells.

Moreover, CJ and silibinin also repressed some lipopolysaccharide-induced signaling molecules. Importantly, catalase-induced COX-2 and iNOS expression needed activations of NF- κ B, PI3K/Akt, and MAPK, which were important for the transcriptional up-regulation of COX-2 and iNOS.

CJ and silibinin interaction on BV2 cells down-regulated NF- κ B-dependent proinflammatory cytokine (IL-2, IL-6) expression. They are involved in the regulation of inflammatory responses.

These data shows that CJ and silibinin exerts anti-inflammatory and analgesic effects, probably by suppression of COX-2 and iNOS synthase expression in BV2 microglial cells.

Key words : *Cirsii Japonici Herba*, Silibinin, BV2 microglial cells, anti-inflammatory

1. 緒 論

미세교세포(microglia)는 뇌 염증에 관여하는 주요 면역세포로, 뇌신경 시스템에서 숙주로부터의 방어와 조직재생에 주요한 역할을 한다¹. 그러나

미세교세포의 과활성화는 염증과 같은 뇌손상 후 빠르게 일어나며, 신경세포의 퇴행성신경질환의 원인이 되고 있다². 만성적 미세교세포의 활성화와 이에 수반되는 전염증 유도물질의 과생성은 알츠하이머, 파킨슨, 뇌경화 및 허혈성 뇌질환 등의 다양한 신경질환의 조직학적 지표로 증명되고 있다³⁻⁵. 그러므로, 미세교세포의 활성화 조절은 퇴행성 신경질환의 치료 가능성을 제시할 것이다.

중추신경계의 퇴행성 질환의 발병 원인은 유전적 성향과 환경적 요인이 복합적으로 작용하는 것

· 교신저자: 이기상 경기도 군포시 산본동 1126-1
원광대학교 군포 한방병원
TEL: 031-390-2670
E-mail: keysang@wonkwang.ac.kr
· 이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

으로 파악되고 있으며 현재까지 free radical에 의한 산화적 손상, inflammation, apoptosis 등이 원인이 되어 신경 손상이 나타난 결과로 생각되어진다⁶. 한의학에서는 腦髓의 충족여부에 따라 인체의 精神 및 신체 활동의 盛衰가 좌우됨을 말하였고⁷, 나이가 들어 腎氣가 점차 쇠하여 陰精이 虧損되면 精이 缺乏되어 腦에 上衝하지 못해 腦海가 空虛해 지는데 이런 정상생리기능의 실조나 감퇴는 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘 등의 증상과 함께, 심하면 知能低下, 痴呆 등을 발하게 된다 하였다^{8,9}.

노인성 뇌질환에 대해서는 더 이상 신경세포의 사멸을 막는 보호 또는 예방이 최우선이라 생각되어지며 본 연구에서는 한의학적으로 사용되어지는 약재 중 항산화작용이나 항염증 작용이 있는 것으로 알려진 大薊에서 퇴행성신경질환의 치료 단서를 얻을 수 있을 것이라 생각하고 이에 대하여 알아보고자 하였다.

국내 다른 논문에서 大薊와 Silibinin이 LPS로 활성화시킨 mouse microglial BV2 cells에서 염증과 관련된 iNOS 및 COX-2의 활성화를 저해함을 실험을 통해 연구한 논문¹⁷이 발표된 바 있다. 그리하여 본 연구에서는 염증에 관여하는 단백질과 사이

토카인 등의 여러 인자들에 大薊와 Silibinin이 미치는 영향을 알아보고자 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화시킨 mouse microglial BV2 cells에서 염증과 관련된 nitrogen oxide(NO)의 양, inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)와 NF-κB의 발현에 미치는 영향을 알아보고, MAPK, PI3K/Akt 경로의 활성화에 미치는 영향과 IL-2, IL-6 등의 사이토카인 mRNA 발현을 관찰하여 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재 료

1) 실험 재료 및 시약

실험에 사용한 大薊는 음니허브(Omniherb, Korea)에서 구입하였고 LPS, Silibinin과 다른 분석 시약은 Table 2와 같이 구입하였다.

Table 1. Experiment herb

韓藥名	生藥名	學名
大薊	<i>Cirsii Japonici</i> Herba	Cirsium japonicum var. ussuriense

Table 2. The Reagent Used in This Experiment

reagent	company	country
Anti-α-tubulin	Sigma Aldrich, Louis MO	
anti-iNOS antibody		
anti-COX-2 antibody	Santa Cruz	
anti-NF-κB antibody	Biotechnology California	
anti-phospho-IκB antibody		
anti-IκB antibody		
anti-p38 antibody		
anti-phospho-p38 antibody		U.S.A.
anti-ERK2 antibody		
anti-phospho-ERK1,2 antibody		
anti-JNK1 antibody	Cell Signaling	
anti-phospho- JNK1,2 antibody	Chemicon, Inc, U.S.A.	
anti-PI3KinaseP85 antibody		
anti-phospho-PI3 Kinase P85		
anti-AKt antibody		
anti-phospho-Akt antibody		

2) 大薊의 수율과 총 페놀릭 함량

80% ethanol로 추출한 大薊의 수율은 25.5 g (g/100g of powder, dry weight)이었으며 이에 따른 phenolics 함량은 1.34 ±1.60로 나타나 비교적 높은 수율을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다(Table 3). phenolics 함량이 높을수록 항산화, 항염증 효과가 높다고 보고 된 바 있다.

Table 3. *Cirsii Japonici* Herba Yield and Total Phenolic Content

수율 (g/100 g of powder, dry weight)	25.5 g/100 g
Phenolics 함량 (g/100g of extract, dry weight)	1.34 ±1.60 g

2. 방법

1) 大薊 추출물 제조

大薊를 믹서로 고운 가루가 될 때까지 분쇄한 다음 분말을 50 mesh sieve로 통과시켜 고른 입자의 크기를 얻었다. 얻은 분말에 80% ethanol을 가하여 초음파 분쇄(30분)를 통하여 추출한 다음 glass filter(Asahi Techno Co., Japan)를 사용하여 여과하였다. 이러한 조작을 2회 반복하여 추출한 여과액을 일정량으로 감압농축(ethanol 제거)을 한 후 동결건조를 하였다. 실험에 사용된 시료는 100 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO로 녹인 후 media로 희석하여 사용하였다.

2) 세포배양

본 실험에서 사용한 mouse BV2 cell은 경희대학교 의과대학 생리학교실에서 분양받아 10% heat-inactivated fetal bovine serum이 첨가된 DMEM(100 U/mL of penicillin A and 100 µg/mL of streptomycin) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

3) Nitrite assay

배양된 세포를 5×10³ cells/well 수준으로 96 well plate에 100 µL씩 접종한 다음 24시간 동안 예비

배양 하였다. 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도 별 시료 100 µL를 가하여 2시간 미리 배양한 다음 LPS(0.5 µg/mL)를 처리하여 18시간 후 세포에서 media로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 즉, medium 150µL와 Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) 20µL 그리고 증류수 130µL를 가하여 실온에서 30분간 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., California, USA, Model 550)를 사용하여 540nm에서 측정하였다.

4) Western blot analysis

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40 mM Tris-HCl, pH7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and PI cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 ice에서 30분간 반응시켰다. 그리고 난 후 13,000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Bradford assay(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 20ug의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1 시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분간 2회 세척하였다. Anti-α-tubulin (Sigma Aldrich, Louis MO), anti-COX-2 antibody, anti-iNOS antibody, NFκB, p-IκB, IκB antibody (Santa Cruz Biotechnology California), anti-p38 antibody, anti-phospho-p38 antibody, anti-ERK2 antibody, anti-phospho-ERK1,2 antibody, anti-JNK1 antibody, anti-phospho-JNK1,2 antibody, anti-PI3KinaseP85 antibody, anti-phospho-PI3 Kinase P85, anti-Akt antibody, anti-phospho-Akt antibody

(Cell Signaling Chemicon, Inc, U.S.)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16시간 반응시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL(Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

5) RT-PCR

Harvest한 세포를 PBS로 세척한 후 4°C에서 원심분리하여 모으고 Trizole Reagent(Invitrogen, Grand Island NY, USA) 1 ml을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4°C, 12,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.5 ml의 2-propanol을 섞었다. 상온에서 10분간 반응시키고 4°C, 12,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. RNA 침전물을 75% ethanol로 세척하고, 상온에서 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. RNA용액에 RNase-free DNase(Promega, USA)를 2 units 가하고 37°C수조에서 30분간 반응시켜 남아있는 genomic DNA를 제거하였다. 동량의 페놀과 클로로포름 혼합액(1:1,v/v)으로 추출한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 다시 동량의 클로로포름으로 추출하였다. 상층액에 2배량의 ethanol과 0.1배량의 3M sodium acetate(pH 5.2)를 가하고 -70°C에서 2시간 이상 방치하였다. 4°C, 12,000 xg에서 10분간 원심분리하여 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후, 상온에서 건조시킨 다음 DEPC로 처리한 증류수에 녹였다. 정제된 RNA를 GeneQuant Pro(Amersham Biosciences)로 정량하고, ethidium bromide를 넣은 한천 겔에 전기영동하여 RNA의 integrity와 정확한 quantification을 재확인하였다.

정제된 총 RNA 1 ug에 random hexamer 4 ug(Amersham Biosciences, USA)과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 5 x first strand buffer와 0.1 M

DTT, 10 mM dNTP, 200 unit M-MLV reverse transcriptase(Invitrogen, USA) 그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30 ul가 되게 하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 95°C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. Polymerase chain reaction(PCR)은 2.5 ul cDNA 주형, iNOS(5' AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT 3' 5'GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC 3')와 COX-2(5' GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT 3' 5' ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA 3')와 IL-6(5' GAT GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC 3' 5'GGT CCT TAG CCA CTC CTT CTG TG 3')와 IL-2(5' GCA GCT GTT GAT GGA CCT AC 3' 5'TCC ACC ACA GTT GCT GAC TC 3')와 GAPDH(5' CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3' 5' CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3')와 같은 특이적인 primer 25 uM, 1 x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂ 그리고 2.5 unit Taq. DNAPolymerase(TaKaRaKorea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5 ul를 취해서 2.0% 한천 gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

6) 데이터 통계분석

본 실험에서 결과는 측정값의 평균±표준편차값을 기준으로 통계분석 하였다. 실험 결과값의 통계적 분석을 위해 independent t-tests 을 사용하여 각 실험군간의 유의성을 분석하였고, 그 유의수준은 p < 0.05로 하였다.

III. 結果

1. 大薊와 Silibinin의 NO 생성량에 대한 영향

1) 大薊의 효과

본 연구에서는 뇌에 존재하는 대식세포인

microglial cell에서 LPS를 처리하였을 때 NO의 생성을 증가시켰으며¹⁵ 이렇게 증가된 NO는 大薊의 80% ethanol 추출물에 의해 농도 의존적으로 현저하게 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

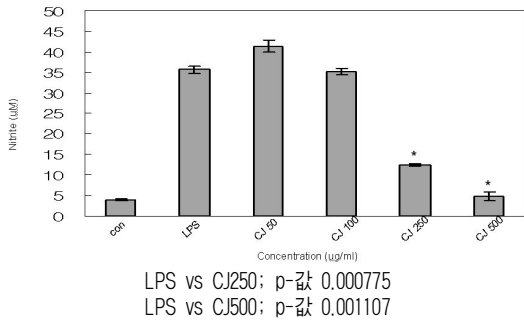


Fig. 1. Effect of Cirsii Japonici Herba on LPS-induced nitrite production in mouse microglial BV2 cell.

Nitrite production was measured by the Griess reaction assay as described in the Methods section. Cells were pretreated with different concentrations of CJ for 1h prior to the addition of LPS (0.5ug/ml), and the cells further incubated for 24h. *p<0.05; significantly different from the control (LPS treatment) value.

2) Silibinin의 효과

LPS를 0.5µg/ml로 처리한 mouse microglial BV2 cell에서 Nitrite assay를 수행한 결과 10uM 에서부터 50% 이상으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 2).

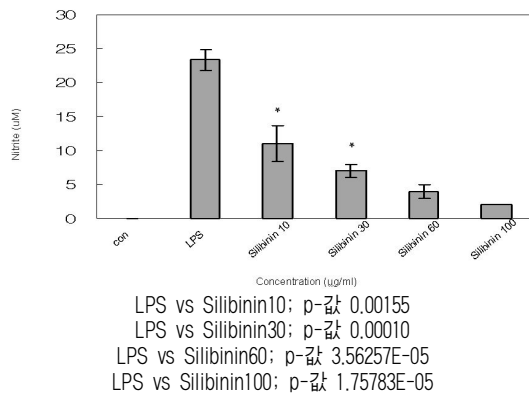


Fig. 2. Effect of Silibinin on LPS-induced nitrite

production in mouse microglial BV2 cell

Nitrite production was measured by the Griess reaction assay as described in the Methods section. Cells were pretreated with different concentrations of Silibinin for 1h prior to the addition of LPS(0.5ug/ml), and the cells further incubated for 24h. *p<0.05; significantly different from the control (LPS treatment) value.

2. 大薊와 Silibinin의 MAPKs 경로의 인산화에 대한 효과

본 실험에서는 BV2 세포에서 LPS로 유도된 JNK1.2, ERK1.2와 p38 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 western blot을 통하여 확인하여 본 결과 大薊와 Silibinin은 MAPKs 신호전달 체계에 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

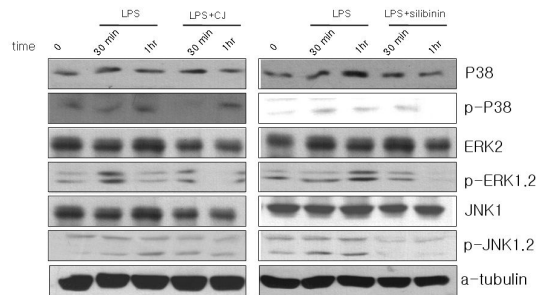


Fig. 3. Activation of p38, ERK, JNK by LPS induced in microglial BV2 cells.

Cells were treated with the indicated doses of CJ(200ug/ml) and silibinin(60uM) 1h before LPS treatment(0.5ug/ml) for indicated time. Total protein was subjected by Western blotting.

3. 大薊와 Silibinin의 PI3K-Akt경로의 인산화에 대한 효과

BV2세포에 大薊와 Silibinin을 1시간 전처리한 후 0.5mg/ml의 농도로 30분, 1시간 동안 LPS 처리하여 PI3K와 Akt의 활성을 실험한 결과 전체 PI3K에서는 大薊와 Silibinin에 의한 억제현상을 보이지 않는 반면, 인산화된 PI3K에서는 大薊와 Silibinin에 의한 억제효과가 30분, 1시간동안 LPS

처리된 세포에서 나타났다(Fig. 4). 또한 Akt에서도 전체 Akt단백질 발현량과 비교하여 인산화된 Akt단백질 발현이 大薊와 Silibinin에 의해 감소되었다(Fig. 4). Total PI3K, total Akt는 어떠한 자극에서도 동일한 조건으로 유지된다. Loading control로 사용한 것으로 Fig. 4.에서alpha-tubulin은 별도로 보여주지 않았다.

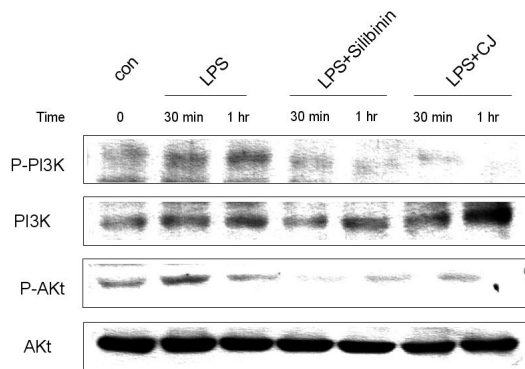


Fig. 4. Effect of CJ and Silibinin on LPS-induced PI3K and Akt activation and PI3K-Akt phosphorylation and degradation.

The BV2 cells were incubated with Silibinin (60 μ M), CJ(200ug/ml) for 30min and 1h before LPS treatment(0.5ug/ml) for indicated time. Total protein was subjected by Western blotting.

4. Silibinin이 NF- κ B 단백질 발현에 미치는 효과

세포질과 핵단백질을 분리하여 NF- κ B/ I κ B의 단백질 발현을 western blot으로 분석한 결과 LPS 처리한 세포에서는 핵에서 NF- κ B의 발현이 증가한 반면, Silibinin을 1시간 전처리한 후 LPS를 처리한 세포에서는 그 발현이 현저히 감소되어 나타났다. 세포질에서 I κ B를 관찰해 보았을 때, 인산화된 I κ B는 LPS 유도시 증가되어 나타나다가 Silibinin 처리시 감소되어 나타났다. 이와 반대로 I κ B는 세포질에서 LPS 유도시 그 단백질 발현이 감소하였다가 Silibinin 처리시 정상세포와 비슷한 수준으로 증가됨을 관찰하였다(Fig. 5).

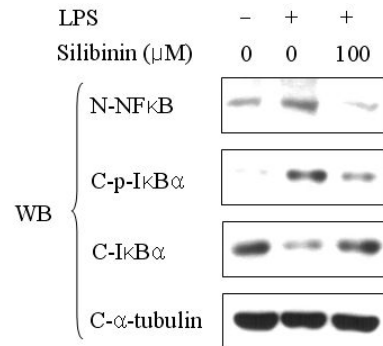


Fig. 5. Effect of Silibinin on LPS-induced NF- κ B activation and I κ B α phosphorylation and degradation.

The BV2 cells were incubated with Silibinin (100 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS for 2h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated by lysis buffer and examined for NF- κ B, p-I κ B α , and I κ B α with Western blot analysis. N, nuclear extract; C, cytosol extract.

5. 大薊와 Silibinin의 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과

1) 大薊의 효과

실험 결과 大薊 추출물의 농도에 따라 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 6).

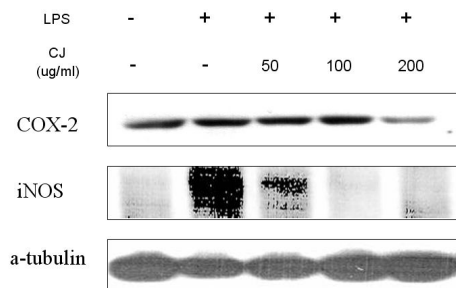


Fig. 6. CJ dose-dependently(50ug/ml, 200ug/ml) inhibited iNOS protein and COX-2 expression in LPS(0.5ug/ml)-induced BV2 microglial cells.

2) Silibinin의 효과

실험 결과 Silibinin의 농도 60, 100에서 iNOS와

COX-2의 단백질 발현을 억제하는 것이 확인되었다(Fig. 7).

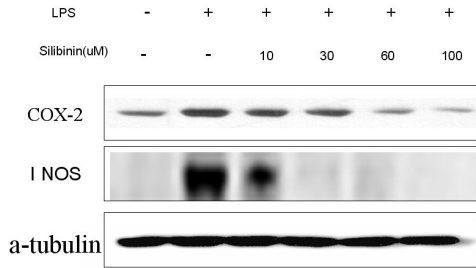


Fig. 7. Silibinin, dose-dependently (10 μ M-100 μ M), inhibited nitrite production, iNOS and COX-2 protein expression in LPS (0.5 μ g/ml)-induced BV2 microglial cells.

6. 大薊와 Silibinin의 IL-2, IL-6 mRNA 감소 효과
본 실험에서는 大薊와 Silibinin에 의한 면역반응에 작용하는 IL-2와 IL-6 발현 효과를 관찰하였다. 그 결과 大薊는 IL-6의 사이토카인을 감소시켰고, Silibinin은 IL-2의 mRNA 발현을 억제시켰다. 하지만 大薊는 IL-2의 mRNA 억제효과가 없었다. 또한 Silibinin은 IL-6의 mRNA 억제에 아무런 효과를 나타내지 않았다(Fig. 8).

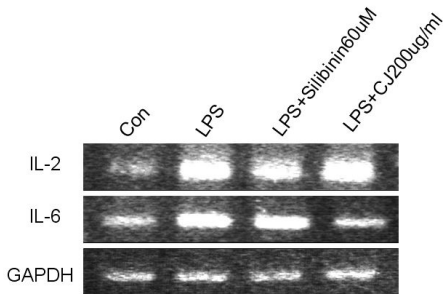


Fig. 8. BV2 cells were pretreated with silibinin (60 μ M), CJ(200 μ g/ml) 1h Before LPS (0.5 μ g/ml) stimulation for 6h. IL-2 and mRNA levels were measured by RT-PCR

7. 大薊와 Silibinin의 i-NOS, COX-2 mRNA 감소 효과
1) 大薊의 효과

이 실험결과 大薊 추출물이 LPS로 유도된 Mouse brain에 존재하는 macrophage인 BV2 cells의 iNOS 와 COX-2 단백질과 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜, 결국 NO의 생성량을 억제시키는 작용을 하는 것을 확인하였다(Fig. 9).

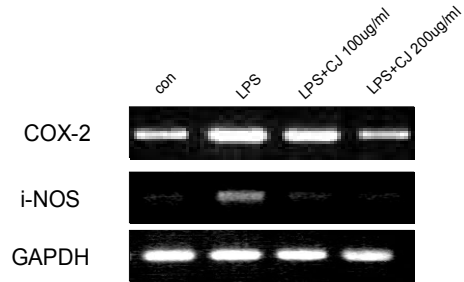


Fig. 9. BV2 cells were pretreated with 100 μ g/ml, 200 μ g/ml CJ 1h Before LPS stimulation for 24h. COX-2 and iNOS mRNA levels were measured by RT-PCR

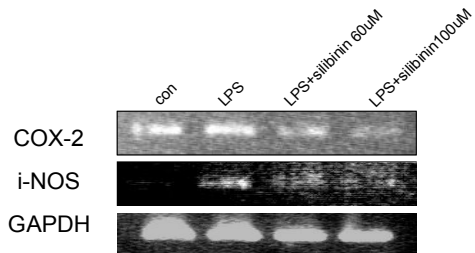


Fig. 10. BV2 cells were pretreated with 60 μ M, 100 μ M Silibinin 1h Before LPS stimulation for 24h. COX-2 and iNOS mRNA levels were measured by RT-PCR

2) Silibinin의 효과

이 실험결과 Silibinin이 LPS로 유도된 Mouse brain에 존재하는 macrophage인 BV2 cells의 iNOS 와 COX-2 단백질과 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜, 결국 NO의 생성량을 억제시키는 작용을 하는 것을 확인하였다(Fig. 10).

IV. 考 察

大薊은 菊花科에 속한 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*) 및 동속식물의 전초를 건조한 것으로, 性은 凉·無毒하고, 味는 甘·苦하며, 心·肝經으로 歸經한다. 效能은 凉血止血 去瘀消腫하며 吐血, 便血, 尿血, 崩血, 癰腫 등에 사용되어 왔다¹⁰. 大薊은 간염, 고혈압 및 지혈 등의 치료 목적으로 사용되어 왔으며¹¹ 주성분은 Silibinin으로 大薊에서 추출한 폴리페놀계열의 주요 플라보노이드이며 항염증 및 항노화 효과를 가지는 것으로 보고된 바 있다¹²⁻⁵. 또한 대계가 단방으로 혹은 다른 약과 함께 방제에 쓰인 처방례로 토혈, 코피, 자궁출혈, 백대하가 멎지 않을 때, 폐열에 의한 해열, 충수염, 화상의 치료에 쓰일 수 있다¹⁶.

박테리아 LPS는 뇌에서 염증을 일으키는 inflammagen으로 널리 사용되어 왔다^{18,19}. LPS는 염증반응의 병원체의 중심적 역할을 하며, nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂), 및 leukotrien과 같은 염증매개체의 생성을 자극하며, 이 염증매개체의 신호경로를 자극한다.

NO는 nitric oxide synthases(NOS) 효소군에 의하여 L-arginine으로부터 합성된다²⁰. NO는 생리학적 합성조절에서 가장 중요한 역할을 하는데 이들은 neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS와 같은 3가지의 형태로 존재한다. 그 중, iNOS는 염증조절을 일으키는 중요한 효소 중 하나이다²¹⁻³. iNOS는 Ca²⁺ 비 의존성 경로를 통해서 장시간에 걸쳐 증가하여 다량의 NO를 형성한다. 유도성 iNOS 발현은 murine macrophage, 내피세포, 평활근세포 및 심근 세포 등 많은 세포에서 관찰되고 있다. 인간의 iNOS는 염증성질환이 있는 환자의 macrophage에서 다량의 NO를 생성하여 세균 침입을 억제하거나 혹은 T-세포증식을 억제하여 국소 염증반응을 하향시키는 방어에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다²⁴. 그러나 과도한 iNOS의 발현은 NO의 생성량을 증가시켜 그 자

체의 독성 효과에 의해 주위 세포의 손상을 야기하며, 또한 염증과 관련된 활성 RNS의 합성 및 PGE₂의 농도 증가에 기여하게 된다²⁵.

또 다른 염증매개물질인 PGE₂의 증가는 염증의 기본적인 특징이다. PGE₂는 염증 매개물질로써 cyclooxygenase(COX)로 인해 arachidonic acid로부터 전환된다. COX는 COX-1과 COX-2로 존재하는데, 그 중 COX-2는 오직 사이토카인, 박테리아 독소와 LPS와 같은 염증 신호에 반응하여 발현된다. 또한 COX-2는 PGE₂의 많은 양을 생성하며, 염증을 유도한다²⁶⁻⁹. Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다³⁰.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 大薊가 효과적으로 NO 생성을 억제한 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 大薊의 주성분의 하나인 Silibinin도 역시 大薊과 유사한 효과가 있을 것이라 생각하였고 이를 검증하기 위하여 LPS를 0.5 μ g/ml로 처리한 mouse microglial BV2 cell에서 Nitrite assay를 수행한 결과 10 μ M 에서부터 50% 이상으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 2).

신경교세포를 포함하여 다양한 세포에서 MAPK는 염증반응에 경로로 생각되고 있다. MAPK의 활성화 억제는 신경교세포 활성화와 염증에 의한 손상으로부터 보호 효과가 있을 것으로 여겨지고 있다³¹. 다양한 외부자극에 의한 전사인자들의 활성화를 통해 COX-2나 iNOS의 발현을 유도하는 과정을 현재까지 비교적 잘 특성화된 주요 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들로 extracellularregulated protein kinase(ERK), c-Jun NH₂-protein kinase(JNK)/stress-activated protein kinase(SAPK), serine/ threonine protein kinase인 p38 MAPK과를 들 수 있다.

이들 MAPKs과는 모두 다양한 세포의 자극에 반응해 upstream MAPK kinase(MEK)에 의해

tyrosine과 threonine에서 인산화가 일어남으로써 활성화된다. 위의 MAPKs의 활성화는 그 후에 다른 kinase나 전사 인자를 인산화, 활성화 시키고, 결국 표적 유전자의 발현을 변화시킨다. ERK가 종종, 세포 사멸 저해 과정과 관련되어 있는 것에 반해 JNK와 p38 MAPK 신호전달체계는 세포사멸을 매개하는 것으로 생각된다. 그러나 이러한 MAPKs 각각의 활성화의 생물학적 결과는 세포 종류, 다른 조절 영향, 관련된 자극의 종류에 따라 결정되며 이런 요소들에 의해 크게 달라질 수 있다.

본 실험에서는 BV2 세포에서 LPS로 유도된 JNK1.2, ERK1.2 와 p38 MAPK 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 western blot을 통하여 확인하여 본 결과 大薊와 Silibinin은 MAPKs 신호전달 체계에 억제효과가 있었다(Fig. 3).

Phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt는 세포증식에 중요하다. PI3K 신호경로는 다양한 세포에서 세포 survival과 관련이 있다³²⁻⁴. 대식세포와 상피세포에서 PI3K는 iNOS의 유도를 불러일으키는 신호전달에서 중요한 역할을 하고 있다³⁵⁻⁷. LPS 유도된 대식세포 활성화는 PI3K의 활성을 자극한다. 반면 LY294002와 같은 PI3K의 특이적 저해제는 NO생성을 감소를 보였다³⁵.

본 연구에서는 LPS 유도된 BV2세포에서 PI3K/Akt 경로에 大薊와 Silibinin이 어떠한 영향을 나타내는지 알아보았다(Fig. 4). BV2세포에 大薊와 Silibinin을 1시간 전처리한 후 0.5mg/ml의 농도로 30분, 1시간 동안 LPS 처리하여 PI3K와 Akt의 활성을 실험한 결과 전체 PI3K에서는 大薊와 Silibinin에 의한 억제현상을 보이지 않는 반면, 인산화된 PI3K에서는 大薊와 Silibinin에 의한 억제효과가 30분, 1시간동안 LPS 처리된 세포에서 나타났다(Fig. 4). 또한 Akt에서도 전체 Akt단백질 발현량과 비교하여 인산화된 Akt단백질 발현이 大薊와 Silibinin에 의해 감소되었다(Fig. 4).

iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF- κ B, AP-1, C/EBP등이

있으며 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF- κ B이다. NF- κ B는 proinflammatory 매개체로써 중요하다^{38,39}. Cell apoptosis의 억제, cell cycle regulation, oncogenesis등과도 관련이 있으며, virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- α 유전자의 발현에 관계된다. 이전 연구에서는 신경교세포에서 LPS로 자극하였을 때 intracellular 신호전달 메카니즘과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다⁴⁰. 더욱이 NF- κ B의 전사활성억제는 iNOS, COX-2의 발현 뿐만 아니라, IL-2, IL-6와 같은 proinflammatory 사이토카인의 발현을 억제한다^{26,27,41-6}.

I κ B protein의 종류는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ 등으로 알려져 있지만 세포에서 가장 풍부한 NF- κ B의 inhibitory protein은 I κ B α 이다. LPS 유도된 BV2세포에서 I κ B의 분해 및 인산화는 NF- κ B의 활성을 유도하고 iNOS와 COX-2, 그리고 NO의 생성을 증가시킨다⁴⁷. 이러한 염증관련 유전자발현은 NF- κ B의 DNA결합과 관련이 있다⁴⁸. iNOS와 COX-2는 프로모터 부분에 NF- κ B 결합부위를 가지고 있으며^{49,50}, 이러한 NF- κ B와 DNA 결합의 활성을 억제함으로써 염증관련 유전자 발현을 억제하는 효과가 있다. 또한 이전연구에서 Akt는 I κ B의 인산화 및 분해를 매개하며⁵¹, 결과적으로 NF- κ B의 활성을 증가시킨다고 보고하였다⁵².

NF- κ B 단백질은 정상상태에서는 세포질에 I κ B와 결합하여 존재하다가, 외부자극에 의해 I κ B의 분해가 일어나면서 결합이 떨어져 NF- κ B단백질이 핵 안으로 이동하게되고 염증과 관련된 COX-2, iNOS 등의 유전자발현을 자극시킨다.

이에 본 실험에서는 Silibinin이 LPS에 의해 자극된 BV2세포에서 NF- κ B/ I κ B의 발현에 어떠한 효과가 있는지 조사하였다. 그 결과 LPS 처리한 세포에서는 핵에서 NF- κ B의 발현이 증가한 반면, Silibinin을 1시간 전처리한 후 LPS를 처리한 세포에서는 그 발현이 현저히 감소되어 나타났다. 세포질에서 I κ B를 관찰해 보았을 때, 인산화된 I κ B는

LPS 유도시 증가되어 나타나다가 Silibinin 처리시 감소되어 나타났다. 이와 반대로 I κ B는 세포질에서 LPS 유도시 그 단백질 발현이 감소하였다가 Silibinin 처리시 정상세포와 비슷한 수준으로 증가됨을 관찰하였다(Fig. 5). 이는 Silibinin이 LPS 유도된 NO생성을 억제하고 Akt경로를 통해 NF- κ B 활성을 억제하는 것을 시사한다.

본 연구에서 iNOS와 COX-2 단백질은 LPS 처리시 강하게 유도되었으나 LPS에 大薊를 함께 처리한 실험군에서는 大薊 추출물 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 또한 大薊의 주요 성분인 Silibinin도 大薊와 비슷한 효과를 가지리라 예상하고 LPS에 Silibinin을 함께 처리한 실험에서 Silibinin 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

IL-2는 활성화된 T세포와 B세포의 증식 및 성숙을 촉진하는 사이토카인이며, IL-6는 T세포와 B세포, monocytes, fibroblast를 포함한 다양한 세포에 의해 다기능 단백질을 생성하는 사이토카인이다. 본 실험에서는 大薊와 Silibinin에 의한 면역반응에 작용하는 IL-2와 IL-6 발현 효과를 관찰하였다. 그 결과 각각 大薊는 IL-6의 사이토카인을 감소시켰고, Silibinin은 IL-2의 mRNA 발현을 억제시켰다(Fig. 8).

Fig. 6에서 大薊가 단백질 수준에서 염증 발현에 관여하는 iNOS와 COX-2의 억제 효과를 확인하였다. 이것이 전사 과정에서 大薊의 효과인지를 확인하기 위하여 RT-PCR를 시행하여 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현에 대한 효과를 상대적으로 평가하였다. 이 실험결과 大薊 추출물이 LPS로 유도된 Mouse brain에 존재하는 macrophage인 BV2 cells의 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜, 결국 NO의 생성량을 억제시키는 작용을 하는 것을 확인하였다(Fig. 9). 또한 Silibinin 역시 Fig. 7에서 단백질 수준에서의 iNOS와 COX-2의 억제 효과를 확인하였고 이것이 전사 과정에서

Silibinin의 효과인지를 확인하기 위하여 RT-PCR를 시행하여본 결과 LPS로 유도된 Mouse brain에 존재하는 macrophage인 BV2 cells의 iNOS와 COX-2 단백질 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜, 결국 NO의 생성량을 억제시키는 작용을 하는 것을 확인하였다(Fig. 10).

결과적으로 본 실험에서 大薊 및 Silibinin은 LPS 자극된 mouse BV2 microglial cells에서 NO와 사이토카인의 생성을 억제하였다. 이와 같은 항염증반응효과는 I κ B α 의 조절을 통해 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 일어나며, MAPK와 PI3K/Akt 경로의 억제를 통해 NO생성을 경감시키는 것으로 사료된다. 이러한 결과들로 미루어 보아 大薊와 Silibinin은 항염증 효과를 지니고 있으며 향후 중풍이나 치매, 파킨슨병 등 퇴행성 뇌질환 및 각종 염증 질환의 효과적인 치료물질로 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

大薊가 염증에 관여하는 단백질과 사이토카인 등의 여러 인자들에 미치는 영향을 알아보고자, LPS로 활성화시킨 mouse microglial BV2 cells에서 염증과 관련된 NO의 양, iNOS 및 COX-2와 NF- κ B의 발현에 미치는 효과와, p38, ERK1.2, JNK인 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로에 미치는 효과, PI3K/Akt 경로의 활성화에 미치는 효과, IL-2, IL-6 등의 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 효과를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 大薊는 LPS로 유도된 mouse microglial BV2 cells에서 NO의 생성량을 억제하였다.
2. 大薊는 p38, ERK1.2/JNK인 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로에 대한 억제효과가 있었으며, PI3K/Akt의 경로에서도 억제효과가 나타났다.
3. 大薊는 전사인자인 NF- κ B의 발현을 조절하는 I

κ B의 세포질 내 인산화와 단백질 분해과정을 통제함으로써 핵 내에 존재하는 NF- κ B의 단백질 발현을 억제하였다.

4. 大薊는 LPS로 유도된 mouse microglial BV2 cells에서 COX-2와 iNOS의 증가를 억제하였다.
5. 大薊는 LPS로 유도된 mouse microglial BV2 cells에서 염증성 사이토카인인 IL-2와 IL-6의 mRNA 발현을 감소시켰다.
6. 大薊는 LPS로 유도된 mouse microglial BV2 cells에서 iNOS, COX-2, mRNA 발현을 감소시켰다.

이러한 결과를 바탕으로 大薊가 뇌의 염증치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 1996;19:312-8.
2. Chao CC, Hu S, Peterson PK. Glia, cytokines, and neurotoxicity. Crit Rev Neurobiol. 1995;9:189, 205.
3. Drew PD, Chavis JA, Bhatt R. Sex steroid regulation of microglial cell activation: relevance to multiple sclerosis. Ann NY Acad Sci. 2003;1007:329-34.
4. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annu Rev Neurosci. 1999;22:219-40.
5. Nakajima K, Kohsaka S. Functional roles of microglia in the brain. Neurosci Res. 1993;17:187,203.
6. Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. Neuroreport. 1994;5:1485-8.
7. 양유결 編. 黃帝內經譯解(靈樞). 서울: 성보사; 1980, p. 84-9, 104-45, 280-3.
8. 이경변 外. 東醫心系內科學(상). 서울: 書苑堂; 1995, p. 36-7, 43-4.
9. 이청복, 유도주 編著. 中醫精神醫學. 天津: 天津科學技術出版社; 1988, p. 211-2.
10. 전국한의과대학본초학교실. 본초학. 서울: 영림사; 1999, p. 390-1.
11. The State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S] 2000Ed: PartI. Beijing: Chemical Industry Press; 2000.
12. Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. SIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell. 2001;107:149-59.
13. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. Cell. 2001;107:137-48.
14. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. Science. 2004;305:390-2.
15. Valenzuela A, Guerra R, Videla LA. Antioxidant properties of the flavonoids silymarin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. PlantaMed. 1986;6:438-40
16. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 완역 중약대사전. 서울: 도서출판 정담; 1998, p. 1181-3
17. 呂賢壽. 大薊와 실리비닌의 mouse microglial BV2 cells에서 LPS에 의해 유발된 염증반응에 대한 신경보호 효과. 경원대학교 대학원 석사학위논문. 2006.
18. S. Lehnardt, L. Massillon, P. Follett, F.E.

- Jensen, R. Ratan, P.A. Rosenberg, J.J. Volpe, T. Vartanian, Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:8514-9.
19. T. Raabe, M. Bukrinsky, R.A. Currie, Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- α by lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.* 1998;273: 974-80.
 20. Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H., *Ann. Neurol.* 1992;32:297-311.
 21. Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K., Kawai C., *J. Biol. Chem.*, 1991;266 :12544-7.
 22. Korhonen R., Lahti A., Hamalainen M., Kankaanranta H., Moilanen E., *Mol. Pharmacol.* 2002;62:698-704.
 23. Vegeto E., Bonincontro C., Pollio G., Sala A., Viappiani S., Nardi F., Brusadelli A., Viviani B., Ciana P., Maggi A., *J. Neurosci.* 2001;21 :1809-18.
 24. Wang MJ, Lin WW, Chen HL et al. *Euro J Neurosci.* 2002;16:2103-12.
 25. Hanisch, U.K. Microglia source and target of cytokines. *Glia.* 2002;40:140-55.
 26. W. Chen, Q. Tang, M.S. Gonzales, G.T. Bowden, *Oncogene.* 2001;20:3921.
 27. M. Lasa, K.R. Mahtani, A. Finch, G. Brewer, J. Saklatvala, A.R. Clark, *Mol. Cell. Biol.* 2000 :20:4265.
 28. Mitchell J. A., Larkin S., Williams T. J., *Biochem. Pharmacol.* 1995;50:1535-42.
 29. Crofford L. J., Lipsky P. E., Brooks P., Abramson S. B., Simon L. S., Van de Putte L. B., *Arthritis Rheum.* 2000;43:4-13.
 30. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(2):116-23.
 31. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol.* 1998;54:99-125.
 32. Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tschlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3627-32.
 33. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997;275:661-5.
 34. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tschlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 1997;11:701-13.
 35. Salh B, Wagey R, Marotta A, Tao JS, Pelech S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J Immunol.* 1998;161:6947-54.
 36. Wright K, Ward SG, Kolios G, Westwick J. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by interleukin-13. An inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial cell line HT-29. *J Biol Chem.* 1997;272:12626-33.
 37. Park YC, Lee CH, Kang HS, Chung HT, Kim HD. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal

- macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240:692-6.
38. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:405-55.
39. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF- κ B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene.* 1995;11:97-106.
40. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques.* 2002;66-72[Suppl.].
41. S. Hunot, M. Vila, P. Teismann, R.J. Davis, E.C. Hirsch, S. Przedborski, P. Rakic, R.A. Flavell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:665.
42. A. Paul, A. Cuenda, C.E. Bryant, J. Murray, E.R. Chilvers, P. Cohen, G.W. Gould, R. Plevin, *Cell. Signal.* 1999;11:491.
43. N.R. Bhat, P. Zhang, J.C. Lee, E.L. Hogan, *J. Neurosci.* 1998;18:1633.
44. B. Salh, R. Wagey, A. Marotta, J.S. Tao, S. Pelech, *J. Immunol.* 1998;161:6947.
45. Petrova TV, Akama KT, van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric oxide synthase by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4668-73.
46. Ye SM, Johnson RW. Regulation of interleukin-6 gene expression in brain of aged mice by nuclear factor κ B. *J Neuroimmunol.* 2001;117:87-96.
47. Park HJ, Son DJ, Lee CW, Choi MS, Lee US, Song HS, et al. Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with I κ B kinase. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:237-47.
48. Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, et al. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1897-907.
49. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994;269:4705-8.
50. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science.* 1999;286:1741-4.
51. Moon DO, Chi YH, Kim ND, Park YM, Kim GY. Antiinflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:506-14.
52. Moon DO, Kim KC, Jin CY, Han MH, Park C, Lee KJ, et al. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced activation in BV2 microglia. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:222-9.