

## 뇌 신경교세포에서 加味補陽還五湯 분획물의 항염증 효과 비교 연구

손혜영, 박용기\*

동국대학교 한방신약개발센터

### Anti-inflammatory Effects of Different Fractions Isolated from Modified *Boyanghwano-tang* Extract in LPS-stimulated Microglial Cells

Hye Young Son, Yong-Ki Park\*

Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, the effects of different fractions isolated from modified *Boyanghwano-tang*(mBHT) extract on LPS-induced inflammation in BV2 microglial cells were investigated.

**Methods** : mBHT was extracted with water, and then fractionated with *n*-hexane, methylene chloride, ethylacetate and *n*-butanol. BV2 cells, a mouse microglia line were incubated with different concentrations of each fraction of mBHT for 30 min, and then stimulated with LPS for 24 h. Cell toxicity was determined by MTT assay. The concentration of nitric oxide (NO) was measured in culture medium by Griess reagent assay. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein was determined by Western blot.

**Results** : Four fractions of mBHT were significantly inhibited LPS-induced NO productions in BV2 cells in a dose-dependent manner. The methylene chloride fraction of mBHT was most strongly inhibited the NO production compared with those of the others. The methylene chloride fraction of mBHT was also suppressed LPS-induced iNOS expression comparison of other fractions at same concentration (50  $\mu$ g/ml) in BV2 cells.

**Conclusions** : The results showed that the methylene chloride fraction of mBHT may have an strong anti-inflammatory property through the inhibition of NO production and iNOS expression in activated microglia, and could a therapeutic potential for the treatment of various brain inflammatory diseases.

**Key words** : *Boyanghwano-tang*, inflammation, microglia, nitric oxide

#### 서 론

중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 구성되며 신경교세포는 성상세포, 희돌기교세포, 신경교세포가 있는데 이 중 신경교세포(microglia)는 중추신경계의 내재된 대식세포로서 뇌 손상 초기에 활성화되어 손상된 신경세포나 이물질을 제거하는 포식작용을 한다<sup>1,2)</sup>. 신경교세포의

활성화는 뇌 안에 다른 세포보다 먼저 일어나며, 구조적이고 조직적인 변화에 선행하여 전해질 항상성의 불균형과 같은 아주 미약한 미세 환경변화에도 반응을 보이게 된다<sup>3)</sup>. 즉 활성화된 신경교세포의 기능은 세포독성기능과 보호기능의 양면성을 모두 가지고 있어 세포사멸을 일으킬 정도의 손상에 대해서는 조직파편을 제거하는 기능을 하고 그 보다 작은 손상에서는 보호작용을 하는 기능을

\* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한방신약개발센터  
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr  
· 접수 : 2009년 11월 23일 · 수정 : 2009년 12월 14일 · 채택 : 2009년 12월 21일

나타내게 된다<sup>4)</sup>. 특히 기능적으로 활성화된 신경교세포는 정상조건에서와 달리 포식작용을 활발히 하며, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-1, IL-6 등의 전염증성 사이토카인이나 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 등의 케모카인, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase(COX)-2 등의 염증효소 분비를 촉진하여 염증매개물질들을 다량 생성함으로써 오히려 신경세포사멸을 유도하기도 한다<sup>4-7)</sup>.

신경교세포로부터 분비되는 이런 염증매개물질들은 신경세포사멸을 유도함으로써 뇌졸중이나 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 따라서 활성화된 뇌신경교세포에 의해 유도되는 염증반응과 신경세포사멸 현상들의 조절은 뇌질환의 진행을 늦추거나 또는 멈출 수 있는 치료전략 수립에 중요한 지표가 된다.

補陽還五湯(Boyanghwano-tang; BHT)은清代王清任의《醫林改錯》에 처음 수록된 처방<sup>7)</sup>으로 補氣하는黃芪와活血祛瘀작용이 있는當歸尾,赤芍藥,川芎,桃仁,紅花와通經活血하는地龍으로 구성되어 있으며, 補氣,活血化瘀,通絡하는 효능으로氣虛로 인한瘀血證을 치료하는 처방으로 활용되어 있다<sup>8-10)</sup>. 또한 BHT는簡明方劑辭典에“此方治半身不遂 口眼喎斜 言語蹇澀 口角流涎 大便乾燥 小便頻數 遺尿不禁”이라 기재된<sup>11)</sup> 이후 주로氣虛血瘀로 인한中風半身不遂의 치료에 활용되어 왔으며, 근래에는 허혈성 뇌혈관 질환, 뇌동맥경화, 심근경색, 협심증, 다발성 신경염, 혈전성 정맥염 등의 질환 치료에도 사용되고 있다<sup>12)</sup>.

補陽還五湯에 대한 실험적 연구로는 뇌혈전, 혈중지질에 대한 개선효과<sup>13)</sup>, 국소 뇌 혈류량 증가효과<sup>14,15)</sup>, 혈압강하<sup>16)</sup>, 혈전생성 억제효과<sup>17)</sup>, 고혈압과 고지혈증 억제효과<sup>18)</sup>, 학습과 기억력 증가 및 치매 억제효과<sup>19)</sup>, 가역성 전뇌허혈로 인한 뇌세포 손상 감소효과<sup>20,21)</sup>, 신경세포사멸 억제효과<sup>22,23)</sup> 등이 보고되어 있다. 그러나 허혈성 뇌졸중의 병태생리에 중요한 역할을 하는 신경교세포 활성화와 이에 따른 염증반응에 대한 BHT의 효과에 대한 연구는 되어 있지 않다.

본 연구에서는 뇌졸중 환자들이 기억력 감퇴 등 치매와 관련한 임상적 증상이 나타나는 것에 착안하여 補陽還五湯 處方에 瘀血을 순환시키는丹蔘,牛膝,桂枝와腦神經을 보호하는遠志,石菖蒲 등을 추가하여 加味補陽還五湯(modified BHT, mBHT)을 만들었으며, 加味補陽還五湯으로부터 다양한 분획물(methylene chloride, ethylacetate, *n*-butanol외 water)을 분리하여 신경교세포에서의 염증매개물질 분비에 대한 억제효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 加味補陽還五湯 처방(Table 1)의 구

성 한약재는 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입한 후 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

Table 1. 加味補陽還五湯의 구성약재

韓藥名	生藥名	配合比
黃芪	Astragali Radix	10
當歸尾	Angelicae Gigantis Radix	2
芍藥	Paeoniae Radix	1.5
川芎	Cnidii Rhizoma	1
蚯蚓	Lumbricus	1
桃仁	Percicae Semen	1
紅花	Carthami Flos	1
土牛膝	Achyranthes bidentata Blume	1.5
丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	4
桂枝	Cinnamomi Ramulus	1
遠志	Polygalae Radix	1
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	1

### 2) 시약

실험에 사용된 시약은 *n*-hexane, methylene chloride, ethylacetate, *n*-BuOH (Merck Co., Germany), lipopolysaccharide (LPS; *E. coli* B0111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA), MTT(Sigma), Protein assay solution(BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), 30% Acrylamide solution (BioRad Laboratories Inc), NP-40 Cell Lysis Reagent (Invitrogen, CA, USA), N-trityl-1,3-propanediamine acetate (Sigma), Sulfanilamide(Sigma), anti-iNOS antibody(SantaCruz Co Ltd, Santa Cruz, CA, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) mBHT 물추출물 제조 및 분획물 분리

본 실험에 사용한 加味補陽還五湯(mBHT)은 Table 1의 처방 비율로 구성된 각 약재를 정량하여 총 50 kg을 세말한 다음, GMP 시설업체의 추출기에 투입하고 물 1,000 L를 용매로 하여 98°C에서 3시간 동안 추출하였으며 3 batch의 연조엑스를 수득하였다. 이를 다시 700 mmHg, 55°C에서 15시간 감압 건조하여 건조엑스를 수득하였으며, 이때 수득률은 34.8%였다.

mBHT 물추출물로부터 다양한 분획물을 분리하기 위하여 mBHT 건조엑스(100 g)를 물 1 L에 현탁하여 3 L 분액여두에 넣은 후 헥산(*n*-hexane) 1 L를 첨가하여 24시간 실온에서 방치한 다음 40°C에서 헥산층을 감압농축하였다. 그러나 헥산 분획물은 얻지 못했다.

남은 물 현탁액에 methylene chloride 용매 1 L를 넣은 후 24시간 상온에서 방치한 다음 40°C에서 감압농축하여 methylene chloride 분획물(3.5 g; mBHT-MC)을 얻었다.

다시 나머지 현탁액에 ethyl acetate 용매 1 L를 넣어 상온에서 24시간 방치 한 후 40°C에서 감압농축하여 ethyl acetate 분획물(1.5 g, mBHT-EtOAc)을 얻었다.

다시 남은 물 현탁액에 *n*-butanol 용매 1 L를 넣어 24 시간 경과 후 60°C에서 감압농축하여 *n*-butanol 분획물 (11 g, mBHT-BuOH)을 얻었다.

마지막으로 남은 물 현탁액은 50°C에서 감압농축함으로써 최종 물분획물(64 g, mBHT-H<sub>2</sub>O)을 얻었다(Fig. 1).

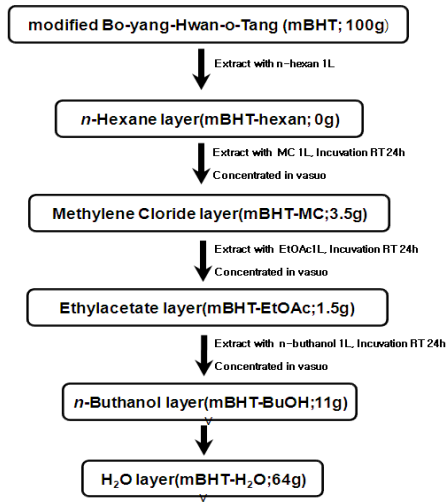


Fig. 1. Scheme for preparation of the mBHT extract and its fractionation

2) 세포배양

마우스의 뇌 신경교세포주인 BV2 cell은 고려대학교 의과대학 뇌신경과학교실로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

3) 세포독성 조사

BV2 세포(5×10<sup>4</sup> cells/well)를 24-well culture plate에 1 ml의 DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 각 분획물을 다양한 농도로 30분 동안 처리한 후 LPS (1 µg/ml) 함께 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 µl씩 넣은 후 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 1 ml의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색 formazan 결정을 완전히 용해시켰다. 각 well의 발색정도를 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 세포만 배양한 무처리구의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4) Nitric oxide 측정

BV2 세포로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태를 Griess reagent 반응법으로 측정하였다. 즉 BV2 세포에 독성이 없는 농도범위의 mBHT 분획물을 30분간 전처리한 다음, LPS(1 µg/ml)

를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 100 µl에 동일한 양의 Griess 시약(0.1% NED/1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 넣은 후 15분간 암반응 하였다. 발색정도를 microplate reader의 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포배양액 내 NO의 농도는 NaNO<sub>2</sub> 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Western blot

BV2 세포에서 발현되는 염증효소인 iNOS 단백질에 대한 효과를 조사하기 위해 Western blot을 수행하였다. 먼저, BV2 세포에 독성이 없는 농도범위의 mBHT 분획물을 30분 동안 전처리한 다음, LPS(1 µg/ml)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 각 세포를 수거하여 HBSS 용액으로 2회 세척한 다음 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) 0.1 ml로 lysis시키고 12,000 rpm에서 20분 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질의 농도를 protein assay solution으로 정량한 다음, 30 µg 단백질을 2× sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 10-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% skim milk로 실온에서 1시간 blocking하였다. 이를 iNOS 및 β-actin에 대한 일차항체와 함께 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. 여기에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣어 1시간 실온에서 반응시키고 이를 다시 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척한 다음 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

6) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Graph Pad Prism program의 1-way ANOVA test를 수행하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검정

mBHT 분획물(1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml)의 BV2 세포에 대한 독성정도를 MTT assay 방법으로 조사한 결과(Fig. 2), mBHT-MC는 100 µg/ml 농도 (15.47±6.95%)에서 독성을 나타내었으며, mBHT-EtoAc, mBHT-BuOH, mBHT-H<sub>2</sub>O는 각각 100 µg/ml 농도에서 93.92±10.76%, 98.47±4.33%, 104.30±1.31%로 모두 독성이 나타나지 않았다. 따라서 이후 실험은 mBHT-MC가 독성을 나타내지 않는 50 µg/ml 이내 농도에서 수행하였다.

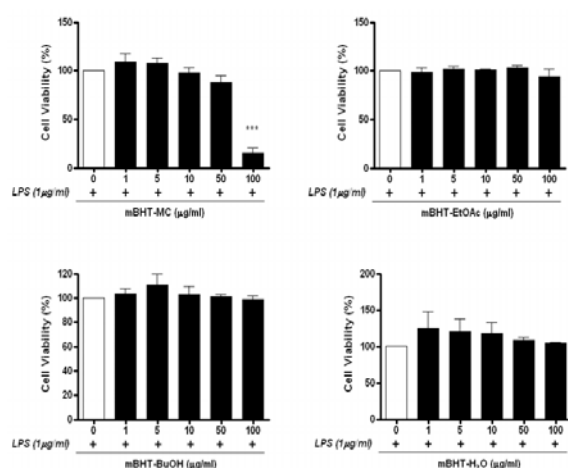


Fig. 2. Effects of mBHT fractions on the viability of BV2 cells

Cells were treated with different concentrations of the methylene chloride(mBHT-MC), ethylacetate fraction (mBHT-EtOAc), *n*-butanol fraction(mBHT-BuOH) and water fraction (mBHT-H<sub>2</sub>O) with LPS(1 µg/ml) for 24h, and cell viability was determined by MTT assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells. \*\*\* : significantly different with LPS only (\*\*\*) :  $p < 0.001$ .

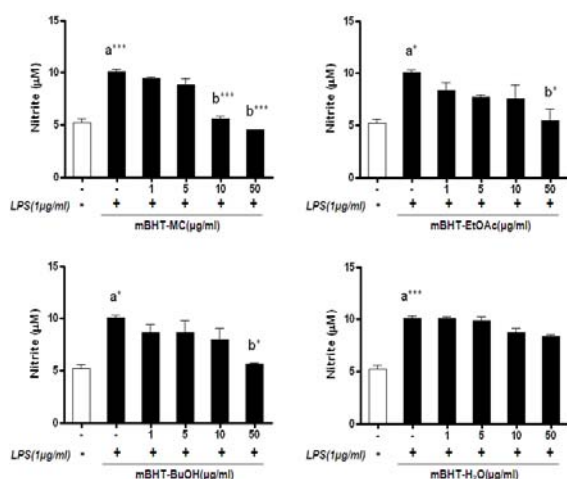


Fig. 3. Effects of the mBHT fractions on NO production in LPS-stimulated of BV2 cells

Cells were treated with different concentrations of the methylene chloride(mBHT-MC), ethylacetate fraction(mBHT-EtOAc), *n*-butanol fraction(mBHT-BuOH) and water fraction (mBHT-H<sub>2</sub>O) for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 µg/ml) for 18h. The nitrite concentrations in medium were determined by Griess reagent assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). Statistical test : a significantly different with control, b significantly different with LPS only (\* :  $p < 0.05$ . \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

## 2. NO 생성에 대한 효과

활성화된 신경교세포로부터 분비되는 염증물질인 NO에 대한 mBHT 분획물의 억제효과를 조사하기 위해서 세포배양액으로부터 Griess assay 방법으로 NO의 양을 측정하였다(Fig. 3). 먼저 세포만 배양하였을 때 세포배양

액 내 NO의 농도는  $5.19 \pm 0.53$  µM로 매우 낮게 측정되었으며, LPS를 처리하였을 때  $10.09 \pm 0.30$  µM 농도로 증가되었다. mBHT-MC는 1, 5, 10, 50 µg/ml 농도에서 각각  $9.38 \pm 0.30$  µM,  $8.84 \pm 0.84$  µM,  $5.56 \pm 0.32$  µM,  $4.52 \pm 0.04$  µM로 측정되었으며, mBHT-EtOAc는 각각  $8.37 \pm 1.10$  µM,  $7.67 \pm 0.30$  µM,  $7.57 \pm 1.90$  µM,  $5.45 \pm 1.62$  µM로 측정되어 유의적이고 처리 농도에 의존적으로 NO 생성이 감소되었다. 반면 mBHT-BuOH은 1, 5, 10, 50 µg/ml 농도에서 NO의 농도가  $8.63 \pm 1.10$  µM,  $8.66 \pm 1.65$  µM,  $8.03 \pm 1.39$  µM,  $5.64 \pm 0.11$  µM로 측정되어 50 µg/ml 농도에서만 유의적인 NO 생성 감소효과가 나타났으며, mBHT-H<sub>2</sub>O는  $10.11 \pm 0.14$  µM,  $9.84 \pm 0.57$  µM,  $8.71 \pm 0.62$  µM,  $8.34 \pm 0.28$  µM로 측정되어 유의적인 감소효과가 나타나지 않았다. 따라서 mBHT의 분획물을 동일한 농도로 비교하였을 때, 10 µg/ml 농도에서 mBHT-MC만 유의적으로 NO 생성을 감소시켰으며(Fig. 4A), 50 µg/ml 농도에서는 mBHT-H<sub>2</sub>O을 제외한 모든 분획물에서 유의적으로 NO의 농도를 감소시켜(Fig. 4B), mBHT의 분획물 중에서는 mBHT-MC가 활성화된 신경교세포로부터 생성되는 NO의 억제효과가 가장 좋은 것으로 나타났다.

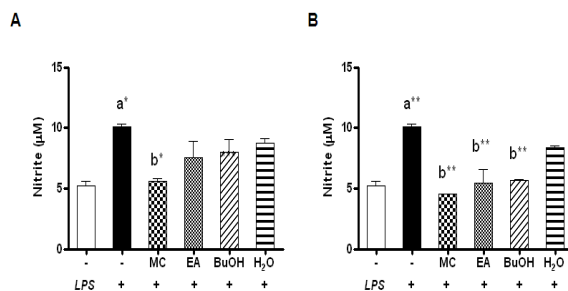
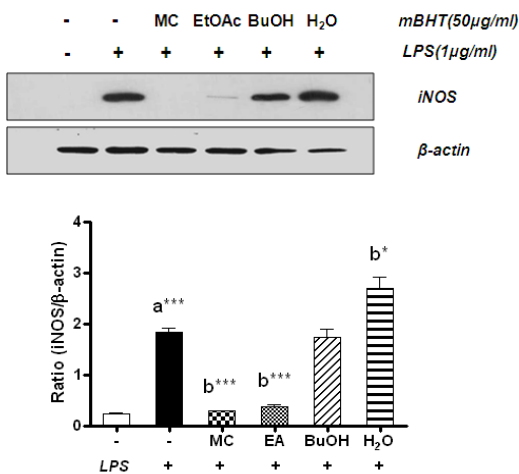


Fig. 4. Effects of the mBHT fractions on NO production in LPS-stimulated of BV2 cells

Cells were treated with same concentrations(A : 10 µg/ml, B : 50 µg/ml) of the methylene chloride(mBHT-MC), ethylacetate fraction (mBHT-EtOAc), *n*-butanol fraction(mBHT-BuOH) and water fraction (mBHT-H<sub>2</sub>O) for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 µg/ml) for 18h. The nitrite concentrations in medium were determined by Griess reagent assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). Statistical test : a significantly different with control, b significantly different with LPS only (\* :  $p < 0.05$ . \*\* :  $p < 0.01$ ).

## 3. iNOS 발현에 대한 효과

활성화된 신경교세포로부터 발현되는 NO 합성효소인 iNOS에 대한 mBHT 분획물의 억제효과를 Western blot 방법으로 조사한 결과, 세포만 배양하였을 때는 iNOS 발현이 거의 관찰되지 않았으며, LPS 처리에 의해 유의적으로 증가하였고 mBHT-MC와 mBHT-EtOAc에 의해 현저히 감소되었다(Fig. 5). 또한 mBHT-BuOH의 경우, mBHT-MC와 mBHT-EtOAc 보다는 적었으나, 대조군에 비해서는 iNOS의 발현이 감소되었고, mBHT-H<sub>2</sub>O는 iNOS 발현을 억제시키지 않는 것으로 나타났다. 따라서 mBHT 분획물 중 mBHT-MC가 다른 분획물에 비해



**Fig. 5. Effects of the mBHT fractions on LPS-induced iNOS expression in BV2 cells**

Cells were treated with same concentrations (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the methylene chloride (mBHT-MC), ethylacetate fraction (mBHT-EtOAc), n-butanol fraction (mBHT-BuOH) and water fraction (mBHT-H<sub>2</sub>O) for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 18h. The protein levels were determined Western blot. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). Statistical test : a significantly different with control, b significantly different with LPS only (\* :  $p < 0.05$ . \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질의 발현을 효과적으로 억제시켜 NO 생성을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

## 고찰

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로써 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변이다<sup>24,25</sup>. 대식세포는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물 체내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 포식작용과 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6와 같은 전염증성 사이토카인을 비롯하여 reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등의 다양한 염증매개물질들을 분비하는 면역세포이다<sup>26,27</sup>. 외부자극으로부터 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증매개물질은 초기 염증반응을 유도하여 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 바이러스 감염 등으로 인한 만성적 염증질환 유발과 질병 발달에 기여하게 된다<sup>19,20</sup>.

뇌졸중에서는 신경세포 손상을 통해 일어나는 염증반응이 주로 신경교세포(microglia) 활성화를 통해 나타나며 뇌부종과 뇌경색을 증가시키게 되므로<sup>28</sup> 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 염증물질을 감소시켜 뇌졸중의 진행을 막거나 치료할 수 있는 방법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>28</sup>. 최근에는 한방임상에서

활용되고 있는 한방처방이나 한약재로부터 유래되는 다양한 활성물질이 뇌졸중 치료약물 개발 분야에서 주목 받고 있다<sup>29-34</sup>.

한의학에는 중풍의 後遺障 障碍 치료와 개선을 위한 많은 治療方法과 處方들이 있는데 그 중 淸時代의 王淸任이 소개한 補陽還五湯(BHT)은 대표적인 偏麻痺 治療法 중의 하나로<sup>35</sup>, 주로 氣虛血瘀로 인한 中風 半身不遂 治療에 활용되어 왔는데 최근에는 虛血性 腦血管 疾患, 腦動脈 硬化 뿐 아니라 冠狀動脈硬化, 心筋梗塞, 狹心症, 多發性神經炎, 血栓性靜脈炎 등의 疾患에도 응용되고 있다<sup>12</sup>.

실제 한방임상에서는 뇌졸중 환자들이 기억력 감퇴 등의 치매 관련 임상증상을 함께 동반하기도 하여 瘀血을 순환시키는 丹蔘, 牛膝, 桂枝와 뇌신경을 보호하는 것으로 알려진 遠志, 石菖蒲 등을 첨가하여 처방하기도 사용하기도 한다. 따라서 본 연구에서는 허혈성 뇌졸중 시 염증반응 유발에 핵심이 되는 신경교세포의 활성을 제어할 수 있는 약물을 개발하기 위해서 加味補陽還五湯(mBHT) 물추출물로부터 다양한 분획물을 분리하고 신경교세포에서의 염증반응 억제효과를 조사하였다.

LPS는 염증반응 유도물질로서 신경교세포로부터 NO, ROS, 염증사이토카인 등 각종 염증매개물질 분비를 유도하게 되는데<sup>32,33</sup>, 최근 신경교세포의 LPS 인식기전의 이해 및 염증유발 관련 유전자의 발굴, 나아가 이들의 조절을 통해 각종 뇌질환 치료에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>36</sup>.

NO는 독성 자유기(free radical)로서 심혈관계, 신경계, 면역계 내 전달물질이며 세포 내 항상성 유지, 신경전달물질 운반, 항암작용 및 세포독성 등 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>37</sup>. NO는 NO 합성경로를 통해 L-arginine이 산화되어 citrullin으로 변환되는 과정에서 형성되는 중간 생성물이며 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)가 있는데 eNOS와 nNOS는 칼슘농도에 의존적으로 소량 발현되는 반면, iNOS는 칼슘농도에 상관없이 염증자극으로 다량 합성되며 NO를 생성하여 염증반응에 기여하게 된다<sup>27,37</sup>. 일반적으로 iNOS는 대식세포에서 LPS, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ 와 같은 염증자극에 의해 유도되며, 특히 LPS나 세균의 lipopeptide에 의해 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>38</sup>.

NO는 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있지만, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 초래하여 세포를 파괴하고 쇼크에 의한 혈관 확장 및 염증반응 가속화를 통해 조직손상을 유발하게 된다<sup>27,37</sup>. 따라서 각종 염증질환에서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO와 iNOS의 생성을 억제하는 것은 효과적인 치료방법의 하나로 인식되고 있다.

본 연구에서는 mBHT 물추출물의 분획물(methylene chloride, ethylacetate, n-butanol, water)은 모두 독성이 없는 농도범위에서 LPS에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 분비되는 NO의 농도를 유의적으로 감소시켰다. 특히

methyl chloride 분획물은 ethyl acetate, *n*-BuOH 분획물에 비해 NO 생성을 가장 많이 억제시키는 것으로 나타났다.

현재까지 한약복합물에 의한 iNOS 생성 억제에 대한 약리학적 기전이 명확하게 밝혀져 있지는 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우에는 약물 전처리에 의해 iNOS의 promoter activity가 억제되거나, iNOS 유전자의 전사가 억제되는 경우 및 세포 밖으로 분비된 NO가 약물에 의해 직접 소거(scavenging)되는 것과 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>3-7,20</sup>. 따라서 mBHT의 분획물은 iNOS의 유전자 전사를 억제함으로써 단백질 합성을 차단하여 최종적으로 NO의 생성을 억제할 수 있는 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구에서는 mBHT의 여러 분획 중 LPS에 의해 활성화된 신경교세포로부터 생성되는 염증 매개물질인 NO와 iNOS를 가장 효과적으로 억제할 수 있는 분획물은 methyl chloride 분획물인 것으로 나타났으며, 이는 mBHT의 methyl chloride 분획물이 뇌졸중에서 신경교세포에 의한 염증반응을 조절할 수 있는 약물로 근거가 될 수 있는 것으로 보아진다.

## 결론

본 연구에서는 加味補陽還五湯(mBHT)으로부터 염증 반응 억제 효과를 가진 생리활성분획물을 도출하기 위하여 신경교세포로부터 LPS에 의해 유도되는 NO와 iNOS에 대한 억제효과를 조사하였다.

1. BV2 세포에서 mBHT의 ethyl acetate, butanol, H<sub>2</sub>O 분획물은 100 µg/ml까지 독성이 없었으며, methyl chloride 분획물은 50 µg/ml까지 독성이 없었다.
2. mBHT의 methyl chloride, ethyl acetate, butanol 분획물은 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 특히 methyl chloride 분획물은 10 µg/ml 농도에서 다른 분획물에 비해 NO의 생성을 현저히 감소시켰다.
3. mBHT의 methyl chloride 분획물은 다른 분획물에 비해 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 단백질 발현을 현저히 감소시켰다.

따라서 mBHT 물추출물의 분획물 중 methyl chloride 분획물이 활성화된 뇌신경교세포로부터 분비되는 NO와 iNOS를 가장 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 한의약연구개발사업(B080027)과 동국대학교 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immun-effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995; 20 : 269-87.
2. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996 ; 19 :312-8.
3. Rock RB, Peterson PK. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006 ; 1 : 117-26.
4. Hailer NP. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol.* 2008 ; 84 : 211-33.
5. Kriz J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 2006 ; 18 : 145-57.
6. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2007 ; 184 : 53-68.
7. 南京中醫學院. 中醫方劑大辭典. 北京 : 人民衛生出版社. 1995 : 891.
8. 신민교. 臨床本草學. 서울 : 영림사. 1986 : 169-71, 221-3, 249-50, 300-1, 464-8, 662-3.
9. 신길구. 申氏本草學. 서울 : 수문사. 1988 : 9-12, 80-4, 448-50, 521-2, 554-6, 562-4, 600-3.
10. 김창민. 中藥大辭典. 서울 : 정담. 1998 : 592-9, 1159-68, 1353-8, 4839-45, 5258-65, 6357-62, 6460-71.
11. 江克明. 簡明方劑辭典. 上海 : 上海科學技術出版社. 1990 : 571.
12. 전영수. 補陽還五湯과 加味補陽還五湯이 endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1993 ; 8 : 157-176.
13. 김남용. 補陽還五湯이 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1985.
14. 정하나. 韓藥材 經구투여에 의해 Th1/Th2 type 면역반응의 선택적인 조절에 관한 研究. 전북대학교 대학원. 2004.
15. 문병순. 補陽還五湯煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1985.
16. 탁의수. 補陽還五湯이 實驗的 血栓에 미치는 影響. 동국대학교 대학원. 1990.
17. 김성훈. 復元活血湯 및 補陽還五湯이 endotoxin으로 유발된 血栓生成抑制에 미치는 影響. 동의대학교 대학원. 1994.
18. 정우상. 高血壓 및 高脂血症에 대한 補陽還五湯의 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1998.
19. 설인숙. 加味補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血

- 症, 高血壓, 및 腦損傷에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1998.
20. 최은정. mongolian gerbil의 reversible forebrain ischemia 모델에 미치는 補陽還五湯의 效果. 동국대학교 대학원. 1999.
  21. 김영현. 抗瘀血 治療劑인 補陽還五湯의 免役調節作用. 전주대학교 대학원. 2002.
  22. 정용준. 補陽還五湯이 LPS 와 PMA에 의해 損傷된 神經膠細胞에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1999.
  23. HS Han, JA Lee, YK Park. Protective effects of modified Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells. Kor J Herbology. 2006 ; 21 : 85-92.
  24. Morson BC. Pathology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Jpn. 1980 ; 15 : 184-7.
  25. Cline MJ. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms. Ser Haematol. 1970 ; 3 : 3-16.
  26. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. Toxicology. 2005 ; 208 : 249-58.
  27. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992 ; 6 : 3051-64.
  28. 임진승. 加味補陽還五湯의 뇌졸중 동물에서의 뇌신경보호효과. 동국대학교 대학원. 2008.
  29. Cao H, Urban JF Jr, Anderson RA. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and pro inflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. J Nutr. 2008 ; 138 : 833-40.
  30. Tao JY, Zhao L, Huang ZJ, Zhang XY, Zhang SL, Zhang QG, Fei-Xiao, Zhang BH, Feng QL, Zheng GH. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl on lps-stimulated RAW 264.7 cell. Inflammation. 2008 ; 31 : 154-66.
  31. Zhao L, Zhang SL, Tao JY, Jin F, Pang R, Guo YJ, Ye P, Dong JH, Zheng GH. Anti-inflammatory mechanism of a folk herbal medicine, *Duchesnea indica* (Andr) Focke at RAW264.7 cell line. Immunol Invest. 2008 ; 37 : 339-57.
  32. Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. J Ethnopharmacol. 2007 ; 114 : 439-45.
  33. Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW2647 cells. J Ethnopharmacol. 2006 ; 106 : 121-8.
  34. Jin HZ, Lee JH, Lee D, Hong YS, Kim YH, Lee JJ. Inhibitors of the LPS-induced NF-kappaB activation from *Artemisia sylvatica*. Phytochemistry. 2004 ; 65 : 2247-53.
  35. 王青林. 醫林改錯. 臺北 : 臺聯國風出版社. 1975 : 40-4.
  36. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 ; 3 : 413-21.
  37. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell. 1992 ; 70 : 705-7.
  38. Sunyer T, Rothe L, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: autocrine NO mediates Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-inhibited bone resorption. Endocrinology. 1997 ; 138 : 2148-62.