

# 지질다당체유도 BV2세포손상에 대한 상백피 추출물의 항염증작용

박신형 · 최영현<sup>1</sup> · 엄현섭 · 지규용\*

동의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 생화학교실

## Anti-inflammatory Action of Extract of *Mori Cortex* against Lipopolysaccharide-induced BV2 Microglia

Shin Hyung Park, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Hyun Sup Eom, Gyoo Yong Chi\*

Department of Pathology, 1: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University

This research is performed to obtain positive evidences of *Mori cortex*, a kind of oriental medicinal herbs, in the cellular levels. The extracts of *M. cortex* have shown anti-inflammatory effects against cutaneous inflammation and clinical effects on pulmonary asthma and congestion in oriental medicine. Thus BV2 cells were chosen because microglia are considered as the main immunocompetent cells in the central nervous system. Lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation of cultured BV2 cells and subsequent release of nitric oxide (NO) and Prostaglandin E2 (PGE2) were effectively suppressed by methylene chloride extract of *Morus alba L.* (MEMA). From the inflammation-mediated mRNA and protein analyses, we showed that inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ) induced by LPS were markedly decreased by MEMA treatment. From the observation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) which is controlling and mediating inflammation through COX-2 and iNOS, there showed that p65, a subunit of NF- $\kappa$ B, was increased in nuclear and I $\kappa$ B, a competitor of NF- $\kappa$ B, was recovered in cytosol after MEMA treatment. These are corresponding with results of iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and confirm some suppressive effect against transcriptional activation of NF- $\kappa$ B. In conclusion, the anti-inflammatory action of *M. cortex* against BV2 microglia cells is expected to protect nerve tissues through suppression of neuronal inflammation in various neurodegenerative diseases.

Key words : BV2 cell, microglia, *Mori cortex*, COX-2, iNOS

### 서 론

상백피는 뽕나무과(Moraceae)에 속한 다년생 식물인 뽕나무(*Morus alba L.*) 및 동속 근연식물의 根皮를 건조한 것<sup>1)</sup>으로 조<sup>2)</sup>와 유<sup>3)</sup> 등에 의해 피부병변에서의 항염효과에 대한 임상보고가 제시된 바 있다. 뽕나무는 우리나라를 비롯한 아시아뿐만 아니라 유럽, 미국, 아프리카 등에도 광범하게 분포하며<sup>4)</sup> 藥用 외에도 양잠산업과도 관련이 깊다. <東醫寶鑑>에서도 本草書를 인용하여 “治肺氣 喘滿 水氣 浮腫 消痰 止渴 去肺中水氣 利水道 治咳嗽 唾血 利大小腸 殺腹藏虫 又可縫金瘡(本草)”<sup>5)</sup>라 하였는데 이는 의

\* 교신저자 : 지규용, 부산시 부산진구 양정동 45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : cgyu@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8659

· 접수 : 2010/05/17 · 수정 : 2010/06/07 · 채택 : 2010/06/12

료용 縫合絲로 사용되었음을 말한다.

염증은 유해자극에 대해 혈관을 위주로 한 생체조직이 일으키는 정상적인 반응이다. 처음에 침입한 병원체를 중화시키기 위하여 免疫樣의 복합적인 반응이 개시되며, 이로써 손상된 조직을 복구하고 항상성을 회복하게 된다.<sup>6)</sup> 특히 주요한 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  및 대식세포와 성장교세포의 질소산화물(NO)들이 자연면역에 관련되어 있다.

이처럼 염증은 기본적으로 긍정적인 치유과정임에도 불구하고 동시에 부정적인 작용을 일으키기도 한다. 즉 진행성인 염증이 신경세포에서 cyst 밖으로 이물을 배출하는 반면 뇌실질조직을 파괴하기도 한다<sup>7)</sup>. 또한 Kipnis<sup>8)</sup>와 Parachikova<sup>9)</sup> 등이 보여준 것처럼 T cell의 기능은 인지기능과 정상관관계를 갖는다. 즉 염증인자들인 TNF- $\alpha$ 와 interleukin들의 작용은 Th1, Th2,

Th17세포 등의 기능과 관련되어 있으므로 이들은 뇌의 인지 기능손상 질환을 평가하는 지표가 될 수 있다. 또한 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 prostaglandin을 만드는데 관여하는 효소인데 프로스타글란딘은 염증과 동통 및 발열을 일으키는 주요염증물질이다.

BV2세포는 약물이나 손상물질에 의한 산화성 뇌손상의 징후를 관찰하는데 사용되는 immortalized mouse의 microglia cell line이다<sup>10)</sup>. 따라서 한방임상에서 항염작용이 있는 것으로 알려진 상백피의 약리작용을 이해하고 인지기능성 뇌질환에 응용할 수 있는지를 확인하기 위하여 상백피를 알콜 추출하고, LPS로 산화성 손상을 BV2세포에 처리하여 NO와 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 그리고 COX-2 등의 발현양상을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 상백피(*Morus alba* L.)는 경북 영주약초시장에서 구입하고 동의대학교 한의과대학 본초학교실에서 표준품 확인을 받은 것으로, 흐르는 물에 수회 세척하여 그늘에서 하루 동안 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 상백피의 에탄올 및 메틸렌클로라이드 추출물(ethanol extract of *Morus alba* L., EEMA; methylene chloride extract of *Morus alba* L., MEMA)을 얻기 위하여 건조된 상백피 200 g에 에탄올 및 메틸렌클로라이드를 각각 1.5 l씩 첨가하여 에탄올은 100rpm, 60 $^{\circ}$ C에, 메틸렌클로라이드는 100rpm, 35 $^{\circ}$ C 조건에서 5일간 교반하였다. 그 후 상층액만 분리하여 건조하고, 분말을 200 mg/ml 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켰다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fatal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 모두 Gibco (Grand Island, NY)에서 구입하였다. mRNA 분석을 위한 primer (Bioneer, Taejeon, Korea)는 Table 1에 나타내었고, 단백질 분석을 위한 모든 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체는 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 별도 표기하지 않은 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

	primer	sequence (5'-3')
iNOS	S	AAGCACATGCAGAATGAGTACCG
	AS	GTGGGACAGCTTCTGGTCGAT
COX-2	S	GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC
	AS	ATGGTCAGTAGACTTTTACGACTA
TNF- $\alpha$	S	CCCCTCAGCAAACCAACCAAGT
	AS	CTTGGGCAGATTGACCTCAGC
IL-1 $\beta$	S	AATCTCAGCAGCAGCATCAA
	AS	AGCCCACTACTTTAGGAAGACA
IL-6	S	GGAGGCTTAATTACACATGTT
	AS	TGATTCCAAGATGAATTGGAT
GAPDH	S	ACCACAGTCCATGCCATCAC
	AS	TCCACCACCTGTTGCTGTA

### 2. 세포 배양

실험에 사용된 BV2 세포는 울산대학교 의과대학 생화학교실 (서울 아산병원)로부터 제공받았으며, 10% fatal bovine serum (FBS)에 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO $_2$  조건에서 배양하였다. 모든 실험에서 BV2 세포는 *Morus alba* L. 추출물을 1시간 선 처리한 후 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 후처리하여 24시간 배양하였다.

### 3. MTT Assay에 의한 세포독성 조사

MTT Assay를 통해 세포생존율을 측정하였다. 세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를 6 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, EEMA (ethanol extract of *Morus alba* L.)와 MEMA (methylene chloride extract of *Morus alba* L.)를 농도별로 1시간 선처리 후 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후에 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/ml 농도로 희석한 tetrazolium bromide salt (MTT)를 well 당 1 ml씩 분주하여 2시간 배양한 후 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)로 formazin을 모두 용해시켜 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에 흡광도 540nm로 측정하였다.

### 4. NO의 측정

Griess Assay를 통해 NO 생성량을 측정하였다. 세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를 6 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, EEMA (ethanol extract of *Morus alba* L.)와 MEMA (methylene chloride extract of *Morus alba* L.)를 농도별로 1시간 선처리 후 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 각 well에서 세포배양액을 100  $\mu$ l씩 취하여 각각 Griess reagent(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H $_3$ PO $_4$ ) 100  $\mu$ l와 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. ELISA reader에 흡광도 540 nm로 NO 함량을 측정 후, sodium nitrite (NaNO $_2$ )의 standard curve를 바탕으로 NO 농도를 계산하였다.

### 5. RT-PCR에 의한 mRNA의 분석

세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를 6 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, MEMA (methylene chloride extract of *Morus alba* L.)를 농도별로 1시간 선처리 후 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 모아진 세포를 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)에 lysis 시켜 total RNA를 분리하고, 동량의 RNA에 iNOS, COX-2, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 primer, DEPC water, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 각각 혼합하여 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 증폭시켰다. 그 후 ethidium bromide (EtBr)이 포함된 1% agarose gel에 각 sample을 loading하여 100V에서 전기영동시킨 후 UV 하에서 mRNA 발현량을 관찰하였다.

6. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

세포 배양용 100 mm dish에 BV2 세포를  $2.5 \times 10^6$  cells/ml로 분주하여 상기한 방식대로 배양한 후 세포들을 모아서 lysis buffer[25 mM Tris-Cl (pH7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]에 1시간 가량 lysis시킨 후 Bio-rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법을 따라 정량하였다. 그 다음에 Laemmli sample buffer (Bio-rad)를 동량으로 섞어 SDS-polyacrylamide gel에 loading한 후 90V로 전기영동하였다. 이 acrylamide gel을 electroblotting을 통해 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 옮긴 다음, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 4°C에서 1차 항체를 붙여 overnight하였다. 그 후 PBS-T로 세척하고 상온에서 1시간 가량 2차 항체를 붙인 후 다시 세척하고 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Height, IL, USA)을 뿌려 Kodak X-ray에 감광시켰다. 핵 단백질과 세포질 단백질의 분리는 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, USA)를 구입하여 그 사용방법에 따라 분리하였고, 그 후의 단백질 분석 과정은 상기한 방식과 동일하다.

7. PGE2의 측정

Cayman chemicals (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입한 EIA kit를 통해 PGE2 생성량을 측정하였다. 세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를  $5 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, MEMA (methylene chloride extract of *Morus alba* L.)를 농도별로 1시간 선처리 후 LPS (0.5 µg/ml)를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 각 well에서 세포배양액을 취하여 EIA kit에 제시된 방법에 따라 처리한 다음 ELISA reader에 흡광도 420 nm로 PGE2의 생성량을 측정하였다.

결 과

1. 상백피 추출물의 BV2 세포에 대한 세포독성 여부

상백피 추출물이 BV2 세포에 독성을 나타내지 않는 조건에서 항염증효과를 조사하기 위해 상백피 메틸렌클로라이드 추출물(MEMA)과 에탄올 추출물(EEMA)을 각각 단독 처리한 군과 1시간 선처리한 후 LPS를 처리한 군에서 MTT assay를 시행하여 BV2 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 MEMA와 EEMA 단독 처리 시 75 µg/ml 처리군까지는 BV2 세포가 90% 이상 생존하였으나, MEMA 100 µg/ml 처리군에서는 생존율 76%로 세포독성을 나타내었다. 따라서 BV2 세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 조건인 75 µg/ml을 최종 농도로 하여 MEMA와 EEMA를 농도별로 1시간 선처리한 후, 역시 세포독성을 나타내지 않는 농도의 LPS(0.5 µg/ml)를 후처리하여 24시간 경과 후에 생존율을 측정한 결과 Fig. 1B에서 나타난 바와 같이 MEMA 처리군과 EEMA 처리군 모두 생존율이 90% 이상으로서 BV2 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다.

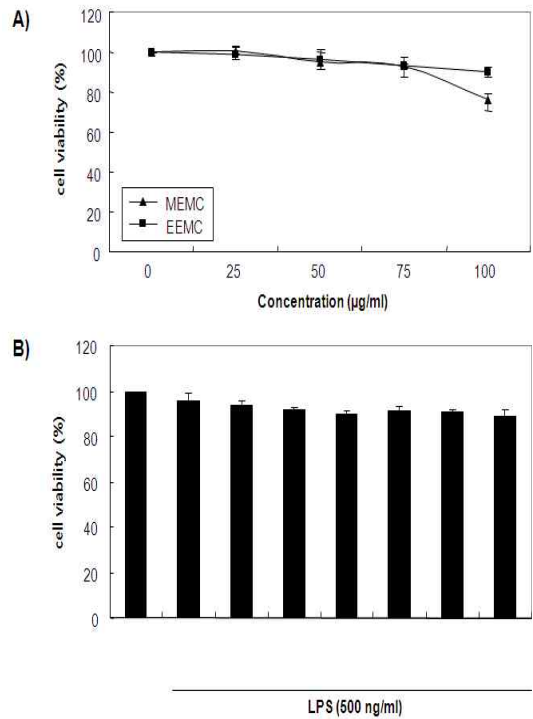


Fig. 1. Effects of M. Cortex extracts and LPS on the cell viability in BV2 microglia cells. The BV2 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 6 well plates and (A) treated with indicated concentrations of M.cortex extracts (methylene chloride extract of M. Cortex, MEMA ; ethanol extract of M. Cortex, EEMA) for 24 h. (B) The cells were pre-treated for 1 h with indicated concentrations of MEMA, EEMA and then incubated with LPS (0.5 µg/ml) for 24 h. The rates of cell viability were measured by MTT assay. The data shown are means±SD of three independent experiments.

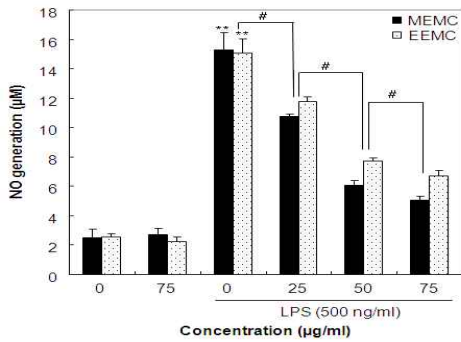
2. LPS로 유도한 NO의 생성증가에 대한 상백피 추출물의 억제 효과

BV2 microglia cell은 LPS에 의해 activation되어 NO(nitric oxide), PGE2, 전구염증 cytokine 및 다양한 ROS(reactive oxygen species)를 생성시켜 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>11-13</sup>. 상백피 추출물이 LPS로 유도된 NO의 증가에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MEMA와 EEMA를 각각 단독 처리(75 µg/ml)하거나 1시간 선처리한 후 LPS(0.5 µg/ml)를 처리하여 Griess assay를 통해 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 LPS 처리 후 최대  $15.27 \pm 1.18$  µM까지 증가했던 NO 생성량이 MEMA와 EEMA 처리에 의해 농도의존적으로 각각 유의하게 감소하여 최고농도인 75 µg/ml에서 MEMA 처리군은  $5.07 \pm 0.25$  µM, EEMA 처리군은  $6.7 \pm 0.35$  µM까지 NO 생성량을 감소시켰다. 이러한 상백피 추출물의 NO 생성 억제효과는 MEMA 처리군에서 더욱 현저하였다.

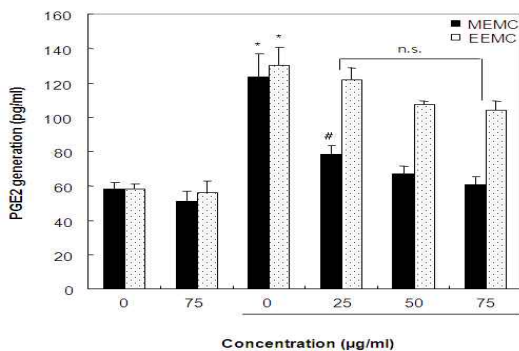
3. LPS로 유도한 PGE2 생성증가에 대한 상백피 추출물의 억제 효과

다음으로 중요한 염증 매개 산물인 PGE2의 증가에 상백피 추출물이 미치는 영향을 조사하였다. NO 측정과 마찬가지로 조건으로 MEMA와 EEMA를 처리하여 24시간 경과 후 PGE2를 측정 한 결과, LPS 처리에 의해 최대  $130 \pm 9.8$  pg/ml까지 증가했던

PGE2 생성량이 MEMA(75  $\mu\text{g/ml}$ )에 의해  $60.5 \pm 4.94$   $\mu\text{g/ml}$ , EEMA(75  $\mu\text{g/ml}$ )에 의해  $104.3 \pm 5.02$   $\mu\text{g/ml}$ 까지 각각 감소하였다(Fig. 3). 이러한 PGE2 생성 억제효과는 NO 생성 억제효과와 마찬가지로 EEMA 처리군보다 MEMA 처리군에서 현저하였으며, 따라서 상대적으로 효과가 좋은 MEMA를 선택하여 이후의 실험을 진행하였다.



**Fig. 2. Effect of M.cortex extracts on LPS-induced NO generation in BV2 microglia cells.** The BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well for 24 h. Then cells were pre-treated with various concentrations of MEMA or EEMA for 1 h and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. The amounts of NO were determined using Griess reagent and a standard curve created using  $\text{NaNO}_2$  in culture medium. The data shown are means  $\pm$  SD of three independent experiments.  $**p < 0.01$  and  $\#p < 0.01$  are significantly different from the value in control cells and cells treated with LPS in the absence of M.cortex extracts, respectively.

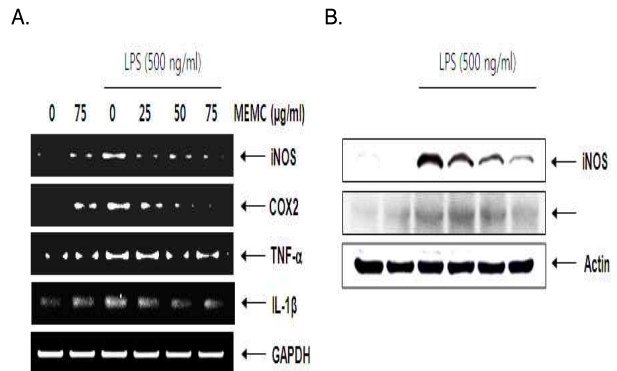


**Fig. 3. Effect of M.cortex extracts on LPS-induced PGE2 generation in BV2 microglia cells.** The BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well for 24 h. Then cells were pre-treated with various concentrations of MEMA or EEMA for 1 h and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. The levels of PGE2 were detected using a specific enzyme immunoassay according to the manufacturer's instruction. The data shown are means  $\pm$  SD of three independent experiments.  $**p < 0.05$  and  $\#p < 0.05$  are significantly different from the value in control cells and cells treated with LPS in the absence of M.cortex extracts, respectively. n.s. means not significant.

4. 상백피 추출물에 의한 염증매개 유전자의 mRNA 및 단백질 변화

MEMA의 BV2 세포에 대한 NO 및 PGE2 생성 억제 효과가 이들을 만들어내는 유전자의 mRNA 및 단백질 변화와 관련있는지 알아보기 위하여 Fig. 4에서는 각각 NO와 PGE2를 생산하는 iNOS와 COX-2 유전자의 변화를 RT-PCR과 웨스턴블롯을 통해 관찰하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2 유전자의 mRNA 및 단백질 발현이 LPS에 의해 증가하였으나 MEMA를 처리하자 농도의존

적으로 현저히 감소하였다. 다음으로 microglia가 활성화되어 분비하는 대표적 전구염증 cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 변화를 관찰한 결과, 마찬가지로 LPS 처리에 의해 증가된 발현이 MEMA에 의해 감소되는 것을 관찰하였다. 이 결과는 MEMA가 염증 매개 유전자들을 조절하여 염증 산물을 억제한 것임을 보여준다. 한 가지 특이할 사항으로 이들 유전자의 mRNA 발현이 MEMA(75  $\mu\text{g/ml}$ ) 단독 처리 시 다소 증가하는 경향을 보였는데, 이는 MEMA(75  $\mu\text{g/ml}$ ) 선처리에 의해 염증 매개 유전자의 발현이 다소간 증가하고, 그 결과 세포의 음성적 피드백을 일으켜 LPS를 처리했을 시 이들 유전자의 발현을 효과적으로 억제한 것으로 보인다. 이러한 결과는 자감초탕이 소량의 NO를 생성하여 항염증작용을 나타낸다는 보고<sup>14)</sup>와 SFN이 소량의 ROS를 생성하나 LPS 처리로 증가한 ROS의 생성은 도리어 감소시킨다는 보고<sup>15)</sup> 등과 일맥상통한다.



**Fig. 4. Effect of M.cortex extracts on the expression of iNOS, COX-2 and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglia cells.** The BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well for 24 h. Then cells were pre-treated with various concentrations of MEMA for 1 h and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. (A) Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of iNOS, COX-2 and proinflammatory cytokine genes. GAPDH was used as a loading control. (B) Cell lysates were electrophoresed and the expression of iNOS and COX-2 was detected by its specific antibody. Actin was used as a loading control. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

5. LPS로 유도한 NF- $\kappa$ B 활성화 증가에 대한 상백피 추출물의 억제 효과

다음으로 iNOS, COX-2 등 세포 증식 유전자의 발현을 조절하여 염증반응을 매개하는 전사인자 NF- $\kappa$ B의 활성을 조사하였다. NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B와 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하고 있다가 자극에 의해 I $\kappa$ B와 분리되면서 subunit인 p65가 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 포함한 다양한 세포 증식 및 염증 매개 유전자들의 전사를 활성화시킨다<sup>16-19)</sup>. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 세포질과 핵을 분리하여 관찰한 결과, LPS(0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리 15분부터 30분까지 핵 내에 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65가 증가하였으나, MEMA(75  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리에 의해 억제되었으며, 세포질에서는 이와 반대로 LPS 처리로 감소했던 p65가 MEMA에 의해 다시 증가되는 것을 관찰하였다. 세포질에서 NF- $\kappa$ B와 결합하여 NF- $\kappa$ B를 불활성화시키는 I $\kappa$ B도 LPS에 의해 분해되었다가 MEMA 처리 시 다시 회복되는 경향을 보였다.

이것은 LPS로 유도한 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 발현 증가가 MEMA에 의해 억제되는 결과(Fig. 4)와 일치하며, MEMA가 NF- $\kappa$ B의 전사활성을 억제하여 이들 유전자의 발현을 저해함을 보여준다.

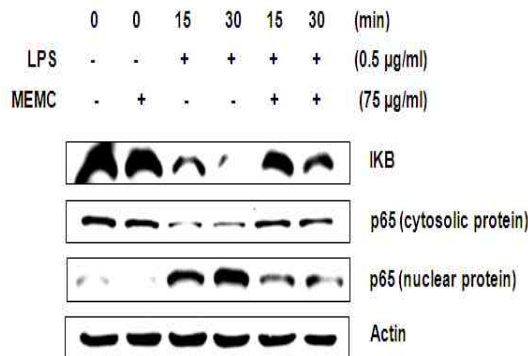


Fig. 5. Effect of M.cortex extracts on NF- $\kappa$ B activity in LPS-stimulated BV2 microglia cells. The BV2 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were cultured in 100 mm dishes for 24 h. Then cells were pre-treated with indicated dose of MEMA for 1 h before LPS treatment (500 ng/ml) for indicated times. Total cell lysate were separated as nuclear proteins and cytosolic proteins following the manufacturer's protocol. Total nuclear protein and cytosolic proteins were subjected to 9% SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-p65 (NF- $\kappa$ B subunit) and I $\kappa$ B $\alpha$ . Actin was used as a loading control. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

## 고찰 및 결론

고령화 사회의 도래와 더불어 치매와 같은 퇴행성 뇌신경질환이 주요한 사회적 과제로 등장함에 따라 한의학에서도 이에 대응한 연구가 요구되고 있다. 퇴행성 뇌질환의 원인으로 만성적인 염증과 산화성 손상이 제시되고 있으며<sup>20)</sup> 이에 근거하여 상백피에 주목하였다. 桑白皮는 瀉肺平喘과 利水消腫하는 효능을 가지고 있어 국내에서 항산화작용<sup>21)</sup>과 항염증작용<sup>22,23)</sup> 및 천식<sup>24)</sup>이나 폐손상<sup>25)</sup>에 관한 연구들이 있었고, 최근에는 신경세포 보호에 관한 연구<sup>26)</sup>도 보고되었다. 이들 대부분은 물추출물을 사용하였는데 예컨대 인<sup>27)</sup>은 桑白皮 熱水추출물은 LPS 또는 INF- $\gamma$ 로 유도된 NO와 TNF 생성을 억제시켰으나 IL-1 억제는 미약하다고 하였고, 김<sup>16)</sup>, 김현정은 N18-RE-105 세포모델에서 상백피 methanol 추출물의 hexane층 10  $\mu$ g/ml 농도에서 71.5%의 신경세포 보호효과를 보인다고 하였다. N18-RE-105세포는 rat와 mouse를 잡종화한 망막신경세포 계열인데 반해 뇌내 면역기능활성과 관련한 염증이나 산화손상에 대해서는 immunocompetent cell인 microglia가 더 적합하다<sup>28,29)</sup>.

상백피 추출물이 BV2 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 농도인 75  $\mu$ g/ml에서 LPS(0.5  $\mu$ g/ml)에 의하여 유도된 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성 증가를 억제하였으며, 특히 ethanol 추출물보다 methylene chloride 추출물에서 더 현저한 효과가 있었다. 또한 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성과 관련된 단백질 및 mRNA의 발현 追試로부터 iNOS와 COX-2가 MEMA에 의해 농도 의존적으로 현저히 감소되었으며, 염증매개물질(cytokine)인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA도 전사수준에서 마찬가지로 감소되었음을 알 수 있었고,

이러한 억제기전은 NF- $\kappa$ B p65 핵내 전위(nuclear translocation) 감소와 관련되어 있는 것으로 나타났다.

NO는 인간을 포함한 포유류에서 장기조직의 허혈성 손상을 막는 유리한 역할을 하지만 과다하면 조직독성에 의한 패혈성 쇼크를 일으키거나 만성적으로는 다양한 암과 염증의 발병에 관계한다<sup>30)</sup>. PGE<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>)는 eicosanoid family의 하나로써 혈관 투과성을 증가시키고 cellular recruitment를 일으켜 염증을 매개하며<sup>31)</sup> 뇌손상과 염증은 eicosanoids를 생산하는 효소들의 발현을 증가시킨다<sup>32)</sup>. 따라서 본 실험에서 독성이 없는 MEMA가 NO뿐만 아니라 PGE<sub>2</sub>까지 억제한 것은 일차적으로 뇌내 염증과정에 있어서 광범위한 개선작용이 있음을 추정할 수 있다.

iNOS(inducible nitric oxide synthase)는 세포질 안에 존재하면서 여러 단계를 거쳐 NO를 생성하는 산화환원효소이고, COX-2(cyclooxygenase-2)는 PTGS2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2) 유전자에 의해 인코딩되는 인체효소로서<sup>33)</sup> prostanoids인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 생합성하여 염증기전에 핵심적으로 관여한다. 또한 COX-2의 발현은 여러 암에서 upregulation되는데 이는 PGE<sub>2</sub> synthase에 의해 PGH<sub>2</sub>가 PGE<sub>2</sub>로 변환되면서 일어난다<sup>34)</sup>.

IL-1 $\beta$ 는 interleukin 1 cytokine family의 하나로 염증반응을 매개하며 세포증식과 분화 및 apoptosis 등에 관련된 중요한 작용을 하며 중추신경계에서는 COX2를 유도하여 염증성 통증과민에 기여하며, TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha)도 전신성 염증에서 급성 단계의 발증과 관련된 사이토카인이다. RT-PCR 및 western blot에서 NO와 PGE<sub>2</sub>의 핵심효소인 iNOS와 COX-2가 함께 농도의존적으로 현저히 억제된 것은 염증과 암의 예방에 효과적인 것을 나타내며, IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA가 농도의존적으로 감소한 것 또한 전신성 및 뇌내 염증과정에 유효할 것으로 추정되는 결과이다.

NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)는 DNA의 전사를 조절하는 단백질 complex로서 스트레스 자극이나 사이토카인, 활성산소종, 박테리아의 세포벽 부산물, vasopressors, 바이러스 감염, DNA damage 등에 의해 활성화되며 거의 모든 동물세포에서 세포성 응답에 관여한다<sup>35)</sup>. 특히 감염에 대한 면역반응을 조절하는 핵심기능을 담당하므로 만일 NF- $\kappa$ B가 정확하게 조절되지 못하면 염증이나 면역성 질환을 일으키게 된다. NF- $\kappa$ B의 가장 흔한 형태는 p50와 p65 heterodimer이며 p65는 Rel A gene에 의해 인코딩된다<sup>36)</sup>. 또한 NF- $\kappa$ B complex는 I $\kappa$ B(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells)와 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하고 있다가 자극에 의해 I $\kappa$ B와 분리되면서 subunit인 p65가 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 포함한 다양한 세포 증식 및 염증 매개 유전자들의 전사를 활성화시킨다.

본 실험에서 세포질과 핵을 분리하여 관찰한 결과, LPS(0.5  $\mu$ g/ml) 처리 후 핵 내에 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65가 증가하였으나, MEMA(75  $\mu$ g/ml) 처리에 의해 억제되었으며, 세포질에서는 이와 반대로 LPS 처리로 감소했던 p65가 MEMA에 의해 다시

증가되었다. 세포질에서 NF-κB와 결합하여 NF-κB를 불활성화시키는 IκB도 LPS에 의해 분해되었다가 MEMA 처리 시 다시 회복되는 경향을 보였다. 이것은 앞서 MEMA가 LPS로 유도한 염증 매개 유전자 발현에 대한 저해 활성이 NF-κB의 핵내 전위(nuclear translocation) 및 전사활성을 억제함으로써 이루어짐을 보여준다.

본 연구의 결과는 상백피 추출물이 NF-κB의 활성을 차단함으로써 염증 매개 유전자 및 그 산물을 저해함을 보여주었으며, 이는 상백피가 강력한 항염증 효능을 가지고 있음을 의미한다. 따라서 상백피 추출물의 microglia에 대한 항염증효과는 퇴행성 뇌질환의 중요한 원인이 되는 만성적인 신경계 염증을 억제함으로써 신경퇴행성 질환 등 다양한 신경계 질환에서 신경보호역할을 할 것으로 기대된다.

### 감사의 글

이 논문은 2009 학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호 2009AA119).

### 참고문헌

1. 김병수 외. 본초학. 영림사, 서울, p 484, 1998.
2. Hyun Gug Cho, et al. Mori Cortex decreases the acute lung injury induced by skin burn, Korean J of Herbology, 18(3):195-202, 2003.
3. Jong Yeop Yoo, et al. A clinical study on the effect of a cream containing Ramulus Mori extract and tea tree oil on Acne Vulgaris and aerobic skin flora, Kor. J of Dermatology 41(9):1136-1141, 2003.
4. Arvind K. Awasthi, G.M. Nagaraja, G.V. Naik, Sriramana Kanginakudru, K. Thangavelu and Javaregowda Nagaraju. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC Genet. 5: 1, 2004.
5. Heo Jun, DongEuiBoGam, Medicinal herbs, Namsan Dang.
6. G. Jean Harry, Andrew D. Kraft, Neuroinflammation and Microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment, Expert Opin Drug Metab Toxicol. 4(10):1265-1277, 2008.
7. Hermes, G., Ajioka, J.W., Kelly, K.A., Mui, E., Roberts, F., Kasza, K., Mayr, T., Kirisits, M.J., Wollmann, R., Ferguson, D.J., Roberts, C.W., Hwang, J.H., Trendler, T., Kennan, R.P., Suzuki, Y., Reardon, C., Hickey, W.F., Chen, L., McLeod, R. Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection, J Neuroinflammation. 5: 48, 2008.
8. Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y., Schwartz, M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. Proc Natl Acad Sci USA. 101(21): 8180-8185, 2004.
9. Parachikova, A., Agadjanyan, M.G., Cribbs, D.H., Blurton-Jones, M., Perreau, V., Rogers, J., Beach, T.G., Cotman, C.W. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease, Neurobiol Aging, 28(12):1821-1833, 2007.
10. Long, T.C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G.V., Veronesi, B. Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons in Vitro, Environ Health Perspect. 115(11):1631-1637, 2007.
11. Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 102: 9936-9941, 2005.
12. McGeer, P.L., Kawamata, T., Walker, D.G., Akiyama, H., Tooyama, I., McGeer, E.G. Microglia in degenerative neurological disease. Glia 7: 84-92, 1993.
13. Dinarello, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. J Infect Dis 179: 294-304, 1999.
14. 나영훈, 조남수, 유준기, 이 인, 신선호, 문병순. 자감초탕이 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 21(3):467-475, 2000.
15. Innamorato, N.G., Rojo, A.I., García-Yagüe, A.J., Yamamoto, M., de Ceballos, M.L., Cuadrado, A. The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation. The journal of immunology 181(1):680-689, 2008.
16. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem 269: 4705-4708, 1994.
17. Schmedtje, J.F., Ji, Y.S., Liu, W.L., DuBois, R.N., Runge, M.S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-κB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. J Biol Chem 272: 601-608, 1997.
18. Baldwin, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 14: 649-683, 1996.
19. Roshak, A.K., Jackson, J.R., McGough, K., Chanbot-Fletcher, M., Mochan, E., Marshall, L.A. Manipulation of distinct NF-κB proteins alters interleukin-1β induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation. J Biol Chem 271: 31496-31501, 1996.

20. Whitney, N.P., Eidem, T.M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J.C. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders, *J Neurochem.* 108(6):1343-1359, 2009.
21. 차윤엽. 桑枝와 桑白皮의 항산화효과 비교 연구. *동의생리병리학회지* 21(4):934-939, 2007.
22. 이진용, 김덕곤, 조형준, 상백피(桑白皮)가 항알러지 및 항염증반응에 미치는 영향, *대한한방소아과학회지* 19(2):175-195, 2005.
23. 盧東一, 文振榮, 林昌秀, 林鍾國. 상백피 약침의 항염증 및 항알레르기 활성, *大韓鍼灸學會誌* 15(1):525-535, 1998.
24. 임홍진, 김정근, 심은기, 홍철희, 황충현. 마우스 모델을 이용한 상백피 추출물의 알러지성 천식 억제 효과, *한국전통의학지* 14(1):79-99, 2004.
25. 조현국, 이영만, 강병수, 전경희, 박원학. 피부화상으로 유도된 급성 부종성 폐손상에 대한 상백피의 효능. *大韓本草學會誌* 18(3):195-202, 2003.
26. 김현정, 김지현, 손은순, 이정민, 박해룡. Glutamate가 유도하는 세포독성으로부터 신경세포를 보호하는 상백피 추출물의 효과, *생명과학회지* 19(7):963-967, 2009.
27. 安在圭, 安德均, 趙在天. 桑白皮가 대식세포의 NO, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\alpha$  생산에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 19(2):485-501, 1998.
28. Liu, Y.P., Lin, H.I., Tzeng, S.F. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture., *Brain Res.* 1054(2): 152-158, 2005.
29. Liu, B., Hong, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther.* 304: 1-7, 2003.
30. Hou, Y.C. Janczuk, A., Wang, P.G. Current trends in the development of nitric oxide donors, *Current pharmaceutical design* 5(6):417-441, 1999.
31. Goetzl, E.J., An, S., Smith, W.L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* 9: 1051-1058, 1995.
32. Caggiano, A.O., Kraig, R.P. Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytes. *J Comp Neurol.* 369: 93-108, 1996.
33. Hla, T., Neilson, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *PNAS* 89(16):7384-7388, 1992.
34. Menter, D.G., Schilsky, R.L., Dubois, R.N. Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward, *Clin. Cancer Res.* 16(5):1384-1390, 2010.
35. Allan R. Brasier. The NF- $\kappa$ B regulatory network, *Cardiovascular Toxicology* 6(2):111-130, 2006.
36. Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P., Baltimore, D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide, *Cell* 64(5):961-969, 1991.