

三七根의 LPS에 의해 활성화된 腦神經膠細胞로부터의 炎症媒介物質 生成抑制效果

박용기^{#*}, 정효원

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Panax notoginseng inhibits LPS-induced pro-inflammatory mediators in microglia

Yong-Ki Park^{#*} and Hyo Won Jung

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju, 780-714 Korea.

ABSTRACT

Objectives : Increasing evidence has linked chronic inflammation to a number of neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease(AD), Parkinson's disease(PD) and Huntington's disease(HD) in the inflammatory process. Uncontrolled activation of microglia may directly toxic to neurons by releasing various substances such as inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), NO, PEG2 and superoxide. In this study, the immunomodulatory effects of the herbal extract *Panax notoginseng* on cultured BV2 microglial cells and primary microglia were investigated to address potential therapeutic or toxic effects. Notoginseng radix extracts extracted from the root of the plant using Methanol.

Methods : Cells were stimulated with LPS and treated with notoginseng at different concentrations. .

Results : Notoginseng significantly decreased LPS-induced production of TNF- α and IL-6 by the cultured microglial cells in a dose-dependent manner. The activation of iNOS mRNA and secretion of nitric oxide(NO) in microglial cells were inhibited in microglial cells in a dose-dependent manner by notoginseng.

Conclusion : These results indicate that notoginseng inhibits LPS-induced activation of microglial cells and demonstrates *notoginseng* possess anti-inflammatory and immunosuppressive properties in vitro.

Key words : Anti-inflammation, BV2 microglial cells, IL-6, inducible nitric oxide synthase, LPS, microglia, nitric oxide, *Panax notoginseng*, TNF- α .

서론

중추신경계(central nervous system; CNS)의 손상은 신경교세포(microglia)의 증식(proliferation) 및 이상비대(hypertrophy)에 의해 유발되는데, 신경교세포의 활성화는 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)이나 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)과 같은 퇴행성 뇌질환 시에 일어나서 퇴행성 뇌질환의 발병 및 진전에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 실제로 타박상 등 뇌에 염증반응을 동반하는 병력을 가진 환자에게서 AD의 발병율이 높고, 염증억제약물에 의해서 AD와 PD의 발병율이 감소한다는 보고가 있다⁴⁾. Microglia는 뇌에 존재하는 대식세포(resident macrophages)로서 다양한 자극(stimuli)에 반응하는 antigen presenting cells로 알려져 있으며⁵⁾, MHC II, macrophage marker EMBL1, tumor necrosis factor(TNF)- α , Interleukin(IL)-1 β , low affinity immunoglobulin (Ig) E receptor CD237, inducible nitric oxide synthase(iNOS)⁸⁾, cyclooxygenase 2 (COX-2)⁹⁾, complement 3 receptor 및 ferritin, prostaglandins(PEG)¹⁰⁾ 등을 발현한다. 또한 microglia는 뇌 염증 반응을 매개하는 주요 세포로서, 뇌 손상 시 활성화(activated microglia)되어 TNF- α , IL-1 β , iNOS 및 PEG 등 염증매개물질들을 다량 분비하는데 이러한 염증매개물질들은 신경세포사멸의 주원인으로 작용하게 되므로 microglia의 활성화를 어떻게 조절되는 가를 이해하고 염증매개물질 분비를 억제시켜주는 것은 여러 원인에 의한 뇌손상 시에 신경세포의 손상을 줄여줄 수 있는 한 가지 접근 방법이 될 수 있다^{5,6)}. 최근에는 한약재 추출물을 이용하여 염증반응을 억제시켜주는 것에 대한 연구가 많이 진행되고 있다¹¹⁾.

삼칠근(三七根)은 五加科(두릅나무과; Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen의 뿌리를 건조한 것으로 甘苦하면서 溫하여 止血하고 活血化瘀하므로 止血하되 瘀血은 생기지 않게 하므로 좋은 止血藥으로 체내의 각종 출혈증에 내복 및 외용하며 이외에도 活血化瘀하여 消腫止痛하므로 外傷의 要藥이고 打撲傷과 瘡瘍腫毒에 적용한다. 오늘날 임상에서는 관상동맥경화증에 치료효과가 좋은 것으로 보고되었다.^{12,13)} 삼칠근의 성분은 saponins과 polyacetylene과 sesquiterpene계 화합물 및 cerebroside, phenolic acid, sterol, 아미노산, 당질 등으로 구성되어 있으며^{13,14)}, 최근 saponins과 sterylglucosides 물질이 대식세포의 활성화를 억제하며, 항산화 효과 및 항염증 효과를 보이는 생리활성물질인 것으로 알려지면서 퇴행성뇌질환 치료를 위한 관심물질로 부각되고 있다^{11,14)}.

따라서 본 연구에서는 삼칠근 추출물이 microglia의 활성화로 인한 염증매개물질 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사함으로써 삼칠근 추출물의 항염증 효과를 통한 퇴행성뇌질환 치료에의 적용 가능성을 실험하여 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 삼칠근 추출물 제조

삼칠근 1kg을 분쇄하여 80% MeOH로 3시간 동안 3회 추출하였으며, 그 여액을 2겹 여과지로 여과하고 rotary evaporator로 감압농축한 후 -20°C에서 동결건조 하였다. 추출된 삼칠근 추출액(yields of 18.5%)은 냉동 보관하며, 실험 직전 DMSO를 이용하여 100mg/ml 농도로 녹인 후 0.45 μ m filter로 여과하여 사용하였다.

2. 세포배양

쥐의 뇌 대식세포주인 BV2 microglial cells을 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone), 100U/ml penicillin(GibcoBRL) 및 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 DMEM(GibcoBRL) 배지를 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 또한 primary microglia는 쥐의 대뇌피질(cerebral cortex)로부터 Chao 등¹⁵⁾에 의한 방법으로 분리하였다. 즉, newborn mice(1-2 days)로부터 무균조건에서 대뇌피질을 적출한 후 성장교세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 75-cm² culture flask에서 5% FBS와 2mM glutamine, 100U/ml penicillin, 0.1 μ g/ml streptomycin 및 0.05mM 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI-1640 배지를 배양액으로 14일간 배양하였다. 세포가 배양된 flask를 200rpm에서 30분간 진탕배양함으로써 microglia만을 분리하여 배양하였다. 분리된 microglia를 순도(purity)는 Mac-1(CD11b/CD18) 항체염색을 통해 확인하였다(purity: >90%).

3. MTT assay

삼칠근 추출액의 세포독성을 평가하기 위해서 BV2 세포(5 \times 10⁴ cells/well) 및 primary microglia(1 \times 10⁵ cells/well)를 96-well culture plate에 DMEM 또는 RPMI 배양액 100 μ l와 함께 하룻밤 배양한(37°C, 5% CO₂) 후, 다양한 농도(0~2000 μ g/ml)의 삼칠근 추출액을 처리하여 24시간 배양

하였다. MTT(Sigma) 용액 10 μ l를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 후 formazan 결정을 용해하기 위해 배양액을 제거하고 100 μ l의 DMSO 용액 첨가하였다. 이를 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포만 배양한 대조군을 기준으로 처리구의 세포생존도(%)를 계산하였다.

4. Nitric oxide 측정

LPS에 의해 활성화된 BV2 세포 및 primary microglia로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 농도를 세포 배양액에 존재하는 NO₂의 형태로 Griess 시약을 이용하여 검출하였다. 즉, BV2 세포 (1×10^5 cells/ml) 및 primary microglia (2×10^5 cells/ml)를 24-well culture plate에 하룻밤 배양한 다음 세포독성이 없는 다양한 농도의 삼칠근 추출액을 처리한 후 30분간 배양하였다(전처리). 여기에 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양함으로써 두 세포를 활성화시켰다. 세포배양액을 수거한 후 배양액 50 μ l에 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 50 μ l를 96 well plate에 넣어 15분간 실온에서 암반응 시킨 후 microplate reader에서 540nm 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 NaNO₂ 표준액의 농도(μ M)를 기준으로 계산하였다.

5. 염증사이토카인의 측정

삼칠근 추출액의 염증매개물질 생성억제효과를 조사하기 위해서 BV2 세포 및 microglia로부터 생성되는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 양을 세포배양액으로부터 Ready-Set-Go mouse TNF- α Cyto -Sets™ Biosource ELISA kit(eBioscience)를 사용하여 측정하였다. 먼저, 1 \times coating solution에 250배로 희석한 capture Ab를 100 μ l씩 96-well ELISA plate(Nunc)의 각 well에 넣은 후 40C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 plate를 0.05% Tween-20이 포함된 1 \times PBS-T로 3회 세척하고 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 1 \times assay solution으로 plate를 1시간동안 실온에서 blocking 하였다. Assay solution을 제거한 다음, 세포 배양액 100 μ l을 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 5회 PBS-T로 세척한 후 250배로 희석한 detection antibody를 100 μ l씩 넣고 1시간 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 PBS-T로 3회 세척한

다음 avidin-HRP solution을 넣어 30분간 실온에서 암반응 시켰다. Plate를 3회 세척한 후 기질용액을 넣고 15분간 암반응 시킨 다음 반응정지액 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 microplate reader의 450nm 흡광도에서 반응정도를 측정하였다. 활성화된 세포로부터 생성된 각 사이토카인의 양은 recombinant cytokine 표준단백질의 흡광도를 기준으로 농도(pg/ml)를 계산하였다.

6. iNOS 및 사이토카인의 유전자 발현 조사

삼칠근 추출액이 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 염증사이토카인의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 BV2 세포(5×10^5 cells/ml) 및 primary microglia (1×10^6 cells/ml)를 6-well plate에 하룻밤 배양하여 삼칠근 추출액을 전처리하였다. 이를 30분 배양한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 3시간(for iNOS) 및 5시간 동안(for inflammatory cytokine) 배양하였다. 각 세포를 수거한 다음 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리하였으며, oligo-(dT) primer와 Improm-II™ reverse transcriptase(Promega)를 이용하여 250C에서 10분, 420C에서 1시간 및 700C에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. PCR 반응을 위해 RNA로부터 합성된 cDNA 1 μ g에 iNOS primers[Forward: 5'-GAC CAG TAT AAG G CA AGC AC-3', Reverse: 5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC -3'], TNF- α primers[Forward: 5'-TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC-3', Reverse: 5'-GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG-3'] 및 IL-1 β primers [Forward: 5'-GAA GCT GTG GCA GCT ACC TAT GT CT-3', Reverse: 5'-CTC TGC TTG TGA GGT GCT GAT GTA C-3']에 10 \times PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP mix, 1U *Tag* polymerase(Takara)를 혼합한 후 denaturation을 위해 940C에서 30초, annealing을 위해서 600C에서 30초, extension을 위해서 700C에서 60초의 조건으로 35 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs[Forward: 5'- CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3', Reverse: 5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3']를 사용하였다.

7. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준오차(standard deviation; SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Prism program의 Two-way ANOVA로 검정하여 p 값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 삼칠근 추출액의 세포독성검정

삼칠근 추출액의 세포독성을 조사하기 위해서 BV2 세포 및 primary microglia에 50 μ g/ml~2000 μ g/ml 농도의 삼칠근 추출액을 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay를 수행하였다.

먼저, BV 세포에 대한 삼칠근 추출액의 세포독성은 세포만 배양한 대조군(control)의 세포생존도 100%를 기준으로 삼칠근의 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 각각 99.29 \pm 6.29%(mean \pm SD), 100.8 \pm 2.06%, 107.1 \pm 1.98%, 113.1 \pm 7.95%, 106.3 \pm 6.01%, 및 93.1 \pm 1.42%로 측정되었다(Fig. 1A). 즉, 삼칠근 추출액은 2000 μ g/ml 농도까지도 BV2 세포에 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 한편, primary microglia에 대한 삼칠근 추출액의 세포독성은 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 각각 100.2 \pm 1.47%, 100.4 \pm 2.26%, 99.5 \pm 1.49%, 99.4 \pm 5.01%, 69.4 \pm 3.10% 및 46.1 \pm 3.94%로 측정되었다(Fig. 1B). 따라서 primary microglia는 BV2 세포에 비해 삼칠근추출액 1000 μ g/ml 농도에 세포독성이 나타났으며, 200 μ g/ml 농도까지 90% 이상의 세포생존도를 나타내어 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

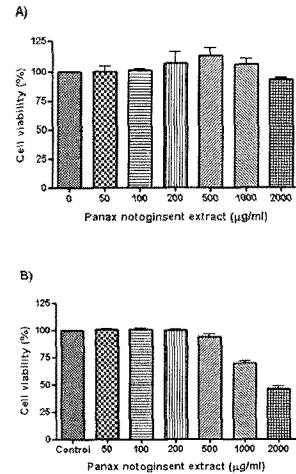


Fig. 1. Cytotoxic effects of Notoginseng extract in BV2 cells(A) and primary microglia(B).

After cells were cultured with various concentrations of *Panax notoginseng* extract for 24h, the cell viability was measured by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments(SD - bars).

2. NO 생성억제효과

삼칠근 추출액이 microglial cells로부터 LPS 자극에 의해 생성된 NO 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위해서 삼칠근 추출액을 전처리한 BV2 세포 및 microglia의 배양액으로부터 Griess 반응법으로 NO의 양을 측정하였다.

먼저 BV2 세포의 경우, 세포만 배양한 대조군(control)의 경우 5.13 \pm 0.04 μ M의 매우 낮은 농도의 NO가 검출된 반면, LPS를 처리할 경우 20.07 \pm 0.04 μ M이 검출되어 BV2 세포가 LPS 자극에 의해 활성화됨으로써 NO 생성을 현저히 증가시키는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 삼칠근 추출액을 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml 및 1000 μ g/ml 농도로 전처리하였을 때, 각각 17.37 \pm 0.55 μ M, 15.57 \pm 0.35 μ M, 12.44 \pm 0.07 μ M, 9.52 \pm 0.03 μ M 및 5.59 \pm 0.06 μ M의 NO가 검출되었다. 따라서 삼칠근 추출액은 LPS에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 NO의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시키는 것을 알 수 있었다.

한편, primary microglia의 경우에는 BV2 세포에서와 같이 세포만 배양한 대조군에서 5.22 \pm 0.57 μ M의 낮은 NO 농도가 검출된 반면, LPS 처리에 의해 57.08 \pm 5.94 μ M의 높은 NO 농도가 검출되었다(Fig. 3B). 또한 삼칠근 추출액을 전처리하였을 때, 50 μ g/ml,

100 μ g/ml, 200 μ g/ml 및 500 μ g/ml 농도에서 각각 56.68 \pm 0.55 μ M, 45.69 \pm 1.29 μ M, 35.75 \pm 0.65 μ M 및 25.95 \pm 0.77 μ M의 NO가 검출되어 농도 의존적이고 유의적으로 NO 생성을 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 삼칠근 추출액은 활성화된 microglial cells로부터의 NO 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 있는 것으로 나타났다.

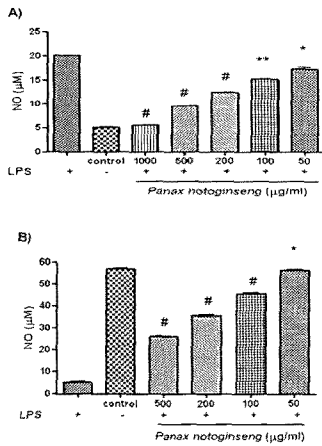


Fig. 3. Inhibitory effect of Notoginseng extract on the production of NO in LPS-stimulated BV2 cells(A) and primary microglia(B). Cells were incubated with various concentrations of Notoginseng extract in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 24h. NO production from BV2 cells was determined in culture supernatants by Griess reaction. * p <0.0001 and ** p <0.01 vs. LPS alone, n=3.

3. 염증사이토카인 생성억제효과

삼칠근 추출액이 LPS 자극으로 활성화된 microglial cells로부터의 염증사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 BV2 세포 및 primary microglia에 삼칠근 추출액을 전처리한 후 세포배양액으로부터 ELISA 방법으로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 양을 측정하였다.

세포만 배양한 대조군(control)의 경우 BV2 세포(Fig. 3A)에서는 45.49 \pm 2.72pg/ml 및 primary microglia(Fig. 3C)에서 44.39 \pm 2.75pg/ml의 매우 낮은 농도의 TNF- α 가 검출된 반면, LPS를 처리할 경우, 900.3 \pm 139.2pg/ml 및 1300.1 \pm 69.46pg/ml이 검출되어 LPS 자극에 의해 세포로부터 TNF- α 생성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 반면, LPS 처리에 의해 증가된 TNF- α 는 BV2 세포에서 삼칠근 추출액 50 μ g/ml 농도에서 1005.4 \pm 20.37pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 988.1 \pm 12.26pg/ml, 200 μ g/ml 농도에서 720.1 \pm 26.61pg/

ml, 500 μ g/ml 농도에서 522.5 \pm 20.54pg/ml 및 1000 μ g/ml 농도에서 294.4 \pm 19.9pg/ml로 삼칠근 추출액의 처리농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 또한 primary microglia의 경우(Fig. 3C)에도 LPS 처리 후 증가된 TNF- α 생성이 삼칠근 처리농도 50 μ g/ml에서 1005.4 \pm 20.37pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 853.3 \pm 33.47pg/ml, 200 μ g/ml 농도에서 555.9 \pm 39.58pg/ml 및 500 μ g/ml 농도에서 222.1 \pm 4.01pg/ml로 BV2 세포에서와 마찬가지로 농도 의존적이고 유의적으로 억제되었다.

한편, IL-6의 경우는 BV2 세포만 배양한 대조군(Fig. 3B)에서 71.45 \pm 1.67pg/ml 및 primary microglia(Fig. 3D)에서 72.45 \pm 2.17pg/ml의 낮은 농도의 IL-6가 검출된 반면, LPS를 처리할 경우, BV2 세포는 975.4 \pm 13.39pg/ml 및 primary microglia의 경우 1442.1 \pm 43.92pg/ml이 검출되어 IL-6 생성이 LPS 자극에 의해 증가하는 것을 확인하였다. LPS 처리에 의해 증가된 IL-6 생성은 BV2 세포에서 삼칠근 추출액 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml 및 1000 μ g/ml 농도처리에 의해 각각 942.1 \pm 43.92pg/ml, 757.1 \pm 5.33 pg/ml, 530.8 \pm 5.62pg/ml, 364.6 \pm 2.08pg/ml 및 306.9 \pm 4.05pg/ml로 측정되어 삼칠근 추출액의 처리농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 primary microglia의 경우에도 LPS 처리 후 증가된 TNF- α 생성이 삼칠근 처리농도 50 μ g/ml에서 990.4 \pm 63.06pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 930.8 \pm 5.62pg/ml, 200 μ g/ml 농도에서 664.6 \pm 6.08pg/ml 및 500 μ g/ml 농도에서 506.9 \pm 4.06pg/ml로 BV2 세포에서와 마찬가지로 농도 의존적이고 유의적으로 억제되었다. 한편, IL-1 β 의 생성은 BV2 세포 및 primary microglia에서 모두 삼칠근 추출액에 의한 유의적인 감소효과가 관찰되지 않았다(data not shown).

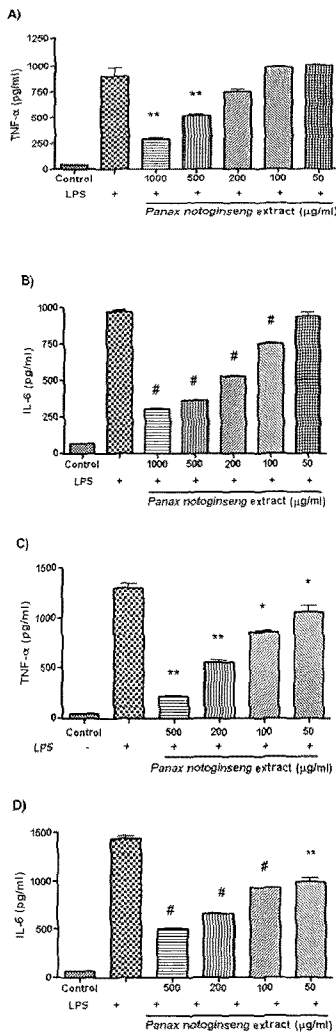


Fig. 3. Inhibitory effect of *Panax notoginseng* extract on the production of TNF- α and IL-6 in LPS-activated BV2 cells(A,B) and primary microglia(C,D). Cells were incubated with various concentrations of *Panax notoginseng* extract in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 14h. TNF- α and IL-6 production from BV2 cells was determined in culture supernatants by ELISA. * p <0.001, ** p <0.01 and # p <0.05 vs. LPS alone, n=3.

4. iNOS 및 사이토카인의 유전자발현 억제효과

삼칠근 추출액에 의한 NO 및 염증사이토카인 생성억제효과가 이들 유전자발현 조절과 어떤 연관성이 있는지 조사하기 위해서 BV2 세포 및 primary microglia에 삼칠근 추출액을 전처리한 후 LPS로 활성화시키고 iNOS 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6에 대한

RT-PCR을 수행하였다.

먼저, iNOS 유전자 발현은 BV2 세포 및 primary microglia 모두 세포만 배양한 대조군에서는 관찰되지 않았으며, LPS 처리에 의해 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현은 삼칠근 추출액 전처리 후에 억제되는 것을 확인하였다.

한편, 삼칠근 추출액에 의한 염증사이토카인의 유전자 발현 억제효과를 조사한 결과, BV2 세포(Fig. 4A) 및 primary microglia(Fig. 4B) 모두 TNF- α 및 IL-6의 유전자 발현이 삼칠근 추출액의 전처리에 의해 억제되어 위의 ELISA 결과와 일치하였으며, IL-1 β 의 유전자발현은 차이가 없었다. 따라서 삼칠근 추출액은 iNOS 및 TNF- α , IL-6와 같은 전염증성 사이토카인의 유전자 발현 단계(gene transcription)를 조절함으로써 NO 및 염증사이토카인 생성을 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다.

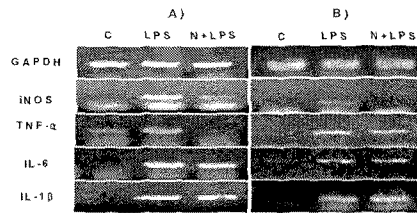


Fig. 4. Inhibitory effects of *Notoginseng* extract on mRNA expression of iNOS, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in BV2 cells(A) and primary microglia(B) by RT-PCR. Cells were incubated with *Notoginseng* extract(1000 μ g/ml for BV2 cells; and 500 μ g/ml for primary microglia) in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 3h(for iNOS) or 5h(for inflammatory cytokines). C, non-treated control group; and N, *Notoginseng* extract-treated group.

고찰

뇌의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해서는 활성화된 microglia로부터 분비되는 NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증반응 사이토카인 생성은 억제되어야 하는 반면, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β 와 같은 항염증반응 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)들에 의하여 필수적으로 제어되어야 한다^{7,8)}. 예를 들어, 현재 양방에서 사용하고 있는 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)의 투여는 알츠하이머 병과 같은 퇴행성뇌질환 증상의 개시 및 그 진행속도를 늦추었다는 최근 보고들이 주목을 받기 시작하였다. 한방에서는 최근 한약재 추출물을 이용하여 염증반응을 억제시켜주는 것에 대한 연구가 많이 진행되

고 있는데¹¹⁾, 특히 삼철근의 saponins과 steryl glycoside 성분이 lipopolysaccharide(LPS) 자극에 의한 염증반응을 억제시키며 항산화 효과가 있는 것으로 보고되어 주목을 받고 있다. 삼철근에 대한 최근 연구에 따르면, 삼철근이 혈전용해(thrombolysis) 및 혈소판 형성을 억제한다고 알려져 있으며¹⁶⁾, 삼철근의 saponins 성분이 scald mice로부터 분리한 복강대식세포에 의한 TNF- α 의 mRNA 발현을 억제하며 이는 NF- κ B 신호전달경로를 차단함으로써 이루어진다고 보고되었다¹⁷⁾. 또한 Notoginsenoside R1 성분이 human arterial smooth muscle cells(HASMCs)에서 TNF- α 처리에 의해 유도되는 fibronectin 생성을 억제한다고 보고되었으며 산화적 손상에 의해 증가된 fibronectin 역시 억제시켜준다고 하였다¹⁸⁾. Chen 등에 의하면¹⁹⁾, 삼철근 추출액이 조혈모세포(hematopoietic progenitor cells)의 증식을 유도하며 세포사멸을 유도하는 Daxx, Fas 등의 발현을 억제시킴으로써 세포생존에 기여한다고 하였다. 이렇듯이 최근 삼철근에 대한 항산화 및 신경세포보호효과에 대한 약리학적 효능(pharmacological activity)에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다¹¹⁾.

Microglia는 중추신경계에서 발견되는 대식세포로서 중추신경계의 재생과 발달에 중요한 역할을 하며 허혈, 타박상, 외상(trauma), 감염 및 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환의 병태생리와 밀접한 연관성이 있다^{22,23)}. Microglia는 죽은 세포를 제거하거나 trophic factors를 분비하는 대식세포로서 식세포 작용과 같은 고전적인 기능 외 TNF- α , IL-1 β 등의 염증사이토카인이나 eicosanoids, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS), NO 및 superoxide(O₂⁻) 등을 다량 분비함으로써 염증질환 발달에 기여하며 신경세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 따라서 최근에는 다양한 뇌질환에서 microglia의 특성 및 염증반응에서의 역할 등에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있는데, 특히 활성화된 microglia로부터 생성되는 과도한 양의 염증매개물질들이 질병과 밀접하게 연관된다는 사실이 밝혀지면서 이들의 분비를 억제하거나 조절할 수 있는 항염증제 개발에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 한편, LPS는 뇌에 염증을 유발하는 주요 inflammagen으로서 LPS에 의해 활성화된 microglia는 NO 및 TNF- α , IL-1 β , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory peptide-1(MIP-1), IL-6, IL-8, IL-18, macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등의 염증반응매개물질들을 다량 분비하며, 특히 TNF-

α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등은 세포독성물질로 작용하여 뇌의 염증반응을 가속화시킴으로써 병발달에 기여하는 것으로 알려져 있다^{19, 21)}. 따라서 최근에는 만성염증성 질환 및 퇴행성 뇌질환 등을 대상으로 염증반응매개물질들의 활성화 및 생성을 저해할 수 있는 억제제 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 특히 한방제재를 이용한 염증매개물질 조절제를 찾기 위한 노력이 이루어지고 있다. 본 연구결과에서 삼철근 추출액은 LPS에 의해 활성화된 BV2 세포 및 primary microglia로부터 생성되는 NO(Fig. 2) 및 iNOS(Fig. 4)의 유전자발현을 유의적으로 감소시켰으며, TNF- α , IL-6와 같은 전염증성 사이토카인의 생성(Fig. 3) 및 유전자발현(Fig. 4)을 유의적으로 감소시켰다. 따라서 삼철근 추출액에 의한 NO 및 염증사이토카인 생성억제효과는 이들 유전자 발현억제와 밀접한 연관성이 있으며 삼철근 추출액이 microglial cells의 gene transcription 단계를 조절함으로써 염증매개물질 생성을 억제하는 것으로 보여진다. Wang 등에 의하면¹⁷⁾, 화상에 의해 심하게 염증이 유발된 쥐의 복강으로부터 분리한 대식세포에서는 비정상적인 TNF- α 의 유전자발현이 관찰되는데 이는 NF- κ B 신호전달을 통해 이루어진다고 하였다. 또한 삼철근의 saponins 성분이 이런 NF- κ B 신호전달경로를 차단함으로써 결국 TNF- α 의 유전자발현을 억제하여 항염증효과를 나타낸다고 하였다. Wang 등에 의하면 삼철근으로부터 분리한 notoginsenoside R1 역시 ROS/ERK pathway를 차단함으로써 HASMCs에서의 과도한 fibronectin 발현을 억제하고 TNF- α 및 H₂O₂에 의해 유도된 migration을 차단한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 밝혀진 BV2 세포 및 primary microglia에서의 삼철근에 의한 염증매개물질 생성억제효과와 NF- κ B 및 ERK signaling pathway와의 연관성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 삼철근 추출액은 LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포 및 primary microglia로부터 NO/iNOS 및 TNF- α , IL-6와 같은 염증사이토카인의 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 인정되었으므로 퇴행성뇌질환과 같은 염증질환의 치료에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

본 연구에서는 퇴행성뇌질환의 염증치료를 위한 항염증 한약재를 개발하기 위해서 뇌대식세포주인 BV2 세포 및 뇌로부터 분리한 primary microglia를

이용하여 삼칠근 추출액의 항염증효과를 조사하였다. 그 결과, 삼칠근 추출액의 세포독성은 BV2 세포에서는 1000 μ g/ml 이상이었으며, primary microglia에서는 500 μ g/ml 이상에서 관찰되었다. 삼칠근 추출액에 의한 염증매개물질 생성억제효과를 조사한 결과, 삼칠근 추출액 농도에 의존적이고 유의적으로 LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포 및 microglia로부터 NO 및 TNF- α , IL-6의 생성이 억제되었다. 또한 삼칠근 추출액은 BV2 세포 및 primary microglia에서 iNOS 및 TNF- α , IL-6의 유전자 발현을 억제시켰다. 따라서 삼칠근 추출액의 항염증 효과는 microglial cells로부터 LPS 자극에 의해 증가하는 염증매개물질의 유전자 발현을 조절함으로써 염증매개물질 분비를 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 삼칠근 추출액은 앞으로 퇴행성뇌질환 및 염증질환 치료를 위한 한약재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Orr CF, Rowe DB, Haliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2002;68:325-340.
- Norton WT, Aquino DA, Hozymi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res*. 1992;17:877-885.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guegan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K, Prezeboriski S. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol*. 2001;14:483-489.
- Lee YL, Shih K, Bao P, Ghimikar RS, Eng LF. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. I: *Neurochem Int*. 2000;36(4-5):417-25.
- Gonzalez-Scarano F, Baultuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative disease. *Annual Rev Neurosci* 1999;34:307-321.
- Cross AK, Woodrooffe MN. Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc. Res. Tech*. 2001;54:10-17.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv. Neurol*. 2001;86:83-93.
- Hunot S, Dugas B, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. Fc ϵ RII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in glial cells. *J. Neurosci*. 1999;19:3440-3447.
- Knott C, Shern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenase-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci*. 2000;16:724-739.
- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moors T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2000;95:425-432.
- Ng TB. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *J. Pharm. Pharmacol*. 2006;58:1007-1019.
- 전국한의학대학 본초학교수. 본초학, 서울, 영림사, p.443, 2004.
- Cho MJ, Lee SY, Kim JS, Lee JH, Choi H, Lee HY, Ha H, Kim C, Kang SS. Isolation of a cerebroside from *Panax notoginseng*. *Kor. J. Pharmacogn*. 2006;37:81-84.
- Komakine N, Okasaka M, Takaishi Y, Kawazoe K, Murakami K, Yamasa Y. New dammarane-type Saponin from roots of *Panax notoginseng*. *J. Nat. Med*. 2006;60:135-137.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol*. 1992; 149:2736-2741.
- Park JA, Choi SH, Ahn KS, Moon JJ. A study on the effect of Samchilgun in thrombosis and elevated blood viscosity. *J. Oriental Medical Pathology*. 1992;7:15-26.
- Wang Y, Peng D, Huang W, Zhou Xin, Liu J, Fang Y. Mechanism of altered TNF- α expression by macrophage and the modulatory effect of *Panax notoginseng* saponins in scald mice. *Bruns* 2006.
- Zhang HS, Wang SQ. Notoginsenoside R1 inhibits TNF- α -induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1664-1674.

19. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral blood monocytes: activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharide. *J. Dent Res* 1988;67:1131-1135.
20. 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: 8514-8519.
21. 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;20:494-496.
22. 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;20:494-496.
23. Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuroglia VI. Postnatal development of microglia cells. *Cell Tissue Res*. 1982;225:469-485.