ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2011** Vol. 21. No. 6. 796~804 DOI : 10.5352/JLS.2011.21.6.796

Extracts of *Allium fistulosum* Attenuates Pro-Inflammatory Action in the Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia Cells

Shin-Hyoung Park[1], Jung-In Kim[4], Yong Kee Jeong[5] and Yung Hyun Choi[2,3]*

[1]*Department of Pathology,* [2]*Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine,* [3]*Department of Biomaterial Control, Graduate School and Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dongeui University, Busan 614-714, Korea*
[4]*School of Food and Life Science, College of Biomedical Sciences & Engineering, InJe University, Gimhae 621-749, Korea*
[5]*Department of Medical Bioscience, Graduate School and Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea*

Received February 15, 2011 / Accepted February 23, 2011

Microglia are central nervous system (CNS)-resident professional macrophages that function as the principal immune cells responding to pathological stimulations in the CNS. Activation of microglia, induced by various pathogens, protects neurons and maintains homeostasis in the CNS, but severe activation causes inflammatory responses secreting various neurotoxic molecules such as nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2) and pro-inflammatory cytokines. *Allium fistulosum*, a member of the onion family, is mainly cultivated for consumption, as well as medicinal use in Oriental medicine. It has been reported that *A. fistulosum* has various biological effects such as anti-oxidant, anti-platelet aggregation, anti-fungus and anti-cholesterol synthesis, however there has been no research about the anti-inflammatory effects of *A. fistulosum* extracts. In this study, it was undertaken to explore the functions of *A. fistulosum* as a suppressor of neuronal inflammation by using BV2 microglia cells. As a result, it was found that four kinds of extracts of *A. fistulosum* effectively reduced the expressions of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) at both mRNA and protein levels, and also attenuated pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis alpha (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) at the mRNA level in BV2 stimulated by lipopolysaccharide (LPS). In addition, the extracts of *A. fistulosum* attenuated the release of NO markedly, as well as resulting in slight decreases of TNF-α and IL-6 production, the effects of which were most significant when treated with ethyl alcohol extract from the whole *A. fistulosum*. In conclusion, the data indicated that the anti-inflammatory actions of *A. fistulosum* against BV2 microglia cells is through the down-regulation of iNOS, COX2 and pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-6, and these effects are expected to help in the protection of nerve tissues by suppressions of neuronal inflammation in various neurodegenerative diseases.

Key words : BV2 microglia, *Allium fistulosum*, neuroinflammation, COX-2, iNOS

서 론

파(*Allium fistulosum*)는 우리나라에서 식용으로 널리 사용되고 있는 백합목 백합과의 여러해살이풀로서, 파의 뿌리 부분은 특히 한의학에서 총백(蔥白)이라 불리며 맵고 따뜻한 성질을 가져 감기를 치료하는 데 사용되어져 왔다. 일반적으로 파는 칼슘과 비타민을 풍부하게 함유하고 있으며, 특히 파의 매운 향을 내는 황화아릴 성분은 소화를 돕고 장을 튼튼하게 하는 강장작용을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 최근 연구에 따르면 파는 항산화작용을 포함하여 항혈액응고, 항콜레스테롤, 항균작용 및 혈당 강하 작용 등을 가지고 있음이 보고되었으나, 파 추출물의 염증에 관한 효과는 아직 연구가 미비한 실정이다[9,18,21,23,24].

염증 반응은 외부 자극에 대한 생체의 정상적인 방어 기작으로서 발생 위치에 따라 관절염, 천식, 염증성 장질환 및 동맥경화 등과 같은 여러 가지 질병의 유발 원인이 된다[7,19]. 특히 중추신경계(central never system, CNS) 내의 염증은 뇌에 존재하는 세포에 의해 일어나거나 혹은 말초로부터 면역세포가 침투함에 따라 일어나는데, CNS의 염증반응에 관여하는 대표적인 세포로서 microglia가 있다. Microglia의 활성화는 다양한 약물이나 독소에 의해 유발되어 이물질을 제거하고 신경성장 인자를 분비하여 신경세포 보호 및 CNS의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다[6,17]. 그러나 microglia의 활성화가 기본적으로 긍정적인 치유 과정임에도 불구하고, 활성화 상태가 너무 오래 지속되거나 과도하게 활성화될 시에는 진행성 염증반응을 일으켜 nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis alpha (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β)

*Corresponding author
Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036
E-mail : choiyh@deu.ac.kr

및 interleukin-6 (IL-6) 등과 같은 염증성 매개인자 및 염증성 cytokine과 reactive oxygen species (ROS) 등을 배출함으로써 신경 독성을 유발하고 뇌실질 조직을 파괴함으로서 [4,12,14,15], 알츠하이머 치매, 파킨슨씨 병 및 크로이펠츠-야콥병과 같은 신경퇴행성 질환의 원인이 됨과 동시에 이러한 환자들의 병소에서 활성화된 microglia가 축적되어 있음이 보고되고 있다[6,20,26,27]. 염증 산물인 NO와 PGE_2는 각각 inducible NO synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 만들어지므로 이들 염증성 유전자와 그 산물을 효과적으로 조절하는 것이 신경염증 조절뿐 만 아니라 신경퇴행성 질환의 치료에 중요한 표적으로 인식되고 있다.

본 연구에서는 immortalized 된 mouse microglia BV2 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 인위적인 활성화 및 염증반응을 일으킨 후 다양한 파 추출물이 염증 저해 활성을 보이는지 조사하였다. 그 결과 파 추출물이 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현과 그 최종 산물을 조절함으로써 신경염증 반응을 효과적으로 억제할 수 있을 가능성을 관찰하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 파(*A. fistulosum*) 추출물은 인제대학교 식품영양학과에서 공급받았으며[9], 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fatal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. mRNA 발현 분석을 위해 사용된 primer (Bioneer, Taejeon, Korea)는 Table 1에 표기하였으며, 단백질 발현 분석에 쓰인 모든 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였고, 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, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 BV2 세포는 인제대학교 의과대학 면역학 교실로부터 제공받아, DMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 모든 실험에서 BV2 세포는 다양한 파 추출물을 각각 1시간 선처리한 후 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포독성 조사

세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를 6×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, 파 전체 열수 추출물(water extract from the whole *A. fistulosum*; WEWA), 파 전체 에탄올 추출물(ethanol extract from the whole *A. fistulosum*; EEWA), 파 뿌리 열수 추출물(water extract from the root of *A. fistulosum*; WERA) 및 파 뿌리 에탄올 추출물(ethanol extract from the root of *A. fistulosum*; EERA)을 각각 농도별로 1시간 선처리 후 LPS를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 모두 제거하고, tetrazolium bromide salt (MTT)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 well 당 1 ml씩 분주하였다. 2시간 배양 후 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)로 formazin을 모두 용해시켜 96 well plate에 200 μl씩 옮긴 다음 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA의 분석

상기와 동일 조건에서 배양된 세포를 모아서 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)에 lysis 시켜 total RNA를 분리하고, 정량을 통해 동량의 RNA를 준비한 후 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 primer, DEPC water, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 각각 혼합

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
iNOS	Sense	5′-AAG-CAC-ATG-CAG-AAT-GAG-TAC-CG-3′
	Antisense	5′-GTG-GGA-CAG-CTT-CTG-GTC-GAT-3′
COX-2	Sense	5′-GGA-GAG-ACT-ATC-AAG-ATA-GTG-ATC-3′
	Antisense	5′-ATG-GTC-AGT-AGA-CTT-TTA-CGA-CTA-3′
TNF-α	Sense	5′-CCC-CTC-AGC-AAA-CCA-CCA-AGT-3′
	Antisense	5′-CTT-GGG-CAG-ATT-GAC-CTC-AGC-3′
IL-1β	Sense	5′-AAT-CTC-ACA-GCA-GCA-CAT-CAA-3′
	Antisense	5′-AGC-CCA-TAC-TTT-AGG-AAG-ACA-3′
IL-6	Sense	5′-GGA-GGC-TTA-ATT-ACA-CAT-GTT-3′
	Antisense	5′-TGA-TTT-CAA-GAT-GAA-TTG-GAT-3′
GAPDH	Sense	5′-ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC-3′
	Antisense	5′-TCC-ACC-ACC-CTG-TTG-CTG-TA-3′

하여 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 증폭시켰다. 그 후 1% agarose gel에 ethidium bromide (EtBr)를 첨가하여 굳힌 다음, 각 sample을 동량 loading하여 100 V에서 전기영동시킨 후, UV 하에서 mRNA 발현의 차이를 비교하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포들을 모아서 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenymethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]에 1시간 가량 lysis시켰다. 그 후 Bio-rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법을 따라 정량 후, Laemmli sample buffer (Bio-rad)를 동량으로 섞어 SDS-polyacrylamide gel에 loading한 후 90 V로 전기영동으로 분리하고, electroblotting을 통해 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 옮긴 다음, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 4℃에서 1차 항체를 붙여 1시간 이상 반응시켰다. 그 후 PBS-T로 수차례 세척하고 상온에서 1시간 동안 2차 항체를 붙인 후 다시 PBS-T로 세척하고 암실에서 Enhanced Chemilunimoecence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp.)에 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

NO의 측정

Griess assay를 통하여 NO 생성량을 측정하였다. 이를 위해 세포 배양용 6 well plate에 상기한 방식으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 100 µl씩 회수하여 각각 Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4] 100 µl와 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. ELISA reader (540nm)를 사용하여 흡광도를 측정한 후, sodium nitrite ($NaNO_2$)의 standard curve를 바탕으로 NO 농도를 계산하였다.

Cytokine의 측정

세포 배양용 6 well plate에 상기한 방식으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 회수하였다. 상층액 내 TNF-α와 IL-6의 양은 각각 R&D System Inc (Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 Fluorokine MAP Mouse IL-6 kit와 Fluorokine MAP Mouse TNF-α kit를 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음, ELISA reader로 흡광도를 측정한 후 standard curve를 바탕으로 TNF-α와 IL-6의 생성량을 계산하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot

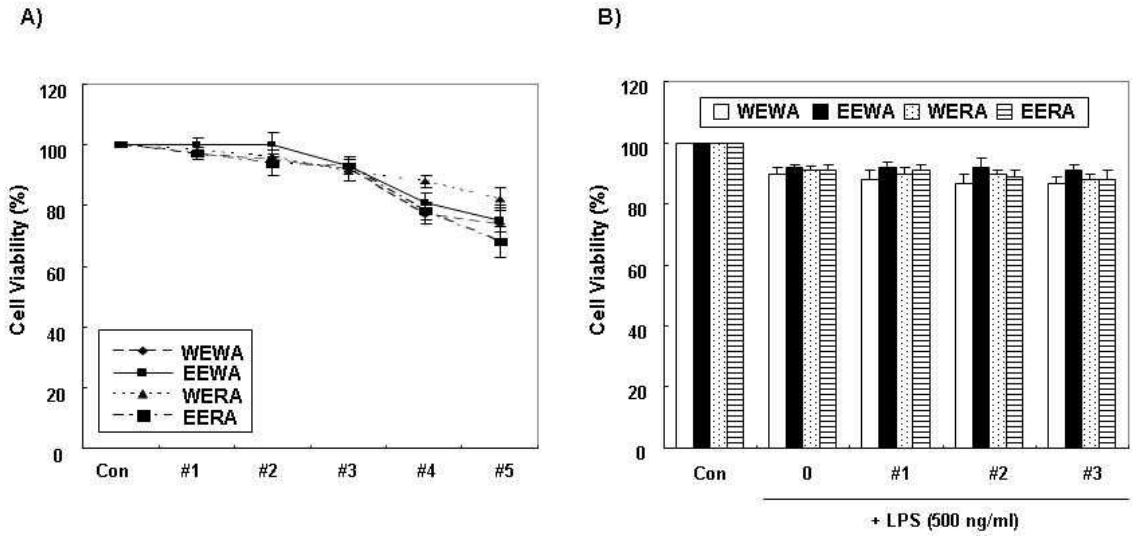

Fig. 1. Effects of *A. fistulosum* extracts and LPS on the cell viability in BV2 microglia cells. BV2 cells (6×10^5 cells/well) were seeded in 6 well plates and stabilized for 24 hr. (A) The cells were treated with the various concentrations of *A. fistulosum* extracts (water extract from the whole *A. fistulosum*, WEWA; ethanol extract from the whole *A. fistulosum*, EEWA; water extract from the root of *A. fistulosum*, WERA; ethanol extract from the root of *A. fistulosum*, EERA) for 24 hr. The concentrations of #1, #2, #3, #4 and #5 indicate 50 µg/ml, 150 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml and 1 mg/ml, respectedly, in the cases of WEWA, EEWA and WERA, while 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 100 µg/ml and 500 µg/ml in the case of EERA. (B) The cells were pre-treated with the various concentrations of WEWA, EEWA, WERA and EERA for 1 hr and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 hr. The concentrations of #1, #2 and #3 indicate 50 µg/ml, 150 µg/ml and 250 µg/ml, respectedly, in the cases of WEWA, EEWA and WERA, while 10 µg/ml, 20 µg/ml and 40 µg/ml in the case of EERA. The rates of cell viability were measured by MTT assay. The data shown are means±SD of three independent experiments.

을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결 과

파 추출물의 BV2 세포에 대한 세포독성 여부

다양한 파 추출물이 BV2 세포에 독성을 나타내지 않는 조건에서 항염증효과를 조사하기 위해 준비된 파 추출물을 각각 단독 처리한 후 MTT assay를 먼저 실시하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 파 추출물 처리 24시간 후 WEWA, EEWA 및 WERA 처리군에서는 250 μg/ml까지, EERA 단독 처리군에서는 40 μg/ml까지는 BV2 세포가 각각 90% 이상의 생존율을 보였으나, 그 이상의 처리 농도에서는 처리 농도 의존적으로 세포독성을 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로 WEWA, EEWA 및 WERA 처리군은 250 μg/ml을, EERA 처리군은 40 μg/ml을 최고농도로 선정하여 몇 가지 농도별로 1시간 선처리한 후 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 경과 후에 생존율을 측정하였다. Fig. 1B의 결과에서 알 수 있듯이 각 추출물의 최고 농도와 LPS를 동시에 처리하여도 생존율이 90% 이상으로서 BV2 세포에 대한 독성을 나타내지 않았기에 이를 항염증효능 실험 조건으로 선정하였다.

LPS로 유도한 BV2 세포의 iNOS 및 COX-2 발현 증가에 미치는 파 추출물의 영향

이상에서 설정된 조건에서 LPS 처리에 의하여 활성화된 BV2 세포에서 파 추출물의 항염증 효과를 조사하기 위하여 LPS에 의해 유도된 대표적인 염증 매개 유전자인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 파 추출물의 영향을 전사 및 번역 수준에서 조사하였다(Fig. 2 및 3). 그 결과 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 유전자의 mRNA 및 단백질 발현이 전체적으로 파 추출물의 처리 농도 의존적으로 감소되었는데, iNOS 발현 억제의 효과는 EEWA 처리군과 EERA 처리군에서 강하게 나타났으며, COX-2 발현의 경우 WEWA 처리군과 EERA 처리군에서 효과적으로 억제시켰음을 알 수 있었다. 아울러 EEWA 처리군은 iNOS의 발현을 현저히 억제한 반면에 COX-2의 억제능은 비교적 낮게 나타났으며, WERA 처리군은 mRNA 수준에서는 두 유전자의 발현을 억제하였으나 단백질 수준에서의 억제능은 다소 약하게 나타났다. 따라서 파 추출물의 종류에 따라 정도의 차이는 있지만, 파 추출물이 iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 억제함으로서 항염증효능이 있을 것임을 알 수 있었다.

LPS로 유도된 BV2 세포의 NO 생성 증가에 미치는 파 추출물의 영향

이상의 결과에서 관찰된 파 추출물의 iNOS 발현 억제 효능이 iNOS의 반응 산물인 NO의 생성 억제와 연관되어 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 파 추출물을 각각 단독 처리하거나 1시간 선처리한 후 LPS를 처리하여 NO 생성량을 측정하기 위하여 Griess assay를 실시하였다. 그 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 LPS 처리 후 현저히 증가했던 NO의 생성량이 파 추출물 처리에 의해 처리 농도 의존적으로 감소되었는데, 특히 EEWA 처리군에서는 거의 대조군 수준까지 감소하여 가장 탁월한 효과를 보였다. 아울러 WEWA와 EERA 처리군은 비슷한 수준의 NO 생성 억제 효과를 보였으

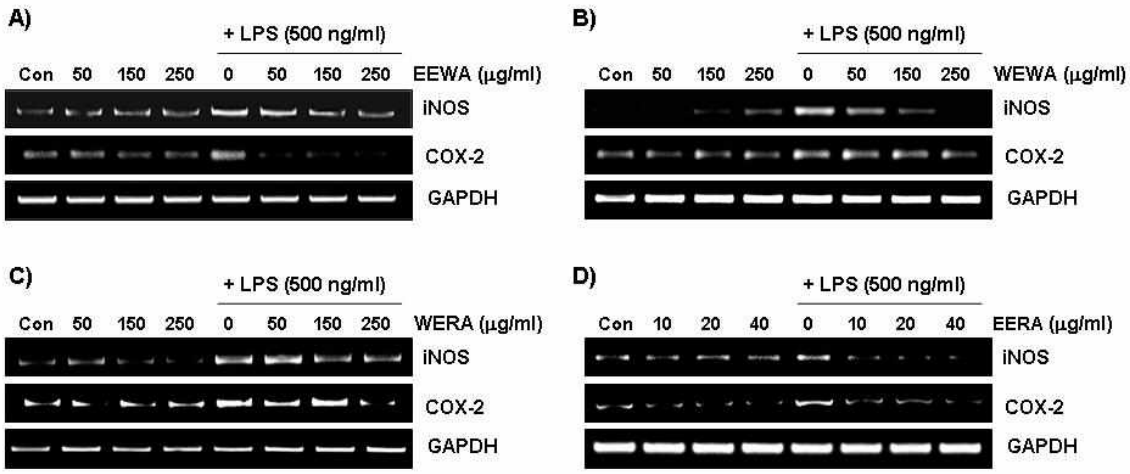

Fig. 2. Effects of *A. fistulosum* extracts on the levels of iNOS and COX-2 mRNA in LPS-stimulated BV2 microglia cells. BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of 5×10^5 cells/well and stabilized for 24 hr. The cells were pre-treated with the various concentrations of *A. fistulosum* extracts (A, WEWA; B, EEWA; C, WERA and D, EERA) for 1 hr and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 hr. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of iNOS and COX-2 genes. GAPDH was used as a loading control.

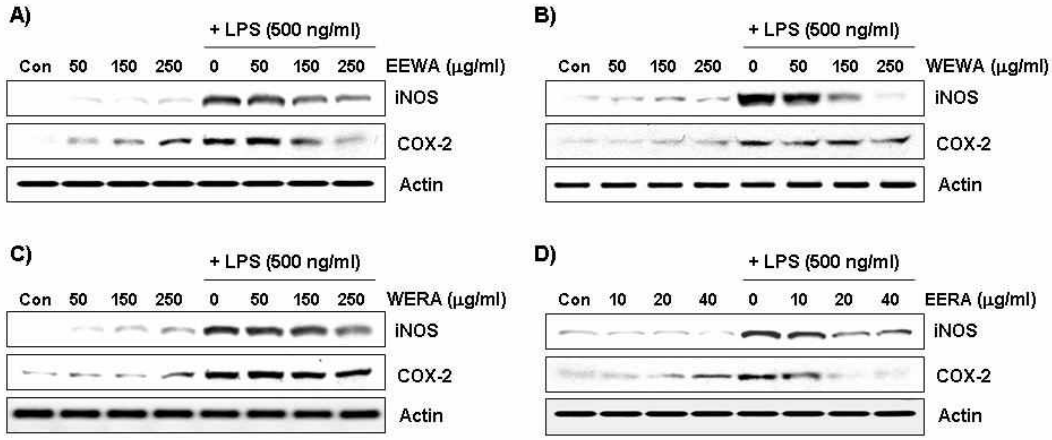

Fig. 3. Effects of *A. fistulosum* extracts on the levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-stimulated BV2 microglia cells. The cells grown under the same conditions as Fig. 2 were lysed and the cellular proteins were then separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

며, WERA 처리군의 효과가 상대적으로 적게 나타났으며, 이러한 결과들은 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 억제 수준과 그 경향성이 유사하였다.

LPS로 유도된 BV2 세포의 염증성 cytokine 발현 증가에 미치는 파 추출물의 영향

다음은 microglia가 활성화되었을 때 분비되는 대표적인 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현에 미치는 파 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 LPS 처리에 의하여 조사된 3가지 cytokine의 발현이 전사 수준에서 모두 증가되었으나, 파 추출물 처리에 의하여 전체적으로 감소되는 경향성을 보였다. 특히 IL-1β가 4가지 파 추출물 처리에 의해 3가지 유전자의 발현을 가장 현저하게 감소시켰으며, IL-6은 파 뿌리 추출물인 WERA와 EERA에 의해서만 감소하는 경향을 보였다. 그리고 TNF-α 발현의 경우 WEWA 처리군에서 약간 감소하였으며, 다른 파 추출물에 의해서 억제되는 효과가 약하게 나타났다. 그러나 전반적으로 LPS로 유도된 전구염증 cytokine의 mRNA 수준을 억제하는 경향을 보여 파 추출물이 iNOS 및 COX-2와 함께 cytokine들의 발현 억제를 통하여 염증반응을 억제할 수 있을 가능성을 보여주었다.

LPS에 의하여 증가된 BV2 세포의 TNF-α 및 IL-6 생성에 미치는 파 추출물의 영향

Fig. 5에서 관찰된 파 추출물의 염증성 cytokine의 발현 억제 효과가 cytokine의 생성 억제 효과와 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 BV2 세포에서의 TNF-α와 IL-6의 양적 변화를 조사하였다. 먼저 TNF-α 생성의 경우, Fig. 5A에 나타낸 바와 같이 LPS 처리에 의하여 증가된

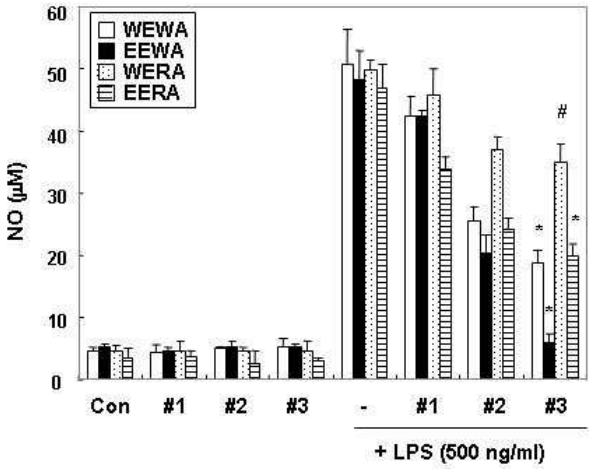

Fig. 4. Effects of *A. fistulosum* extracts on LPS-induced NO generation in BV2 microglia cells. BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of 5×10^5 cells/well for 24 hr. The cells were pre-treated with the various concentrations of *A. fistulosum* extracts for 1 hr and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 hr. The amounts of NO were determined by Griess assay and a standard curve created using $NaNO_2$ in culture medium. The data shown are means±SD of three independent experiments. *$p<0.01$ and #$p<0.05$ are significantly different from the value in cells treated with LPS in the absence of *A. fistulosum* extracts, respectively.

TNF-α 생성이 EEWA 처리에 의하여 유의적인 감소를 보였고, WEWA와 EERA 처리군에서도 TNF-α 생성량을 다소 감소되었으나 통계적으로 유의할 수준은 아니었다. IL-6의 경우도 LPS 단독 처리에 의하여 매우 증가되었으며, 파 추출물의 처리에 의하여 부분적으로 감소되었으나 통계적으로 유의한 수

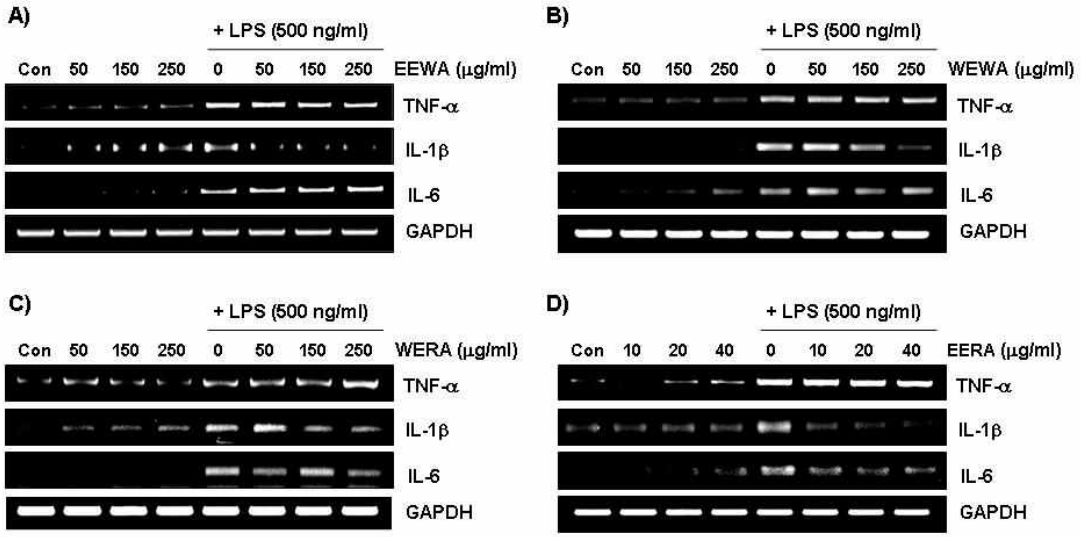

Fig. 5. Effects of *A. fistulosum* extracts on the expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglia cells. BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of 5×10^5 cells/well for 24 hr. The cells were pre-treated with the various concentrations of *A. fistulosum* extracts for 1 hr and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

준은 아니었다. 이들 결과는 Fig. 5에서 보여준 TNF-α와 IL-6의 mRNA 발현 변화와는 다소 차이가 있었음을 알 수 있었는데, EERA 처리군에서 TNF-α의 mRNA는 큰 변화가 없었으나 실제 TNF-α의 생성은 감소하였다는 점과, WERA 처리군에서 IL-6의 mRNA 수준은 감소하였으나 실제 IL-6의 생성은 오히려 다소 증가하였다는 점 등이다. 이들은 유전자의 발현 과정에서 전사 후 번역 과정이나 번역 후 조절 과정에서 변화가 생겼을 것으로 추측되며, 이에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

고 찰

Microglia는 CNS에 존재하는 면역세포로서 다양한 약물이나 독소에 의해 활성화되어 이물질을 제거하고 면역기능을 나타내므로 신경세포를 보호하고 CNS의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 microglia가 과도하게 활성화될 경우 진행성인 염증반응을 일으켜 NO, PGE_2, 전구염증 cytokine 및 ROS 등을 배출하며, 이러한 인자들은 microglia 매개 신경 독성을 유발한다고 알려져 있다[11,13-15]. 염증성 반응과 연관된 과도한 NO와 PGE_2를 생성하는 효소로서 iNOS와 COX-2가 가장 중요한 표적 유전자인데, iNOS는 세포질 안에서 여러 단계를 거쳐 NO를 생성하며, COX-2는 prostanoids인 prostaglandins, prostacyclin 및 thromboxanes 등의 합성을 촉진하여 염증반응을 유도하는 핵심 인자로서 작용한다. 병리학적 측적에서 iNOS와 COX-2는 다양한 CNS의 외상과 질병 연관 조직에서 과다하게 발현되어 있으며[8,25], 특히 신경교증(gliosis) 및 파킨슨씨 병의 흑질 내 glia 세포에서 발현이 동시에 증가되어 있음이 보고되어 있다[10]. 또한 LPS를 처리한 마우스 뇌의 microglia에서 iNOS와 COX-2가 동시에 과발현된다는 보고 등[3,16]은 다양한 *in vitro* 실험에서 LPS는 microglia를 활성화시켜 염증반응 및 신경독성을 유발하는 자극원으로 사용될 수 있음을 의미한다[15,22]. 몇 가지 선행 연구에서 iNOS와 COX-2의 저해제가 LPS로 유도한 신경독성에 대해 보호 효과를 보인 바[1,2,25], microglia에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 효과적으로 저지하는 것이 염증성 cytokine의 생성 억제와 함께 신경염증과 신경퇴행성 질환의 치료와 예방을 위한 일반적인 접근 방법으로 인식되고 있다.

본 연구에서는 BV2 세포에 LPS를 처리하여 인위적으로 염증반응을 유도시킨 후 4가지 종류의 파 추출물의 염증 저해 활성 효과를 비교하였다. 이를 위하여 파의 전체 및 뿌리 부분을 각각 열수 및 에탄올 추출물을 사용하였으며, 먼저 각 파 추출물 및 LPS의 단독 처리 혹은 복합 처리에 의해 세포독성을 나타내지 않는 조건을 설정하였고(Fig. 1), 동일 조건에서 파 추출물이 LPS에 의해 유도된 염증 매개 인자인 iNOS와 COX-2의 발현 증가를 억제할 수 있는지를 조사하였다. Fig. 2 및 3에 제시된 바와 같이 본 실험에 사용된 파 추출물은 추출물의 종류에 따라 다소의 차이는 있었지만, 전반적으로 LPS에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2의 발현을 매우 억제하였

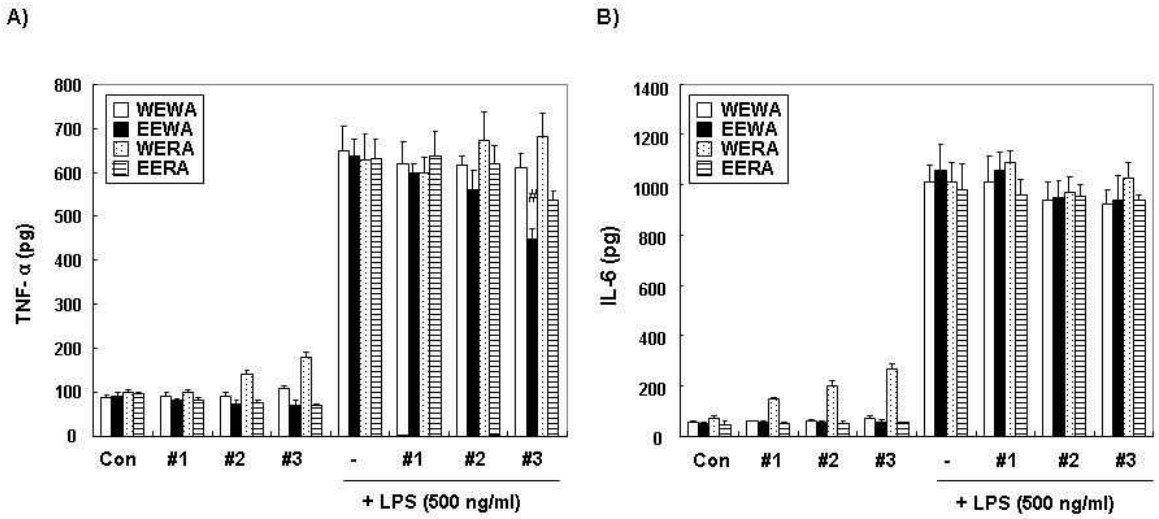

Fig. 6. Effects of *A. fistulosum* extracts on TNF-α and IL-6 generation in LPS-stimulated BV2 microglia cells. BV2 cells were seeded in 6 well plates at a density of 5×10^5 cells/well for 24 hr. The cells were pre-treated with the various concentrations of *A. fistulosum* extracts for 1 hr and then treated with LPS (500 ng/ml) for 24 hr. The amounts of TNF-α (A) and IL-6 (B) were determined according to the manufactural's instruction of Fluorokine MAP Mouse TNF-α and IL-6 kits. The data shown are means±SD of three independent experiments. #$p<0.05$ is significantly different from the value in cells treated with LPS in the absence of *A. fistulosum* extracts.

음을 확인할 수 있었다. 아울러 iNOS의 발현 증가데 대한 반응 산물인 NO의 생성 억제 효과를 조사한 결과에서도, 파 추출물은 전반적으로 처리 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO의 생성을 유의적으로 차단시켰으며, 이는 전사 및 번역 수준에서 iNOS의 발현 억제 효과와 연관성이 있었음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

다음은 파 추출물의 염증성 cytokine의 발현 및 반응 산물의 억제 효과를 조사하기 위하여 동일 조건에서 LPS에 의해 유도된 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5의 결과에 제시한 바와 같이, 조사된 4 종류의 파 추출물은 LPS에 의해 유도된 3가지 종류의 cytokine의 발현을 전사 수준에서 효과적으로 억제하였음을 알 수 있었다. 이러한 전사 수준에서의 염증성 cytokine의 발현 저하가 cytokine의 생성 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, TNF-α의 생성 억제에 전체 열수 추출물(WERA)이 유의적인 효과를 보였지만, 나머지 파 추출물에 대한 효과는 전사 수준에서의 발현 억제 효과에 비하여 다소 미비하게 나타났다(Fig. 6). 이러한 파 추출물의 염증성 cytokine 발현의 전사 수준 억제 효과와 cytokine의 생성 억제 효과가 다소 다르게 나타난 가능성으로 해당 cytokine 유전자들의 전사 후 번역 과정에서의 조절 및 다른 신호 전달계들과의 상호 작용 여부 등을 생각할 수 있겠지만, 파 추출물이 iNOS와 염증성 cytokine의 증가를 억제하는 경향성은 분명하였으며, 4가지의 파 추출물 중에서는 파 전체 에탄올 추출물(EEWA)이 가장 탁월한 항염증 효과를 보였다.

본 연구에서 사용된 파 추출물의 염증 억제 작용에 관한 추가적인 연구의 수행과 활성형 분획의 선별과 후보물질의 동정 등에 관한 연구가 추가로 이루어져야겠지만, 본 연구의 결과는 파 추출물이 CNS의 면역세포인 microglia의 과도한 활성화로 인한 신경염증 작용을 차단함으로써 항염증 효과 및 신경 보호 효과를 지닐 수 있음을 보여 주는 것이다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(610003-03-1-SU000)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

1. Araki, E., C. Forster, J. M. Dubinsky, M. E. Ross, and C. Iadecola. 2001. Cyclooxygenase-2 inhibitor ns-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. *Stroke* **32,** 2370-2375.
2. Arimoto, T. and G. Bing. 2003. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **12,** 35-45.
3. Boje, K. M. and P. K. Arora. 1992. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587,** 250-256.
4. Dinarello, C. A. 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. *J. Infect. Dis.* **179,** 294-304.
5. Elkabes, S., E. M. DiCicco-Bloom, and I. B. Black. 1996. Brain

microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* **16,** 2508-2521.
6. Gonzalez-Scarano, F. and G. Baltuch. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22,** 219-240.
7. Guzik, T. J., R. Korbut, and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Phamacol.* **43,** 469-487.
8. Hunot, S, F. Boissière, B. Faucheux, B. Brugg, A. Mouatt-Prigent, Y. Agid, and E. C. Hirsch. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* **72,** 355-363.
9. Kang, M. J., J. H. Kim, H. N. Choi, M. J. Kim, J. H. Han, J. H. Lee, and J. L. Kim. 2010. Hypoglycemic effects of Welsh onion in an animal model of diabetes mellitus. *Nutr. Res. Pract.* **4,** 486-491.
10. Knott, C., G. Stern, and G. P. Wilkin. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson''s disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell Neurosci.* **16,** 724-739.
11. Le, W., D. Rowe, W. Xie, I. Ortiz, Y. He, and S. H. Appel. 2001. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson''s disease. *J. Neurosci.* **21,** 8447-8455.
12. Li, J., O. Baud, T. Vartanian, J. J. Volpe, and P. A. Rosenberg. 2005. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102,** 9936-9941.
13. McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes, and E. G. McGeer. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson''s and Alzheimer''s disease brains. *Neurology* **38,** 1285-1291.
14. McGeer, P. L., T. Kawamata, D. G. Walker, G. Akiyama, I. Tooyama, and E. G. McGeer. 1993. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* **7,** 84-92.
15. Melchior, B., S. S. Puntambekar, and M. J. Carson. 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem. Int.* **49,** 145-153.
16. Minghetti, L., D. T. Walsh, G. Levi, and V. H. Perry. 1999. *In vivo* expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58,** 1184-1191.
17. Nakajima, K., S. Honda, Y. Tohyama, Y. Imai, S. Kohsaka, and T. Kurihara. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci.* **65,** 322-331.
18. Park, J. R., J. C. Park, and S. H. Choi. 1997. Screening and characterization of anticholesterogenic substances from edible plant extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26,** 236-241.
19. Patal, T. N., M. H. Shishehbor, and D. L. Bhatt. 2007. A review of high-dose statin theraoy: targeting cholesterol and inflammation in atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **28,** 664-672.
20. Perlmutter, L. S., E. Barron, and H. C. Chui. 1990. Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **119,** 32-36.
21. Sang, S., A. Lao, Y. Wang, C. K. Chin, R. T. Rosen, and C. T. Ho. 2002. Antifungal constituents from the seeds of *Allium fistulosum* L. *J. Agric. Food Chem.* **50,** 6318-6321.
22. Schmid, C. D., L. N. Sautkulis, P. E. Danielson, J. Cooper, K. W. Hasel, B. S. Hilbush, J. G. Sutcliffe, and M. J. Carson. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* **83,** 1309-1320.
23. Seo, D. C., S. M. Chung, J. Y. Lee, Y. S. Kim, and J. H. Chung. 1996. Effect of oriental Onion (*Allium fistulosum*) on platelet aggregation. *J. Fd. Hyg. Safety* **11,** 273-276.
24. Stajner, D., R. Igić, B. M. Popović, and D. J. Malencić. 2008. Comparative study of antioxidant properties of wild growing and cultivated *Allium* species. *Phytother. Res.* **22,** 113-117.
25. Teismann, P., M. Vila, D. K. Choi, K. Tieu, D. C. Wu, V. Jackson-Lewis, and S. Przedborski. 2003. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson''s disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **991,** 272-277.
26. Wegiel, J., K. C. Wang, M. Tarnawski, and B. Lach. 2000. Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plague degradation. *Acta Neuropathol.* **100,** 356-364.
27. Wegiel, J. and H. M. Wisniewski. 1990. The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta Neuropathol.* **81,** 116-124.

초록 : Lipopolysaccharide에 의한 BV2 세포의 염증 반응에 대한 파 추출물의 저해 활성

박신형[1] · 김정인[4] · 정영기[5] · 최영현[2,3]*

(동의대학교 [1]한의과대학 병리학교실, [2]생화학교실 및 한의학연구소, [3]대학원 바이오물질제어학과 및 블루바이오 소재개발센터, [4]인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, [5]동아대학교 생명공학과 및 대학원 의생명과학과)

본 연구에서는 파의 항염증 효과를 밝히고 그 생화학적 기전 해석을 위해 LPS로 활성화된 BV2 microglia를 이용하여 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현 및 그 산물에 미치는 파 추출물의 영향을 조사하였다. 그 결과 파 추출물은 LPS 처리에 의한 BV2 세포의 iNOS의 발현을 전사 및 번역 수준에서 처리 농도 의존적으로 억제시켰으며, 특히 파 전체 에탄올 추출물(EEWA)의 효과가 가장 탁월하였다. LPS로 유도한 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현 역시 파 추출물 처리에 의하여 감소되었으며 뿌리 에탄올 추출물(EERA) 처리군에서 가장 현저한 억제가 관찰되었다. 아울러 염증 반응의 또 다른 주요인자인 염증성 cytokine들(TNF-α, IL-1β 및 IL-6)의 mRNA 변화를 조사한 결과 파 추출물이 대체적으로 이들 cytokine의 발현을 억제하는 경향을 보였으며, 최종산물인 TNF-α와 IL-6의 생성량 역시 유의한 수준은 아니었으나 감소하는 경향을 보였다. 본 연구의 결과는 파의 추출물은 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현을 조절함으로서 신경염증 반응을 효과적으로 억제하며, 향후 지속적인 연구가 필요하지만 신경 보호 작용에 탁월한 효능이 있음을 보여주는 것으로 생각된다.