

포도잎으로부터 분리된 Quercetin-3-O-glucuronide의 LPS로 유도된 BV2 미세아교세포에서의 항염증 효과

윤치수^{1,2#} · 김동철^{1,2#} · 고원민^{1,2} · 김경수^{1,2} · 이동성³ · 김대성⁴ · 조형권⁴
서정원² · 김성연² · 오현철^{1,2,3*} · 김윤철^{1,2,3*}

¹원광대학교 약학대학 천연물신소재은행, ²원광대학교 약품연구소, ³원광대학교 한방체액조절센터, ⁴(유)한풍제약

Anti-neuroinflammatory Effects of Quercetin-3-O-glucuronide Isolated from the Leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced Neuroinflammation in BV2 Cells

Chi-Su Yoon^{1,2#}, Dong-Cheol Kim^{1,2#}, Won-Min Ko^{1,2}, Kyoung-Su Kim^{1,2}, Dong-Sung Lee³, Dae-Sung Kim⁴,
Hyung-Kwon Cho⁴, Jungwon Seo², Sung Yeon Kim², Hyuncheol Oh^{1,2,3*}, Kim Youn-Chul^{1,2,3*}

¹Standardized Material Bank for New Botanical Drugs, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

³Hanbang Body-Fluid Research Center, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

⁴Hanpoong Pharm & Foods Co., Ltd., Jeonju, 561-841, Korea

Abstract – Grapes has long been used for food, and reported as containing polyphenol which has antioxidant and anti-cancer effects. Neuroinflammation is chronic inflammation at the brain, lead to neurodegenerative diseases. In this study, quercetin-3-O-glucuronide (QG) isolated from the leaf of *Vitis labruscana* has anti-neuroinflammatory effects. QG were investigated using MTT assay, western blot, nitric oxide (NO) assay, prostaglandin E₂ (PGE₂) assay, cytokine assay in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in BV2 cells. QG dose-dependently attenuated the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), accordingly inhibited the production of NO and PGE₂. QG decreases the levels of pro-inflammatory cytokine such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β). Thereby, QG may offer therapeutic potential for treatment of neurodegenerative disease related to neuroinflammation.

Key words – *Vitis labruscana* leaf, Quercetin-3-O-glucuronide, Anti-neuroinflammation, BV2 cells

포도는 갈대나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 목본성 덩굴 식물로, 포도과에는 11 속, 700 여종의 포도가 있다. 포도는 대체로 아시아, 지중해군에 속하는 유럽종(*Vitis vinifera* L.), 미국종(*Vitis labrusca* L.) 및 그들 상호간의 교배종(*Vitis labruscana* B.)의 세 종류로 크게 나눌 수 있다.¹⁾ 포도 잎은 맛이 시고 떼어서 식용으로 사용하지 않다가, 최근 웰빙에 대한 관심이 높아지며 식용으로 쓰이려는 시도가 나타나고 있으며, 항산화 작용과, 항당뇨 효과 또한 발표되었다.²⁾ 중동이나 동·서 유럽에서는 포도잎을 절임이나 통조림으로 조제하여 식용으로 이용하고 있고, 그리스에서는 포도잎을 이용한 전통 음식이 개발되어 소비되고

있다.³⁾ 그러나 우리나라에서는 포도잎에 함유된 생리 활성 성분에 대한 연구가 미흡하며 국민들의 인식이 낮아 포도 재배 시 수확량과 당도를 높이기 위한 순따기를 통해 대부분 폐기되고 있는 실정이다.⁴⁾ 포도에는 당분과 무기질이 다량으로 함유되어 있고, 대표적인 성분으로 잘 알려진 레스베라트롤(resveratrol), 안토시아닌(anthocyanin)계, 탄닌(tannin)계, 퀘세틴(quercetin)계 등의 폴리페놀(polyphenol) 성분을 함유하는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 포도의 다양한 폴리페놀 성분은 항암, 항산화, 항노화에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며,^{7,8)} 특히 레스베라트롤은 항산화, 항염증, 혈관보호, 항암 효과가 있다고 보고되어 있다.⁹⁾ 적포도주에서 분리되었다고 보고된¹⁰⁾ 바 있는 quercetin-3-O-glucuronide(QG)는 뇌를 타겟으로 한 알츠하이머 개선 효과와,¹¹⁾ RAW264.7 세포와 human macrophage에서의 항염증 효과,¹²⁾ AMPK의 경

#These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): yckim@wku.ac.kr, hoh@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6823

로 eNOS 활성을 통한 혈관 기능 개선에 효과가 있다.¹⁵⁾ 그러나 QG의 뇌염증 개선에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

최근 사회의 고령화가 진행됨에 따라 퇴행성 뇌질환 환자가 증가하고 있으며 질병의 원인 규명과 이에 대한 약물 개발이 빠르게 이루어지고 있다.¹⁴⁾ 뇌와 척수의 신경세포들은 그 위치에 따라 매우 다양한 기능을 하고 있으며, 중추신경계(central nerve system, CNS)에 존재하는 미세아교세포(microglial)는 뇌의 염증, 면역과 퇴행성에 중요한 역할을 하므로, 이 세포에서 발생하는 염증 반응을 조절하여 퇴행성 뇌질환을 막을 수 있다.¹⁵⁾ 미세아교세포가 활성화되면 약물이나 독소에 의한 이물질을 제거하고 신경 성장 인자를 분비하여 신경세포를 보호 및 CNS의 항상성 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 뇌 손상 등으로 지속적인 활성화가 되거나, lipopolysaccharide(LPS), interferon-gamma (IFN- α), tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)와 같은 자극으로 인해 과도하게 활성화되 되면 신경계에 독성을 보이는 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE₂)와 같은 전염증 매개체(proinflammatory mediators), 사이토카인(cytokine), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등이 분비 되어 신경 독성을 유발하고, 뇌 조직을 파괴함으로써 알츠하이머, 파킨슨씨병 및 크로이츠펠트야콥병과 같은 퇴행성 뇌질환의 원인이 된다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 염증 반응으로 분비되는 NO와 PGE₂의 경우 소량 분비되면 혈액순환 촉진, 면역력 증강 등의 긍정적인 효과를 가져오지만 과분비 될 경우 염증 반응을 촉진시켜 다양한 염증성 질환을 야기하게 된다.^{19,20)} 이 중 NO와 PGE₂는 염증 유발 인자인 TNF- α , IL-1 α , LPS 등에 의해 발현되는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 생성되므로 이들 단백질 조절이 염증의 조절에 중요한 기전으로 인식되고 있다.²¹⁾ 따라서, 본 논문에서는 포도잎으로부터 분리한 quercetin-3-O-glucuronide의 LPS 로 유도된 BV2 세포에서 항염증 효과에 대한 연구를 진행하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 포도잎은 2013년 전북 김제시 백구면 지역의 포도 재배 농가에서 재배된 것을 채취 후 건조하여 사용하였으며, 원광대학교 자원식물원 장규관 교수에게 의뢰하여 동정하였다. 확증표본(WP-2013-76)은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관하였다. 정선된 포도잎(*Vitis labruscana* B. campbell early) 100 g을 20배의 50% 에탄올과 3% 초산(acetic acid)을 넣고, 85-95°C에서 3시간 동안 추출하였다. 추출액을 1 μ m 크기의 마이크로필터를 이용하여 여과하고 잔사를 동일 조건으로 2회 추출하고 여과 후 60°C이하에서 감압농축하여 건조엑스 약 21.4 g을 얻었다(수

득률 21.4%).

시약 및 기기 - DMEM 배지, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), fetal bovine serum (FBS)는 Gibco Laboratorie사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader 를 이용하여 측정하였다. NMR 스펙트럼은 JEOL JNM ECP-400 spectrometer(400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C)기기로 DMSO-d₆와 CD₃OD 용매를 이용하여 측정하였다. HPLC는 Younglin사의 YOUNGLIN-YL9100 기기를 통하여 측정하였고, column은 SHISHIDO사의 CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mmI.D×250 mm, 5 μ m-particle size)를 이용하였다.

포도 잎 추출물로부터 QG의 분리 및 NMR Analysis - 포도잎 추출물 14 g을 증류수로 현탁 시킨 후 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 순으로 분획한 후 각 분획들을 감압 농축하여 용매를 휘발시킨 뒤 무게를 측정하였다. *n*-hexane (1.1 g), CH₂Cl₂ (0.7 g), EtOAc (0.9 g), BuOH (2.1 g), H₂O (9.3 g)을 얻었고, BuOH 분획물 2.1 g을 Sephadex-LH20 column chromatography를 이용하여 80%와 100% MeOH의 용매 조건으로 순차적인 분획을 나누어 4가지 분획물을 얻고 감압 농축하였다. 3번째 분획물 0.27 g을 두 차례 reverse phase (RP-C₁₈) column chromatography를 50% MeOH의 용매 조건으로 하여 quercetin-3-O-glucuronide (41 mg)을 얻었다.

Quercetin-3-O-glucuronide: ¹H NMR data (400 MHz, CD₃OD) δ 7.70 (1H, s, H-2'), 7.59 (1H, dd, *J*=2.0 Hz, 8.4 Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.36 (1H, brs, H-8), 6.18 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-6), 5.31 (1H, d, *J*=7.3 Hz, H-1"), 3.74 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-5"), 3.61-3.43(3H, combine glucose peak, H-2",3",4"); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 177.2 (s, C-4), 170.0 (s, C-6"), 164.2 (s, C-7), 161.1 (s, C-5), 156.5 (s, C-2), 156.2 (s, C-9), 148.4 (s, C-4'), 144.8 (s, C-3'), 133.2 (s, C-3), 121.3 (s, C-6'), 120.7 (s, C-1'), 116.5 (s, C-5'), 115.2 (s, C-2'), 103.8 (s, C-10), 101.6 (s, C-1"), 98.7 (s, C-6), 94.2 (s, C-8), 76.0 (s, C-3"), 75.5 (s, C-2"), 73.8 (s, C-5"), 71.3 (s, C-4").

검량선 작성 - QG를 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31.25 mg/ml, 15.625 mg/ml의 농도로 조제하였다. HPLC 측정 시 QG는 각각 10 μ l씩 주입하였고, 5%-50%-100%(v/v) AcN을 용매기울기법으로 측정하였다. 이를 이용하여 외부 검량선을 얻었으며 검량선의 식은 $Y=33.7X+400.2$ ($R^2=0.9965$)이다. 여기서 Y는 HPLC를 UV/vis 330 nm에서 분석한 peak area이며, X는 QG의 양을 의미한다. 얻어진 검

광선을 이용하여 포도 잎 추출물에서의 QG의 농도를 구한 후, 함량을 %(w/w)로 환산하였다.

세포 배양 – BV2 미세아교세포(5×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C의 온도로 배양하였다.

세포 독성 – 본 실험에서 BV2 미세아교세포에 대한 세포 독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하고, QG의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 사용하였다. 간단히 기술하면 먼저 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 DMSO에 녹인 시료를 다양한 농도(10, 20, 40, 80 µM)로 DMEM 배지에 희석하여 첨가하였다. DMSO의 처리 농도는 배지 대비 0.1% 이하가 되도록 하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 MTT 시약(5 mg/ml)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO 20 µl를 첨가한 후 orbital shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균 값을 구하였으며, control의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

Western Blot Analysis – BV2 세포를 60 mm dish에 3×10^5 cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. BV2 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane(NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방유가 포함된 신선한 blocking buffer(0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한 후 iNOS, COX-2 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody(Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정한다.

Nitrite Assay – 배양된 세포를 5×10^5 cells/well 수준으로 96 well plate에 100 µl 씩 접종한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료 처리 후 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 24시간 후 세포에서 media로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess시약(0.1%(w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid)을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., California, USA, Model 550)를 사용하여

540 nm에서 측정하였다.

EIA에 의한 PGE₂ 측정 – PGE₂의 측정은 항체(Iyophilized prostaglandin E2 conjugate to horseradish peroxidase)를 사용하여 prostglandin E2 enzymeimmunoassay system(EIA, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ)을 이용하였다.

TNF-α and IL-1β assay – TNF-α와 IL-1β의 측정은 항체(Iyophilized TNF-α or IL-1β conjugate to horseradish peroxidase)를 사용하여 enzymeimmunoassay system kit (R&D Systems, Abingdon, UK)을 이용하여 측정 하였다.

통계처리 – 본실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 사용하였다. 각 실험군 간의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(p<0.05)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

염증 반응이란 외부 자극이나 질병에 대하여 다양한 세포와 여러 인자들이 관여하는 일련의 방어 기전이다. 염증이 발생하면 염증 부위에 면역 세포들이 침투되고, 화학반응에 의해 사이토카인이나 여러 인자들이 생성 및 분비된다. 염증 초기에 항원제공 및 탐식에 관여하는 대식세포는 NO, TNF-α 등을 분비하여 염증 반응을 일으켜 생체를 방어한다. 하지만 과도한 염증반응은 세포 손상 등의 병리적 상태에 이르게 하기 때문에 염증 반응을 유발하는 사이토카인이나 염증 매개체의 조절하는 것이 염증성 질환의 치료법으로 제시되고 있다.^{22,23)} 뇌염증은 신경병성 장애로 인한 신경 조직의 병리적인 상태이다.^{24,25)} BV2 세포는 무한증식하는 murine 세포로 소교세포의 병리 작용에 관한 실험에 널리 쓰이고 있다. 미세아교세포는 신경교의 대식 세포로 중추신경계의 10-20% 정도를 차지하며, 면역 방어나 조직 재생의 중요한 역할을 한다.^{26,27)}

본 연구에서는 선행연구를 통해 포도잎 추출물이 LPS로 자극한 BV2 세포에서 NO의 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인하였고, 이 결과를 바탕으로 추출물 14 g을 분획하여 얻은 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 분획물을 BV2 세포에서 NO assay 결과 BuOH 분획물에서 NO 억제 효과를 나타내어 BuOH 분획물의 분리를 진행하였다. BuOH 분획물 2.1g을 Sephadex LH-20 column chromatography, reverse phase(RP-18) column chromatography 이용하여 순수한 화합물 quercetin-3-*O*-glucuronide을 얻었고, QG의 ¹H NMR과 ¹³C NMR을 측정한 후 선행 문헌^{28,29)}과의 비교를 통해 구조를 동정하였다(Fig. 1A). QG를 이용한 포도잎 추

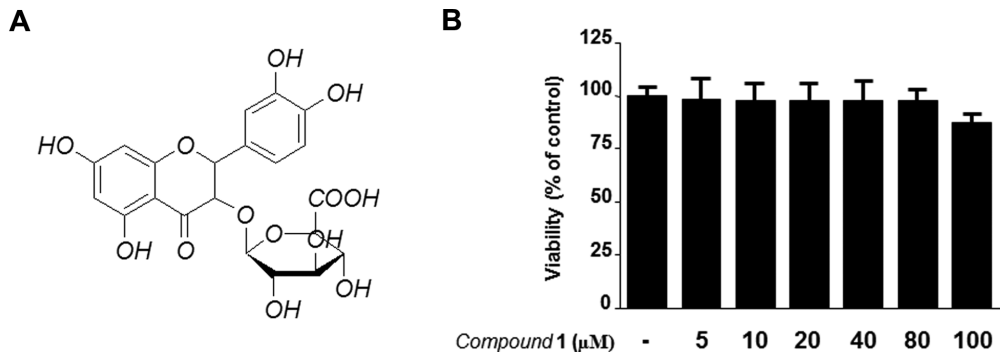


Fig. 1. Chemical structure of QG (A) and effects of QG on cell viability (B). BV2 microglia were incubated for 24 h with various concentrations of QG (10-80 μM). Cell viability was determined as described under Materials and methods. Data represent the mean values of three experiments ±SD.

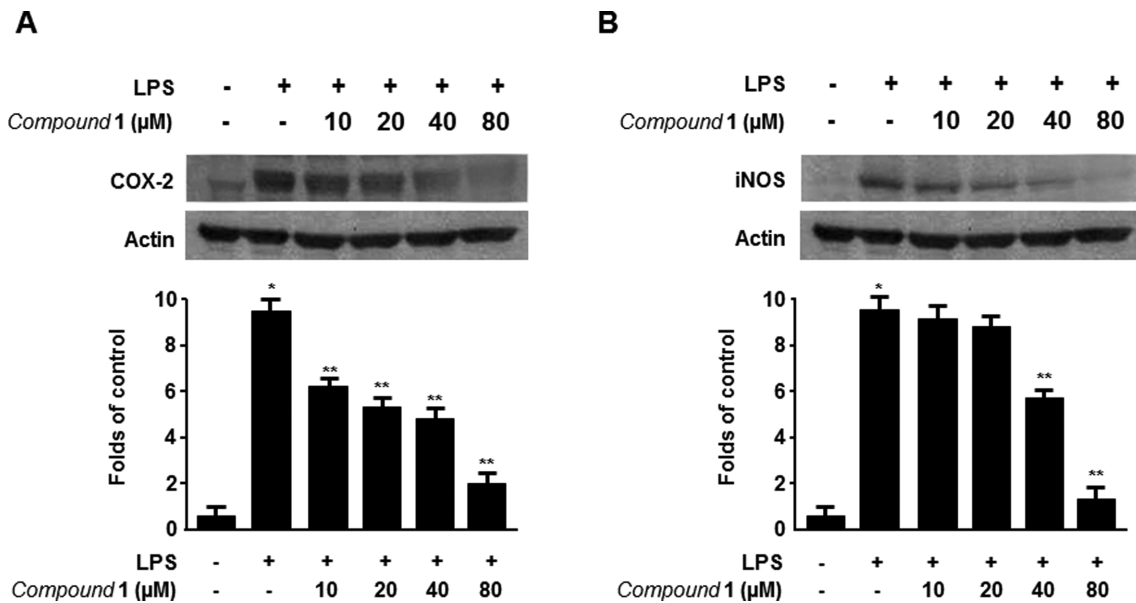


Fig. 2. Effects of QG on protein iNOS (A) and COX-2 (B) expression in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 h with indicated concentrations of QG, and 24 h with LPS (1 μg/mL). Western blot analysis (A, B) were performed as described in Materials and methods, and representative blots of three independent experiments are shown. **p*<0.05 compared to the group treated with LPS. ***p*<0.05 compared to the group treated with compound.

출물의 HPLC 정량실험에서 추출물에 QG가 0.74% 함유되어 있음을 확인하였다. 포도잎으로부터 분리한 QG가 미세아교세포에서 항염증 효과를 갖는지 검색하기 위해, LPS로 유도된 BV2 미세아교세포에서의 염증 관련 인자들을 측정하였다. QG의 BV2 세포에서의 독성은 MTT assay를 통해 확인하였고, QG를 농도별로 BV2 미세아교세포에 처리하였을 때, 세포 독성을 나타내지 않은 10, 20, 40, 80 μM을 실험 가능한 농도로 정하여 실험을 진행하였다(Fig. 1B). 항염증 효과를 검색하기 위해서 LPS로 유도한 BV2 세포에서 iNOS, COX-2 단백질의 발현과 이에 따라 나오는 부산물인 NO, PGE₂의 생성을 측정하였다. 먼저 BV2 미세아교세포에 QG를 10, 20, 40, 80 μM로 3시간 동안 전 처리한 후,

LPS 1 μg/ml을 처리하고 24시간 후에 iNOS와 COX-2의 발현 정도를 Western blot을 통해 관찰하였다. QG는 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰다(Fig. 2). 다음으로, BV2 미세아교세포에 QG를 10, 20, 40, 80 μM로 처리한 후, 3시간 동안 incubator에 배양하고 LPS 1 μg/ml을 처리하였고, 24시간 후에 NO와 PGE₂의 생성을 확인하였다. QG는 농도 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성 또한 감소시켰다(Fig. 3). 다음으로는 BV2 미세아교세포에 QG를 10, 20, 40, 80 μM로 처리한 후, 3시간 동안 incubator에 배양하고 LPS 1 μg/ml을 처리하여, 염증 반응에서 생성되는 사이토카인 TNF-α, IL-1β들을 측정하였다. QG는 LPS로 유도된 BV2 세포에서 사이토카인을 농도 의존적으로 감소시

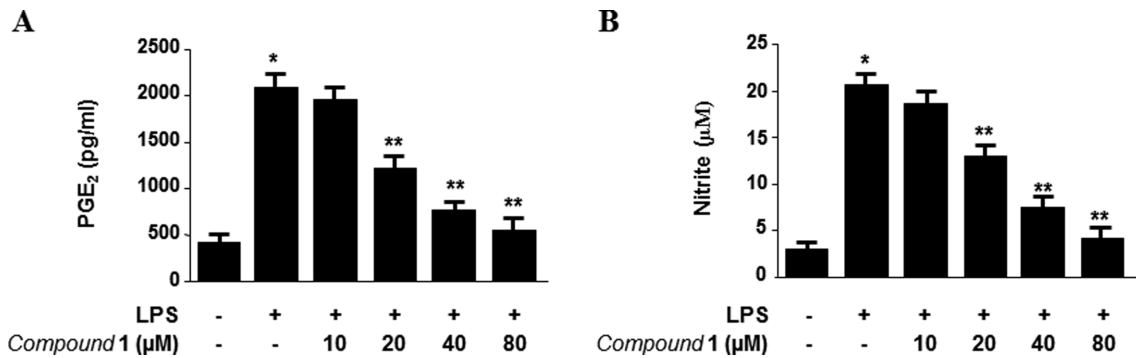


Fig. 3. Effects of QG on nitrite (A), PGE₂ (B) production in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 h with indicated concentrations of QG, and stimulated 24 h with LPS (1 µg/mL). The concentration of nitrite (A), PGE₂ were determined as described under Materials and methods. Data represent the mean values of three experiments ±SD. **p*<0.05 compared to the group treated with LPS. ***p*<0.05 compared to the group treated with compound.

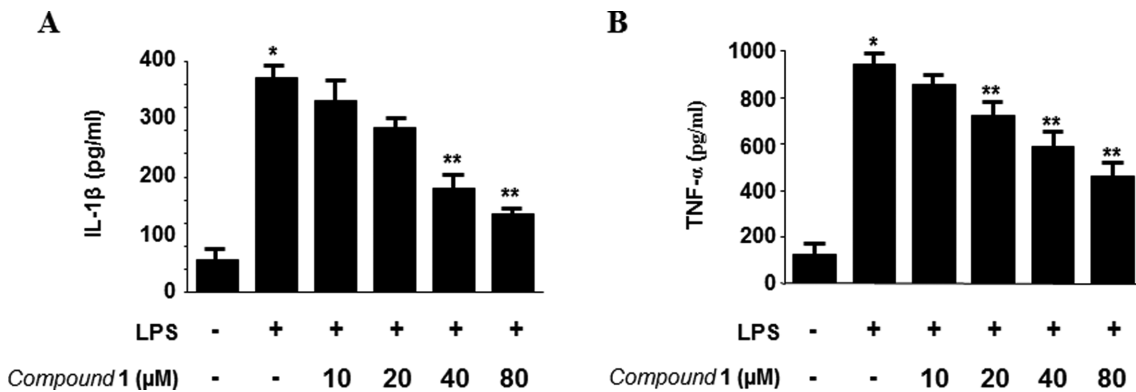


Fig. 4. Effects of QG on TNF-α (A), and IL-1β (B) production in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 h with indicated concentrations of QG, and stimulated 24 h with LPS (1 µg/mL). The concentration of TNF-α (A), and IL-1β (B) were determined as described under Materials and methods. Data represent the mean values of three experiments ±SD. **p*<0.05 compared to the group treated with LPS. ***p*<0.05 compared to the group treated with compound.

켰다(Fig. 4). 한편, QG는 human macrophage에서도 항염증 효과를 나타낸다는 사실이 보고되어 있어,¹²⁾ QG가 본 연구에서 사용한 BV2에서 항염증 효과를 나타내는 것을 보완해주는 결과라고 판단된다.

결론

본 연구에서는 포도잎 추출물에서 분리한 QG의 항염증 효과를 확인하고자 하였고, 그 결과 QG는 유의적인 항염증 효과를 나타냈다. QG는 iNOS와 COX-2의 발현 억제와, 그의 부산물인 NO, PGE₂의 생성을 억제시켰고, TNF-α, IL-1β와 같은 사이토카인의 생성을 억제하는 뚜렷한 항염증 효과를 나타냈다. 이러한 결과와 선행 연구들을 토대로 포도잎과 그 주요 성분인 QG는 앞으로 퇴행성 뇌질환 약물이거나 항염증제로 개발 가능할 것으로 사료된다.

사사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업(R0002267)으로 수행된 연구결과입니다.

인용문헌

- Hwang, I. W., Lee, H. R., Kim, S. K., Zheng, H. Z., Choi, J. U., Lee, S. H., Lee, S. H. and Chung, S. K. (2008) Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Korean J. Food* **15**: 859-863.
- Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D. D., Ergun, F. and Yeilada, E. (2006) In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **108**: 280-286.
- Simopoulos, A. P. (2003) The traditional diet of Greece and cancer. *Eur. J. Cancer. Prev.* **13**: 219-230

4. Choi, S. K., Yu, Q. M., Lim, E. J. and Seo, J. S. (2013) The effects of extraction conditions on the antioxidative effects of extracts from Campbell Early and Muscat Bailey A grapevine leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 168-174.
5. Sung, K. C. (2009) A study on the pharmaceutical and chemical characteristics of nature grape extract. *J. Korean Oil Chem. Soc.* **26**: 341-349.
6. Chang, S. W., Shin, N. S., Song, J. H., Kim, H. J., Lee, K. Y. and Rho, Y. T. (2009) Production of high-level polyphenol powders from young grape leaves. *Korean J. Food Preserv.* **16**: 714-718.
7. Schlachterman, A., Valle, F., Wall, K. M., Azios, N. G., Castillo, L., Morell, L., Washington, A. V., Cubano, L. A. and Dharmawardhane, S. F. (2008) Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl. Oncol.* **1**: 19-27.
8. Yilmaz, Y. and Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 255-260.
9. Lee, S. H., Park, S. Y., Kim, I. S., Park, O. J. and Kim, Y. M. (2012) Effects of resveratrol on migration and proliferation in HT-29 colon cancer cells. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **27**: 289-294.
10. Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H. and Hermosín-Gutiérrez, I. (2009) Flavonol 3-*O*-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 209-219.
11. Ho, L., Ferruzzi, M. G., Janle, E. M., Wang, J., Gong, B., Chen, T. Y., Lobo, J., Cooper, B., Wu, Q. L., Talcott, S. T., Percival, S. S., Simon, J. E. and Pasinetti, G. M. (2013) Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-*O*-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. *Faseb J.* **27**: 769-781.
12. Derlindati, E., Dall'Asta, M., Ardigò, D., Brighenti, F., Zavaroni, I., Crozier, A. and Del Rio, D. (2012) Quercetin-3-*O*-glucuronide affects the gene expression profile of M1 and M2a human macrophages exhibiting anti-inflammatory effects. *Food Funct.* **3**: 1144-1152.
13. Shen, Y., Croft, K. D., Hodgson, J. M., Kyle, R., Lee, I. L., Wang, Y., Stocker, R. and Ward, N. C. (2012) Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochem. Pharmacol.* **84**: 1036-1044.
14. Sohn, E. S. and Sohn, E. H. (2011) A study on the R&D trend and patent analysis of treatments for degenerative brain diseases. *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc.* **12**: 4411-4417.
15. Nakamura, Y., Si, Q. S. and Kataoka, K. (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci. Res.* **35**: 95-100.
16. Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A. L., Citron, M. and Landreth, G. (2003) Anti-inflammatory drug therapy alters β -amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **23**: 7504-7509.
17. Tremblay, M. È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A. and Nimmerjahn, A. (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* **31**: 16064-16069.
18. Kreutzberg, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**: 312-318.
19. Minghetti, L. and Levi, G. (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* **54**: 99-125.
20. Glezer, I., Simard, A. R. and Rivest, S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **147**: 867-883.
21. Liao, C. H., Sang, S., Liang, Y. C., Ho, C. T. and Lin, J. K. (2004) Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. *Mol. Carcinog.* **41**: 140-149.
22. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**: 347-373.
23. Trowbridge, H. O. and Emling, R. C. (1997) Inflammation: a review of the process, 5th ed. Quintessence Pub. Co., Chicago.
24. González-Scarano, F. and Baltuch, G. (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 219-240.
25. Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Wu, D. C., Teismann, P., Choi, D. K., Tieu, K. and Przedborski, S. (1999) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* **14**: 483-489.
26. Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R. and Bis-toni, F. (1990) immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* **27**: 229-237.
27. Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P. and Kettenmann, H. (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* **31**: 616-621.
28. Goetz, G., Fkyerat, A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R. and Pont, V. (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759-767.
29. Moon, J. H., Tsushida, T., Nakahara, K. and Terao, J. (2001) Identification of quercetin 3-*O*-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1274-1285.

(2014. 3. 10 접수; 2014. 3. 18 심사; 2014. 3. 21 게재확정)