

Kaempferol이 LPS로 유도된 생쥐 중추신경계 염증에 미치는 영향

이흥기^{1#}, 김도훈², 김연섭^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실, 2 : 가천대학교 한의과대학 원전외과학교실

Effects of Kaempferol on Lippolysaccharide-induced Inflammation in Mouse Brain

Hung-Gi, Lee^{1#}, Do-Hoon Kim², Youn-Sub Kim^{1*}

1 : Department of Anatomy-Pointology, Gachon University,
2 : Department of Oriental Medical Classics & History, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Brain inflammation early activates the microglia and activated microglia secrete a variety of pro-inflammatory cytokines. Kaempferol, which is a flavonoid in Cuscutae Semen, shows a wide range of physiological activities, including neurons protection and anti-inflammatory actions through inhibition of pro-inflammatory mediators. The present study examined the modulatory effect of kaempferol on cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6)) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and microglia activation in the brain tissue of the mouse.

Methods : Kaempferol was administered orally three doses of 10, 20 and 30 mg/kg respectively, once 1 hour before the lippolysaccharide(LPS) (3 mg/kg, i.p.) injection. Brain tissue was removed at 4 hours after LPS injection. Cytokines and COX-2 mRNA expression in the brain tissue was measured by the quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) method. Iba1 expression was calculated by western blotting method. Microglia was observed with immunohistochemistry. Immunohistochemistry stained microglia was analyzed by using ImageJ software.

Results : Kaempferol 20 and 30 mg/kg was significantly attenuated the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA, Kaempferol 10, 20 and 30 mg/kg significantly attenuated COX-2 mRNA expression in the brain tissue. Kaempferol 30 mg/kg significantly suppressed the increase of Iba1 protein expression by LPS. Kaempferol 30 mg/kg significantly decreased the number of microglia in the cerebral cortex and the number and cell size of microglia in the hypothalamic region and the area percentage of ionized calcium binding adaptor molecule 1(Iba1)-expressed microglia in the hippocampus.

Conclusions : This results indicate that kaempferol plays an anti-inflammatory role in the brain.

Key words : Kaempferol, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, Microglia

서론

중추신경계의 염증은 침윤 주변 대식세포와 림프구뿐만 아니라 상주 미세아교세포와 성상세포의 활성화에 의해 시작된다. 활성화된 미세아교세포 등은 싸이토카인, 케모카인, 신경전달물질 및 활성 산소종을 과잉 분비한다¹⁾. 이런 요인들은 혈액뇌장벽 (Blood-Brain Barrier, BBB)을 붕괴하며 염증

지역에 성상아교세포 증식을 자극하고 상주 미세아교세포를 모이게 한다. 특히, 이렇게 모인 미세아교세포는 활성화되어 신경손상을 야기하고 더 많은 염증 인자를 분비 한다²⁾.

미세아교세포의 활성화와 BBB의 붕괴로 매개된 중추신경계 염증은 신경세포 사멸과 허혈 재관류 손상에서 경색영역 (infarct area) 확산에 기여하는 중요한 요소이다³⁾. 그리고 미세아교세포

*Corresponding author : Youn-Sub Kim, Department of Anatomy-Pointology, Gachon University
· Tel : +82-31-750-5420 · FAX : +82-31-750-5416 · E-mail : ysk5708@hanmail.net

#First author : Hung-Gi, Lee, Department of Anatomy-Pointology, Gachon
· Tel : +82-31-750-5427 · FAX : +82-31-750-5416 · E-mail : omd1969@empal.com
· Received : 08 December 2014 · Revised : 02 February 2015 · Accepted : 02 February 2015

포로 인한 중추신경염증은 뇌 허혈, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 루게릭병과 같은 신경퇴행성 질환 및 다양한 신경학적 발병과 강한 관련성이 있다고 한다⁴⁻⁶.

Kaempferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)은 馬牙木屬⁷, 紅花⁸, 靑黛⁹, 山養蔘¹⁰, 菟絲子¹¹ 등에 함유되어 있는 플라보노이드 성분중 하나이다. Kaempferol의 실험적 연구에서 알레르기성 천식 생쥐¹², lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 유선염 생쥐¹³, 텍스트란 황산나트륨으로 유도된 궤양성 대장염 생쥐¹⁴ 및 카라기난을 이용한 air pouch model 쥐에서¹⁵ 항염증 효과가 있다고 보고되었다.

이에 저자는 kaempferol이 중추신경계 염증에도 효과가 있을 것이라고 생각되어 kaempferol의 중추신경계에 대한 항염증 효능을 연구하였다. LPS를 생쥐 복강에 투여하여 염증을 유발시킨 후 뇌조직에서 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 interleukin-6 (IL-6) mRNA 발현과 Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA 발현을 살펴보고 중추신경계염증의 특징인 미세아교세포의 활성을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로 C57BL/6 생쥐 (25-28 g) 수컷을 나라바이오텍 (Nara Biotech nology, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 생쥐는 온도 (21-23°C), 습도 (40-60%)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 동물실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 먹을 수 있게 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물 및 시약

본 실험에 사용한 kaempferol (C₁₅H₁₀O₆; Molar mass, 286.24; #K0133)과 lipopolysaccharide (LPS; from Escherichia coli O55:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) antibody (#016-20001, #019-19741)는 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)에서, mouse anti- β -actin antibody는 Chemicon International (Temecula, CA, USA)에서, goat anti-rabbit와 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 이외의 모든 시약들은 전문제조회사의 최고 품질 시약을 구입하여 사용하였다.

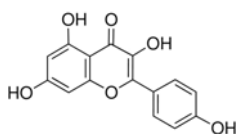


Fig. 1. Chemical structure of kaempferol

3. 실험군의 구분 및 처치

생쥐를 무작위로 5개 군으로 구분하였다. 정상군 (Normal)은 약물처치 없이 통상적으로 사육되었으며, 대조군 (Control)은 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다. Kaempferol의 투여량에 따라 10 mg/kg 투여군과 20 mg/kg 투여군 및 30 mg/kg 투여군으로 구분하였으며, 각각의 용량을 생리식염수에 녹여 LPS의 복강주사 1시간 전에 1회 경구투여 하였다. 실험동물은 real-time polymerase chain reaction (PCR) 측정에 30마리, Western blotting 측정에 18마리, 면역조직화학염색에 18마리, 총 66마리의 생쥐가 사용되었다.

4. 염증유발 사이토카인과 COX-2 mRNA의 real-time PCR 측정

염증유발 사이토카인 중 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 COX-2 mRNA 발현을 뇌조직에서 정량적인 real-time PCR 방법으로 측정하였다. Kaempferol 처치와 LPS 복강주사 4시간 후에 생쥐를 단두로 희생시키고 뇌를 적출한 다음, 뇌조직으로부터 Trizol (Qiagen, Germany)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 이후 1 μ g의 total RNA와 Script cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 DNA로 역전사 하였으며, 정량적 real-time PCR은 CFX 96 REAL-TIME PCR Detection System (Bio-Rad, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, USA)와 preoptimized primer/probe mixture를 사용하여 측정하였다. Housekeeping gene으로는 β -actin을 사용하였으며, 측정에 사용된 gene의 primer sequence는 아래 Table 1과 같다. 이외 측정방법은 제조사의 사용설명서에 따랐으며, 각 시료로부터 측정된 mRNA 발현량은 β -actin 발현에 대해 정량화된 cycle time value로서 측정치가 1인 기준시료의 배수 (fold change)로 표시되었다.

Table 1. Primer Sequences

TNF- α	forward	5'-TGA GAA GTT CCC AAA TGG C-3'
	reverse	5'-GCT ACA GGC TTG TCA CTC-3'
IL-1 β	forward	5'-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3'
	reverse	5'-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'
IL-6	forward	5'-AGA CTT CAC AGA GGA TAC CA-3'
	reverse	5'-GCA TCA TCG TTG TTC ATA CA-3'
COX-2	forward	5'-GCT GGC CTG GTA CTC AGT AGG TT-3'
	reverse	5'-CGA GGC CAC TGA TAC CTA TTG C-3'
β -actin	forward	5'-TTT CCA GCC TTC CTT GGG TAT G-3'
	reverse	5'-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC-3'

5. Iba1 발현의 western blotting 측정

염증유발 사이토카인 mRNA의 real-time PCR 측정용과는 별도의 생쥐를 kaempferol 처치와 LPS 복강주사 4시간 후에 생쥐를 단두로 희생시키고 뇌를 적출한 다음, 뇌조직을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣고 얼음으로 차갑게

한 상태에서 균질화한 다음 원심분리(13000 rpm, 10분)하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50 µg의 단백질을 포함한 용해물을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, western blotting을 시행하였다. 1차항체는 rabbit anti-Iba1 antibody (#016-20001, Wako, Japan)와 mouse anti-β-actin antibody (MAB1501, Chemicon, USA)를 사용하였다. Detection reagent인 ECL은 Amersham(UK)사, developer는 JPI healthcare co(Korea) 제품을 사용하였다. 그리고 Gel Documentation(Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였다.

6. 뇌조직의 처리

Real-time PCR 및 Western blotting 측정용과는 별도의 생쥐를 kaempferol 투여와 LPS 복강주사 4시간 후에 tiletamine과 zolazepam (50:50, 18 mg/kg, Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France)으로 깊게 마취한 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시킨 다음 뇌조직을 -40°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30 µm 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

7. 미세아교세포의 면역조직화학염색

미세아교세포를 면역조직화학염색하기 위해, 뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어 낸 후, 미세아교세포 표식자인 anti-Iba1 (1:500, #019-19741, Wako, Japan)을 1차 항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다. Iba1에 면역염색된 미세아교세포는 CCD camera (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

8. 미세아교세포에 대한 영상분석

Iba1에 면역염색된 미세아교세포의 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 뇌 부위별로 Iba1 양성반응의 미세아교세포 수와 크기 및 면적비율을 ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 광학현미경에서 컬러영상을 받고 (step-1), 그 영상을 흑백이치영상 (black-white binary image)으로 변환시키고 (step-2), 다음 원본 영상과 대조하여 gray value를 결정하고 (step-3), 결정된 gray value보다 높은 값의 pixel들을 선정하여 그 수

와 크기 및 면적비율을 측정하였다 (step-4) (Fig. 2). 면역염색된 미세아교세포의 특성에 따라 대뇌피질 부위와 시상하부 부위에서는 일정면적 (100,000 µm²) 당 미세아교세포의 수와 미세아교세포의 크기를, 해마의 치상회 부위에서는 Iba1이 발현된 미세아교세포의 면적비율을 측정하였다. 측정된 뇌 부위는 Fig. 3과 같으며, 각 실험동물 당 4장의 조직표본, 각 조직표본 당 3개의 부위에 대해 영상분석을 실시하고 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

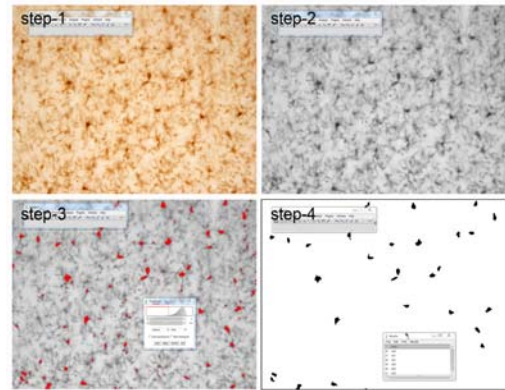


Fig. 2. Representative process of image analysis. Capture of original image (step-1), inverting to black-white binary image (step-2), determination of threshold gray value and pixels definition, refer to original image (step-3), measurement of all pixels which gray value is greater than threshold (step-4).

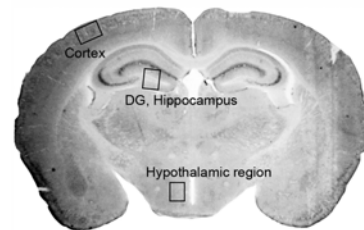


Fig. 3. Brain areas to process the image analysis.

9. 통계처리

본 연구에서 제시된 자료들은 Mean ± Standard error로 표시하였으며, 각 자료의 통계적 유의성 검증은 student's t-test와 ANOVA 분산분석을 사용하여 Control군과 kaempferol 투여군들 사이에 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 뇌조직의 염증유발 사이토카인과 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

뇌조직의 염증유발 사이토카인 및 염증 관련인자로 TNF-α와 IL-1β, IL-6 및 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 kaempferol 10 mg/kg과 20 mg/kg 및 30 mg/kg을 용량별로 투여한 후 관찰하였다.

1) TNF- α mRNA 발현의 변화

염증유발 싸이토카인의 일종인 TNF- α mRNA 발현을 LPS 처리 4시간 후에 뇌조직에서 real-time PCR 방법으로 측정된 결과, Normal군의 4.0 \pm 0.6 배에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 TNF- α mRNA 발현이 16.8 \pm 2.7 배로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 10 mg/kg 투여군은 11.6 \pm 1.2 배, 20 mg/kg 투여군은 8.1 \pm 1.6 배, 30 mg/kg 투여군은 6.6 \pm 1.2 배로, Control군에 비하여 kaempferol 20 mg/kg 투여군은 $p < 0.05$, 30 mg/kg 투여군은 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 TNF- α mRNA 발현의 감소가 나타났다(Fig. 4).

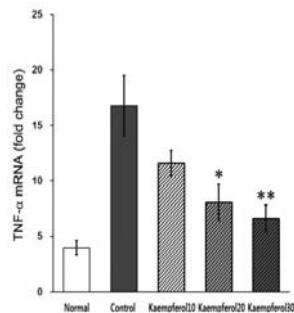


Fig. 4. Effect of kaempferol on TNF- α mRNA in the LPS-treated mouse brain tissue. Control treated LPS only increases brain TNF- α mRNA, while kaempferol 20 and 30 mg/kg attenuated brain TNF- α mRNA. The values represent the mean \pm SEM (n=6 in each group). $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. Control.

2) IL-1 β mRNA 발현의 변화

염증유발 싸이토카인의 일종인 IL-1 β mRNA 발현을 LPS 처리 4시간 후에 뇌조직에서 real-time PCR 방법으로 측정된 결과, Normal군의 42.9 \pm 7.9 배에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 IL-1 β mRNA 발현이 287.4 \pm 46.5 배로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 10 mg/kg 투여군은 204.8 \pm 28.3 배, 20 mg/kg 투여군은 99.0 \pm 17.0 배, 30 mg/kg 투여군은 69.6 \pm 10.7 배로, Control군에 비하여 kaempferol 20과 30 mg/kg 투여군 모두 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소가 나타났다(Fig. 5).

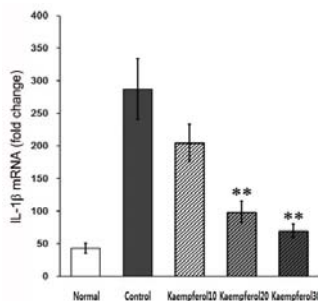


Fig. 5. Effect of kaempferol on IL-1 β mRNA in the LPS-treated mouse brain tissue. Control group treated LPS only increases brain IL-1 β mRNA, while kaempferol 20 and 30 mg/kg attenuated brain IL-1 β mRNA. The values represent the mean \pm SEM (n=6 in each group). $p < 0.01$ vs. Control.

3) IL-6 mRNA 발현의 변화

염증유발 싸이토카인의 일종인 IL-6 mRNA 발현을 LPS 처리 4시간 후에 뇌조직에서 real-time PCR 방법으로 측정된 결과, Normal군의 31.9 \pm 4.0 배에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 IL-6 mRNA 발현이 111.8 \pm 14.6 배로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 10 mg/kg 투여군은 80.1 \pm 8.1 배, 20 mg/kg 투여군은 61.7 \pm 6.1 배, 30 mg/kg 투여군은 42.6 \pm 1.7 배로 Control군에 비하여, kaempferol 20 mg/kg 투여군은 $p < 0.01$, 30 mg/kg 투여군은 $p < 0.001$ 의 매우 유의성 있는 IL-6 mRNA 발현의 감소가 나타났다(Fig. 6).

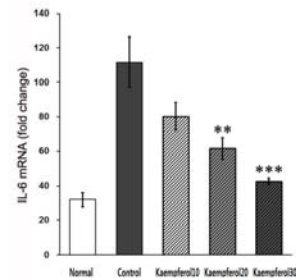


Fig. 6. Effect of kaempferol on IL-6 mRNA in the LPS-treated mouse brain tissue. Control group treated LPS only increases brain IL-6 mRNA, while kaempferol 20 and 30 mg/kg attenuated brain IL-6 mRNA. The values represent the mean \pm SEM (n=6 in each group). $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs. Control.

4) COX-2 mRNA 발현의 변화

뇌조직에서 염증 관련인자인 COX-2 mRNA 발현을 LPS 처리 4시간 후에 real-time PCR 방법으로 측정된 결과, Normal군의 1.17 \pm 0.18 배에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 COX-2 mRNA 발현이 4.52 \pm 0.66 배로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 10 mg/kg 투여군은 2.66 \pm 0.39 배, 20 mg/kg 투여군은 2.36 \pm 0.28 배, 30 mg/kg 투여군은 1.80 \pm 0.26 배로, Control군에 비하여 kaempferol 10과 20 mg/kg 투여군은 $p < 0.05$, 30 mg/kg 투여군은 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 COX-2 mRNA 발현의 감소가 나타났다(Fig. 7).

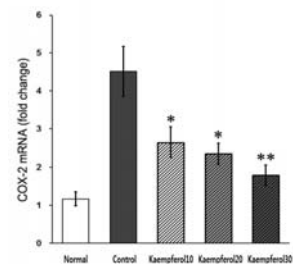


Fig. 7. Effect of kaempferol on COX-2 mRNA in the LPS-treated mouse brain tissue. Control group treated LPS only increases brain COX-2 mRNA, while kaempferol 10, 20, and 30 mg/kg attenuated brain COX-2 mRNA. The values represent the mean \pm SEM (n=6 in each group). $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. Control.

2. 뇌조직의 미세아교세포 활성화에 미치는 영향

뇌조직의 미세아교세포 활성화에 미치는 영향은 뇌조직의 염증유발 싸이토카인과 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향에서 모든 지표에 대해 유의한 억제효능을 나타낸 kaempferol 30 mg/kg 투여군에서 관찰하였다.

1) Iba1 단백질 발현의 변화

뇌조직에서 미세아교세포 활성화의 표지단백질인 Iba1 발현을 LPS처리 4시간 후에 Western blotting 방법으로 측정된 결과, Normal군의 100%에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 Iba1 단백질 발현이 $237.3 \pm 16.2\%$ 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 $181.9 \pm 10.0\%$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 Iba1 단백질 발현의 억제가 관찰되었다(Fig. 8).

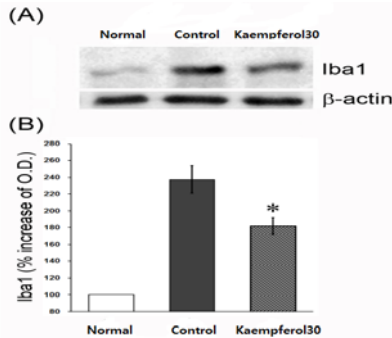


Fig. 8. Effect of kaempferol on Iba1 expression in the LPS-treated mouse brain. Representative Western blots illustrate differences in the bands of Iba1 (A). Control group treated LPS only up-regulates Iba1 expression in brain tissue, while kaempferol 30 mg/kg attenuated up-regulation of Iba1 expression (B). The values represent the mean \pm SEM ($n=6$ in each group). $p < 0.05$ vs. Control.

2) 대뇌피질에서 미세아교세포 수와 크기의 변화

대뇌피질에서 미세아교세포의 표지단백질인 Iba1에 양성반응을 나타낸 미세아교세포의 수를 측정하였다. Normal군의 45.7 ± 2.8 개/ $10^5 \mu m^2$ 에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 미세아교세포의 수가 77.8 ± 5.5 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 58.0 ± 5.3 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 미세아교세포 수의 감소가 관찰되었다. 또한 미세아교세포의 크기를 관찰한 결과 Normal군의 $52.76 \pm 0.25 \mu m^2$ 에 대하여 Control군은 미세아교세포의 크기가 $57.15 \pm 0.73 \mu m^2$ 로 증가하였으며, kaempferol 30 mg/kg 투여군은 $55.70 \pm 0.78 \mu m^2$ 로 Control군에 비하여 크기가 감소는 하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 9).

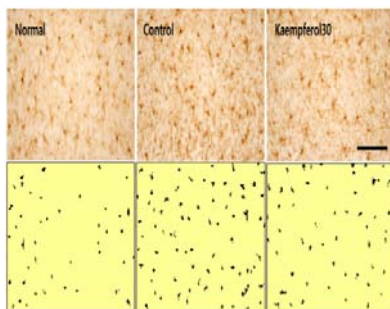


Fig. 9. Representative photographs show Iba1 immuno-stained microglia in the cerebral cortex of LPS-treated mouse brain. Upper column image is an original image and lower column image is the image produced from image analysis. Kaempferol 30 mg/kg shows decreases in number and cell size of microglia as compared to the Control (treated LPS only). Scale bar is 100 μm , applicable to all sections.

3) 해마에서 미세아교세포 면적비율의 변화

치상회 부위를 중심으로 한 해마에서는 조직 구조와 Iba1에 대한 면역염색 결과의 특성상 미세아교세포의 수와 크기를 측정하지 못하고 미세아교세포의 면적비율을 측정하였다. 그 결과, Normal군의 $2.36 \pm 0.13\%$ 에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 미세아교세포의 면적비율이 $5.08 \pm 0.39\%$ 로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 $3.27 \pm 0.41\%$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 미세아교세포 면적비율의 감소가 관찰되었다(Fig. 10).

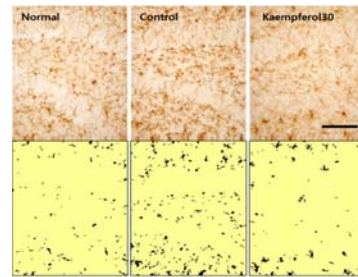


Fig. 10. Representative photographs show Iba1 immuno-stained microglia in the hippocampus of LPS-treated mouse brain. Upper column image is a representative original image and lower column image is the image produced from image analysis. Kaempferol 30 mg/kg group shows a decrease in microglia activation as compared to the Control (treated LPS only). Scale bar is 100 μm , applicable to all sections.

4) 시상하부에서 미세아교세포 수와 크기의 변화

시상하부 부위에서 미세아교세포의 표지단백질인 Iba1에 양성반응을 나타낸 미세아교세포의 수를 측정된 결과, Normal군의 30.7 ± 1.5 개/ $10^5 \mu m^2$ 에 대하여 LPS만 처리한 Control군은 미세아교세포의 수가 57.3 ± 2.9 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 증가하였다. 이에 비하여 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 41.2 ± 2.1 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 미세아교세포 수의 감소가 관찰되었다. 또한 미세아교세포의 크기를 관찰한 결과 Normal군의 $50.33 \pm 1.60 \mu m^2$ 에 대하여 Control군은 미세아교세포의 크기가 $80.46 \pm 2.35 \mu m^2$ 로 크게 증가하였으며, kaempferol 30 mg/kg 투여군은 $71.91 \pm 1.99 \mu m^2$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 미세아교세포 크기의 감소가 관찰되었다(Fig. 11).

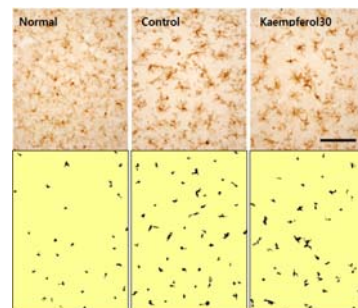


Fig. 11. Representative photographs show Iba1 immuno-stained microglia in the hypothalamic region of LPS-treated mouse brain. Upper column image is a representative original image and lower column image is the image produced from image analysis. Kaempferol 30 mg/kg shows decreases in number and cell size of microglia as compared to the Control (treated LPS only). Scale bar is 100 μm , applicable

고찰

Kaempferol은 피토에스트로겐으로 가장 일반적인 식이 플라보노이드 중 하나이며⁷⁾, 플라보노이드가 풍부한 음식과 음료의 섭취는 다양한 신경계 장애와 연관된 신경계퇴행을 억제하고 뇌의 퇴화를 억제하거나 방지한다¹⁶⁾.

Kaempferol은 chang liver 세포에서 inducible NO synthase (iNOS)와 COX-2 mRNA 와 nuclear factor-kappa B (NF-kB)의 활성을 억제하고¹⁷⁾ LPS로 유도된 RAW264.7 세포와¹⁸⁾ BV2 미세아교세포에서¹⁹⁾ TNF- α 와 IL-1 β 생성 및 COX-2의 수준을 낮추었다. 또한 kaempferol은 뇌 허혈/재관류 손상 쥐와²⁰⁾ 파킨슨병 동물모델 쥐에서²¹⁾ 신경보호 효과가 있었다.

저자는 kaempferol의 중추신경계에 대한 항염증 작용을 살펴 보기위해 생쥐에 LPS 복강주사 1시간 전에 kaempferol을 경구투여 하였다. 그리고 LPS 복강주사 4시간 후 뇌조직을 적출하여 real-time PCR을 이용하여 염증유발 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA와 COX-2 mRNA 발현을, western blot과 면역조직화학염색으로 미세아교세포 활성을 관찰하였다.

LPS는 염증의 가장 강력한 세포독성 유도인자의 하나이다²²⁾. 미세아교세포 표면의 toll-like receptor4 (TLR4)에 LPS의 결합은 염증성 사이토카인, 케모카인과 같은 효과인자와 iNOS와 COX-2를 포함한 유도효소 그리고 증폭인자 조정 및 변환기와 NF-kB의 활성화를 야기 한다²³⁻²⁵⁾. 이로 인하여 미세아교세포가 활성화되고, 이어서 염증유발 사이토카인, 염증유발 효소 및 염증유발 접착분자와 같은 염증에 관련된 유전자의 과잉 발현에 의해 뇌조직의 염증을 확산시키고 신경세포를 손상 시킨다²⁶⁾.

중추신경계에서 TNF- α 는 주로 감염과 부상 등의 다양한 자극에 대한 반응으로 활성화된 미세아교세포 의해 생성된다. TNF- α 는 중추신경계염증의 주요 매개인자로 TNF- α 의 농도 증가는 다양한 신경퇴행과 신경독성에 기여하고 있다²⁷⁾. IL-1 β 는 급성 및 만성 염증 유도에 즉각적이고 직접적인 역할을 한다²⁸⁾. IL-6은 TNF- α 와 IL-1 β 의해 촉발되는 중요한 염증성 매개인자로 고농도의 IL-6는 신경세포 사멸을 이르게 한다²⁹⁾. 또한, TNF- α 는 염증의 연쇄반응을 일으키며 IL-1 β , IL-6와 함께 공동상승 작용한다³⁰⁾.

본 실험에서 TNF- α mRNA 발현은 kaempferol 20 mg/kg과 30 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 그리고 IL-1 β mRNA 발현도 kaempferol 20mg/kg과 30 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. IL-6 mRNA 발현도 kaempferol 20 mg/kg과 30 mg/kg의 투여군에서 매우 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이러한 결과들은 kaempferol이 LPS에 유도된 뇌조직 염증유발 사이토카인 mRNA 발현을 유의하게 억제하였다.

COX-2 mRNA의 발현은 주로 신경세포에서 관찰되며 다양한 염증원에 의해 급속히 발현되기 때문에 급성 염증반응의 핵심 요소이다. 그리고 조직 대부분에서 염증성 자극에 의해 유도되는 특징을 가지고 있으며 과잉 발현 시 직접적으로 신경세포의 손상을 초래한다³¹⁻³³⁾.

본 실험에서 COX-2 mRNA 발현은 kaempferol 10mg/kg, 20 mg/kg 및 30 mg/kg의 투여군에서 유의성 있는 감소

를 나타내었다.

미세아교세포는 중추신경계에 상주하는 면역 감시 세포이고 뇌의 숙주 방어 및 조직을 치료하는 역할을 한다¹⁹⁾. 그러나 미세아교세포는 뇌조직의 상해나 면역성 자극이 가해지면 활성화 형태로 변하여 운동성과 식작용을 갖는 아메바형태로 변한다³⁴⁾. 활성화된 미세아교세포는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2)를 분비하며, 이들은 신경기능장애와 세포사멸을 야기하여 궁극적으로 악순환의 고리를 생성시킨다³⁵⁻³⁷⁾.

본 실험에서 Iba1 단백질의 발현은 kaempferol 30 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 억제되었다. 미세아교세포의 수는 대뇌피질과 시상하부 모두에서 유의성 있는 감소가 관찰되었고 크기도 시상하부에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 그리고 해마에서도 유의성 있는 미세아교세포의 면적비율 감소가 관찰되었다.

이러한 결과들을 종합해보면, kaempferol은 LPS에 의한 생쥐 뇌조직에서 염증유발 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 COX-2의 mRNA의 발현을 현저히 감소시키고 중추신경계 염증의 특징인 미세아교세포의 활성을 억제시킴으로써 중추신경계 염증에 대한 항염증 효과를 발휘하는 것으로 판단된다.

결론

Kaempferol의 중추신경계염증에 대한 효능을 관찰하기 위하여 생쥐에 LPS를 복강주사하고 뇌조직에서 염증유발 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현과 COX-2 mRNA 발현을 살펴보고 중추신경계염증의 특징인 미세아교세포의 활성을 관찰한 결과 다음과 같다.

1. Kaempferol 20 mg/kg과 30 mg/kg 투여 군에서 Control 군에 비하여 유의성 있는 TNF- α mRNA 발현의 감소가 나타났다.
2. Kaempferol 20 mg/kg과 30 mg/kg 투여 군에서 Control 군에 비하여 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소가 나타났다.
3. Kaempferol 20 mg/kg과 30 mg/kg 투여 군에서 Control 군에 비하여 매우 유의성 있는 IL-6 mRNA 발현의 감소가 나타났다.
4. Kaempferol 10mg/kg과 20mg/kg 및 30 mg/kg 투여한 모든 군에서 Control군에 비하여 유의성 있는 COX-2 mRNA 발현의 감소가 나타났다.
5. Kaempferol 30 mg/kg 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 Iba1 단백질 발현의 억제가 관찰되었다.
6. 대뇌피질에서 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 Control 군에 비하여 유의성 있는 미세아교세포 수의 감소가 관

찰되었다.

7. 해마에서 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 미세아교세포 면적비율의 감소가 관찰되었다.
8. 시상하부에서 kaempferol 30 mg/kg 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 미세아교세포 수와 크기의 감소가 관찰되었다.

이러한 결과들로 보아 kaempferol이 중추신경계의 염증에 효과가 있었다.

References

1. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 2009 ; 108(6) : 1343-59.
2. Das S, Basu A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci. Res*, 2008 ; 86(6) : 1199-208.
3. Liu T, Zhang T, Yu H, Shen H, Xia W. Adjuvant protects against cerebral ischemia reperfusion injury by inhibition of neuroinflammation and blood-brain barrier disruption. *J Neuroinflammation*, 2014 ; 11(1) : 107.
4. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*, 2002 ; 3(3) : 216-27.
5. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, 2005 ; 76(2) : 77-98.
6. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 2010 ; 37(3) : 510-8.
7. Olszewska M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species. *J Pharm Biomed Anal*, 2008 ; 48(3) : 629-35.
8. Yu L, Chen C, Wang LF, Kuang X, Liu K, Zhang H, Du JR. Neuroprotective effect of kaempferol glycosides against brain injury and neuroinflammation by inhibiting the activation of NF- κ B and STAT3 in transient focal stroke. *PLoS One*, 2013 ; 8(2) : e55839.
9. Oh HA, Han NR, Kim MJ, Kim HM, Jeong HJ. Evaluation of the effect of kaempferol in a murine allergic rhinitis model. *Eur J Pharmacol*, 2013 ; 718(1-3): 48-56.
10. Kim TH, Ku SK, Bae JS. Inhibitory effects of kaempferol-3-O-sophoroside on HMGB1-mediated proinflammatory responses. *Food Chem Toxicol*, 2012 ; 50(3-4) : 1118-23.
11. Lin MK, Yu YL, Chen KC, Chang WT, Lee MS, Yang MJ, Cheng HC, Liu CH, Chen DzC, Chu CL. Kaempferol from Semen cuscudae attenuates the immune function of dendritic cells. *Immunobiology*, 2011 ; 216(10) : 1103-9.
12. Gong JH, Shin D, Han SY, Kim JL, Kang YH. Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma. *J Nutr*, 2012 ; 142(1) : 47-56.
13. Cao R, Fu K, Lv X, Li W, Zhang N. Protective effects of kaempferol on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation*, 2014 ; 37(5) : 1453-8.
14. Park MY, Ji GE, Sung MK. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci*, 2012 ; 57(2) : 355-63.
15. Mahat MY, Kulkarni NM, Vishwakarma SL, Khan FR, Thippeswamy BS, Hebbali V, Adhyapak AA, Benade VS, Ashfaq SM, Tubachi S, Patil BM. Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. *Eur J Pharmacol*, 2010 ; 642(1-3) : 169-76.
16. Spencer JP. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc*, 2010 ; 69(2) : 244-60.
17. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*, 2007 ; 557(2-3) : 221-9.
18. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 1999 ; 20(10) : 1945-52.
19. Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol*, 2011 ;

- 164(3) : 1008–25.
20. Lo'pez-Sa'nchez C, Martín-Romero FJ, Sun F, Luis L, Samhan-Arias AK, García-Martínez V, Gutie'rrez-Merino C. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion -induced damage in rat brain. *Brain Res.* 2007 ; 1182 : 123–137.
 21. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012 ; 33(4) : 767–85.
 22. Wong PM, Chugn SW, Sultzer BM. Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin. *Scand J Immunol.* 2000 ; 51(2) : 123–7.
 23. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001 ; 1(2) : 135–45.
 24. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2009 ; 59(2) : 278–92.
 25. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010 ; 140(6) : 918–34.
 26. González-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 1999 ; 22 : 219–40.
 27. Liu S, Wang X, Li Y, Xu L, Yu X, Ge L, Li J, Zhu Y, He S. Necroptosis Mediates TNF-Induced Toxicity of Hippocampal Neurons. *Biomed Res Int.* 2014 ; 2014 : 290182.
 28. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2001 ; 107(12) : 1529–36.
 29. Chen SF, Hsu CW, Huang WH, Wang JY. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 2008 ; 155(8) : 1279–96.
 30. Chen X, Yang X, Liu T, Guan M, Feng X, Dong W, Chu X, Liu J, Tian X, Ci X, Li H, Wei J, Deng Y, Deng X, Chi G, Sun Z. Kaempferol regulates MAPKs and NF- κ B signaling pathways to attenuate LPS-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 2012 ; 14(2) : 209–16.
 31. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol.* 1999 ; 13(1) : 45–82.
 31. Aid S, Bosetti F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie.* 2011 ; 93(1) : 46–51.
 33. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res.* 2014 ; 79 : 1–12.
 34. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 1999 ; 57(6) : 563–81.
 35. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995 ; 21(2) : 195–218.
 36. Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem.* 2001 ; 77(1) : 182–9.
 39. Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006(1) ; 84 : 49–59.