



Original Article / 원저

미세아교세포에서 알츠하이머형 치매 치료 처방인 뇌명산(腦明散)의 효능 및 기전연구

한상태¹, 정지천^{2*}

¹(브레인)동의보감한의원, ²동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects and molecular mechanisms of *Noemyeong-san*, a novel herbal prescription for treating Alzheimer's disease on microglia

Sangtae Han¹, Ji-Cheon Jeong^{2*}

¹(Brain) Donguibogam Korean Medicine, Goyang 10350, Korea

²Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, Goyang 10326, Korea

ABSTRACT

Objectives : Noemyeong-san (NMS) is a novel herbal prescription composed of five oriental medicinal herbs including *Prunellae Spica*, *Betulae Cortex*, *Foeniculi Fructus*, *Asiasari Radix*, and *Clematidis Radix* for treating Alzheimer's disease. In the present study, we investigated the effects and molecular mechanisms of NMS on BV2 microglia to evaluate the potential action of this formula for preventing or treating neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

Methods : To determine the cytotoxicity of NMS on BV2 microglia, the MTT assay was performed. The effects of NMS on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglia were determined with a nitric oxide (NO) assay and western blots for inflammatory mediator-related proteins, mitogen activated protein kinases (MAPKs), nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway-related proteins, and heme oxygenase-1 (HO-1).

Result : NMS inhibited induction of iNOS and COX-2 as well as NO production without affecting the cell viability in LPS-stimulated BV2 microglia. NMS also suppressed activation of ERK and p38 MAPK among main kinases of MAPKs as well as NF- κ B by LPS stimulation. Furthermore, NMS dose-dependently induced the expression of HO-1 and the inhibitory effect of NMS on the production of NO were blocked by pretreatment with an HO-1 inhibitor, Snpp.

© 2017 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results demonstrate that NMS has potent anti-neuroinflammatory effect on the LPS-stimulated microglia. These findings provide evidences for NMS to be considered as a new prescription for preventing or treating neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

Key words : Noemyeong-san, Neurodegenerative disease, Microglia, Neuroinflammation, heme oxygenase-1

I. 緒論

알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 뇌세포의 퇴화로 기억력, 사고력 및 행동상의 문제를 야기하는 뇌 질환이며, 치매의 가장 흔한 형태로 알려져 있다^{1,2)}. 전 세계적으로 고령화의 추세로 알츠하이머병 및 기타치매에 걸린 환자가 매년 증가하고 있으며, 전체 치매 환자 중 55~70%가 알츠하이머형 치매 환자로 추정된다³⁾. 아직까지 알츠하이머병의 발병 원인은 명확히 밝혀지지 않았으며, 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성 감소, beta-amyloid (A β) 축적, 타우(Tau) 단백질의 과인산화로 인한 신경세포의 손상 등이 주된 원인으로 꼽히고 있다. 현재 알츠하이머병 등의 치매 증상에 처방되는 치료제로 아리셉트(Aricept, 성분명: donepezil), 엑셀론(Exelon, 성분명: rivastigmine), 레미닐(Reminyl, 성분명: galantamine), 에비사(Ebixa, 성분명: memantine) 등의 4종이 있으나, 이들은 발병 후 진행 속도를 늦추는 완화제일 뿐, 질환을 근본적으로 개선하는 치료제는 아직 없는 실정이다⁴⁾. 보건복지부에 따르면 2015년 기준으로 한국의 65세 이상 노인 인구 중 9.79%인 약 64.8만 명이 치매로 고통 받고 있으며, 한국은 전세계에서 고령화가 가장 빠르게 진행되고 있어 향후 알츠하이머병 치료제 시장은 급성장할 것으로 예상된다³⁾.

최근까지 알츠하이머병은 병리적 특징인 A β 가 세포 외 공간에 축적되어 형성되는 아밀로이드 플라그(amyloid plaque)와 과인산화된 타우단백질로 이루어진 신경섬유다발성병변(neurofibrillary tangle)을 중심으로 연구되고 있으며, 별아교세포(astrocyte)와 미세아교세포(microglia)와 같은 신경아교세포(neuroglial cell)들이 A β 와 관련된 신경염증 반응에 관여하여 알츠하이머병으로 진행시킨다고 알려졌다^{4,5)}. 뇌에서

대식세포의 역할을 수행하는 미세아교세포(microglia)는 중추신경계(central nervous system) 내 면역 반응을 조절하는 면역세포로서, 외부 물질을 인식하여 제거하고 신경 성장 인자를 분비하여 중추신경계의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다^{4,5)}. 그러나 박테리아의 내독소인 lipopolysaccharide (LPS), human immunodeficiency virus (HIV)의 외부 단백질인 gp120 및 β -amyloid 관련 단백질과 같은 외부 물질들에 의한 미세아교세포의 과도한 활성화는 염증성 매개 인자와 활성산소종의 분비를 촉진하여 과도한 신경염증 반응을 유도하게 되고, 신경독성을 일으켜 신경세포의 손상을 유발함으로써 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증 및 뇌경색 등과 같은 신경퇴행성 질환의 원인이 된다^{6,7)}.

최근 Gomez-Nicola 연구팀에 의해 미세아교세포가 알츠하이머병과 관련된 뇌의 염증을 유발하고, 알츠하이머병 환자의 뇌에는 건강한 사람보다 미세아교세포가 많고, 증세가 심할수록 미세아교세포가 더욱 활성화된다는 사실을 밝히면서, 뇌의 염증을 억제하면 치매 증상의 악화를 막을 수 있다고 보고하였다⁸⁾. 실제로 알츠하이머병의 치료에 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 활용하여, 이들이 알츠하이머병의 발병 및 진행으로부터 보호한다고 밝혀졌으며, 신경염증 조절을 통한 알츠하이머병 치료법도 전임상 및 임상 수준에서 분석되고 있다⁹⁾. 염증반응의 조절이 알츠하이머병의 치료 및 예방의 한 전략으로 알려지면서 미세아교세포의 과도한 활성화 억제를 위한 후보약물 개발 연구가 다양하게 진행되고 있으며, 특히 한국은 합성의약품 중심의 해외 연구 동향과는 달리 천연물신약 중심으로 알츠하이머병 치료제 개발 연구가 활발하다⁴⁾. 이러한 연구 동향을 바탕으로 저자는 임상에서 수년

* Corresponding author : Ji-Cheon Jeong, Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.
Tel : +82-31-961-9001, E-mail: kyjic1931@daum.net

• Received : November 8, 2017 / Revised : November 20, 2017 / Accepted : November 21, 2017

간 알츠하이머병의 예방 및 치료 목적으로 사용 중인 한약재 중에 하고초(夏枯草, *Prunellae Spica*), 화피(樺皮, *Betulae Cortex*), 소회향(小茴香, *Foeniculi Fructus*), 세신(細辛, *Asiasari Radix*), 위령선(威靈仙, *Clematidis Radix*) 등의 조합이 신경계에 작용하여 뇌의 염증반응을 억제할 것으로 예상하여 새로운 처방을 구성하였고, 뇌명산(腦明散, *Noemyeong-san*, NMS)이라 명명하였다. 본 연구에서는 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환에서 뇌명산의 효능을 평가하고자, LPS 자극에 의한 BV2 생쥐 미세아교세포의 활성화로 유도된 신경염증반응에서 효능을 평가하고, 그 조절 기전을 연구하여 알츠하이머병의 예방, 개선 및 치료 후보제로서의 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Anti-COX-2, anti-iNOS, anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-p38, anti-p38, anti-p-JNK, anti-JNK,

anti-p-IkB- α , anti-IkB- α , anti-p-NF- κ B, anti-HO-1, anti- β -actin 항체, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 그 외 LPS (E.coli 055:B5), Griess reagent, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 등 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 뇌명산 물추출물의 제조

본 연구에 사용된 夏枯草(*Prunellae Spica*), 樺皮(*Betulae Cortex*), 小茴香(*Foeniculi Fructus*), 細辛(*Asiasari Radix*), 威靈仙(*Clematidis Radix*)는 ㈜옵니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 선별하고 정선한 후 사용하였고, 뇌명산의 구성 비율은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Prescription of *Noemyeong-san* (NMS).

Herbal Name	Latin Name	Scientific name (Family name)	Ratio	Dosage (g)
夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	- <i>Pueraria lobata</i> Ohwi (Leguminosae)	8	23
樺皮	<i>Betulae Cortex</i>	- <i>Betula platyphylla</i> Suk. var. <i>japonica</i> Hara (Betulaceae)	8	23
小茴香	<i>Foeniculi Fructus</i>	- <i>Foeniculum vulgare</i> Miller (Umbelliferae)	7	20
細辛	<i>Asiasari Radix</i>	- <i>Asiasarum heterotropoides</i> F. Maekawa var. <i>mandshuricum</i> F. Maekawa - <i>Asiasarum sieboldii</i> Miquel var. <i>seoulense</i> Nakai (Aristolochiaceae)	6	17
威靈仙	<i>Clematidis Radix</i>	- <i>Clematis manshurica</i> Ruprecht - <i>Clematis hexapetala</i> Pallas - <i>Clematis chinensis</i> Osbeck (Ranunculaceae)	6	17
Total amount				100

뇌명산 약재 무게의 8배에 해당하는 증류수를 가하여 열탕 추출기(100°C)에서 4시간 동안 끓인 후, 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 두 번 여과하고, 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)에서 감압농축한 후, 동결건조기(freeze dryer,

EYELA)로 동결건조하였다. 뇌명산 물추출물의 수율은 8.6%였으며, 분말을 멸균 증류수에 용해시켜 Minisart® Syringe filter (0.22 μ m, Sartorius AG, Weender Landstr. Germany)로 여과 후, 실험에 따라 적당한 농도로 배지로 희석하여 사용하였다.

3. 세포 배양

본 실험에 사용된 세포인 생쥐 신경미세아교세포주, BV2는 전남대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 사용하였으며, 세포의 배양을 위해 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, WELGENE, Daegu, Korea)과 항생제로 100 U/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin (Gibco, Life Technologies, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WELGENE) 배지를 사용하여, 배양기 내에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

4. MTT assay

BV2 세포에서 뇌명산 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양용 96-well plate에 BV2 세포를 6×10^3 cells/well로 분주하고 12시간 이상 안정화시킨 다음, 뇌명산 추출물을 다양한 농도로 1시간 동안 처리하고 뒤이어 LPS 500 ng/ml을 처리하였다. 24시간 배양 후, MTT 시약(최종 농도 0.2 mg/ml)을 처리하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 배지를 제거하고 DMSO 100 µl를 첨가하여 각 well에 생성된 formazan crystals을 용해시킨 후, GENios-basic microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였다.

5. NO 생성량 측정

BV2 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 12시간 이상 안정화시킨 후, 뇌명산 추출물을 50~500 µg/ml 농도로 1시간 동안 처리한 후, LPS 500 ng/ml를 처리하여 18시간 배양하였다. 그런 다음 배양 배지를 원심분리하여 상층액을 100 µl를 취하고, Griess 용액을 동량으로 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시킨 후, GENios-basic microplate reader (Tecan Austria GmbH)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot analysis

약물처리가 끝난 세포를 모은 후, protease/phosphatase inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 함유한 RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 첨가하여 세포를 lysis 시킨 후, 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 추출하였다.

단백질의 농도는 bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Scientific)으로 정량한 다음, sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하여 단백질을 분리시키고 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전이시킨 다음, 5% skim milk에서 1시간 이상 비특이적인 단백질들에 대하여 blocking을 실시하였다. iNOS, COX-2, p-ERK, ERK, p-p38, p-38, p-JNK, JNK, p-IκB-α, IκB-α, p-NF-κB, HO-1에 대한 1차 항체들을 4°C에서 over night 반응시키고, PBST (PBS with Tween 20)로 3회 세척한 후, 뒤이어 horseradish-peroxidase가 연결된 goat-anti-rabbit 또는 goat-anti-mouse 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후, enhanced chemiluminescence solution (Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 적용시킨 다음 Fusion FX7 chemiluminescence imaging system (Vilber Lourmat, Marne-la-vallée, France)에서 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

7. 통계분석

실험에서 얻은 결과들은 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 기록하였으며, 각 실험군 간의 차이를 분석하기 위하여 GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 일원분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)을 실시하여 비교하였으며, 사후검정은 Tukey's multiple comparison test를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결과

1. 뇌명산 추출물의 세포독성

BV2 생쥐 미세아교세포에서 뇌명산 추출물이 세포독성을 유발하는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 뇌명산 추출물을 10~500 µg/ml 농도로 24시간 처리하였을 때, BV2 세포의 생존율이 90% 이상으로 세포 독성을 유발하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1). 따라서, 향후 실험에서는 뇌명산 추출물을 최고 500 µg/ml 농도까지 처리하는 것으로 실험을 진행하였다.

Figure 1. Effect of Noemyeong-san (NMS) on cell viability of BV2 microglia. Cells were treated with the various concentration of NMS (10~500 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h and cell viability was determined by MTT assay. Results were expressed as relative percentages of non-treated control.

2. 뇌명산 추출물의 신경염증 억제 효과

뇌명산 추출물이 미세아교세포의 활성화로 매개된 신경염증반응에 영향을 미치는지 평가하기 위해, LPS 자극으로 미세아교세포를 활성화시킨 다음 LPS에 의해 유도되는 염증 매개 물질인 NO의 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 양상을 분석하였다. BV2 세포에 500 ng/ml의 LPS 처리는 NO의 생성량을 현저히 증가시켰고, 뇌명산의 전처리는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 농도 의존적으로 NO 생성량을 통계학적으로 유의하게 억제시켰다(Figure 2A). LPS 등의 외부 자극에 의해 L-arginine을 기질로 NADPH와 산소의 존재 하에서 NO를 합성하는 효소인 iNOS도 LPS 처리에 의해 현저히 증가되었으나, 뇌명산 전처리에 의해 농도 의존적으로 발현량이 감소되었다(Figure 2B). 다음으로 NO와 함께 염증성 매개인자로 잘 알려져 있는 PGE_2 의 합성에 관여하는 COX-2 단백질의 발현을 western blot으로 분석해 본 결과, LPS로 유도된 COX-2 단백질의 발현 증가가 뇌명산 추출물의 전처리에 의해 100~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위에서 억제되었다(Figure 2B). 따라서, 뇌명산 추출물은 LPS로 활성화된 미세아교세포에서 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 염증 반응에 중요한 매개인자들의 생성을 효과적으로 차단하는 것을 확인할 수 있었다.

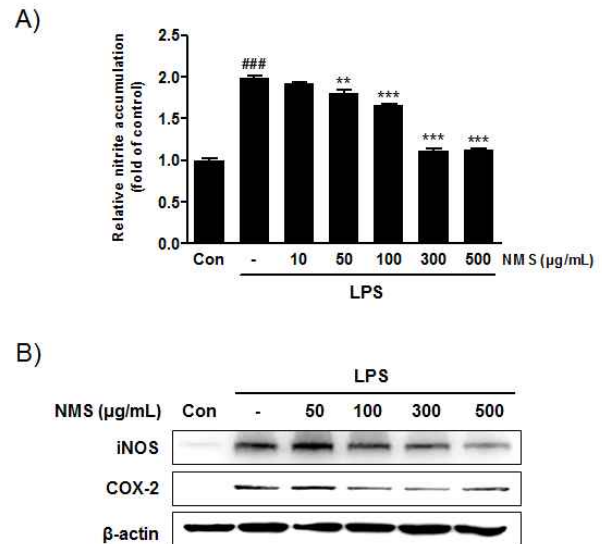


Figure 2. Effects of NMS on NO production and protein expression of iNOS and COX-2 by LPS stimulation in BV2 microglia. Cells were pre-treated with indicated concentration of NMS for 1 h and then stimulated with 500 ng/ml LPS for 18 h. (A) The amounts of NO were determined using Griess reagent. (Significant vs. control, ### $p < 0.001$; significant vs. LPS treatment, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) (B) Protein expression levels of iNOS and COX-2.

3. 활성화된 BV2 미세아교세포에서 뇌명산 추출물의 MAPK 신호전달경로 활성화에 미치는 영향

뇌명산 추출물의 신경염증 억제효능을 나타내는 분자생물학적 기전을 탐색하기 위해 염증반응의 세포내 신호전달경로로 잘 알려진 mitogen activated protein kinase (MAPK) 신호전달경로를 먼저 확인해보았다. MAPK 신호전달경로의 주요 kinase인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK의 인산화를 western blot을 통하여 확인해 본 결과, LPS로 활성화된 BV2 세포는 ERK, JNK 및 p38 MPAK의 인산화된 형태의 단백질이 강하게 발현되는 반면, 뇌명산 추출물의 전처리는 ERK와 p38 MAPK의 인산화를 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 농도 의존적으로 감소시켰고, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 LPS를 처리하지 않은 control과 유사한 수준으로 억제되었다. 그러나 뇌명산 추출물은 JNK

의 인산화에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(Figure 3). 이는 뇌명산 추출물이 LPS로 자극된 미세아교세포의 염증반응을 ERK와 p38 MPAK의 신호전달 경로를 통하여 억제한다는 것을 보여준다.

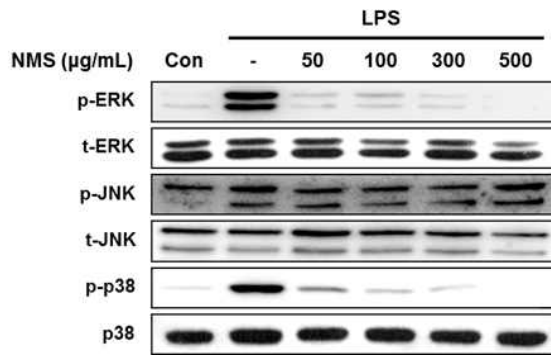


Figure 3. Effect of NMS on the MAPK signaling activation in LPS-stimulated BV2 microglia. Cells were pre-treated with the various concentration of NMS for 18 h and then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 30 min. Phosphorylated and total form proteins of main kinases including ERK, JNK, and p38 MAPK were analysed by western blotting.

4. 활성화된 BV2 생쥐 미세아교세포에서 뇌명산 추출물의 NF-κB 신호전달경로 활성화에 미치는 영향

NF-κB는 면역 세포에서 염증 기전에 관여하는 중요한 전사인자 중 하나로, 뇌명산 추출물의 신경염증 억제효능을 나타내는 분자 생물학적 기전을 탐색하기 위해 NF-κB 신호전달경로의 구성 요소들을 western blot으로 확인해 보았다. BV2 세포에 LPS 처리는 IκB-α의 발현을 현저하게 감소시키고, IκB-α의 인산화된 형태인 p-IκB-α는 강하게 유도하여 뒤이어 NF-κB의 인산화도 증가시켰다. 반면, 뇌명산의 전처리하는 LPS에 의한 IκB-α 단백질의 발현 감소를 억제하였고, p-IκB-α의 발현을 감소시킴으로써 IκB-α의 분해를 억제하였다. 또한 뇌명산 추출물은 100~500 µg/ml의 범위 내에서 p-NF-κB의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰으며, 특히 500 µg/ml의 농도는 control군과 거의 유사하였다(Figure 4). 이는 뇌명산 추출물이 LPS로 자극된 미세아교세포의 염증반응을 NF-κB의 활성화를 통하여 억제한다는 것을 보여준다.

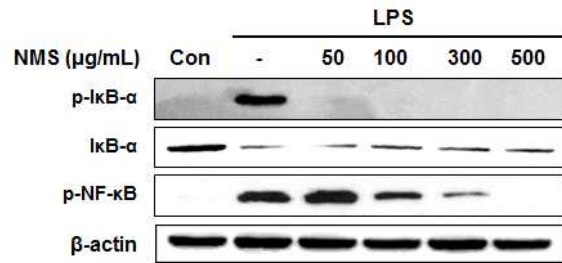


Figure 4. Effect of NMS on NF-κB signaling pathway in LPS-stimulated BV2 microglia. Cells were pre-treated with the various concentration of NMS for 18 h and then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 1 h. Immunoblots showed the protein levels of p-IκB-α, IκB-α, and p-NF-κB.

5. BV2 생쥐 미세아교세포에서 뇌명산 추출물이 HO-1 신호전달경로의 활성화에 미치는 영향

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme을 분해하여 biliverdin, free iron, CO 등을 생성하는데 관여하는 효소로 산화적 스트레스(oxidative stress), 자외선 조사(UV irradiation), 염증성 사이토카인, 중금속 등의 다양한 스트레스인자들로부터 세포를 보호하여 염증 반응을 억제시킨다고 알려져 있다¹⁰⁾. 이를 바탕으로, 뇌명산 추출물이 HO-1 단백질의 발현을 유도하는지 western blot으로 확인해 본 결과, 뇌명산 추출물은 10~500 µg/ml의 범위 내에서 농도 의존적으로 HO-1의 발현을 강하게 유도하였다(Figure 5A). 다음으로 HO-1 단백질의 발현이 LPS 자극에 의한 염증매개인자 NO 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 HO-1 억제제인 Snpp를 전처리한 후, NO 생성량을 측정해 보았다. 그 결과 Snpp 50 nM을 30분 동안 처리한 후, 뇌명산 추출물 500 µg/ml을 처리하여 HO-1 발현을 억제한 후 LPS로 자극시켰을 때, 뇌명산 추출물에 의해 감소되었던 NO의 생성량이 LPS 단독 처리군과 유사한 수준으로 다시 증가하였다(Figure 5A). 이를 통하여 뇌명산 추출물이 HO-1 유도를 통하여 NO의 생성을 억제함으로써 신경염증 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

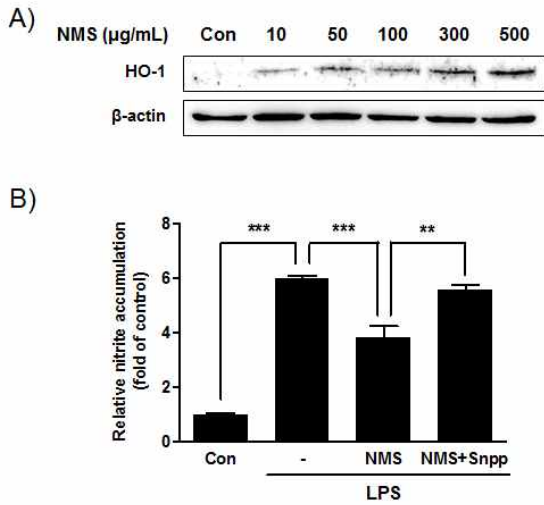


Figure 5. Effect of NMS on the HO-1 signaling pathway in BV2 microglia. (A) Effects of NMS on the induction of HO-1 expression in BV2 microglia. Cells were pre-treated with 10–500 µg/ml of NMS for 18 h. Protein expression of HO-1 in BV2 microglia was assessed by western blotting. (B) Role of HO-1 induction by NMS on the NO production in LPS-stimulated BV2 microglia. Cells were pre-treated with NMS (500 µg/ml) for 1 h in the presence or absence of SnPP (50 nM, 30 min), and then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. Significant **p<0.01 and ***p<0.001.

IV. 고찰

전세계적으로 고령화가 급속도로 진행되면서 노화 관련 질병도 함께 증가하고 있는 추세이며, 특히 치매의 가장 흔한 형태인 알츠하이머병이 급증하고 있으나 현재까지 증상 완화 또는 진행을 지연시키는 약물만 있을 뿐 근본적으로 치료할 수 있는 효과적인 치료제가 없는 실정이므로 글로벌 시장의 미충족 의학적 수요가 높은 영역이다⁴⁾. 따라서 많은 제약사가 관심을 가지고 연구 중에 있으며, 합성의약품과 한방 치료제 비중이 높은 해외와는 달리 국내 제약사는 천연물신약과 줄기세포치료제 등을 중심으로 알츠하이머병 치료제를 개발하여 대부분 임상 1상 혹은 2상 단계에 있다⁴⁾. 천연물신약의 소재로서 한약재가 많이 활용되고 있으며, 한약의 응용 가능성에 대해서도 연

구가 활발히 진행 중이다^{11,12)}. 특히 한의학의 치료법들이 현대 과학적 방법론을 적용하여 검증을 통해 그 효용성을 증명해 나가고 있는데, 대표적인 예로, 알츠하이머형 치매의 치료에 공진단, 조위승청탕 및 건뇌탕 등의 한방처방들을 이용하여 임상시험을 통해 인지 기능 향상, 인지기능의 저하 방지, 인지기능 장애 진행의 지연 등이 보고되기도 하였다^{13–16)}.

본 연구에서는 이러한 연구동향을 바탕으로 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 새로운 한약 처방을 개발하기 위해 미세아교세포의 과도한 활성화 억제를 목표로 뇌명산 추출물의 효능을 평가하였고, 그 기전을 연구하였다. 뇌명산은 (브레인)동의보감 한의원에서 알츠하이머형 치매의 치료 목적으로 임상에서 실제로 사용 중인 경험처방에서 중요 약재로만 구성된 새로운 처방이다. 뇌명산의 구성 처방 중 하고초(夏枯草, *Prunellae Spica*)는 꿀풀과(Labiatae)에 속한 여러해살이 초본식물인 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai) 또는 하고초(*Prunella vulgaris* Linne)의 꽃대로 해독산결(解毒散結), 청설간화(淸泄肝火), 소종(消腫) 등의 효능이 있고, 현재까지 약리연구로 항염증, 항균, 혈당감소, 혈압 하강 작용 등이 보고되어 있다^{17,18)}. 화피(樺皮, *Betulae Cortex*)는 자작나무과(Betulaceae)에 속한 만주자작나무(*Betula platyphylla* Suk.) 또는 자작나무(*Betula platyphylla* Suk. var. *japonica* Hara)의 나무껍질로 청열이습(淸熱利濕), 거담지해(祛痰止咳), 소종해독(消腫解毒) 등의 효능을 가지고 있어, 주로 염증성 질환이나 피부질환에 활용되어 왔다¹⁷⁾. 소회향(小茴香, *Foeniculi Fructus*)은 미나리과(Umbelliferae)에 속한 여러해살이 초본식물인 회향(茴香, *Foeniculum vulgare* Miller)의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 행기화위(行氣和胃), 산한지통(散寒止痛) 등의 효능을 가지고 있으며, 약리연구로 중추억제 작용, 진통 작용, 항암, 항응혈 등의 작용이 알려져 있다^{17,18)}. 세신(細辛, *Asiasari Radix*)은 쥐방울덩굴과(Aristolochiaceae)에 속한 여러해살이 초본식물인 북세신(北細辛, *A. heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.) 혹은 화세신(華細辛, *Asarum sieboldii* Miq.)의 뿌리 및 뿌리줄기로 한의학에서는 거풍산한지통(祛風散寒止痛), 온폐소음지해(溫肺消飲止咳), 개규통비(開竅通鼻) 등의 효능이 알려져 있고, 약리연구로는 항염증, 강심, 항쇼크 작용,

항산화, 항알러지 등의 연구와 더불어 마취, 진통, 최면 작용에 대한 연구도 보고되었다^{17,18)}. 위령선(威靈仙, *Clematidis Radix*)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 위령선(*Clematis chinensis* Osbeck)의 뿌리와 뿌리줄기로 제풍습(除風濕), 통락지통(通絡止痛) 등의 효능이 있으며, 혈당강화, 심근보호, 담즙분비 촉진, 항균, 진통작용 등의 약리연구가 보고되어 있다^{17,18)}.

알츠하이머병, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환 병변 부위에 미세아교세포의 활성화가 관찰되었고, 신경염증이 결국 신경세포 사멸을 유도함으로써 퇴행성 뇌질환의 병리기전에 크게 기여한다고 알려져 신경염증 반응의 억제에 대한 연구들이 활발하다. 본 실험에서 사용한 BV2 세포는 생쥐의 미세아교세포이며, primary 미세아교세포를 대체하여 가장 빈번하게 활용되고 있는 세포주로 LPS로 자극 후 primary 미세아교세포와 비교해본 결과 반응 양상이 매우 유사하다고 알려져 신경염증 모델로 많은 연구들이 진행되어왔다^{19,20)}. LPS는 그람음성균 세포외막에 존재하는 내독소로 미세아교세포를 효과적으로 활성화시킨다고 알려져 있으며, 활성화된 미세아교세포는 NO와 PGE₂와 같은 염증매개인자들을 분비하고, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 등의 염증성 사이토카인들을 분비하여 알츠하이머병의 특징인 아밀로이드 플라그와 신경섬유다발성병변의 생성과 진행에 중요한 신경독성 변화를 일으킨다고 알려져 있다^{6,7,21,22)}. 따라서 뇌명산을 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료 처방으로 알리고자 과학적인 증거를 제시하기 위하여 먼저 LPS로 자극된 BV2 생쥐 미세아교세포의 염증반응에서의 효능을 평가하였다.

본 연구 결과에 따르면, 뇌명산은 미세아교세포에 독성을 일으키지 않는 농도 범위에서 LPS로 유도된 염증매개인자 NO의 생성을 효율적으로 억제하였다. NO는 정상적으로 중추 신경계와 말초 신경계에 일정량 존재하여 세포 내 신호전달 및 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으나, 과량의 NO가 생성될 경우 세포손상, 염증반응 및 신경세포 사멸을 유도한다^{23,24)}. NO를 합성하는 데 관여하는 NO 합성 효소(NOS, nitric oxide synthetase)에는 eNOS (endothelial NOS), nNOS (neural NOS), iNOS (inducible NOS)가 있는데, 이들 중 iNOS는 대식세포에 주로 존재하며 염증성 사이토카인들에 의해 발현이 유도되어 NO를 생성한다²⁵⁾. PGE₂는 손상된 부위나 조직에 국소

적으로 활성화되어 발열과 동통 등을 매개하는 염증매개인자로 면역 및 염증 신호들에 반응하여 만들어지는 COX-2에 의해 합성이 촉진된다²⁶⁾. 본 연구에서도 NO와 PGE₂의 생성에 각각 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현 양상을 분석해본 결과, LPS로 자극된 BV2 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현 증가가 뇌명산 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. 뇌명산의 신경염증 억제효능을 나타내는 기전을 알아보기 위해, 먼저 염증반응의 경로로 잘 알려져 있는 MAPK 신호전달경로에 대해 알아보았다. MAPK는 세포의 증식, 분화, 면역 및 염증반응을 조절한다고 알려져 있고, 특히 LPS (TLR4 리간드)가 TLR4 수용체에 결합하면서 활성화되어 염증매개 인자들의 생성을 유도하며, 대표적으로 ERK, JNK, p38 MAPK 등이 포함되어있다²⁷⁾. LPS로 자극된 BV2세포에서 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 인산화를 western blot으로 분석해 본 결과, LPS에 의해 세 종류의 인산화효소 모두 인산화가 증가되었고, 뇌명산 추출물의 전처리는 ERK와 p38 MAPK의 인산화는 억제되었으나, JNK의 인산화에는 큰 영향을 미치지 못하였다. 따라서 미세아교세포에서 뇌명산이 LPS에 의한 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제시킴으로써 신경염증 억제효능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

LPS에 의해 TLR4 수용체가 자극을 받으면 NF- κ B도 활성화되며, NF- κ B의 활성 조절은 알츠하이머병의 병인이 되는 신경염증의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{28,29)}. NF- κ B는 정상 환경에서는 세포질에 I κ B와 결합하여 존재하다가, 외부 자극에 의해 I κ B가 인산화되면 NF- κ B와 떨어져 나와 분해가 되고, NF- κ B는 결국 핵 안으로 이동하여 염증과 관련된 iNOS와 COX-2 등의 발현을 전사시킨다³⁰⁾. 따라서 본 연구에서도 뇌명산이 LPS로 자극된 BV2세포에서 NF- κ B와 I κ B의 발현에 영향을 미치는지 실험해본 결과, LPS의 처리는 I κ B- α 를 감소시키고, I κ B- α 의 인산화 형태는 강하게 유도하여 NF- κ B의 인산화도 증가되는 것으로 보아 LPS에 의해 I κ B- α 가 분해되어 NF- κ B가 활성화되는 것을 알 수 있었다. 반면, 뇌명산의 전처리는 LPS에 의한 p-I κ B- α 의 발현을 감소시킴으로써 I κ B- α 의 분해를 억제하여 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것을 확인하였다.

HO-1은 cellular defensive phase 2 detoxifying



antioxidant enzyme으로 가장 잘 알려져 있으며, heme을 분해하는 효소로서 스트레스나 염증 환경에서 유도되어 산화적 스트레스로부터 세포 보호, 항산화 및 항염증 작용을 한다³¹⁾. 또한 HO-1은 iNOS의 발현을 조절하는 피드백 억제기전을 가지고 있어 활성화된 면역 세포내 HO-1과 iNOS는 상호조절에 의해 적절한 양이 유지되며, 이것을 통하여 세포의 보호작용에 중요하게 작용한다고 알려졌다^{32,33)}. 많은 연구들이 천연물 유래 소재들, 예를 들어 curcumin³²⁾, aromatic-turmerone³³⁾, morin³⁴⁾, 배암차즈기 잎 추출물³⁵⁾ 등이 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) 활성화를 통하여 HO-1과 같은 다양한 항산화 효소들을 유도하여 항산화 및 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서도 뇌명산 추출물이 HO-1을 유도하는지 확인해 본 결과, HO-1의 발현을 농도 의존적으로 강하게 유도함을 알 수 있었고, HO-1 억제제를 이용한 실험에서도 뇌명산 추출물에 의해 감소되었던 NO의 생성량이 다시 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 뇌명산 추출물이 HO-1 유도로 iNOS의 발현을 억제시키고, 결과적으로 NO의 생성을 저해함으로써 신경염증 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

뇌명산 추출물이 미세아교세포에서 LPS로 유도된 신경염증 모델에 미치는 영향을 연구해본 결과, 미세아교세포의 활성화로 인한 신경염증반응에 뇌명산 추출물이 HO-1의 발현유도와 ERK/p-38 MAPK/NF- κ B의 활성 억제를 통해 NO의 생성을 저해함으로써 신경염증 억제효과가 있음을 보여주었고, 이를 통해 뇌명산 추출물이 알츠하이머병과 같은 신경염증 관련 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료제로서의 가능성과 효용성을 증명하였으므로 향후 임상에서 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. About Alzheimer's. What is Alzheimer's? Available from: URL:https://www.alz.org/asian/about/what_is_alzheimers.asp?nL=KO&dL=KO
2. Alzheimer's disease. Available from: URL:https://ko.wikipedia.org/wiki/%EC%95%8C%EC%B8%A0%ED%95%98%EC%9D%B4%EB%A8%B8%EB%B3%91
3. National Institute of Dementia. Available from: URL:https://www.nid.or.kr/info/diction_list4.aspx?gubun=0401
4. Kim GH and Kim YS. Global market analysis of Alzheimer's disease. Korea Health Industry Development Institute (KHIDI). Health Industry Brief 2017;239:1-16.
5. Kim Jeong Lan. Neuroglial Cell and Alzheimer's Disease. Korean J Biol Psychiatry 2015;22(2):40-6.
6. Arimoto T, Bing G: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. Neurobiol Dis 2003;12:35-45.
7. F. Gonzalez-Scarano, G. Baltuch. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annual Review of Neuroscience. 1999;22:219-40.
8. Olmos-Alonso A, Schettters ST, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, Holscher C, Perry VH, Gomez-Nicola D. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. Brain. 2016;139(Pt 3):891-907.
9. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. CNS Neurol Disord Drug Targets 2011;10:57-67.
10. Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. Arch Biochem Biophys. 2014;564:83-8.
11. Kwon YJ, Cho HY, Whang WW, Cho SH. A Systematic Review of Clinical Studies for Herbal Medicines of Dementia. J. of Oriental Neuropsychiatry. 2010;21(4):151-61.
12. Kim WY, Jeon WK, Heo EJ, Park SY, Han CH.

- Literature Review and suggestions: dementia clinical studies in Korean Oriental Medicine. Korea Journal of Oriental Medicine. 2011;17(2): 39-46.
13. Jung HC, Jang HJ, Sung WY, Lee SH, Son JH, Han SH. A study for Gonggin-dan in patients with mild dementia of Alzheimer type, Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(2):141-8.
 14. Cho SH, Kim JW, Kim HT, Chung KC, Whang WW. A Study of Jowiseungchungtang in patients with mild Dementia of Alzheimer type. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2003;14(1): 17-26.
 15. Kim BG, Kim JW, Kim HT, Jung KC, Whang WW. The effects of Jowiseungchungtang of patients with early DAT using auditory ERP and K-DRS. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2003;14(2):43-59.
 16. Eom HJ, Kim JW, Park EH, Kim HT, Whang WW. The Effects on Kunneotang of Patients with Early Dementia of Alzheimer Type - 12 Months Clinical Study-. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2005;16(1):43-66.
 17. Shin MK. Clinical Traditional Herbalogy. Seoul:Yeong Lim's Publisher. 2000:305-6, 327-9, 383-4, 399-40, 696-7.
 18. Kim YH. Herbalogy. Seoul:Hanol Publisher 2014:76, 259, 371, 387.
 19. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schratzenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. ALTEX. 2009;26(2): 83-94.
 20. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2012;9:115
 21. Woo MS, Jang PG, Park JS, Kim WK, Joh TH, Kim HS. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutylryl-cAMP in BV2 microglial cells. Brain Res Mol Brain Res. 2003;113(1-2):86-96.
 22. Min KJ, Lee SR, Jung IC. Effects of Sungsimjihwang-tang Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 2008;22(5):1178-91.
 23. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed Pharmacother 2004;58:39-46.
 24. Yang YH, Yang Y, Cho DH. Enhancement of Nitric Oxide Production by Corticotropinreleasing Hormone (CRH) in Murine Microglial Cells, BV2. Immune Network 2004;4(1):60-4.
 25. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol. 1992;149:2736-41.
 26. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol. 2012;188(1):21-8.
 27. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev. 2001;81(2):807-69.
 28. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1997;94:2642-7.
 29. Zhou W, Hu W. Anti-neuroinflammatory agents for the treatment of Alzheimer's disease. Future Med Chem 2013; 5(13): 1559-71.
 30. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. Trends Mol. Med. 2007;13: 460-9.
 31. Foresti R, Bains SK, Pitchumony TS, de Castro Brás LE, Drago F, Dubois-Randé JL, Bucolo C, Motterlini R. Small molecule activators of the Nrf2-HO-1 antioxidant axis modulate heme metabolism and inflammation in BV2 microglia cells. Pharmacol Res. 2013 Oct;76: 132-48.
 32. Parada E, Buendia I, Navarro E, Avendaño C, Egea J, López MG. Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and



- glioprotective effects. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Sep;59(9):1690–700.
33. Park SY, Kim YH, Kim Y, Lee SJ. Aromatic-turmerone's anti-inflammatory effects in microglial cells are mediated by protein kinase A and heme oxygenase-1 signaling. *Neurochem Int*. 2012 Oct;61(5):767–77.
34. Dilshara MG, Jayasooriya RG, Lee S, Choi YH, Kim GY. Morin downregulates nitric oxide and prostaglandin E2 production in LPS-stimulated BV2 microglial cells by suppressing NF- κ B activity and activating HO-1 induction. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;44:62–8.
35. Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. Anti-Inflammatory Activity of *Salvia plebeia* R. Br. Leaf through Heme Oxygenase-1 Induction in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012;41(7):888–94.