

LPS로 유도된 미세아교세포에서 작약감초탕의 항염증 효과

문연자^{1,2*}

1 : 원광대학교 한의과대학 해부학교실, 2 : 한국전통의학연구소

Anti-inflammatory activity of jakyakgamcho-tang on Lipopolysaccharide-Stimulated BV-2 Microglia Cells

Yeun-Ja Mun^{1,2*}

1 : Department of Anatomy, School of Korean Medicine

2 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : Jakyakgamcho-tang (JGT) has been traditionally used to treat muscular convulsion and pain in South Korea. According to recent studies, JGT has been reported to have anti-depression, anti-inflammation, anti-oxidative, anti-diabetics, anti-spasm and analgesic effects, but studies on its anti-neuroinflammatory and neuro-protective effect have not been deeply conducted. Thus, we investigated the anti-neuroinflammatory activity of JGT on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse microglia cells.

Methods : To investigate the anti-neuroinflammatory effects of JGT on BV2 microglial cells, we examined the production of nitric oxide (NO) using griess assay, and mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α using real time RT-PCR. Furthermore, to determine the regulating mechanisms of JGT, we investigated the heme oxygenase (HO)-1 by real time RT-PCR.

Results : Pre-treatment of JGT effectively decreased NO production in LPS-stimulated BV2 cells at concentrations without cytotoxicity. Additionally, JGT significantly suppressed the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in LPS-stimulated BV2 cells. Furthermore, JGT activated the HO-1 expression, which is one of the immunomodulatory signaling molecules. And the abolishment of HO-1 by tin protoporphyrin IX (SnPP, the HO-1 inhibitor) reversed the anti-inflammatory activity of JGT in LPS-stimulated BV2 cells.

Conclusions : Our results suggest that the JGT has anti-neuroinflammatory effect through the activation of HO-1 in LPS-stimulated BV2 cells. Thereby, JGT could expected to be used for the prevention and treatment of neurodegenerative disease related to neuroinflammation.

Key words : jakyakgamcho-tang, microglia, neuro-inflammation, lipopolysaccharide, neurodegenerative disease

I. 서 론

신경염증(Neuroinflammation)은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 다발성 경화증 등 퇴행성 신경질환의 악화 요인으로 최근 많은 주목을 받고 있다¹⁾. 중추신경계는 신경세포인 뉴런

(Neuron)과 비신경세포인 교세포(Glia)로 구성되어 있으며 이 중 미세아교세포(Microglia)는 중추신경계에 상주하는 대식세포로서 신경염증에서 중요한 역할을 한다²⁾. 미세아교세포는 신경세포의 발달에 도움을 주고 결합이 존재하는 신경세포와 시냅스를 제거하여 중추신경계의 항상성에 기여하며, 병

*Corresponding and First author : Yeun-Ja Mun, Department of Anatomy, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, 54538 Jeollabuk-do, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6942

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr

· Received : 14 September 2022

· Revised : 21 September 2022

· Accepted : 25 September 2022

원체의 침투 및 비정상적 단백질 축적 등으로부터 신경세포를 보호하고 있다³⁻⁵). 그러나 미세아교세포의 과도한 활성화는 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 전염증성 사이토카인(Pro-inflammatory cytokine)과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증 유발 단백질 등을 분비하여 신경세포를 손상시키고 신경염증을 일으킨다⁶). 이러한 신경염증은 신경 질환, 특히 퇴행성 신경질환의 발달에 관여할 수 있어 최근 퇴행성 신경질환 치료에 있어서 많은 관심을 받고 있다⁷). 따라서, 퇴행성 신경질환의 근본적 치료법이 없는 상황에서 미세아교세포 활성을 조절할 수 있는 항염증, 항산화 효능이 있는 소재의 연구가 필요하다.

작약감초탕(芍藥甘草湯, Jakyakgamcho-tang, JGT)은 작약(芍藥, *Paeonia lactiflora* Pallas)과 감초(甘草, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 두 개의 약재로 구성된 처방으로서 상한론(傷寒論)에 수재되어 있으며 한방(韓方)에서는 완급지통(緩急止痛) 등의 효능이 있어 복통이나 사지 근육의 경련에 대한 진통(鎮痛), 진경(鎮痙)제로 사용되어 왔다⁸). 전통적 효능에 맞추어 최근에는 운동 및 피로 개선, 통증 개선 등에 연구가 진행되고 있으며^{9,10}), 그 외에도 항염증, 항당뇨, 신경세포 보호 작용 등이 보고되고 있지만¹¹⁻¹³), 미세아교세포 염증 억제에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

작약감초탕 구성 약재의 주요 성분이 뇌신경세포 항염증 작용이 탁월하다는 보고로부터^{13,14}) 작약감초탕이 신경염증으로 인한 경련, 통증을 개선하는 데 도움이 될 것으로 판단되어, 본 연구에서는 mouse 유래 microglia cell인 BV2 세포를 사용하여 Lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 신경염증 모델에서 작약감초탕의 항신경염증 효과를 조사하였다. 염증반응에 관여하는 nitric oxide (NO)의 생성 및 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 발현에 미치는 영향을 확인하였고, 염증 조절 기전으로서 heme oxygenase (HO)-1의 활성화에 대한 영향도 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에 사용된 작약, 감초는 광명당 제약(Ulsan, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 작약 50 g, 감초 25 g과 물 1 L를 약탕기(Daewoong, Korea)에 넣고 2시간 30분 동안 전탕하였다. 그 후 여과 과정을 거치고 동결 건조하였다. 동결 건조된 분말은 15.7 g이었고, 실험 시 분말가루를 3차 증류수에 희석하고 여과한 뒤 사용하였다.

2. 세포독성 (WST assay)

BV2 세포를 2×10^5 cells/well의 세포수가 되도록 배지에 현탁하여 24 well plate에 배양하였다. 작약감초탕을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 뒤 상층액을 제거하였다. WST (Abcam, UK)를 처리하여 1시간 동안 배양하고 spectrophotometer

(Molecular Device, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 450 nm에서 측정하였다.

3. Griess assay

NO의 농도는 세포 배양액에 존재하는 NO₂⁻를 인지하는 Griess 시약을 이용하여 검출하였다. 2×10^5 cells/well의 세포수가 되도록 배지에 현탁하여 24 well plate에 배양하고, 작약감초탕을 1시간 전 처리한 뒤 LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 상층액 100 μ L을 수거하여 동량의 Griess 시약과 실온에서 반응시켰으며, 반응액을 spectrophotometer를 이용하여 540 nm 흡광도에서 측정하였다. 세포로부터 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)을 이용한 표준액을 기준(standard curve)으로 계산하였다.

4. RNA 추출 및 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응 (Real time RT-PCR)

전염증성 사이토카인 및 HO-1 측정을 위하여 1×10^6 cells/well의 세포수로 배지에 현탁하여 6 well plate에 배양하였다. HO-1 inducer로서 cobalt protoporphyrin (CoPP, 10 μ M), HO-1 inhibitor로서 tin protoporphyrin IX (SnPP, 5 μ M)를 사용하였다. 작약감초탕을 1시간 전 처리한 뒤 LPS (1 μ g/ml)를 처리하였으며, 6 시간 후 세포 상층액을 제거하고 Easy Blue (iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea) 용액 1 mL에 넣어서 세포를 용해시켰다. Chloroform 200 μ L을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그 후 동량의 isopropanol을 넣어 섞고 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 버려 침전물을 얻었다. 남은 침전물을 80% ethanol로 세척한 후 건조시켰다. 마지막으로 침전물에 DEPC treated water를 15 μ L씩 넣어 RNA를 녹이고 정량하였다. RNA 1 μ g과 cDNA synthesis kit (Toyobo, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA 1 μ L, PCR master mix 4 μ L 및 primer를 넣어 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 10 분, 다음으로 95 $^{\circ}$ C에서 15 초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분을 40 cycle로 반응시켰다. Real-Time PCR에 사용한 Primer는 코스모진텍(Daejeon, Korea)에서 합성하여 사용하였다 (Table. 1).

Table 1. Sequence of primers used for Real-Time PCR

Gene	Primer
IL-1 β (F)	5'-CCT CGT GCT GTC GGA CCC AT-3'
IL-1 β (R)	5'-CAG GCT TGT GCT CTG CTT GTG A-3'
IL-6 (F)	5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'
IL-6 (R)	5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'
TNF- α (F)	5'-AAC TAG TGG TGC CAG CCG AT-3'
TNF- α (R)	5'-CTT CAC AGA GCA ATG ACT CC-3'
HO-1 (F)	5'-CAG GTG ATG CTG ACA GAG GA-3'
HO-1 (R)	5'-GAG AGT GAG GAC CCA CTG GA-3'
GAPDH (F)	5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
GAPDH (R)	5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'

5. 통계 처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하였고 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험 결과는 SPSS for windows Version 12.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA) 분석 프로그램의 one way ANOVA에 준하였고 p -value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. BV2 세포에서 작약감초탕의 세포독성 측정

작약감초탕의 세포독성을 확인하기 위해 WST assay를 실시하였다. BV2 세포에 작약감초탕(0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/mL)을 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤 WST assay를 이용해 세포 생존율을 측정하였다. BV2 세포에서 작약감초탕을 처리하지 않은 대조군에 비해 작약감초탕 2 mg/mL 농도 이상부터 유의적인 세포 생존율 감소가 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 추후 실험은 1 mg/mL 이하의 농도로 진행하였다.

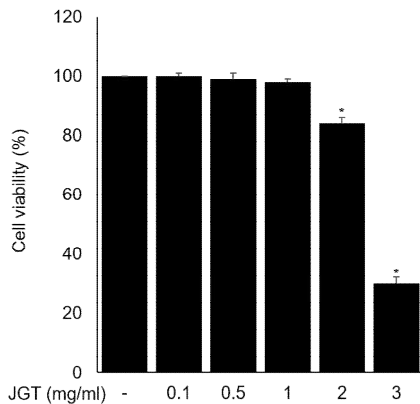


Fig. 1. Effect of JGT on cell viability in BV2 cells. BV2 cells were treated for 24 h with the saline or JGT as indicated concentrations. Cell viability was determined by WST assay, as described in Methods. Data are the mean \pm S.D. * P <0.05 versus the saline treatment.

2. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 작약감초탕의 NO 생성 억제 효과

작약감초탕이 염증 매개 인자 물질인 NO의 생성을 억제하는지 확인하기 위해 Griess assay를 이용하여 NO의 농도를 측정하였다. 작약감초탕(0.1, 0.5, 1 mg/mL)을 1시간 전처리한 후 LPS (1 μ g/mL)를 24시간 처리하였다. LPS로 인해 활성화된 BV2 세포에서 대조군에 비해 유의성 있게 NO가 증가하였다. 그러나 LPS에 의해 증가된 NO는 작약감초탕 처리에 의해 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 2).

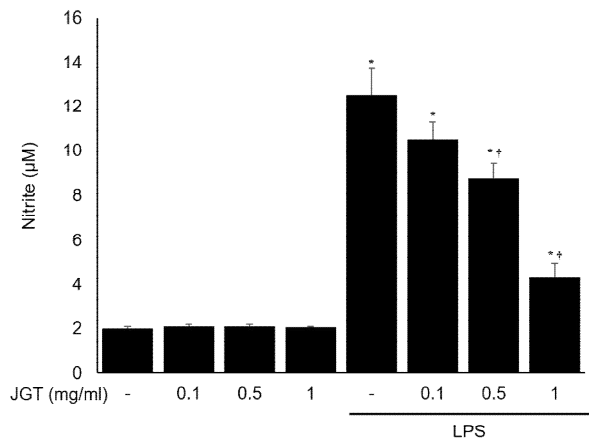


Fig. 2. Effect of JGT on LPS-induced nitrite production in BV2 cells. BV2 cells were incubated with saline, or JGT (0.1, 0.5, and 1 mg/mL) and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL). The concentrations of the nitrite were determined by Griess reagent as described in methods. Data are the mean \pm S.D. * P <0.05 versus the saline. † P <0.05 versus the LPS only.

3. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 작약감초탕의 전염증성 사이토카인의 생성 억제 효과

염증 반응에 관여하는 중요한 인자인 전염증성 사이토카인에 작약감초탕이 미치는 영향을 조사하기 위해 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 수준의 변화를 Real-Time PCR로 확인하였다. 작약감초탕(0.1, 0.5, 1 mg/mL)을 1시간 전처리 하고 LPS (1 μ g/mL)을 6시간 처리한 뒤 세포를 실험에 사용하였다. LPS로 인해 활성화된 BV2 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의

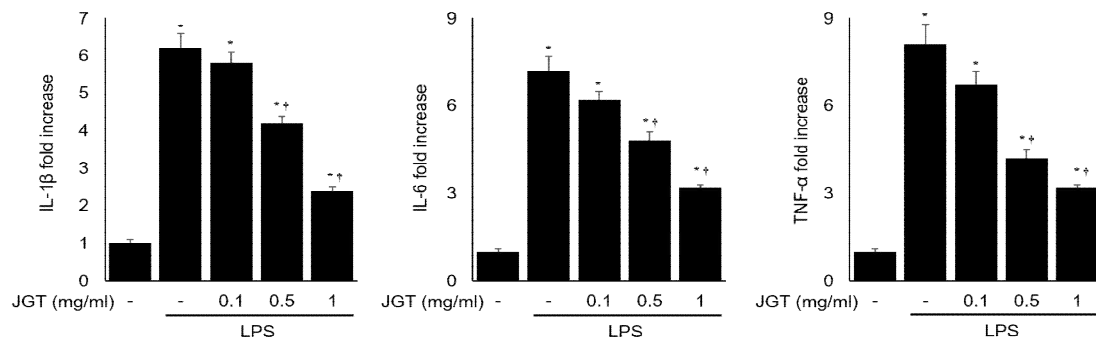


Fig. 3. Effect of JGT on inflammatory cytokine expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were incubated for 1 h with saline or JGT, and then stimulated for 6 h with LPS (1 μ g/mL). The mRNA expression level of IL-1 β , IL-6, TNF- α were measured by qPCR. Data are the mean \pm S.D. * P <0.05 versus the saline. † P <0.05 versus the LPS only.

mRNA가 대조군에 비해 크게 증가하는 것이 확인되었다. 한편 작약감초탕은 농도 의존적으로 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 감소시켰다(Fig. 3).

4. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 작약감초탕의 HO-1 발현에 미치는 영향

작약감초탕의 항염증 기전을 찾기 위해 염증 반응에 관여

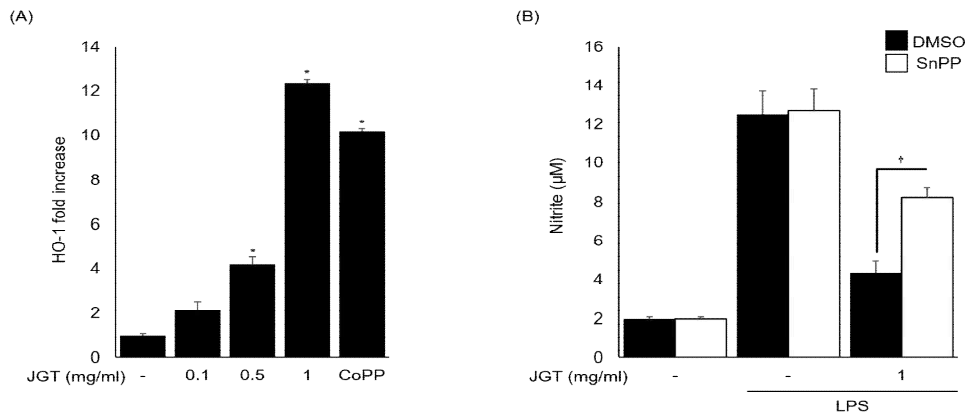


Fig. 4. Effect of JGT on HO-1 expression in LPS-stimulated BV2 cells. (A) BV2 cells were incubated for 6 h with saline or JGT. The mRNA expression level of HO-1 was measured by qPCR. (B) BV2 cells were pre-treated with DMSO or SnPP (5 μ M), then incubated with saline, or JGT (0.1, 0.5, and 1 mg/mL) and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL). The concentrations of the nitrite were determined by Griess reagent. Data are the mean \pm S.D. * P <0.05 versus the saline, $\dagger P$ <0.05 versus the DMSO.

IV. 고 찰

미세아교세포(Microglia)는 중추신경계에서 조직 손상 초기에 대응하는 중요한 세포로서, 염증 매개 물질인 전염증성 사이토카인, 활성산소종, NO, PGE₂등을 분비하여 조직 손상을 야기하는 신경염증을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다¹⁵. 지속적인 신경염증은 자가면역 관련 퇴행성 신경질환을 유발하고 진행시키기 때문에, 미세아교세포의 과도한 활성화로 인한 뇌 신경 반응 조절 장애를 이해하고 미세아교세포로부터 분비되는 염증 매개 물질을 조절하는 것이 퇴행성 신경 질환의 치료법으로 인식되고 있다¹⁶. 퇴행성 신경질환의 가장 큰 문제점인 운동능력 손실을 조절하는 한의학 소재를 찾던 중, 대표적인 항경련, 항진통 처방인 작약감초탕을 연구의 주제로 선정하였다. 기존의 연구에서 작약감초탕은 운동수행 능력 개선에 긍정적인 영향을 주며, 신경전달호르몬인 세로토닌의 분비를 활성화시켜 신체적·정신적 피로 회복에 모두에 도움을 줄 수 있다고 보고 되었다^{17,18}. 또한 HT22 신경세포에서는 작약감초탕이 신경손상보호 및 항산화 작용을 보였으며, 근육 및 뇌 신경세포 등에 유효하다고 다수 보고 되었다^{9,10}. 이에 본 저자는 작약감초탕이 뇌 신경염증 개선에도 유효할 것으로 판단하여, 미세아교세포 염증에서 작약감초탕의 항염증 효과와 그 작용기전을 조사하였다.

NO는 인체의 다양한 생리 및 병리 과정에 중요한 역할을

하는 중요한 신호전달 인자인 HO-1을 조사하였다. 이를 위해 BV2 세포에 작약감초탕을 6시간 처리한 뒤 세포를 실험에 사용하였다. 작약감초탕은 HO-1의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 양성대조군으로 사용한 CoPP도 HO-1의 발현을 유의성있게 증가시켰다(Fig. 4A). 이에 작약감초탕의 항염증 효과가 HO-1에 의하여 매개되는지 HO-1억제제 SnPP를 이용하여 확인하였다. SnPP를 전처리하고, 작약감초탕을 처리하였을 때, 작약감초탕의 NO 억제 효과는 반전되었다(Fig. 4B).

하고 있다¹⁹. 특히 NO synthase (NOS)는 L-arginine을 기질로 하여 NO를 합성하는 효소로서 endothelial, neuronal, inducible의 세 가지 형태가 존재한다. 그 중 iNOS는 세균내독소와 염증성 자극에 의해 발현이 증가되어 염증반응에 관여한다^{20,21}. 그러나 과도하게 증가된 NO는 세포독성을 일으킬 뿐만 아니라 중추신경계에서는 신경세포의 산화적 손상이나 뇌혈관장벽(blood-brain barrier)의 붕괴를 야기하는 등 다양한 방법으로 뇌신경 질환과 관련이 있다²². 이에 따라 작약감초탕의 LPS로 인해 활성화된 BV2 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 확인해 보았다. 작약감초탕이 세포독성을 가지는 농도를 조사하여 세포독성이 없는 범위에서 실험을 진행하였고(Fig. 1), 작약감초탕은 LPS로 인한 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켜 항신경염증 효과를 나타냈다(Fig. 2).

사이토카인은 다양한 세포에서 분비되는 작은 단백질로, 세포 간 상호작용 수단 역할을 한다²³. 여러 사이토카인들 중 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성되며 염증반응을 증가시키는데 관여한다²⁴. 일반적으로 염증반응은 외부로부터의 세균의 침입 혹은 신체 내부의 물질로 인한 유해한 자극에 대해 반응하는 방어 기전이지만 다양한 원인으로 인해 증가된 전염증성 사이토카인은 과도한 염증반응을 야기하고, 오히려 정상적인 세포에 해를 끼치게 된다²⁵. 특히 중추신경계에서 과도한 염증반응은 알츠하이머 및 파킨슨병 같은 퇴행성 신경 질환의 진행에 큰

영향을 미칠 수 있다²⁶⁾. 이번 연구에서 작약감초탕은 LPS로 활성화된 BV2 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 발현을 mRNA 수준에서 감소시켰다(Fig. 3).

HO-1은 heme이 일산화질소, 빌리버리딘, 철 이온으로 분해되는 반응을 촉진하는 효소로 전염증성 사이토카인을 억제하고 항염증 사이토카인의 생성을 촉진시키는 반응에 관여하고 있다²⁷⁾. HO-1은 활성화된 대식세포에서 NO의 생성과 iNOS 단백질의 발현을 조절하며, 또한 COX-2, IL-6와 IL-1 β 의 생성을 억제하는 것으로 보고되었다²⁾. 본 실험 결과, 작약감초탕에 의해 HO-1의 발현이 증가하였으며, HO-1의 억제제 처리에 의해 작약감초탕의 NO억제효과는 현저하게 감소되었다. 이는 작약감초탕이 HO-1의 발현을 유도하여 NO 및 다양한 염증성 매개물질의 생성을 조절하는 것으로 판단된다. 심지어, 작약감초탕은 HO-1 inducer인 CoPP보다 더 높은 수준의 HO-1을 유도하여 더 우수한 항염증효과를 나타낼 수 있을 것으로 보인다. 비록 이 연구에서는 HO-1이 유도되는 기전 등이 자세하게 이루어지지 않았지만, 추후 작약감초탕의 chemical finger printing과 동시에 HO-1이 유도되는 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 LPS로 유도한 미세아교세포의 염증 반응에서 작약감초탕의 항염증 효과 및 그 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 작약감초탕은 미세아교세포에서 LPS로 유도된 염증 반응에서 NO의 생성을 억제하였다.
2. 작약감초탕은 미세아교세포에서 LPS로 유도된 염증 반응에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하였다.
3. 작약감초탕은 HO-1을 유도하였으며, HO-1에 의존적으로 NO의 생성이 조절되었다.

이상의 결과는 작약감초탕이 LPS로 인해 활성화된 BV2 세포에서 HO-1 활성을 통하여 염증 매개 인자 및 그 산물의 생성을 억제하여 항신경염증 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 작약감초탕은 추후 중추신경계의 염증으로 인해 나타나는 퇴행성 신경질환을 예방 및 치료제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*. 2017;127(7):624-33.
2. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004;1(1):14.
3. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(4):225-42.
4. González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1-2):1-13.
5. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):470S-4S.
6. Subhramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;94:112-20.
7. Cai Y, Liu J, Wang B, Sun M, Yang H. Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Related Therapeutic Targets. *Front Immunol*. 2022;13:856376.
8. Son SK, Im CK, Kim KJ. Anxiolytic-like effects of Jackyagakgamcho-tang using the elevated plus-maze mice. *J East-West Med*. 2010;35(3):107-23.
9. Lee HS, Lee HK, Seo DI. Effects of Peony-Licorice Mixture Supplementation on Blood Glucose and Lactate Levels. *The Korea Journal of Herbology*. 2012;27(5):93-7.
10. Ha S. Effect of Penoy-Licorice mixture supplementation on post-exercise blood glucose and lactate in college basketball player. *The Korea Journal of Sports Science*. 2011;20(2):993-1001.
11. Kim BW. Anti-inflammatory Effect of Jakyakgamcho-tang. *Korean J Orient Int Med*. 2010;31(2):365-71
12. Kim J, Kim CS, Kim YS, Lee IS, Kim JS. Jakyakgamcho-tang and its major component, paeonia lactiflora, exhibit potent anti-glycation properties. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2016;20(4):60-4.
13. Kang TH, Baek HY, Kim YC. Protective effect of jakyak-gamcho-tang extract and its constituents against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. *Am J Chin Med*. 2005;33(2):181-9.
14. Liu H, Wang J, Wang J, Wang P, Xue Y. Paeoniflorin attenuates A β 1-42-induced inflammation and chemotaxis of microglia in vitro and inhibits NF- κ

- B- and VEGF/Flt-1 signaling pathways. *Brain Res.* 2015;1618:149–58.
15. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14(11):1189–97.
 16. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140(6):918–34.
 17. Davis JM, Alderson NL, Welsh RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):573S–8S.
 18. Hong JA, Chung SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD, Kim H, Jang MH, Lee TH, Lim BV, Kim YP, Kim CJ. Effects of paeonia radix on 5-Hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in the dorsal raphe of exercised rats. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(2):166–9.
 19. Mander P, Borutaite V, Moncada S, Brown GC. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res.* 2005;79(1–2):208–15.
 20. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6(12):3051–64.
 21. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(2):522–6.
 22. Jiang Z, Li C, Arrick DM, Yang S, Baluna AE, Sun H. Role of nitric oxide synthases in early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. *PLoS One.* 2014;9(3):e93134.
 23. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.
 24. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503–8.
 25. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017;9(6):7204–18.
 26. Van Eldik LJ, Carrillo MC, Cole PE, Feuerbach D, Greenberg BD, Hendrix JA, Kennedy M, Kozauer N, Margolin RA, Molinuevo JL, Mueller R, Ransohoff RM, Wilcock DM, Bain L, Bales K. The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* 2016 May 30;2(2):99–109.
 27. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:517–54.
 28. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.* 2002;234–235(1–2):249–63.