



## LPS로 자극한 microglia BV2 cell에서 *Cyrtomium fortunei* J.Sm. 추출물의 항염증 효과

최지원<sup>1</sup> · 김신태<sup>1</sup> · 최상윤<sup>1</sup> · 최인욱<sup>1</sup> · 허진영<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>2</sup>한국과학기술연합대학원 대학교

### Anti-inflammation Effect of *Cyrtomium fortunei* J.Sm. Extracts in Lipopolysaccharides-induced Microglia BV2 Cell

Jiwon Choi<sup>1</sup>, Shintae Kim<sup>1</sup>, Sang Yoon Choi<sup>1</sup>, Inwook Choi<sup>1</sup>, Jinyoung Hur<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute

<sup>2</sup>University of Science Technology (UST)

#### Abstract

In this study, we investigated the effect of the extracts of *Cyrtomium fortunei* J.Sm. (CFJ) on lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation in mouse BV-2 microglial cells. Nitric oxide (NO) production and cell viability were measured using the Griess reagent and the (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT) assay. Inflammatory cytokines were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in BV-2 microglial cells with and without CFJ extracts. Subsequently, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and antioxidant markers were assessed by western blot analysis. It was found that the CFJ extract significantly decreased the production of pro-inflammatory cytokines (interleukin [IL]-6, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ) and NO in BV-2 microglial cells that were stimulated with LPS. In addition, the expression levels of the phosphorylation of the MAPK family (p38, c-Jun N-terminal kinases [JNK], and extracellular-signal regulated kinase [ERK]) were reduced by CFJ. Also, treatment with CFJ significantly increased the activities of superoxide dismutase type 1(SOD1) and Catalase in BV-2 microglial cells. Our results indicate that CFJ has a potent suppressive effect on the pro-inflammatory responses of activated BV-2 microglia. Therefore, CFJ has the potential to be an effective treatment for neurodegenerative diseases, as it can inhibit the production of inflammatory mediators in activated BV-2 microglial cells.

**Key Words :** *Cyrtomium falcatum*, anti-inflammation, microglial cells, MAPKs, anti-oxidants

## 1. 서 론

쇠고비잎(*Cyrtomium fortunei* J. Smith)는 주로 대한민국, 일본 및 중국 중부의 바닷가 숲속에 자생하는 면마과(Dryopteridaceae)에 속하는 여러해살이 양치식물로써 주로 관상용으로 이용하나 우리나라에서는 전통적으로 뿌리 부분을 해독제 및 지혈제로써 쓰여져 왔다 (Bae 2001). 쇠고비의 생리활성에 관한 연구는 뿌리의 항산화 효과(Jeong et al. 2007)와 피부 미백효과에 대한 보고(Choi 2013)가 있었을 뿐 다른 생리활성에 관한 연구와 쇠고비에 함유된 성분에 관한 연구는 지금까지 미비한 실정이다. 본 연구에서는 쇠고비잎의 뇌 염증 억제 효과를 새로 발견 및 검증하여 이를 최초로 보고하는 바이다.

미세아교세포(microglia)는 뇌에 존재하는 대식세포(macrophage) 중 하나로, 뇌 교질세포(glial cell)의 10-15%를 차지하며, 중추신경계 내에서 면역 방어기능을 하고 있다(Lawson et al. 1992). 그러나 microglia가 과도하게 활성화되거나 장기간 유지될 때 진행성 염증반응을 일으키며 nitric oxide (NO)와 염증성 cytokine인 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-6 (IL-6) 뿐만 아니라 reactive oxygen species (ROS)를 분비해 신경독성을 유발하고 뇌 손상을 유도하여(McGeer et al. 1993; Dinarello 1999; Li et al. 2005) 파킨슨병과 알츠하이머 등과 같은 신경 퇴행성 질환의 원인이 된다고 알려져 있다(Wegiel & Wiwniewski 1990; Scarano & Baltuch 1999; Zheng & Zhang 2021). 본 연구는 lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 mouse microglia

\*Corresponding author: Jinyoung Hur, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Republic of Korea  
Tel: 82-63-219-9299 Fax: 82-63-219-9360 E-mail: jyhur@kfri.re.kr

BV2 cell의 염증 반응을 과활성화 시키고 쇠고비잎 추출물 (CFJ)이 염증 저해 활성에 효능이 나타나는지 확인하였다. 이러한 염증성 유전자와 그 산물을 효과적으로 제어하는 것은, 신경 염증 조절 인자를 포함하여 신경 퇴행성 질환의 치료를 위해 중요한 대상으로 인식되고 있다. Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)의 인산화와 nuclear factor kappa B (NF-κB)의 전사는 대식세포 초기 면역반응에서 중요한 역할을 한다. 이러한 역반응에는 세포 밖 조절 단백질 인산화 효소(ERK), c-Jun NH2-단백질 인산화효소(JNK), 그리고 세린/트레오닌 단백질 인산화효소(p38)가 포함된다고 알려져 있다(Byun 2013). 본 연구에서는 쇠고비잎의 에틸아세테이트 분획물이 이러한 염증을 조절하는 바이오마커를 어떻게 조절하는지 확인하여 항염증 기능을 검증하고자 하였다. 본 연구에 사용된 쇠고비잎의 에틸아세테이트 분획물 내 성분 함량분석에 관한 기존 연구는 진행된 바 없으며, 본 연구에서 추후 Xevo TQ MS (Waters, Manchester, U.K.)와 ACQUITY UPLC 시스템을 이용하여 쇠고비잎 추출물의 성분을 분석한 후 어떠한 성분이 포함되어 있으며, 뇌염증 억제 효과에 작용하는지에 대해서 확인할 예정이다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 재료 및 방법

본 실험에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin (PS), fetal bovine serum (FBS) 및 phosphate buffered saline (PBS)은 Gibco (Gibco, Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. 또한 Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Bovine serum albumin (BSA), Griess reagent, Lipopolysaccharides (LPS) 및 다른 모든 시약은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. *Cyrtomium fortunei* J.Sm. 추출물 (CFJ) 제조

본 연구에서 사용한 쇠고비잎, *Cyrtomium falcatum* J.Sm. (0000-MAT-0093, CFJ)는 충청북도 지역에서 채취된 것으로 잎 부분을 분리하여 증류수로 세척하고 50°C에서 열풍 건조한 후 메탄올을 사용하여 상온에서 1시간씩 3회 추출하였다. 이를 여과하여 얻어진 상등액을 회전 감압 농축기로 완전히 농축하여 메탄올 추출물을 제조하였고 메탄올 추출물에 물과 에틸아세테이트를 가하여 분획을 나누고 농축하여 에틸아세테이트 가용성 분획물(수율: 원물 건조물 중량 대비 0.6%)을 제조하였다. 제조된 쇠고비잎 에틸아세테이트 분획물은 -70°C에서 보관하면서 분석 시료로 사용하였다.

### 3. 세포배양

본 실험에 사용한 mouse microglia 세포인 BV2 cell은 경희대학교 의과대학 생리학 교실에서 분양받아 DMEM (Gibco, Rockville, MD, USA) 배지에 10% heat-inactivated FBS (Gibco, Rockville, MD, USA)와 5% penicillin (Gibco, Rockville, MD, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 세포가 80-90%에 이르면 10회 이상 계대 배양한 후 사용하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

LPS와 CFJ가 세포 생존율에 영향을 미치는 영향을 확인하기 위해 세포는 96-well plate에 3×10<sup>4</sup> cells/well로 100 μL씩 분주하여 세포 배양기에서 24시간 배양한 뒤 모든 배양액을 제거하고 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1 μg/mL과 CFJ를 각각 10, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하여 추가로 18시간 배양하였다. 이후 MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)시약 0.1 mg/mL을 100 μL 첨가하여 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양한 후 배양액을 제거하고 동량의 DMSO에 녹여 10분간 반응시킨 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 다음과 같은 공식을 이용하여 나타내었다(Richter-Landsberg & Besser 1994).

세포 생존율(%)

$$= (\text{시료처리군의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$$

### 5. Nitric Oxide (NO) 생성 저해 효과

LPS에 의해 활성화된 mouse microglia BV2 cell로부터 NO의 농도 측정하기 위해 LPS (0.1 μg/mL)와 CFJ (10, 50, 100 μg/mL)을 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 상등액은 다른 well-plate에 옮기고 Griess reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1:1 비율로 15분간 차광한 곳에서 반응시킨 후 540 nm에서 microplate기를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포로부터 형성된 NO의 양은 NaNO<sub>2</sub> 표준액의 농도를 기준(standard curve)으로 계산하였다(Kim et al. 2017).

### 6. Western blot을 통한 단백질 발현

세포를 60 mm plate에 13×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 CFJ (10, 50, 100 μg/mL)과 LPS (0.1 μg/mL)을 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PBS (Gibco, Rockville, MD, USA)로 1회 세척하고 scraper를 이용하여 세포를 회수한 뒤 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액은 제거하고 세포에 Pro-prep (iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 lysis한 뒤 ice에 30분간 방치하였다. 그리고 난 후 15,000 rpm에서 15

분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 총단백질을 얻었다. 얻은 총단백질은 Brad-ford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 정량하였다. 이후 2X LDS sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 같이 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후, 5% skim milk (0.1% Tween 20 containing PBS, TBST)로 1시간 blocking 하였다. TBST로 3회 washing 후  $\beta$ -actin, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , p-p38, p-ERK, p-JNK, p-p65는 1차 항체는 모두 1:3000 비율로 희석하고 4°C에서 overnight 하였다. TBST에 희석한 2차 항체 (1:5000)를 상온에서 60분간 반응시킨 뒤 TBST로 washing 하여 ECL (enhanced chemiluminescence)을 1:1로 섞어 membrane에 골고루 반응 시킨 후 image analyzer는 ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad, CA, USA)로 검출하였고 Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

7. RT-PCR을 통한 유전자 발현

Mouse microglia BV2 cell에서 염증성 cytokine 생성 저해에 미치는 영향을 평가하기 위해 mRNA 수준에서 변화를 분석하였다. RNA 추출은 NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany)를 사용하였고 RNA 펠렛을 nuclease-free water에 용해 시키고 추출된 RNA 농도는 Nanodrop one (Thermo Fisher scientific, Cleveland, OH, USA)를 사용하여 측정하였다. cDNA 합성은 Biorad사의 iScript cDNA Synthesis kit의 프로토콜을 따라 Real-time PCR 와 thermocycler를 이용하여 cDNA를 증폭시켰다. 유전자 발현은 QuantStudio™3 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)에서 iQ™ SYBR® green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 96-well plate에 20  $\mu$ L씩 첨가하였다. Initial denaturation (10 min, 95°C), denaturation 40 cycle (15 s, 95°C), annealing 40 cycle (30 s, 60°C)로 결과는 실시간 시스템 Quantstudio™ design & Analysis software를 이용하여 분석하였고, 모든 값은 GAPDH 발현을 기준으로 정규화 하였다<Table 1>.

8. 통계분석

모든 실험은 3번 반복하고 결과 분석은 평균±표준편차 (mean±Standard deviation)로 표시하였다. 집단 간 차이는 one-way ANOVA로 분석한 후에 tukeys multiple comparison test로 사후 검증하였다. 그래프는 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA)를 이용하여  $p < 0.05$  이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

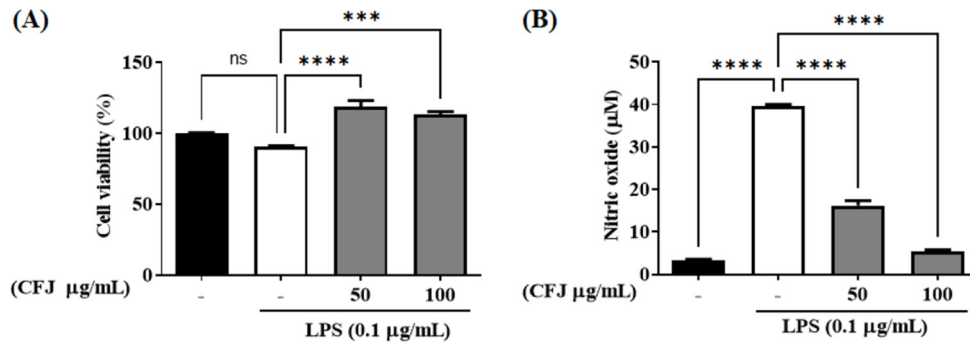
III. 결과 및 고찰

1. CFJ의 세포 생존률과 NO 생성 억제 효능

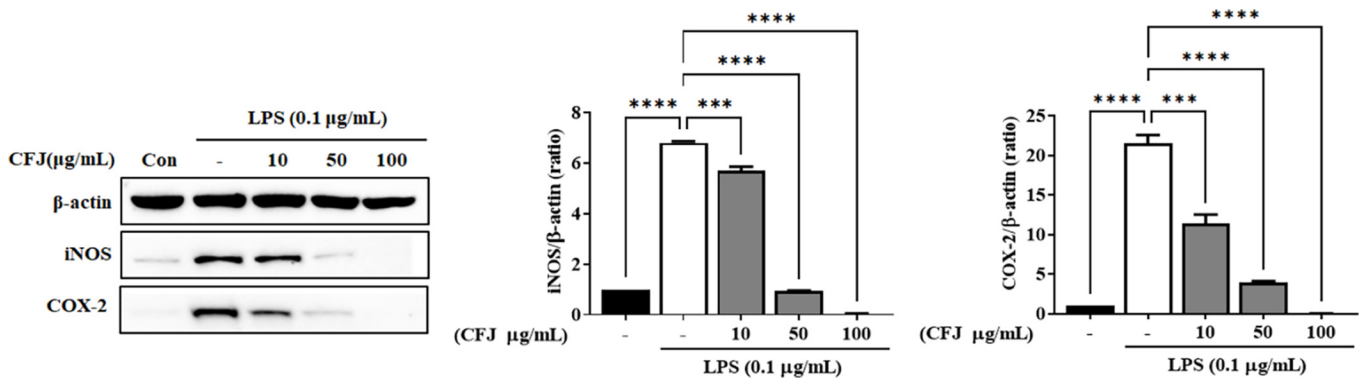
CFJ의 현대 약리학적 효능에 대한 연구는 항산화와 피부 보호효능으로 국한되어 있고 항염증이나 뇌질환 관련 효능에 대한 연구는 보고된 바 없다. 그래서 본 연구에서 CFJ의 항염증 효과를 확인하고자 하였으며, 특히 BV2 cell에서의 항염증 효과를 확인함으로써 추후 뇌질환 예방 및 뇌보호 효능에 대해서 CFJ의 다양한 생물학적 활성을 연구하는 데 도움이 될 것으로 생각된다. CFJ가 microglia BV2 cell의 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS 0.1  $\mu$ g/mL 과 CFJ 50, 100  $\mu$ g/mL을 동시에 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존률을 측정하였다. 대조군을 100%라고 했을 때, LPS를 처리한 군에서의 세포생존률은 90.4%로 나타났고 CFJ 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 군에서는 118.9, 113.2%의 세포생존율이 나타났다. 이 결과를 통해 CFJ를 50, 100  $\mu$ g/mL 처리한 군에서는 세포 독성이 나타나지 않아 추후 효능 실험은 10, 50, 100  $\mu$ g/mL으로 처리하여 실험하고자 하였다<Figure 1A>. NO의 생성은 염증반응의 대표적인 지표라 할 수 있으며 뇌에서의 microglia 세포의 과활성으로 인한 NO의 과다 형성은 뉴런세포를 자극하여 뉴런세포의 세포사멸을 유도한다. 이러한 microglia의 과염증을 억제하여 염증의 진행을 막는 것이 뇌세포 사멸 연구에서 중요한 기전 중 하나이다. 본 연구는 LPS에 의해 microglia인 세포인 BV2 cell로부터 생성되는 NO에 대한 CFJ의 억제효과를 Griess assay로 측정하였다. 그 결과, LPS 처리군은 대조군에 비해 NO의 생성이 약 30배(39.6  $\mu$ M) 증가하여 과도한 염증

<Table 1> Primer sequence

Gene name	Primer sequence	Sequence
IL-1 $\beta$	5'-GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGTT G-3'	Forward (F)
	5'-TGG ATG CTC TCA TCA GGA CAG-3'	Reverse (R)
IL-6	5'-TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC-3'	Forward (F)
	5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC-3'	Reverse (R)
TNF- $\alpha$	5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT-3'	Forward (F)
	5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3'	Reverse (R)
GAPDH	5'-CTG ACT TCA ACA GCG ACA CC-3'	Forward (F)
	5'-TGC TGT AGC CAA ATT CGT TGT-3'	Reverse (R)



<Figure 1> The effects of CFJ on cell viability and NO production in LPS activated BV2 microglial cells. (A) BV2 cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and CFJ at different concentrations (50, 100 µg/mL), and cell viability was confirmed through MTT assay. (B) BV2 microglia cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and CFJ at different concentrations and incubated for 18 hr. Only the supernatant was transferred and reacted with the griess reagent to confirm the release of nitric oxide (NO). Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests. Results are expressed as mean±SEM of three independent experiments. \*\*\**p*<0.001 and \*\*\*\**p*<0.0001 compared with the LPS-treated group.

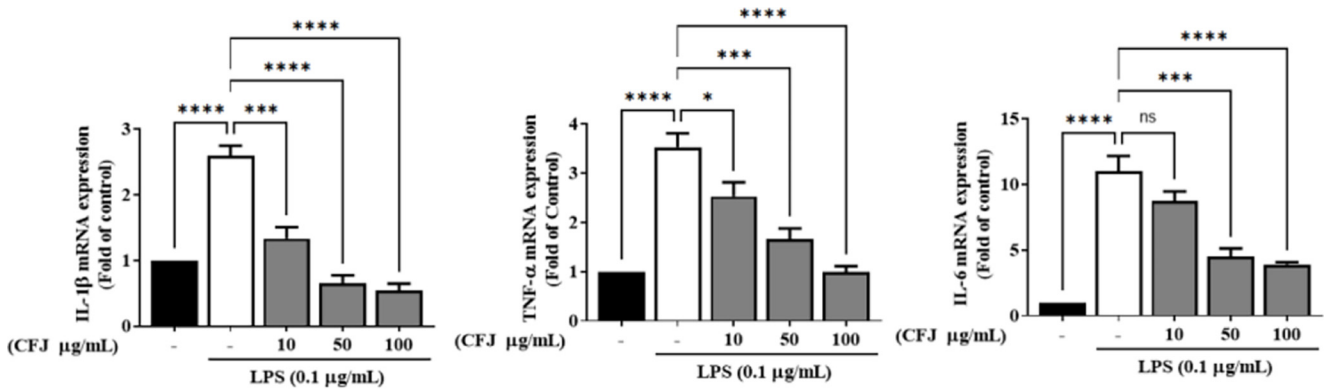


<Figure 2> The effects of CFJ on iNOS (A) and COX2 (B) inhibition in LPS activated BV2 microglia. BV2 microglia cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and CFJ 10, 50, 100 µg/mL, cultured for 18 hr, and analyzed by Western blot. β-actin was used as an internal control and it was proved that the band quantification was constant. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests. Results are expressed as mean±SEM of three independent experiments. \*\*\**p*<0.001 and \*\*\*\**p*<0.0001 compared with the LPS-treated group.

반응이 유도되었음을 확인하였다<Figure 1B>. 반면, CFJ를 50, 100 µg/mL로 처리할 때, 각각 16.1, 5.32 µM의 NO 생성률을 나타내어 CFJ의 NO억제 효능을 확인하였다. 따라서 LPS에 의해 활성화된 BV2 cell에서 CFJ는 NO 생성을 억제함으로써 염증을 완화할 수 있고, 뉴런 세포의 사멸도 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

2. CFJ의 염증성 매개 인자인 iNOS, COX-2 생성 억제 효능  
염증성 매개 인자인 COX-2와 iNOS는 여러 조직에서 발현되고 항염증 효능에서 중요한 효소 단백질로 LPS와 같은 감염원의 자극으로 발현이 급격하게 증가하여 또 다른 염증성 물질을 생성한다. COX-2는 효소로서 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있으며, 급성 염증 반응에서 prostaglandins의 합성에 관여하며 이는 LPS 및 cytokine에 같은 자극으로 발현이 유도된다(Needleman & Isakson 1997). 따라서 항염증 조절과 치료에 있어서 두 효소 단백질

(iNOS, COX-2)을 조절하는 것이 중요하다(Turini & DuBois 2002). BV2 cell에서 CFJ의 NO 생성 억제 효능과 iNOS와의 상관성을 알아보기 위해 iNOS 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, LPS 처리군에서는 대조군에 비해 6.8 배 증가하였고 CFJ 10, 50, 100 µg/mL 처리군에서는 각각 5.7, 0.9, 0.04 µM로 농도 유의적으로 iNOS의 단백질 발현량이 감소하였다<Figure 2>. 따라서 CFJ는 염증 반응을 일으키는 iNOS 단백질 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제하는 것으로 생각된다. COX-2는 염증반응에서 중요한 역할을 하는 인자로, 정상 조직에서는 측정되지 않지만, LPS나 기타 염증 유발 인자와 같은 자극을 받으면 활성화된다(Yang et al. 1999). CFJ가 LPS로 유도된 염증 반응에서 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, <Figure 2>와 같이 LPS 처리군에서 대조군에 비해 COX-2 발현량이 21배 증가하였고 CFJ 10 µg/mL 처리군은 LPS 처리군 보다 COX-2의 발현량을 50% 이상 감소시켰다. 특히 CFJ 100 µg/mL



**<Figure 3>** The effects of CFJ on the IL-1β (A), TNF-α (B), IL-6 (C) mRNA expression in LPS activated BV2 microglia cell. BV2 microglia cells were treated with LPS 0.1 μg/mL and CFJ 10, 50, 100 μg/mL, cultured for 18 hr, and analyzed by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control and it was demonstrated that the band quantification was constant. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with the LPS-treated group.

처리군은 대조군 보다 낮은 COX-2의 발현량을 나타내었다. 따라서, CFJ는 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2의 발현을 억제하는 효과를 가지며, 이로 인해 염증 매개 인자인 NO의 생성을 억제하는 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

### 3. CFJ의 염증성 cytokine 생성 억제 효능

염증세포가 활성화되면 NO뿐 아니라 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α는 염증에 관여하는 세포 신호 전달 단백질이며, 염증 반응에 필수적이다(Yang et al. 2013). 따라서 항염증 조절과 치료에 있어서 염증성 cytokine의 분비량을 감소시키는 것이 중요하다. 본 실험은 LPS로 자극한 BV2 cell에 CFJ를 처리한 후 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 생성량을 측정함으로써 CFJ에 의한 염증 매개성 cytokine의 생성 억제 효과를 검토하였다. <Figure 3>의 결과와 같이 LPS 처리군에서는 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)의 유전자 발현량은 대조군에 비해 각각 2.59, 3.52, 11배 증가하였다. 반면, CFJ 50, 100 μg/mL 처리군의 경우 IL-1β, TNF-α 발현량을 대조군과 비교했을 때, 감소하는 경향을 나타내었고, 또한 CFJ 50, 100 μg/mL 처리한 군에서의 IL-6은 LPS 처리군에 비해 50% 이상의 유전자 발현량을 감소시켰다. 이상의 결과를 통해 CFJ는 iNOS 및 COX-2와 뿐만 아니라 염증성 cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α)들의 발현 억제를 통하여 염증반응을 조절 할 수 있을 것으로 예상된다. 추후 이러한 cytokine 유전자의 전사를 활성화 시키는 nuclear factor kappa B (NF-κB) 경로를 확인함으로써 CFJ가 NF-κB 경로를 조절하는지 확인하고자 한다.

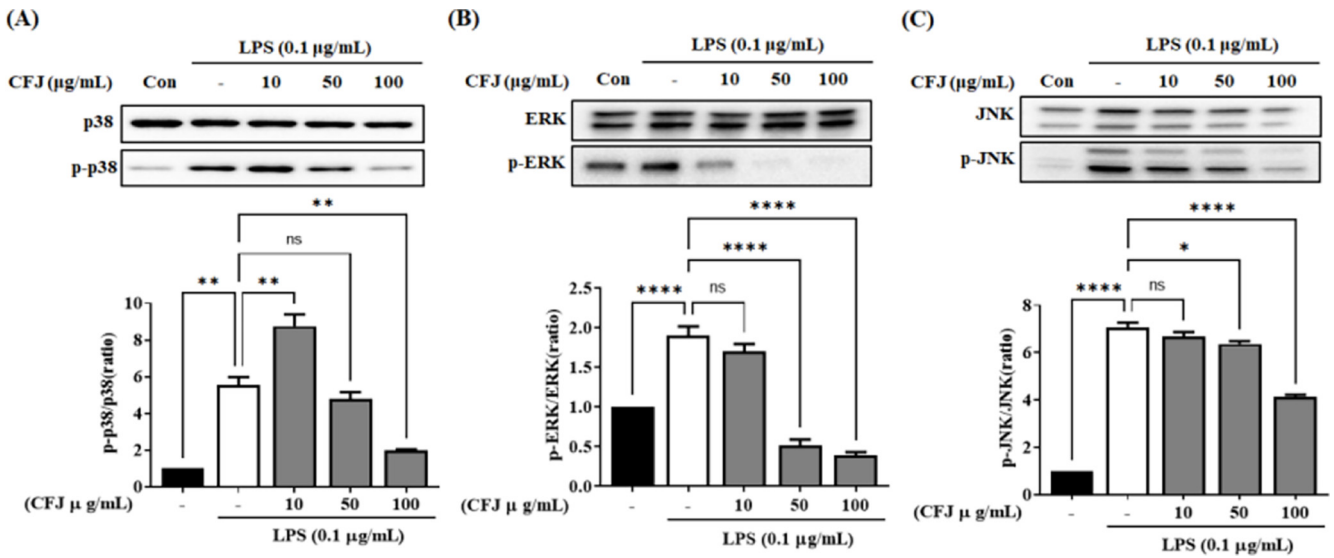
### 4. CFJ의 MAPKs 활성화 억제 효능 검증

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun kinase (JNK/SAPK) and p38의 세 가지 유형이 있으며 이들은 세포질에서 비 인

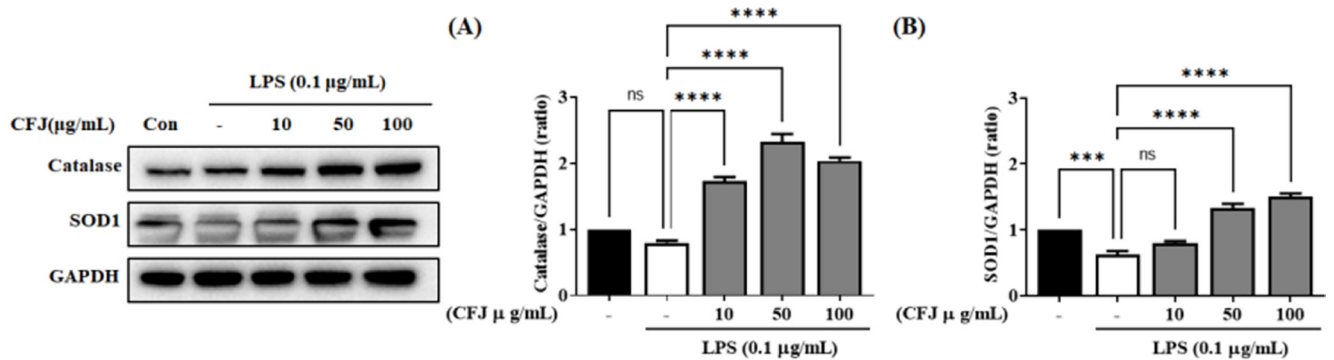
산화 상태로 존재한다. 그러나 LPS 자극으로 인해 세포가 활성화되면 인산화되어 염증 매개 인자인 iNOS 및 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β 등)의 발현을 촉진 시키기 때문에 MAPKs 경로를 억제하는 방법은 항염증의 주요 기전으로 주목받고 있다(Yang et al. 2015; Kim et al. 2017). 본 연구에서는 CFJ의 NO 생성 억제 활성이 MAPKs의 인산화 억제와 관련이 있는지 확인하기 위해 LPS로 자극한 BV2 cell에 CFJ를 처리하여 단백질 발현량을 측정하였다. LPS 처리한 군에서 phosphorylated forms/total form으로 나타낸 MAPKs (p38, ERK, JNK)의 인산화 비율이 대조군 대비 각각 5.5, 1.9, 7.0배 증가함을 확인하였다. 반면 CFJ를 처리한 군에서는 농도 유의적으로 p38, ERK, JNK의 인산화가 감소된 것을 확인하였다. 특히 CFJ 50, 100 μg/mL은 대조군 (ratio 1) 보다 p38, JNK의 인산화가 50% 이상 감소된 것을 확인하였다<Figure 4A, C>. CFJ는 LPS에 의해 유도되는 MAPKs 경로의 활성화를 억제하는 것으로 생각된다. 기존 연구자들은 이 세가지 MAPK 경로를 확인 하였을 때, p38의 인산화 외에 ERK나 JNK의 활성화는 확인하지 못하는 경우도 있다(Yin et al. 2019). 하지만 본 연구에서는 CFJ가 MAPK의 세가지 경로를 모두 조절함을 확인하였고, 이는 세포사멸억제 및 다른 스트레스 자극에 의한 인산화 조절이 가능하다고 판단되어 추후 뉴런 세포에 적용했을 때 세포사멸 억제 효능도 있을 것으로 예상하며 추후 신경세포에 적용할 예정이다. CFJ의 MAPK 신호전달 조절은 염증성 cytokine과 NO 분비량 및 iNOS, COX-2의 발현을 감소시키고 염증성 매개 물질의 발현을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

### 5. CFJ의 산화적 스트레스 억제효능

신경 염증과 더불어 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)에 의한 신경세포 손상 및 사멸은 뇌졸중과 알츠하이머



<Figure 4> Effect of CFJ on the expression of MAPKs in LPS activated BV2 microglia cells. BV2 microglia were treated with CFJ 10, 50, 100 μg/mL and LPS 0.1 μg/mL for 18 hr and confirmed by western blot (p38, phosphorylated p38, ERK, phosphorylated ERK, JNK, phosphorylated JNK, p65, and phosphorylated p65). Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests. Results are expressed as mean±SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with the LPS-treated group.



<Figure 5> The effect of CFJ on antioxidant protein expression in BV2 microglia. BV2 microglia were treated with CFJ 10, 50, 100 μg/mL and LPS 0.1 μg/mL for 18 hr and confirmed by western blot. GAPDH was used as an internal control and it was proved that the band quantification was constant. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests. Results are expressed as mean±SEM of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with the LPS-treated group.

치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 발병 기전에 공통적으로 존재하는 중요한 요소이다(Manoharan S et al. 2016). LPS에 의해 유도되는 신경교세포에서의 활성산소종의 증가는 주변 신경세포를 자극하여 세포 사멸이 일어나고 사멸되면서 분비되는 신경세포에서의 물질들은 또 다시 신경교세포를 과활성화 시켜 악순환을 반복하게 된다. 본 연구에서는 CFJ의 BV2 cell에서 항산화 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 우리 몸은 산소호흡에 의해 대사과정에서 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성하게 되며, 이것은 산화적 스트레스를 유발하는 물질로 알려져 있다. 이러한 산화적 스트레스로부터 생체 기관을 방어하기 위해 항

산화효소인 SOD1, Catalase 등을 생성하여 활성산소종으로부터 방어하는 방어기전이 존재하며, 활성산소종과 염증성 cytokine은 이러한 산화적 스트레스를 유발하는 작용과 밀접한 관련이 있다(Cho et al. 2008). BV2 cell에서 CFJ가 세포 내 항산화 관련 단백질의 발현을 조절하는지 확인하였다. 본 연구에서는 CFJ의 항산화 효능을 확인하였고 <Figure 5>에 확인할 수 있듯이 CFJ에 의해 SOD1, Catalase와 같은 항산화 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가된 것을 확인하였고<Figure 5> 이는 CFJ가 BV2 cell에서 LPS 자극에 의한 산화적 스트레스 보호효과가 있음을 나타낸다.

#### IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 mouse microglia BV2 cell로부터 *Cyrtomium fortunei* J.Sm. (CFJ) 추출물의 항염증 효과를 확인하였다. Microglia 세포인 BV2 cell에서 CFJ 처리시 세포 독성은 나타나지 않았고 pro-inflammatory cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 및 NO의 분비량을 억제하였으며 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량도 감소시켰다. 또한 염증반응의 상위 조절 인자인 MAPKs 관련 단백질 발현량을 검토한 결과, CFJ에 의해 MAPK family인 인산화 된 p38, ERK, JNK의 단백질 발현이 억제 되었다. 또한, 항산화 인자 Catalase, SOD1의 활성을 증가시켜 산화적 스트레스를 감소시켰다. 위 결과를 종합해 볼 때, CFJ는 MAPKs의 활성화 억제를 통해 염증 매개 물질의 생성을 억제시켜 항염증 활성 및 항산화 관련 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 CFJ는 지속적인 염증성 반응에 의한 퇴행성 뇌신경 관련 질환의 예방 및 치료에 잠재적인 효능을 가지고 있음을 의미한다.

#### 저자정보

최지원 (한국식품연구원, 기능소재연구단, 연구원 0000-0001-7225-004X)

최상윤 (한국식품연구원, 기능소재연구단, 책임연구원, 0000-0001-8712-6877)

김신태 (한국식품연구원, 기능소재연구단, 박사후연구원, 0000-0002-5228-7344)

최인욱 (한국식품연구원, 기능소재연구단, 책임연구원, 0000-0003-1461-2887)

허진영 (한국식품연구원, 기능소재연구단, 선임연구원, 교수. 0000-0003-1292-9290)

#### 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 기본사업의 지원을 받아 연구되었습니다(E0210200, E0212021).

#### Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

#### References

- Bae KH. 2001. The medicinal plants of Korea. Kyohak-sa Press. Seoul, Korea, pp 298-299
- Byun MW. 2013. Immunomodulatory activities of apple seed extracts on macrophage. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 42:1513-1517
- Cho HY, Noh KH, Cho MK, Jang JH, Lee MO, Kim SH, Song YS. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of genistein in BALB/c mice injected with LPS. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 37:1126-1135
- Choi SY. 2013. Inhibitory effects of *Cyrtomium fortunei* J. Smith root extract on melanogenesis, Pharmacogn Mag., 9(35): 227-230
- Dinarelli CA. 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. J. Infect. Dis., 179(2):294-304
- Jeong JA, Kwon SH, Lee CH. 2007. Screening for antioxidative activities of extracts from aerial and underground parts of some edible and medicinal ferns. Korean J. Plant. Res. 20(2):185-192
- Kim MJ, Kim KBWR, Park SH, Choi JS, Ahn DH. 2017. Anti-inflammatory effect of *Chondria crassicaulis* ethanol extract on MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Korean Soc Biotechnol Bioengin J., 32:352-360
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 48:405-415
- Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. 2005. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 102(28): 9936-9994
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. 2016. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of alzheimer's disease, parkinson's disease, and huntington's disease: A mini review. Oxid Med Cell Longev. 2016:8590578
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG. 1993. Microglia in degenerative neurological disease. GLIA 7(1):84-92
- Needleman P, Isakson PC. 1997. The discovery and function of COX-2. J. Rheumatol., 49:6-8
- Richter-Landsberg C, Besser A. 1994. Effects of organotins on ratbrain astrocytes in culture. J. Neurochem., 63:2202-2209
- Scarano FG, Baltuch G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annu. Rev. Neurosci., 22:219-240
- Turini ME, DuBois RN. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. Annu. Rev. Med., 53:35-57
- Wegiel J, Wisniewski HM. 1990. The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. Acta Neuropathologica, 81:116-124
- Yang H, Oh KH, Yoo YC. 2015. Anti-inflammatory effect of hot water extract of aronia fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 44:7-13
- Yang T, Sun D, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann JB. 1999. Differential regulation of COX-2 expression in the

- kidney by lipopolysaccharide: role of CD14. *Am. J. Physiol.*, 277(1):F10-F16
- Yang YZ, Tang YZ, Liu YH. 2013. Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using RAW264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.*, 148(1):271-276
- Yin P, Zhang Z, Li J, Shi Y, Jin N, Zou W, Gao Q, Wang W, Liu F. 2019. Ferulic acid inhibits bovine endometrial epithelial cells against LPS-induced inflammation via suppressing NK- $\kappa$ B and MAPK pathway. *Res. Vet. Sci.*, 126:164-169
- Zheng T, Zhang Z. 2021. Activated microglia facilitate the transmission of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochem. Int.*, 148:105094
- 
- Received March 17, 2023; revised June 30, 2023; accepted June 30, 2023