



# 공심채 추출물(IAE)의 LPS로 유도된 미세아교세포에서의 Nrf2기전을 통한 항염증 효과

최지원<sup>1</sup> · 최상윤<sup>1</sup> · 허진영<sup>1,2,\*</sup>  
<sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>2</sup>한국과학기술연합대학원 대학교

## *Ipomoea aquatic* Extracts (IAE) Attenuated Microglial Inflammation via Nrf2 Signaling

Jiwon Choi<sup>1</sup>, Sang Yoon 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

*Ipomoea aquatic* is a leafy vegetable of the Convolvulaceae family, and is a tropical plant widely inhabiting southern China and Southeast Asia, and is widely known as Morning Glory in the West. In this study, the anti-inflammatory effects of ethyl acetate extract from *Ipomoea aquatic* extracts (IAE) were tested against lipopolysaccharide (LPS)-induced activation microglia BV2 cells. The production of nitric oxide (NO) and cell viability were measured using the Griess reagent and MTT assay, respectively. Inflammatory cytokine [interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ ] were detected qPCR in LPS induced BV-2 cells. Subsequently, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) were analyzed through western blot analyses and immunofluorescence. *Ipomoea aquatic* down-regulated of inflammatory markers and up-regulated anti-inflammatory and anti-oxidants in BV2 cells.

**Key Words :** *Ipomoea aquatic*, anti-inflammation, microglial cells, Nrf2 signaling, anti-oxidants

## 1. 서 론

공심채는 메꽃과의 일채소로서 중국남부와 동남아시아 일대에 널리 서식하는 열대식물이며 서구권에서는 모닝글로리라는 이름으로 널리 알려져 있다. 공심채는 예로부터 식품으로서 널리 소비 되어 왔고 향당뇨(Malalavidhane et al. 2003), 변비개선(Samuelsson et al. 1992), 피부미백, 피부장벽 개선효과(Kim 2017) 등이 보고된 바 있으나 뇌염증 억제 효과는 아직까지 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 공심채 추출물의 뇌염증 효과를 최초로 검정하였고 이의 결과를 보고하는 바이다. 중추신경계에는 혈뇌장벽 (Blood-brain barrier)이라는 혈관내 내피세포들이 밀착결합되어 있는 특수한 세포막의 구조를 갖고있어 뇌 기능 유지에 필수적인 물질만을 선택적으로 통과시켜 뇌의 기능을 정상적으로 유지하고 외부 물질로부터 뇌를 보호하는 역할을 한다(Pardridge 2022). 이로 인해 BBB로 인해 표적세포까지 전달되지 못하는 물질들이 많다. 에틸아세테이트 추출물의 항산화 및 항염증에 효능이 있는 페놀릭 물질이 많이 존재하

며 특히 저분자의 물질을 분획할 수 있어 BBB를 통과하여 뇌세포 기능에 도움이 될 것으로 생각되어 에틸아세테이트 분획물을 본 연구에 사용하였다. 파킨슨병과 알츠하이머병은 뇌의 인지기능을 담당하는 hippocampus나 cortical 뉴런세포의 사멸에 의해서 일어나는 신경퇴행성질환 중 하나이다(Barnett 2019). 이러한 퇴행성뇌질환의 특징은 뇌 세포내 neurofibrillary tangles (MFTs), amyloid- $\beta$  펩타이드가 축적되는 것이다. 이렇게 축적된 물질들은 시냅스와 신경세포의 사멸을 일으키게 된다. 이러한 단백질의 응집(agggregation)뿐만 아니라, 신경면역반응의 변화도 신경세포 사멸의 원인이 된다고 알려져 있다(Hickman & Khoury 2014). 미세아교세포(microglia)는 중추신경계의 선천적인 면역세포 중 하나이다(Ginhoux et al. 2013). 미세아교세포는 뇌의 다른 병리학 적 기전이나 뇌손상으로 인하여 나타나는 면역반응을 일으킨다(Rozemuller & Muiswinkel 2000). 미세아교세포는 정상상태에서는 휴지기 상태(resting stage)를 존재하며 외부의 자극에 의해 활성화되고 활성화된 미세아교세포는 병원균의 식균작용과 병변 부위의 세포 파편 및 퇴화 세포 제거에 중

\*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

요한 역할을 한다. 활성화된 미세아교세포는 cytokine, NO synthase isoform (nNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 reactive oxygen species (ROS)와 같은 염증매개체를 생성하여 신경 기능을 방해하고 세포 손상을 일으킨다 (Solito & Sastre 2012; Suzumura 2013). LPS에 의해 염증반응이 유도된 미세아교세포는 과도하게 활성화 되어 nitric oxide (NO)와 염증성 cytokine인 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-6 (IL-6) 등을 분비하여 염증반응을 매개한다(Tao et al. 2021). Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) 그리고 serine, threonine을 인산화시키는 효소인 p38이 포함되는데 이는 대식세포 초기 단계에서 면역반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Byun 2013). 산화적 스트레스나 염증 반응에 의해 핵으로 전이가 되어 heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)과 같은 항산화 단백질을 발현시킨다. 최근 논문에 의하면 Nrf2 기전은 산화적 스트레스에 의한 방어기작 뿐 아니라 뇌세포에서 미세아교세포의 면역반응에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Yang & Chen 2021). 미세아교세포의 활성 조절과 Nrf2의 활성화는 퇴행성뇌신경질환에 중요한 치료방법으로 연구되고 있으며, 특히 식품 소재나 천연물을 이용하여 미세아교세포의 활성을 조절하여 뇌신경세포의 사멸을 억제하고자 하는 노력이 진행되고 있다(Choi et al. 2023). 본 연구에서는 공심채의 에틸아세테이트 추출물이 미세아교세포의 과면역 활성을 억제하고 항염증조절인자를 조절하여 뇌신경세포의 효능을 나타내는지 확인하고자 하였다. 추후에는 추가적으로 공심채의 어떤 성분이 뇌염증억제 역할을 하는지 LC/MS 기법으로 분석할 예정이다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 재료 및 방법

본 연구에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin (PS), fetal bovine serum (FBS) 및 phosphate buffered saline (PBS)은 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 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA), RNA extract kit는 Macherey-Nagel(Macherey-Nagel, Düren, Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

### 2. *Ipomoea aquatic* extracts (IAE) 추출물 제조

본 연구에 사용된 공심채, *Ipomoea aquatic* (KFRI-GAP-

0077)는 2020년 한국 경기도 안산시에서 채취된 것으로 증류수로 세척하고, 동결 건조한 후 믹서기를 이용하여 분쇄한 뒤 메탄올을 사용하여 상온에서 1시간씩 3회 추출하였다. 이를 여과하여 얻어진 상등액은 회전식 감압농축기로 완전히 농축하여 메탄올 추출물을 제조하였다. 이후 메탄올 추출물에 물과 에틸아세테이트를 넣고 분획 한 뒤 농축하여 에틸아세테이트 가용성 분획물로 제조한 공심채 추출물은 -70°C에 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 3. 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 mouse 유래 microglia BV2 cell로 경희대학교 의과대학 생리학교실에서 분양 받아 DMEM배지에 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 세포가 80-90% confluent한 상태에서 10회 이상 계대배양 한 뒤 사용하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

BV2 cell에서 IAE가 세포 생존율에 영향을 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 세포는 96-well plate에 3 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 100  $\mu$ L씩 분주하여 세포 배양기에서 24시간 배양한 뒤 모든 배양액을 제거하고 LPS 0.1  $\mu$ g/mL과 IAE를 각각 10, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하고 18시간 배양하였다. 18시간 후, MTT 시약 0.1 mg/mL의 농도로 희석한 후 100  $\mu$ L을 첨가하여 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 추가 배양하였다. 모든 배양액을 제거 한 뒤 DMSO에 용해시킨 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Kim et al. 2018). 세포 생존율(%)은 아래와 같은 식을 사용하여 나타내었다.

세포 생존율(%)

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

### 5. Nitric Oxide (NO) 농도 측정

세포로 생성된 Nitric Oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 NO assay 방법을 이용하여 측정하였다. LPS에 의해 활성화된 BV2 cell로부터 NO의 생성량을 측정하기 위해 LPS (0.1  $\mu$ g/mL)와 IAE (10, 50, 100  $\mu$ g/mL)을 동시에 처리하여 18시간 배양하였다. 상등액(50  $\mu$ L)은 다른 96 well-plate에 옮기고 Griess reagent 를 1:1 비율(50  $\mu$ L)로 15분간 차광한 곳에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate (NaNO<sub>2</sub>) 표준액의 농도를 기준(standard curve)으로 형성된 NO의 함량을 계산하였다(Green et al. 1982).

### 6. 염증조절 바이오마커 단백질 발현

BV2 세포를 60 mm plate에 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여

24시간 동안 배양하였다. 이후 모든 배양액을 제거하고 IAE (10, 50, 100 µg/mL)과 LPS (0.1 µg/mL)을 동시에 처리하여 추가로 18시간 동안 배양하였다. PBS를 이용하여 세척하고 scraper를 이용하여 세포를 회수 한 뒤 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 세포에 Pro-prep (iNtRON biotechnology, Seongnam Korea) lysis buffer 첨가하고 ice에 10분간 반응시킨 후 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 취하여 총 단백질을 얻고, 총 단백질은 BCA protein detection kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량 하였다. 20 µg/mL의 단백질을 취하여 2X LDS sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 첨가하고 100°C에서 boiling한 후 10% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 이후 PVDF membrane으로 transfer하고, 5% skim milk (0.1% Tween 20 containing PBS, TBST) 로 1시간 blocking 하였다. TBST buffer로 3회 washing 후 β-actin, iNOS, COX-2, IL-1β, p-p38, p-ERK, p-JNK, p-p65는 1차 항체는 모두 1:3,000 비율로 희석하고 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 이후 TBST로 3번 washing 한 뒤 5% skim milk로 희석한 2차 항체(1:5,000)를 상온에서 60분간 반응시킨 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 1:1 비율로 멤브레인에 반응 시킨 후 image analyzer (ChemiDoc XRS+imaging system, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 밴드를 확인하고 Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

7. 염증사이토카인 mRNA 발현량 분석

BV2 cell에서 염증성 cytokine 생성 저해에 미치는 영향을 평가하기 위해 RT-PCR을 실시하여 mRNA 수준에서 변화를 확인하였다. NucleoSpin RNA kit를 이용하여 RNA를 추출하였고, 추출한 RNA 펠렛을 nuclease-free water에 용해시키고 Nano drop one (Thermo Fisher scientific, Cleveland, OH, USA)를 사용하여 RNA농도를 측정 하였다. cDNA 합성은 Biorad사의 iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)의 프로토콜을 따라 Real-time PCR기

와 thermal cycler를 이용하여 cDNA를 합성하였다. mRNA 발현은 QuantStudio™3 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific, USA)과 iQ™ SYBR® green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 20 µL씩 첨가하여 mixture를 만들어. initial denaturation (10 min, 95°C), denaturation 40 cycle (15 s, 95°C), annealing 40 cycle (30 s, 60°C)로 반응하였다. 발현량은 Quantstudio™ design & Analysis software를 이용하여 분석하였고, 모든 값은 하우스 키핑 유전자인 GAPDH를 사용하여 RNA양을 보정하였다. 사용한 프라이머는 <Table 1>과 같다.

8. Immunofluorescence (IFC) 분석

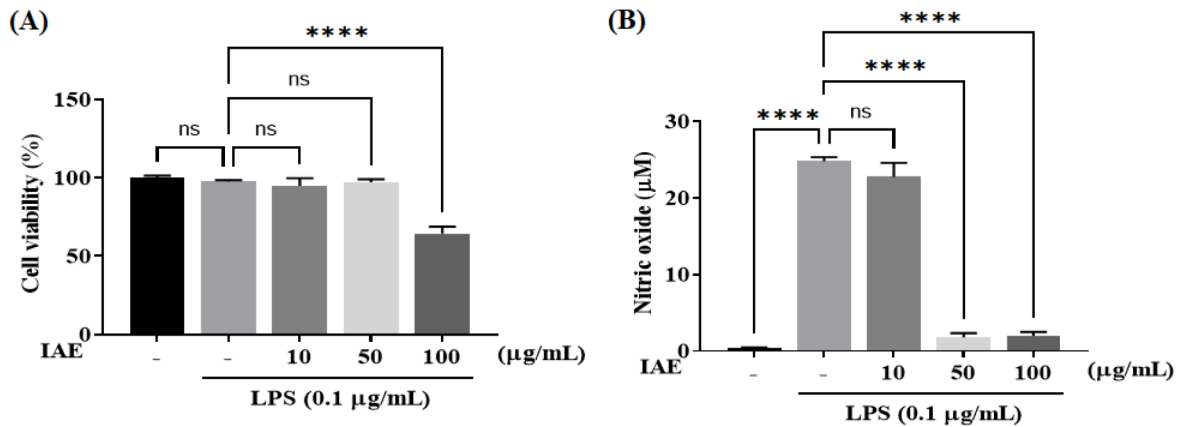
Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)의 translocation을 평가하기 위해 세포를 4-chamber에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 뒤 IAE를 6시간 반응시켰다. 이후 4% formaldehyde (Deajung Chemical & Metals Co. Ltd., Korea)로 15분간 고정하고 0.05% saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 으로 침투시킨 뒤 PBS로 3번 washing 하였다. 이후 1% BSA로 실온에서 30분 방치하고 Nrf2 antibody (1:200)으로 4°C에서 overnight 하였다. 다음 날, 2차 antibody, Alexa Fluor Plus 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)를 1:500으로 희석 한 뒤 실온에서 1시간 반응 시킨 후 DAPI (4,-diamidino-2-phenylindole)(VECTASHIELD: Vector Laboratories, USA)로 핵을 염색 시켰다. Cytosol (green)과 nuclei (blue)는 fluorescence microscopy (Fluoview™ FV300, Olympus, Japan)로 이미지화 하여 발현량을 확인하였다.

9. 통계분석

모든 실험은 3회 반복하고 실험결과의 오차는 Mean± standard error of mean (SEM)로 표시하였다. 집단 간 차이는 One-way ANOVA로 분석한 후에 Tukey’s method로 사후 검증하였다. 통계분석은 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 \*\*\*p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001 이하 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

<Table 1> Primer sequences for real time RT-PCR

Gene name	Primer sequence	Sequence
IL-1β	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-α	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 IAE on cell viability and NO production in LPS stimulated BV2 microglial cells.

(A) BV2 cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and IAE at different concentrations (10, 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 IAE at different concentrations (10, 50, 100 µg/mL) and incubated for 18 hours. 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. n=3, \*\*\*\*<0.0001 vs LPS-treated group.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. IAE의 세포 생존율과 NO 생성 억제 효능

본 연구는 IAE의 항염증 효과를 확인하고자 하였으며 이를 확인함으로써 추후 뇌질환 예방 및 뇌 보호 효능에 대해서 생물학적 활성을 연구하는데 도움이 되고자 한다. Microglia BV2 cell에서 IAE가 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS 0.1 µg/mL과 IAE 10, 50 100 µg/mL를 동시에 처리하여 세포생존율을 확인하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군은 100% 세포생존율을 보였으며, LPS를 처리한 군에서는 97.5%로 나타났다. 반면 IAE 10, 50 µg/mL 처리한 군은 96.6, 94.6%의 세포생존율을 나타내었고, IAE 100 µg/mL군은 53.6%의 세포생존율로 세포 독성이 나타났으므로 모든 실험은 독성이 없는 농도 IAE 50 µg/mL로 실험을 진행하였다<Figure 1A>. 기존에 발표된 연구들에 의하면 NO의 농도 증가는 면역 활성의 증가되는 지표로 사용되고 있다(Chen et al. 2018; Han et al. 2021). 내독소의 하나인 LPS는 세포에서 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 전염증성 사이토카인을 증가시키며, NO 등의 염증매개물질을 분비한다고 알려져 있다(Lee & Lim 2008). 본 연구는 LPS에 의해 microglia BV2 cell로부터 생성되는 NO에 대한 IAE의 억제효과를 알아 본 결과 LPS 처리군은 대조군에 비해 NO의 생성이 80배 (24.8 µM) 증가하여 과도한 염증반응이 유도되었음을 확인하였고 IAE 10, 50 µg/mL 농도에서 각각 22.7, 1.8 µM로 NO의 생성량이 감소하였다<Figure 1B>. 반면 IAE 100 µg/mL에서는 2.0 µM의 NO 생성물이 나타났지만 이는 세포 독성에 의해 NO의 생성이 저해된 것으로 판단된다. 따라서 LPS에 의해 활성화된 microglia BV2 cell에서 IAE (50 µg/mL)는 NO 생성을 억제함으로써 염증을 완

화할 수 있는 효능이 있음을 확인하였다.

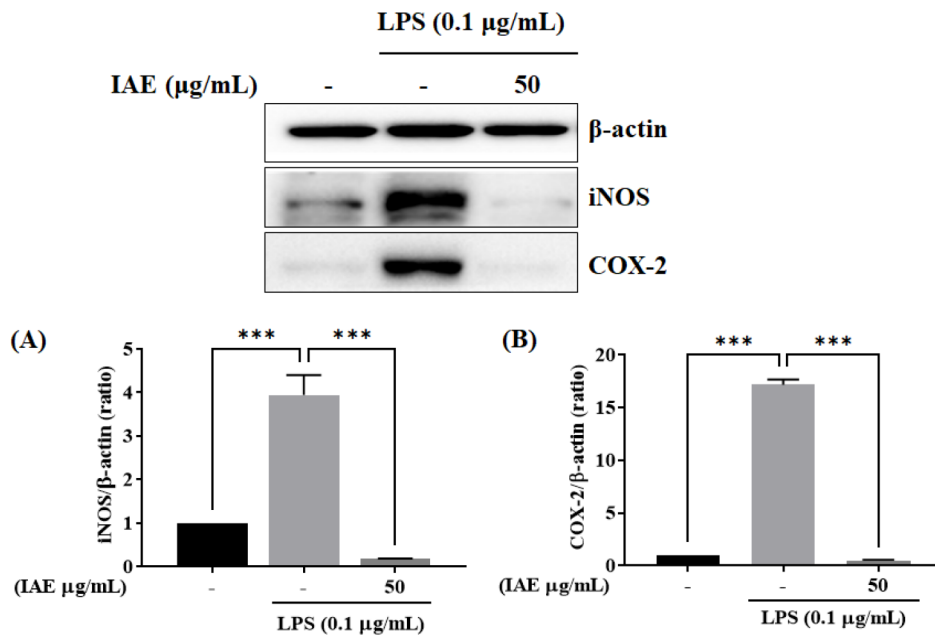
#### 2. IAE의 염증성 매개인자의 생성에 미치는 영향

염증 진행과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 iNOS 및 COX-2는 효소의 비정상적인 활성화가 진행되면 발현한다고 알려져 있다(Murakami & Ohigashi 2007). BV2 cell에서 IAE의 NO 생성억제효능을 확인하였고 LPS 자극에 의해 NO를 생성하는 것으로 알려져 있으며 염증 단계에서 중요한 역할을 하는 염증성 사이토카인인 COX-2와 iNOS의 단백질 발현의 양을 측정하였다. 그 결과 LPS 처리군에서는 대조군에 비해 iNOS의 3.9배 단백질 발현량이 증가하였고 IAE는 LPS 처리군 보다 iNOS의 단백질 발현량이 24배 감소하였다<Figure 2A>. 이는 IAE는 염증반응을 일으키는 iNOS 단백질 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제시키는 것으로 사료된다. 사람의 정상적인 조직에서는 COX-2가 측정되지 않지만, 염증반응을 자극하는 LPS와 같은 경우에는 COX-2가 빠르게 활성화 된다(Yang et al. 1999). <Figure 2B>와 같이 LPS 처리군은 대조군에 비해 COX-2 발현량이 17배 증가하여 염증반응이 활성화 된 것을 확인할 수 있었고 IAE는 대조군(ratio 1) 보다 낮은 단백질 발현량(0.5)을 나타내었다. 이는 IAE는 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2의 발현을 억제하는 효과를 가지며, 이로 인해 염증매개 인자인 NO의 생성을 억제 하는 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

#### 3. IAE가 염증성 cytokine 생성에 미치는 영향

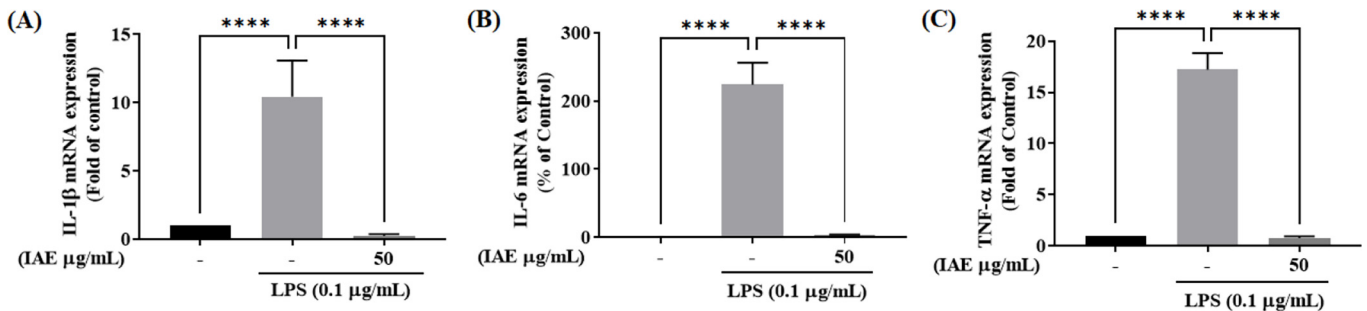
신경 염증반응에서 중요한 요소로 알려져 있는 Interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α과 같은 염증성 cytokine은 신경 염증을 악화시키는 인자로 중요하다(Kim





<Figure 2> The effects of IAE on iNOS and COX2 inhibition in LPS stimulated BV2 microglia.

BV2 microglia cells were treated with LPS (0.1 μg/mL) and IAE 50 μg/mL, cultured for 18 hours, 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. n=3, \*\*\*p<0.001 vs LPS-treated group.



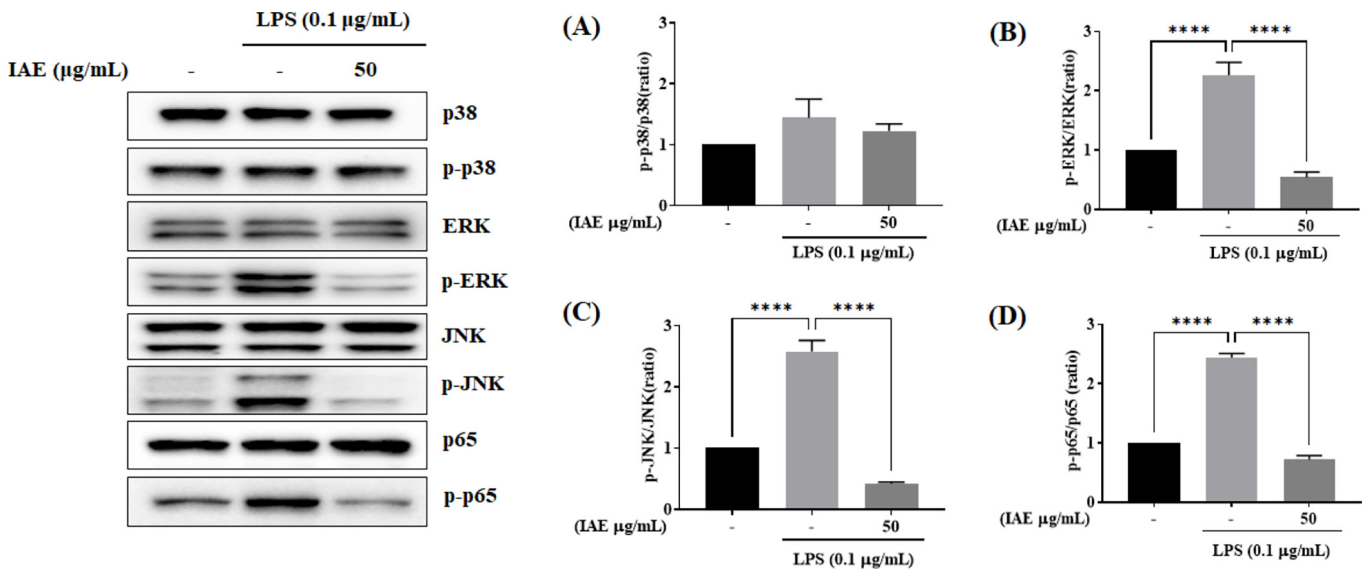
<Figure 3> The effects of IAE on the cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) mRNA expression in LPS activated BV2 microglia cell.

BV2 microglia cells were treated with LPS 0.1 μg/mL and IA 50 μg/mL, cultured for 18 hours, 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. n=3, \*\*\*\*<0.0001 vs LPS-treated group.

et al. 2016). 본 실험은 LPS로 자극한 microglia BV2 cell 에 IAE를 처리하여 염증성 cytokine이 효과적으로 조절하는 지 mRNA 수준의 변화를 관찰하였다. <Figure 3>의 결과와 같이 LPS 처리군에서는 염증성 cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α)의 유전자 발현량은 대조군(ratio 1)에 비해 각각 10, 224, 17배로 현저하게 증가하였고 IAE를 처리한 군은 대조군(ratio 1)과 유사한 수준으로 유전자 발현의 억제 효능이 나타났다. 이러한 결과를 통해 IAE는 iNOS 및 COX-2와 함께 cytokine들의 발현을 억제 시킴으로써 신경 염증 억제 효능을 갖고 있을 뿐만 아니라 새로운 천연물 유래 신경 염증 억제 물질로 사용 될 수 있을 것으로 예상된다.

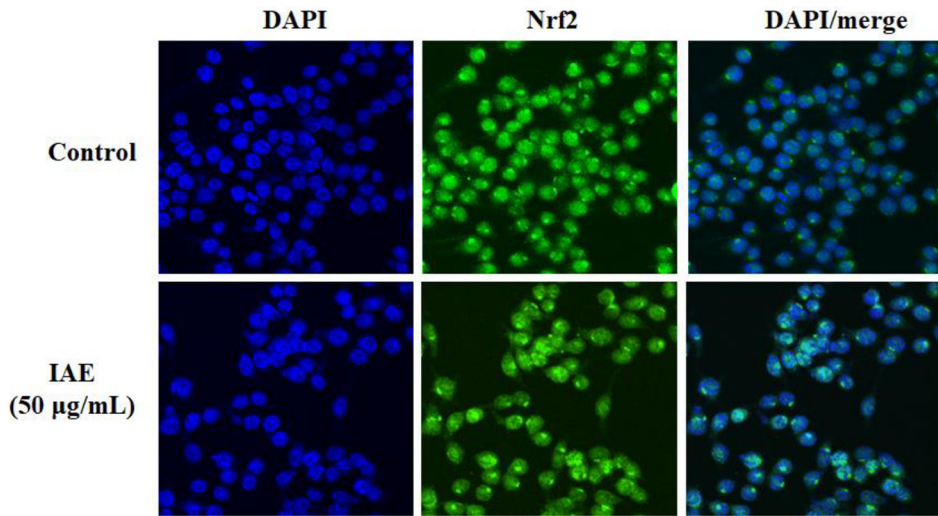
#### 4. IAE의 MAPKs와 NF-κB 신호전달 경로에 미치는 영향

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 LPS와 같은 염증성 자극으로 인해 발현되는 대표적인 세포 내 신호 전달 인자이다. 또한 extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2-protein kinase (JNK) 및 serine/threonine protein kinase (p38)의 3종은 (MAPKs)에 속하는 대표적인 단백질이며, 활성화 된 MAPKs는 NF-κB로 염증성 신호를 전달하여 염증성 매개 단백질 발현 및 세포 소기관에 영향을 미치게 된다(Cobb & Goldsmith 2000). ERK, JNK 및 p38를 포함하는 MAPKs는 신경염증 조절 인자의 생성에 관하여 세포 생존, 사멸 및 염증을 포함한 세포 기능을 조절하



<Figure 4> Effect of IAE on the expression of MAPKs and NF-κB in LPS activated BV2 microglia cells.

BV2 microglia were treated with IAE 50 μg/mL and LPS 0.1 μg/mL for 18 h and confirmed by western blot (p38, phosphorylated p38, ERK, phosphorylated ERK, JNK, phosphorylated JNK, p65, and phosphorylated p65). 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. n=3, \*\*\*\*<0.0001 vs LPS-treated group.



<Figure 5> Effects of IAE on Nrf2 nuclear translocation.

Confocal images of BV-2 microglia stained with cytosol (green) and DAPI (blue), a nuclear marker from untreated culture, and cultures treated with IAE. Olympus FluoView 300, ×40, Scale bar 30 μm. The cells were plated in 60 mm dish and incubated for 24 h, next the cells were treated with indicated concentration of IAE for 6 h and cytosolic and nuclear extracts were prepared for analysis.

고(Cargnello & Roux 2011; Lim et al. 2018), NF-κB는 면역 및 염증반응에서 cytokine 및 chemokine 같은 염증반응을 제어하는 유전자 발현을 조절하는 전사인자로 알려져 있다(Chen et al. 1999). 본 연구에서는 IAE의 NO 생성 억제 활성이 MAPKs (p38, ERK, JNK) 및 NF-κB의 인산화 억제와 관련이 있는지 확인하기 위해 microglia BV2 cell를 이용하여 LPS와 IAE를 처리하여 항염증 활성기전을 확인하였다. LPS 처리한 군에서 phosphorylated forms/total form

으로 나타낸 MAPKs (p38, ERK, JNK)의 인산화 비율이 대조군 대비 각각 1.4, 2.26, 2.57배 증가하여 cytokine 생성이 유발된 것을 확인하였다. 반면 IAE 처리에 의해 대조군 (ratio 1) 보다 ERK, JNK의 인산화가 50% 이상 감소된 것을 확인하였다<Figure 4A 4B 4C>. IAE은 LPS에 의해 유도되는 MAPKs의 3가지 경로의 활성화를 억제시켜 이는 세포사멸 억제 뿐만 아니라 스트레스 자극에 의한 인산화 조절이 가능하다고 판단된다. 또한 NF-κB의 발현에 IAE가 미

치는 영향을 확인한 결과<Figure 4D>, LPS를 처리하였을 때 NF- $\kappa$ B의 발현이 대조군 대비 2.4배 증가한 반면, IAE 50  $\mu$ g/mL군은 대조군(ratio 1)보다 30%의 인산화가 감소되었다. 이러한 결과를 종합해보면 IAE는 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화 억제와 MAPKs의 인산화를 억제에 관여하고 있음을 알 수 있었고 이러한 신호전달 억제는 염증성 cytokine과 NO 분비량 및 iNOS, COX-2의 발현을 감소시키고 염증성 매개 물질의 발현을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

#### 5. IAE가 Nrf2 신호전달 경로에 미치는 영향

다양한 염증성 및 산화적 자극에 대한 세포 내 항상성 유지에는 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)라는 전사 인자가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Huang et al. 2015; Lee et al. 2017). 산화-환원 조건이 정상적인 조건일 때, Nrf2는 주로 세포질에서 Nrf2의 대표적인 억제 인자인 Keap1에 결합하고, ubiquitin-proteasome 경로를 통해 쉽게 분해된다(Zhang et al 2017; Innamorato et al. 2018). 그러나 스트레스나 산화 방어 유도 물질에 노출되면 Nrf2는 Keap1에서 결합이 분해되고 세포의 핵으로 이동하며 세포 보호 및 항산화 효소 관련 유전자들의 전사 활동을 활성화시킨다(Kang & Hyun 2017). IAE의 항산화력이 생체 내 대표적인 항산화 시스템인 Nrf2 신호계와 연관되어 있는지 여부를 확인하였다. <Figure 5>의 immunofluorescence의 이미지에서 알 수 있듯이, IAE를 처리함에 따라 Nrf2의 cytosol (green)의 발현이 감소하는 반면, 핵 내부 (blue)의 Nrf2의 발현이 증가하는 양상을 보이는 것을 보아 Nrf2의 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이러한 효능은 IAE는 산화방지 관련 유전자인 Nrf2 신호전달계의 활성화와 연관성이 있음을 알 수 있었다. 추후 항산화 관련 단백질 발현을 확인하여 IAE가 BV2 cell에서 산화적 스트레스 보호효과가 있는지 확인 할 예정이다.

### IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 LPS로 유도된 microglia BV2 cell에서 공심채, *Ipomoea aquatic* extracts (IAE)의 항염증 효능을 평가하였다. IAE 100  $\mu$ g/mL 농도에서 세포독성을 나타내었고 IAE 10, 50  $\mu$ g/mL 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았으며 LPS 자극에 의한 NO의 생성량을 감소시켰다. 또한 IAE는 LPS로 자극으로 분비된 염증성 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )과 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 감소시켰다. 대표적인 염증관련 신호 전달경로인 NF- $\kappa$ B/MAPKs 관련 유전자의 단백질 발현을 검토한 결과, IAE에 의해 염증반응의 전사 인자인 NF- $\kappa$ B의 발현이 억제되었으며, MAPKs family인 인산화된 p38, ERK, JNK의 단백질 발현량이 억제된 것으로 보아 이는 신호전달 경로 억제를 통하여 IAE 추출물

은 항염증 활성이 나타난다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 IAE는 산화방지관련 핵 전사인자인 Nrf2의 발현에 영향을 미쳤다. 결과적으로 IAE는 MAPKs의 활성화 억제를 통해 염증 매개 물질의 생성을 억제시켜 항염증 활성에 영향을 미치는 것으로 판단되며 세포 보호방어 기작에 관련하는 Nrf2의 활성을 증가시키므로 항산화 관련 유전자의 발현에도 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이러한 연구결과에 따라 공심채는 노화나 지속적인 염증성 반응으로 인한 퇴행성 뇌신경 관련 질환의 예방 및 치료에 도움이 될 것으로 생각되며 추후 동물실험을 통해 전임상 연구를 진행하고자 한다.

#### 저자정보

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

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

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

### 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 기본사업(E0210300, E0212021)과 한국연구재단 바이오소재 활용기반조성사업(GA224600, 2022M3H9A1084670)의 지원을 받아 연구되었습니다.

### Conflict of Interest

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

### References

- Barnett R. 2019. Alzheimer's disease Lancet., 393(10181):1589
- Byun MW. 2013. Immunomodulatory activities of apple seed extracts on macrophage. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 42: 1513-1517
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK activated protein kinases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 75(1):50-83
- Cobb MH, Goldsmith EJ. 2000. Dimerization in MAP-kinase signaling. Trends Biochem. Sci., 25(1):7-9
- Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. 1999. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin. Chem., 45(1):7-17
- Chen Q, Qi C, Peng G, Liu Y, Zhang X, Meng Z. 2018. Immune-enhancing effects of a polysaccharide PRG1-1 from *Russula griseocarnosa* on RAW 264.7 macrophage cells via the MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways.

- Food. Agric. Immunol., 29(1):833-844
- Choi JW, Kim ST, Choi SY, Choi IW, Hur JY. 2023. Anti-inflammation Effect of *Cyrtomium fortunei* J.Sm. Extracts in Lipopolysaccharides-induced Microglia BV2 Cell. *J. Korean Soc. Food Cult.*, 38(3): 176-183
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. 2013. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell Neurosci.*, 7:1-14
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 126(1): 131-138
- Han NR, Kim HJ, Lee JS, Kim HY, Moon PD, Kim HM, Jeong HJ. 2021. The immune-enhancing effect of anthocyanin-fucoidan nanocomplex in RAW264.7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *J. Food Biochem.*, 45:e13631
- Hickman SE, El Khoury J. 2014. TREM2 and the neuro-immunology of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 88(4):495-498
- Huang BP, Lin CH, Chen HM, Lin JT, Cheng YF, Kao SH. 2015. AMPK activation inhibits expression of proinflammatory mediators through downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signaling in murine macrophages. *DNA Cell Biol.*, 34(2): 133-141
- Innamorato NG, Rojo AI, García-Yagüe AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A. 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.*, 181(1):680-589
- Kang KA, Hyun JW. 2017. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicol. Res.*, 33:1-5
- Kim HS. 2017. Effect of *Ipomoea aquatica* extract on anti-melanogenesis and skin barrier function. *J. Food Sci. Technol.*, 49(5):519-523
- Kim SJ, Lee S, Park SE, Lee JS, Chung MJ. 2018. Neuroprotective effects of bread containing *Aster scaber* Thunb. and *Stachys sieboldii* Miq. against ethanol- or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell death. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 47:24-31
- Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. 2016. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Bio. Psychiatry.*, 64:277-284
- Lee DH, Park JS, Lee YS, Sung SH, Lee YH, Bae SH. 2017. The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB Rep.*, 50(2): 91-96
- Lee SJ, Lim KT. 2008. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipo-polysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377:45-54
- Lim HS, Kim YJ, Kim BY, Park G, Jeong SJ. 2018. The Anti-neuroinflammatory Activity of Tectorigenin Pretreatment via Downregulated NF-kappaB and ERK/JNK Pathways in BV-2 Microglial and Microglia Inactivation in Mice With Lipopolysaccharide. *Front. Pharmacol.*, 9(462):1-13
- Malalavidhane TS, Wickramasinghe SM, Perera MS, Jansz ER. 2003. Oral hypoglycaemic activity of *Ipomoea aquatica* in streptozotocin-induced, diabetic wistar rats and type II diabetics. *Phytother. Res.*, 17(9):1098-1100
- Murakami A, Ohigashi H. 2007. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer.*, 121(11):2357-2363
- Pardridge WM. 2022. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 14(6):1283
- Rozemuller JM, van Muiswinkel FL. 2000. Microglia and neurodegeneration. *Eur. J. Clin. Invest.*, 30(6):469-470
- Samuelsson G, Farah MH, Claeson P, Hagos M, Thulin M, Hedberg O, Warfa AM, Hassan AO, Elmi AH, Abdurahman AD. 1992. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia. II. Plants of the families combretaceae to labiatae. *J. Ethnopharmacol.*, 37(1): 47-70
- Solito E, Sastre M. 2012. Microglia function in Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.*, 3(14):1-10
- Suzumura A. 2013. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 14(1):16-20
- Tao W, Hu Y, Chen Z, Dai Y, Hu Y, Qi M. 2021. Magnolol attenuates depressive-like behaviors by polarizing microglia towards the M2 phenotype through the regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway. *Phytomed.*, 91:153692
- Yang F, Chen R. 2021. Sestrin1 exerts a cytoprotective role against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal injury by potentiating Nrf2 activation via the modulation of Keap1. *Brain Res.*, 1750 (1):147165
- 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
- Zhang R, Xu M, Wang Y, Xie F, Zhang G, Qin X. 2017. Nrf2-a Promising Therapeutic Target for Defending Against Oxidative Stress in Stroke. *Mol. Neurobiol.*, 54:6006-6017