

LPS로 자극된 BV2 cell에서 총명공진단(聰明拱辰丹)의 신경염증 보호효과

유수민^{1#}, 권빛나^{1,2#}, 김동욱^{1,2#}, 오진영^{1,2}, 하원배^{3,4}, 이정환^{3,4}, 김호인⁵
주종천^{3,5}, 김동구^{6*}, 배기상^{1,2,3*}

1 : 원광대학교 한의과대학 약리학교실, 2 : 원광대학교 한방심신증후군연구센터
3 : 원광대학교 한의과대학 한국전통의학연구소, 4 : 원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실
5 : 원광대학교 전주한방병원 사상체질의학교실, 6 : 동의대학교 한의과대학 본초학교실

Anti-neuroinflammatory Effects of Chongmyunggongjin-dan on LPS-stimulated BV2 Cells

Sumin Ryu^{1#}, Bitna Kweon^{1,2#}, Dong-Uk Kim^{1,2#}, Jin-Young Oh^{1,2}, Won-Bae Ha^{3,4}
Jung-Han Lee^{3,4}, Hoin Kim⁵, Jong Cheon Joo^{3,5}, Dong-Gu Kim^{6*}, Gi-Sang Bae^{1,2,3*}

1 : Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University
2 : Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University
3 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University
4 : Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Wonkwang University
5 : Dept of Sasang Constitutional Immune Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University
6 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

Objectives : Neuroinflammation is a well-known pathological factor in neurodegenerative diseases, highlighting the urgent need for effective therapeutic agents. Chongmyunggongjin-dan (CGD) has been traditionally recognized in Korea for its benefits in boosting immunity, promoting mental calmness, and supporting physical recovery. However, no experimental evidence currently supports its effects on Alzheimer's disease. This study aimed to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of CGD in BV2 cells activated by lipopolysaccharide (LPS).

Methods : BV2 cells underwent pretreatment with CGD for 1 h before LPS stimulation. To assess CGD's neuroprotective potential, we measured the expression levels of inflammatory mediators, including nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α in LPS-activated BV2 cells. Additionally, the regulatory pathways influenced by CGD were examined by analyzing the protein levels of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) 1/2, and C-Jun N-Terminal Kinases (JNK) and inhibitory κ -B α (I κ -B α) through western blotting.

*Corresponding author : Dong-Gu Kim, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

· Tel : +82-51-890-3371 · E-mail : kdq2409@deu.ac.kr

Gi-Sang Bae, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6842 · E-mail : baegs888@wku.ac.kr

#First author : Sumin Ryu, Bitna Kweon, and Dong-Uk Kim, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6842 · E-mail : appmusic@naver.com, kbn306@naver.com, ckck202@naver.com

· Received : 10 October 2024

· Revised : 14 November 2024

· Accepted : 25 November 2024

Results : The results demonstrated that CGD treatment suppressed NO production in LPS-stimulated BV2 cells. And the mRNA expression levels of iNOS and COX-2 were decreased by CGD treatment in LPS-stimulated BV2 cells. CGD also significantly downregulated the mRNA levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , and it suppressed the phosphorylation of P38, ERK 1/2, and JNK.

Conclusions : These findings indicate that CGD may offer neuroprotective activity by mitigating neuroinflammation through the inhibition of MAPK signaling pathways.

Key words : Chongmyunggongjin-dan (CGD), Alzheimer's disease (AD), LPS (Lipopolysaccharide), neuroinflammation

I. 서 론

신경염증은 중추신경계의 항원, 비정상적 단백질 축적, 자가면역 등에 의한 신경 조직 손상으로부터 신경세포를 보호하는 중요한 방어 기전이지만, 중추신경계의 과도한 염증반응이 지속되면 퇴행성 신경질환의 원인이 된다고 알려져 있다¹⁻³. 퇴행성 신경질환은 신경세포의 변형 및 사멸로 인해 신경망 구조와 기능이 붕괴되고 인지, 기억, 행동 및 운동 기능의 손실이 특징적으로 나타난다⁴. 대표적인 퇴행성 신경질환에는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)과 파킨슨병 (Parkinson's disease)이 있으며 그 중 국내 알츠하이머 발병율이 증가하는 추세로 알츠하이머병으로 인한 사회, 경제적 부담은 급격히 증가하고 있다⁵. 지금까지 알츠하이머병의 원인으로 신경세포에 타우 (tau), 아밀로이드 베타 (amyloid β)와 같은 비정상적인 단백질의 축적이 지목되었고, 이와 관련된 치료제를 개발해오고 있었지만 아직까지 성공하지는 못하였다⁶. 현재는 신경염증이 퇴행성 신경질환에 주요한 원인이 주목받고 있으며 신경염증에 관한 여러 연구가 진행되고 있다⁷⁻¹².

신경염증에는 미세아교세포 (microglial cell)과 별아교세포 (astrocyte)와 같은 신경아교세포 (neuroglial cell)들이 관여하고 있으며, 특히 미세아교세포는 중추신경계에서 대식세포 (macrophage)의 역할을 하고 있다^{13,14}. 또한 미세아교세포는 결합이 있는 신경세포와 시냅스를 제거하여 중추신경계의 항상성 유지에 기여하며, 병원균과 비정상적인 단백질 축적으로부터 신경세포를 보호한다^{15,16}. 그러나 미세아교세포가 다양한 원인으로 인해 지나치게 활성화되면 interleukin (IL)-1 β , IL-6와 tumor necrosis factor (TNF)- α 같은 전염증성 사이토카인의 분비 및 염증성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현이 증가하고, 이로 인해 신경세포의 손상을 초래해 퇴행성 신경질환을 일으킬 수 있다¹⁷. 따라서 미세아교세포의 과도한 활성을 막아 신경염증을 줄이는 것이 퇴행성 신경질환 치료에 주요 타겟이 될 수 있다.

총명공진단은 녹용(鹿茸), 당귀(當歸), 산수유(山茱萸), 사향(麝香)으로 구성된 기본 공진단 처방에 총명탕에 배합되어 있는 석창포(石菖蒲), 복신(茯神), 원지(遠志) 등을 가미한 것이다. 총명공진단의 개별적인 약재들은 항염증 효과가 있다는 연구

결과들이 있고, 선행연구를 통해 총명공진단의 구성 약재들이 알츠하이머병 관련 유전자와 관련성이 높고, 염증반응을 조절하여 알츠하이머병에 작용할 가능성을 네트워크 약리학 분석을 통해 밝혀 냈다¹⁸⁻²⁰. 이에 본 연구를 통해 총명공진단의 항염증 효과를 마우스 미세아교 세포주인 BV2 세포를 이용한 신경염증 모델에서 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료 준비 및 제조

실험에 사용한 총명공진단은 원광대학교 한방병원(익산, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 증류수 600 mL에 30 g의 총명공진단을 첨가하고, 열수에서 2시간 동안 환류 추출을 진행하였다. 추출물은 Whatman 필터지(No.2)로 여과하고, 동결 건조하여 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다. 최종 추출 수율은 24.83%였고 총명공진단 추출물을 3차 증류수에 녹여서 필터 후 사용하였다. 총명공진단의 구성은 다음과 같다 (Table 1).

2) 시약

Easy-BlueTM total RNA extraction kit는 iNtRON biotechnology (성남, 한국)에서 구입하였다. RPMI Medium 1640, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin/streptomycin은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (pERK1/2), Phospho-c-Jun N-terminal kinase (pJNK), phospho-p38 mitogen activated protein kinase (pP38), ERK1/2, JNK, P38, inhibitory κ -B α (I κ -B α), β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하여, 1:1000의 농도로 사용하였다. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit IgG-HRP (Kary, TX, USA)에서 구입하여 1:5000의 농도로 사용하였다.

Table 1. The composition of Chongmyunggongjin-dan (CGD)

Latin Name	Scientific Name	Amount (mg)
Cervi Parvum Cornu	<i>Cervus nippon</i> Temminck	400
Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	400
Corni Fructus	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini	400
Rehmanniae Radix Preparata	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz ex Steudel	200
Red Ginseng(Ginseng Radix)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	200
Poria Sclertum Cum Pini Radix	<i>Poria cocos</i> Wolf	160
Polygalae Radix	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	80
Acori Graminei Rhizoma	<i>Acorus gramineus</i> Solander	80
Chrysanthemi Indici Flos	<i>Chrysanthemum indicum</i> Linné	40
Amomi Fructus	<i>Amomum villosum</i> Loureiro var. <i>xanthioides</i> T. L. Wu et Senjen	120
Moschus	<i>Moschus berezovskii</i> Flerove	33.3
Mel	-	1,900

2. 방법

1) 세포 배양

본 연구에서 사용된 mouse 유래 microglia cell인 BV2 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. 이들 세포주의 세포 배양액은 RPMI 1640에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 이들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTT 분석

BV2 세포를 24 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하고 증류수에 녹인 총명공진단을 0.1, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL의 농도로 처리해서 24시간 동안 배양하였다. MTT solution을 처리하고 배양기에서 30분 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하고 DMSO를 분주하여 formazan을 녹여내 SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

3) Griess assay

Griess 시약은 세포 배양액 내의 Nitric oxide (NO) 농도 측정을 위해 사용하였다. BV2 세포를 2×10⁵ cells/well 이 되도록 분주하고, 총명공진단을 1시간 전처리하고 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양한 후 상층액을 취하였다. 그 중 100 µL를 동량의 Griess 시약과 실온에서 반응시켰다. 이후 SpectraMax M2를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였으며, sodium nitrate (NaNO₂)를 이용한 표준액을 기준으로 세포로부터 생성된 NO의 양을 계산하였다.

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

1×10⁶ cells/well의 세포수로 6 well plate에 분주하고 총명공진단을 1시간 전처리하고 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 6

시간 배양한 후 세포 상층액을 제거하였다. Easy-Blue 1 mL로 세포를 용해시킨 뒤 chloroform 200 µL를 넣고 잘 섞어준 후 21,055 g에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하였다. 상층액과 2-propanol를 동일 비율로 넣고 상온에서 잘 섞어준 뒤 21,055 g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 침전물을 80% ethanol로 세척 후 건조하였다. 이후 침전물에 DEPC treated water를 15 µL씩 넣어 RNA를 용해시켰다. 추출한 RNA 1 µg은 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 µL와 primer (코스모진텍, 대전, 한국)는 SYBR Premix kit (Applied Biosystems, MA, USA)에 넣어 95°C에서 10분 동안 예비 가열 후, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing하는 방식으로 40번 반응시켰다. 모든 과정에서 GAPDH를 동시에 측정하여 RNA양을 보정하였다. 각 Primer의 염기서열은 Table 2에 나타났다.

Table 2. Primer sequence of SYBR Green Real-time PCR.

Gene	Primer
iNOS	F 5'-GTT GAA GAC TGA GAC TCT GG-3'
	R 5'-GAC TAG GCT ACT CCG TGG A-3'
COX-2	F 5'-GGT GGC TGT TTT GGT AGG CTG-3'
	R 5'-GGG TTG CTG GGG GAA GAA ATG-3'
IL-1β	F 5'-CCT CGT GCT GTC GGA CCC AT-3'
	R 5'-CAG GCT TGT GCT CTG CTT GTG A-3'
IL-6	F 5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'
	R 5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'
TNF-α	F 5'-AAC TAG TGG TGC CAG CCG AT-3'
	R 5'-CTT CAC AGA GCA ATG ACT CC-3'
GAPDH	F 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
	R 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'

5) Western blot analysis

5 × 10⁶ cells/dish의 세포수로 6 cm dish에 분주하고 총명공진단을 1시간 전처리하고 LPS (1 μg/mL)를 처리하였다. RIPA lysis buffer (iNtRON biotechnology, 성남, 한국)를 넣어 1시간 동안 세포를 lysis한 후 이를 21,055 g에서 20분 간 원심분리하고 상층액을 분리한 후 단백질 양을 측정하였다. 20 μg의 단백질을 10% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리시킨 후 nitrocellulose membrane으로 transfer하고 5% skim milk로 실온에서 2시간 blocking하였다. 각 표적 단백질에 대한 항체와 4℃에서 overnight 동안 반응시키고, 이후 2차 항체는 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 표적 단백질은 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 이미지화 하였다.

6) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± standard error of the mean (S.E.M.)로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램 (v22.0)의 one way ANOVA에 준하였고, Duncan method로 사후검증을 하였다. P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 총명공진단 추출물의 BV2 세포에 대한 독성

총명공진단 추출물이 BV2 세포에서 생리 활성은 최대로 발휘하되, 독성은 나타나지 않는 농도를 찾기 위해 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 총명공진단 추출물의 1 mg/mL 까지 처리하였을 때 유의미한 세포독성을 보이지 않는다는 것이 확인되었고, 이에 본 연구에서는 총명공진단 추출물을 1 mg/mL 이하의 농도를 사용하여 다음 실험들을 진행하였다 (Fig. 1).

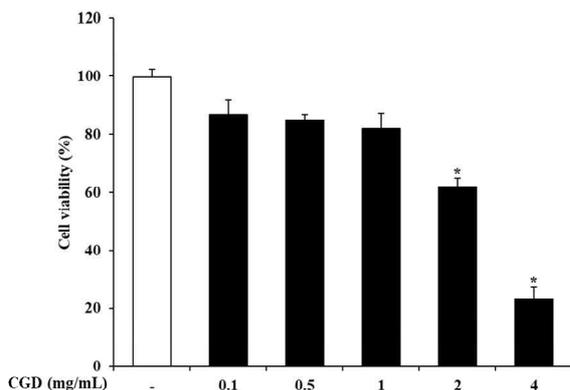


Fig. 1. Effect of cultivated ChongmyungGongjin-dan (CGD) in BV2 cells. BV2 cells were incubated with CGD (0.1, 0.5, 1, 2, and 4 mg/mL). After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are presented as the Mean ± S.E.M. Results are representative of three independent experiments. *P < 0.05 vs saline treatment alone.

2. LPS로 자극한 BV2 세포에서 총명공진단 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

총명공진단 추출물이 LPS로 자극한 BV2 세포의 NO 생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 Griess assay를 진행하였다. 총명공진단 추출물을 BV2 세포에 1시간 동안 전처리한 후, 24시간 동안 LPS로 염증반응을 유도하였다. LPS로 인해 증가되었던 NO가 총명공진단 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 2).

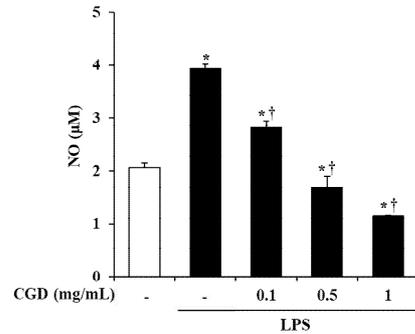


Fig. 2. Effects of CGD on NO production in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with 0.1, 0.5, 1 mg/mL of CGD for 1 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL). After 24 h, NO concentration in supernatant was evaluated by griess assay as described in Materials and Methods. Results are presented as the Mean ± S.E.M. Results are representative of three independent experiments. *P < 0.05 vs saline treatment alone, †P < 0.05 vs LPS treatment alone.

3. LPS로 자극한 BV2 세포에서 총명공진단 추출물이 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

LPS로 자극한 BV2 세포에서 염증 반응이 발생할 시, 총명공진단이 염증 매개 인자 유도 효소인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Real time RT-PCR을 진행하였다. 총명공진단을 BV2 세포에 1시간 동안 전처리한 후, 6시간 동안 LPS로 자극하였다. 총명공진단을 처리한 군에서 LPS로 인해 증가된 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 3).

4. LPS로 자극한 BV2 세포에서 총명공진단 추출물이 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

총명공진단 추출물이 전염증성 사이토카인을 효과적으로 조절할 수 있는지 평가하기 위해서 Real time RT-PCR을 진행하였다. 총명공진단 추출물을 BV2 세포에 1시간 동안 전처리한 후, 6시간 동안 LPS로 염증을 유도하였다. 총명공진단을 처리한 군에서 LPS로 인해 증가된 IL-1β, IL-6 및 TNF-α mRNA 발현을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 4).

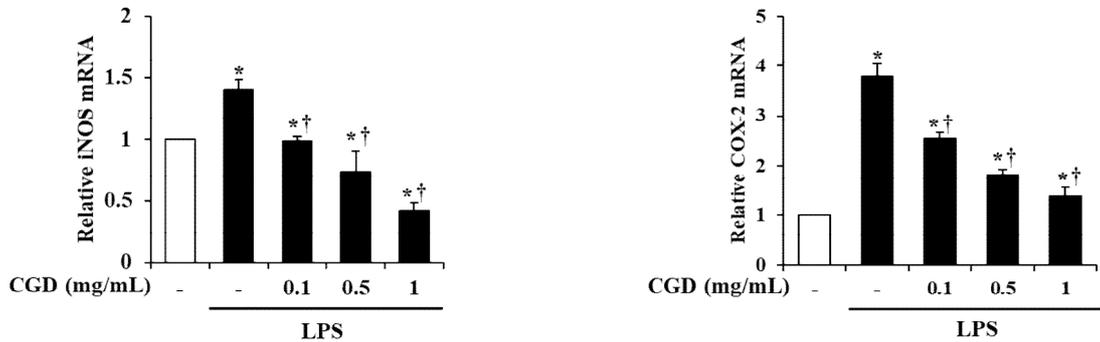


Fig. 3. Effect of CGD on mRNA expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with 0.1, 0.5, 1 mg/mL of CGD for 1 h and then stimulated with LPS (1 μ g/mL). After 6 h, the mRNA expression was measured using the Real time RT-PCR. Results are presented as the Mean \pm S.E.M. Results are representative of three independent experiments. * P < 0.05 vs saline treatment alone. † P < 0.05 vs LPS treatment alone.

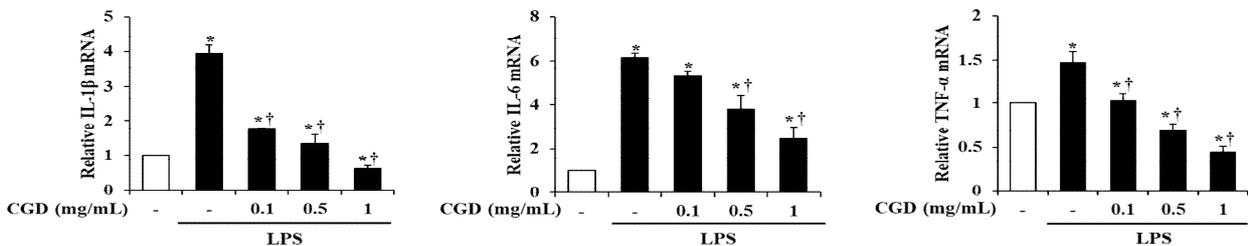


Fig. 4. Effect of CGD on LPS-induced mRNA expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were pre-treated with 0.1, 0.5, 1 mg/mL of CGD for 1 h and then stimulated with LPS (1 μ g/mL). After 6 h, the mRNA expression was measured using the Real time RT-PCR. Results are presented as the Mean \pm S.E.M. Results are representative of three independent experiments. * P < 0.05 vs saline treatment alone. † P < 0.05 vs LPS treatment alone.

5. LPS로 유도한 총명공진단 추출물이 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 및 nuclear factor (NF)- κ B의 활성에 미치는 영향

LPS로 유도한 BV2 세포 염증 시, 총명공진단이 MAPKs 및 NF- κ B 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 총명공

진단 추출물을 1시간 전 처리한 후 LPS로 자극하였다. LPS를 단독 처리한 군에서 ERK1/2, JNK, P38이 인산화되며, I κ -B α 가 분해되는 것을 확인하였다. 총명공진단을 처리하였을 때, LPS 단독 처리군에 비해 ERK1/2와 JNK, P38의 인산화가 억제되었지만, I κ -B α 분해에는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 5).

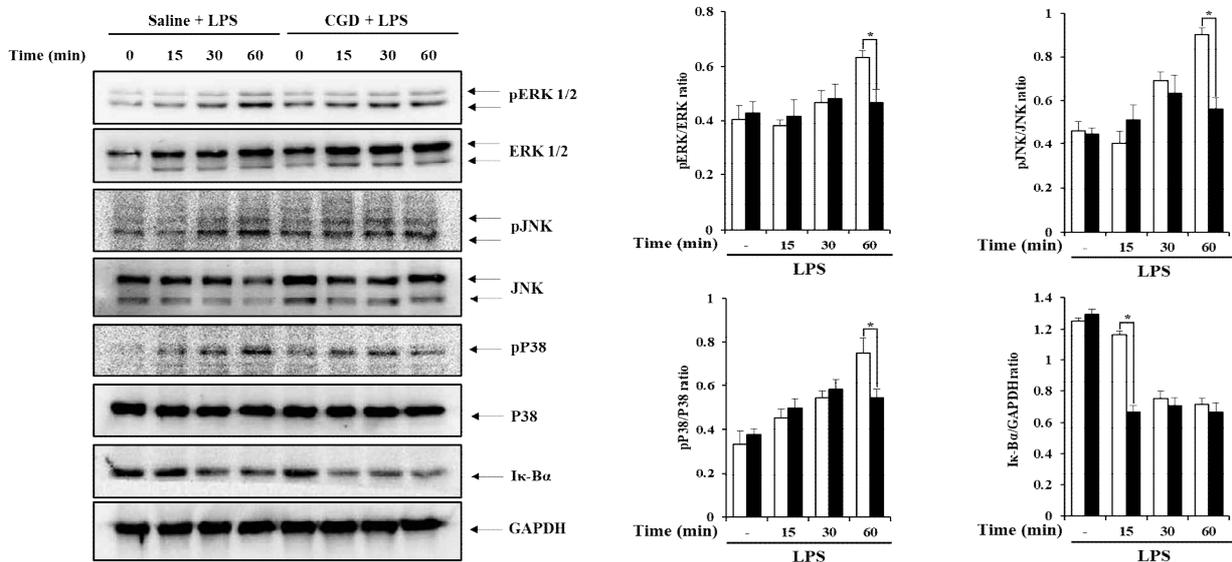


Fig. 5. Effect of CGD on MAPKs phosphorylation and I κ -B α degradation in LPS-stimulated BV2 cells. The cells were pretreated with CGD (1 mg/mL) for 1 h and then incubated with LPS (1 μ g/mL) for indicated time. Results are presented as the Mean \pm S.E.M. Results are representative of three independent experiments. * P < 0.05 vs saline treatment alone.

IV. 고찰

미세아교세포는 중추신경계의 초기 조직 손상에 반응하는 중요한 역할을 하지만 과도하게 활성화된 미세아교세포는 활성 산소종, NO, 전염증성 사이토카인 등을 분비하여 과도한 염증 반응을 일으키고 오히려 신경 조직을 손상시킨다²¹⁾. 이로 인해 신경염증은 다양한 질병의 원인이 되며, 특히 최근에는 퇴행성 신경질환의 주요한 원인으로 생각되고 있어 미세아교세포를 통한 신경염증 조절이 퇴행성 신경질환의 새로운 접근법으로 떠오르고 있다³⁾. 네트워크 약리학 분석을 통한 선행연구에서 총명공진단이 알츠하이머병에서 염증을 조절할 가능성을 확인하였기 때문에 마우스 미세아교세포주인 BV2 세포에서 총명공진단의 항신경염증 효과를 조사하였다.

NO는 전구물질인 L-arginine을 사용하여 NOS에 의해 합성되며, 인체의 다양한 곳에서 생리적, 병리적 작용을 하고 있다²²⁾. NOS는 neuronal NOS (nNOS), iNOS, endothelial NOS (eNOS)로 3가지 유형의 타입이 있으며, 이 중에서 iNOS 염증 반응이나 내독소에 의해 활성화되어 대량의 NO를 생산해서 염증 반응에 관여한다^{23,24)}. 하지만 과도하게 생산된 NO는 신경을 손상시키거나 혈액-뇌 관문 (Blood-brain barrier)을 손상시키는 등, 중추신경계에 악영향을 미친다²⁵⁾. 그러므로 이번 연구에서는 총명공진단이 LPS로 자극한 BV2 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 우선 연구를 진행하기 앞서 BV2 세포에 총명공진단 추출물을 처리하여 세포 독성을 나타내지 않는 농도를 탐색하였고, 총명공진단 추출물 1 mg/ml를 최고농도로 설정하여 후속 실험을 진행하였다 (Fig. 1). LPS로 자극한 BV2 세포에서 NO 생성량이 급격하게 증가되었으나 총명공진단 추출물을 전처리한 군에서는 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되었다 (Fig. 2). 또한 총명공진단 추출물이 LPS로 자극한 BV2 세포에서 NO, Prostaglandin E2와 같은 염증성 매개인자를 생성하는 효소인 iNOS와 COX-2를 mRNA 수준에서 억제하였다 (Fig. 3).

정상적인 염증 반응은 해로운 자극원으로부터 몸을 지키는 훌륭한 방어기전이지만, 과도하게 증가된 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 같은 전염증성 사이토카인은 염증 반응을 촉진하여 정상 세포들을 손상시킨다^{26, 27)}. 활성화된 미세아교세포는 전염증성 사이토카인들을 분비하는 것으로 알려져 있으며 특히 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 는 다양한 퇴행성 신경질환의 진행과 관련되어 있다²⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 LPS로 인해 자극된 BV2 세포에서 전염증성 사이토카인의 생성에 대한 총명공진단 추출물의 효과를 평가해보았다. 총명공진단 추출물은 mRNA 수준에서 증가되었던 전염증성 사이토카인수치를 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 4).

신경염증의 신호전달 과정에는 다양한 분자들이 관여하며, 그 중에서도 MAPK와 NF- κ B를 통한 경로는 LPS에 의해 유발된 염증 반응에서 주로 관찰되는 기전이다^{11,29)}. MAPK 경로는 ERK 1/2, JNK, P38을 포함하며, 이들은 신경염증 조절 인자의 생성을 통해 세포 생존, 사멸, 염증 등 여러 세포 기능을 조절한다²⁹⁾. NF- κ B 또한 면역 및 염증 반응에서 사이토카인과 케모카인 같은 염증 반응 조절에 중요한 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다³⁰⁾. NF- κ B는 비활성 상태에서 억제성 단백질인 I κ -B α 와 결합한 상태로 세포질에 위치하지만, I κ -B α

의 인산화를 통한 분해가 발생하면 NF- κ B는 핵으로 들어가 전사 인자로 작용한다. 이번 연구에서는 총명공진단 추출물의 신경염증 억제 효과가 MAPK 및 NF- κ B 경로를 통해 조절되는지 확인하기 위해 ERK 1/2, JNK, P38의 인산화와 I κ -B α 의 분해를 western blot을 사용해 조사하였다. 총명공진단 추출물은 LPS로 자극된 BV2 세포에서 ERK, JNK, P38의 인산화를 억제하였으나 I κ -B α 의 분해를 억제하지는 못했다 (Fig. 5).

본 연구의 결과를 종합해보면 총명공진단 추출물은 LPS로 인해 자극된 BV2 세포에서 ERK 1/2, JNK, P38의 인산화를 억제하여 염증 반응에 관여하는 인자의 생성, 분해를 억제하여 항신경염증 효과를 나타내는 것으로 보인다. 따라서 본 연구를 통해 총명공진단 추출물은 중추신경계의 신경염증으로 인한 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료제로서의 가능성을 보였다. 다만, 이번 연구는 세포 수준에서 총명공진단이 항신경염증 효과를 나타낼 가능성을 확인하였고, 동물 수준에서 신경염증 및 인지 기능에 대한 후속 연구가 필요가 있다고 사료된다.

V. 결론

본 실험은 신경염증에 대한 총명공진단 추출물의 억제 효과를 알아보기 위하여 LPS로 자극한 BV2 세포에 총명공진단 추출물을 처리한 후 NO, 염증성 매개 인자 유도 효소, 전염증성 사이토카인의 발현을 측정하였다. 또한, 조절 기전으로서 MAPK와 NF- κ B 신호경로의 활성화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총명공진단 추출물은 LPS로 자극된 BV2 세포에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였다.
2. 총명공진단 추출물은 LPS로 자극된 BV2 세포에서 iNOS, COX-2와 같은 염증성 매개인자를 억제하였다.
3. 총명공진단 추출물은 LPS로 자극된 BV2 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 억제하였다.
4. 총명공진단 추출물은 LPS로 자극된 BV2 세포에서 ERK 1/2, JNK, P38의 인산화를 억제하였다.

이와 같은 결과로 토대로, 총명공진단 추출물은 신경염증에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다. (RS-2024-00351313/NRF2021R1I1A2053285/RS-2024-00450002/RS-2023-00248483)

References

- Sun Y, Koyama Y, Shimada S. Inflammation from peripheral organs to the brain: how does systemic inflammation cause neuroinflammation? *Frontiers in aging neuroscience*. 2022;14:903455. [https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.903455]
- Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*. 2017;127(7):624-33. [https://doi.org/http://10.1080/00207454.2016.1212854]
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918-34. [https://doi.org/http://10.1016/j.cell.2010.02.016]
- Wilson DM, Cookson MR, Van Den Bosch L, Zetterberg H, Holtzman DM, Dewachter I. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*. 2023;186(4):693-714. [https://doi.org/http://10.1016/j.cell.2022.12.032]
- Lee JJ, Lee SB. Recent Advances in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Korean Journal of Biological Psychiatry*. 2016;23(2):48-56.
- Kim YJ. Pharmacotherapy for patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Korean Medical Association*. 2024;67(3). [https://doi.org/https://doi.org/10.5124/jkma.2024.67.3.213]
- Kim B, Lee KY, Park B. Isoorientin inhibits amyloid β_{25-35} -induced neuronal inflammation in BV2 cells by blocking the NF- κ B signaling pathway. *Molecules*. 2021;26(22):7056. [https://doi.org/http://10.3390/molecules26227056.]
- Jung H-W, Park Y-K. Effects of subfractions of *Coptidis Rhizoma* extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2007;22(2):73-8. [https://doi.org/http://10.6116/kjh.2014.29.5.83.]
- Hu H, Li Z, Zhu X, Lin R, Chen L. Salidroside reduces cell mobility via NF- κ B and MAPK signaling in LPS-induced BV2 microglial cells. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2014;2014. [https://doi.org/http://10.1155/2014/383821]
- Jia Y, Zhang D, Yin H, Li H, Du J, Bao H. Ganoderic acid A attenuates LPS-induced neuroinflammation in BV2 microglia by activating farnesoid X receptor. *Neurochemical Research*. 2021;46:1725-36. [https://doi.org/http://10.1007/s11064-021-03303-3]
- Bitna K, Jin-Young O, Dong-Uk K, Mi-Kyung J, Jun-Hyoung C, Sung-Joo P, et al. Anti-neuroinflammatory effects of cultivated red ginseng with fermented complex mushroom-cereal mycelium on lipopolysaccharide activated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2023;38(1):11-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.6116/kjh.2023.38.1.11.]
- Oh H-I, Park H-B, Ju M-S, Jung S-Y, Oh M-S. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcumae longae Radix* and *Curcumae longae Rhizoma*. *The Korea Journal of Herbology*. 2010;25(1):83-91. [https://doi.org/https://doi.org/10.6116/kjh.2010.25.1.083]
- Kim JL. Neuroglial Cell and Alzheimer's Disease. *The Korean Society Of Biological Psychiatry*. 2015;22(2):40-6. [https://doi.org/http://doi.org/10.000/kjbp.2015.22.2.40]
- Fetler L, Amigorena S. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*. 2005;309(5733):392-3. [https://doi.org/http://10.1126/science.1114852]
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(4):225-42. [https://doi.org/http://10.1038/nri.2017.125.]
- Griffin WST. Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(2):470S-4S. [https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.470S]
- Park JH, Kim SH, Lee SR. Inhibitory effect of *Petalonia binghamiae* on neuroinflammation in LPS-stimulated microglial cells. *Journal of Nutrition Health*. 2017;50(1):25-31. [https://doi.org/https://doi.org/10.4163/jnh.2017.50.1.25]
- Kweon B, Ryu S, Kim D-U, Oh J-Y, Jang M-K, Park S-J, et al. Network pharmacology-based prediction of efficacy and mechanism of Chongmyunggongjin-dan acting on Alzheimer's disease. *Journal of Korean Medicine*. 2023;44(2):106-18. [https://doi.org/https://doi.org/10.13048/jkm.23019]
- Cho JH, Kwon JE, Cho Y, Kim I, Kang SC. Anti-inflammatory effect of *Angelica gigas* via heme oxygenase (HO)-1 expression. *Nutrients*. 2015;7(6):4862-74. [https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu7064862]
- Quah Y, Lee S-J, Lee E-B, Birhanu BT, Ali MS, Abbas MA, et al. *Cornus officinalis* ethanolic extract with potential anti-allergic, anti-inflammatory, and

- antioxidant activities. *Nutrients*. 2020;12(11):3317. [https://doi.org/http://10.3390/nu12113317] 2-4.]
21. Thameem Dheen S, Kaur C, Ling E-A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(11):1189-97. [https://doi.org/http://10.2174/092986707780597961.]
 22. Moncade S. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;517:317-26.
 23. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell*. 1994;78(6):919-25. [https://doi.org/http://10.1016/0092-8674(94)90267-4.]
 24. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(2):522-6. [https://doi.org/http://10.1073/pnas.90.2.522]
 25. 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. [https://doi.org/http://10.1371/journal.pone.0093134]
 26. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204. [https://doi.org/http://10.18632/oncotarget.23208.]
 27. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8. [https://doi.org/http://10.1378/chest.118.2.503.]
 28. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, et al. Fcε RII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in glial cells. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(9):3440-7. [https://doi.org/http://10.1523/JNEUROSCI.19-09-03440.1999]
 29. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology molecular biology reviews*. 2011;75(1):50-83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mnbr.00031-10]
 30. Chen P-R, Li C-Y, Yazal T, Chen I-C, Liu P-L, Chen Y-T, et al. Protective effects of nordalbergin against LPS-induced endotoxemia through inhibiting MAPK/NF- κ B signaling pathway, NLRP3 inflammasome activation, and ROS production. *Inflammation Research*. 2024;73(10):1657-70. [https://doi.org/http://10.1007/s00011-024-0192