

황련 클로로포름 분획물의 뇌신경소교세포로부터 염증매개물질 생성억제 효능 연구

박용기^{#*}, 이경열

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Anti-inflammatory effect of chloroform fraction of *Coptidis rhizoma* on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells

Yong-Ki Park^{#*}, Kyuon-Yeol Lee

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
Gyeongju 780-714, South Korea

ABSTRACT

Objectives : In the present study, we investigated anti-inflammatory effects of chloroform fraction of *Coptidis rhizoma* (CR-C) on the production of inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in LPS-stimulated BV2 microglial cells.

Methods : *Coptidis rhizoma* was extracted with 80% methanol, and then extracted with chloroform. BV2 cells were pre-treated with CR-C, and stimulated with LPS. The cytotoxicity was determined by MTT assay. The production of NO and cytokines was measured by Griess assay and ELISA. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cytokines were determined by RT-PCR.

Results : CR-C significantly inhibited the production of NO, TNF- α and IL-1 β in a dose-dependent manner in LPS-stimulated BV2 cells. In addition, CR-C suppressed the mRNA expressions of iNOS and inflammatory cytokines induced by LPS stimulation. These results indicate that CR-C was involved in anti-inflammatory effects in activated microglia.

Conclusion : The present study suggests that chloroform extract of *Coptidis rhizoma* can be useful as a potential anti-inflammatory agent for treatment of various neurodegenerative diseases.

Key words: BV2 cells, *Coptidis thizoma*, fractions, inflammation, microglia

緒 論

중추신경계(central nervous system; CNS)의 손상은 뇌 대식세포인 신경소교세포(microglia)의 증식 및 이상비대에 의해 유발되는데, 특히 신경교세포의 활성화는 뇌졸중, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병 및 진전에 관여하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 실제 타박상 등 뇌에 염증반응을 동반하는 병력을 가진 환자에게서 알츠하이머병이나 파킨슨병의 발병율이 높으며, 이는 염증억제약물에 의해서 감소한다는 보고가 있다³⁾.

신경소교세포는 다양한 자극에 반응하는 항원제시세포로서 MHC II, macrophage marker EMB11, TNF- α , IL-1 β , low affinity immunoglobulin E receptor CD234, iNOS⁵⁾, cyclooxygenase⁻²⁶⁾, complement 3 receptor 및 ferritin, prostaglandins(PGE)⁷⁾ 등을 발현한다. 신경소교세포는 뇌 염증 반응을 매개하는 주요 세포로서, 뇌 손상 시 활성화되어 TNF- α , IL-1 β , NO/iNOS 및 PGE2/COX-2 등의 염증매개물질들을 다량 분비하는데 이러한 염증매개물질들은 신경세포사멸의 주원인으로 작용하게 되므로 신경소교세포의 활성화를 어떻게 조절되는 가를 이해하고 염증매개물질 분비를 억제시켜주는 것은 여러 원인에 의한 뇌손상 시에 신경세포의 손상을 줄여줄 수 있는 한 가지 접근 방법이 될 수 있다^{3,4)}. 따라서 최근에는 다양한 한약재 추출물을 이용하여 대식세포 활성화를 조절함으로써 염증반응을 억제시켜주는 것에 대한 연구가 많이 진행되고 있다⁸⁾.

황련(川黃連; *Coptidis chinensis* Franch, *Coptidis Rhizoma*)은 미나리아재비과(毛茛科; Ranunculaceae)에 속하는 多年生 草本으로서 중국이 원산이며 한국, 일본, 중국 등지에서 재배하고 있고, 주로 산지의 습지에서 서식하며, 가을에 채취하여 鬚根과 泥砂를 제거하고 乾燥하여 사용한다⁹⁻¹¹⁾. 황련은 苦, 寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸經 등에 작용하며, 淸熱濕燥, 淸心除煩, 火解瀉毒 등의 효능이 있어 濕熱痞滿, 瀉痢, 嘔吐吞酸, 黃疸, 高熱神昏, 心火亢盛, 心煩不寐, 血熱吐衄, 目赤, 牙痛, 消渴, 癰腫疔瘡, 外治濕疹, 濕瘡, 耳道流膿 등의 병을 치료하는데 사용하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 황련의 주성분은 isoquinoline 계열 alkaloid인 berberine이며, 기타 coptisine, epiberberin, feluric acid, magnoflorine, palmatine, worenine 등의 성분을 함유하고 있다. 특히 berberine 성분은 다양한 주요 병균에 강한 항균작용을 나타

내며, 항염증, 지혈, 혈압하강작용, 항암작용 등이 탁월한 것으로 알려져 있고, 중추신경억제작용이나 신장염 치료 및 기관지 평활근 확장에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹³⁾. 따라서 황련추출물의 항염증 활성화에 대한 연구가 최근 많이 이루어지고 있는데, LPS로 활성화된 쥐의 복강대식세포에서의 iNOS, COX-2 및 TNF- α 생성억제효과¹³⁾, 췌장세포의 세포사멸에 대한 보호효과¹⁴⁾, keratinocytes에서 TNF- α inhibitor로서 작용¹⁵⁾ 등이 보고되고 있다. 또한 퇴행성 뇌질환과 관련하여 알츠하이머병 동물 모델에서 iNOS 및 IL-1 β 생성억제 및 기억장애 개선효과가 최근에 보고되었다¹⁶⁾. 황련추출물(methanol extract) 및 berberine과 같은 성분은 퇴행성 뇌질환 후보치료물질로 인식되고 있으나, 아직까지 정확한 효능이나 구체적인 작용기전에 대한 연구는 되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 예비연구를 통해 항염활성이 좋은 것으로 나타난 클로로포름(chloroform) 추출물이 LPS 자극에 의해 활성화된 뇌신경소교세포로부터 생성되는 염증매개물질인 NO 및 염증사이토카인들의 생성을 억제시킬 수 있는지 조사하고, 이를 통해 퇴행성 뇌질환 치료의 적용 가능성을 검토하고자 수행하였다.

材 料 및 方 法

1. 황련 추출물 및 분획물 제조

중국의 사천성에서 생산된 황련(川黃連; *Coptidis chinensis* Franch, *Coptidis Rhizoma*)을 광명당 제약(울산, 한국)에서 수입(원료시험성적서 구비)하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 본 실험에 사용하였다. 황련시료는 1kg을 분쇄하여 80% methanol로 5시간 동안 추출하였으며, 이 추출물을 다시 chloroform 으로 분획 추출한 다음 여액을 감압 농축 시킨 후, 동결건조하여 황련 chloroform 시료(CR-C)를 제조하였다. 동결건조된 CR-C는 냉동 보관하였으며, 실험 직전 DMSO를 이용하여 녹인 후 최종 DMEM 배지로 희석하여 사용하였다.

2. 세포배양

생쥐의 뇌신경소교세포(mouse microglial cell line)인 BV2 세포는 10% fetal bovine serum(FBS,

GibcoBRL, Invitrogen Life Technology, MD, USA), 1% penicillin(GibcoBRL) 및 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 DMEM 배지(Hyclone, UT, Canada)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성(cytotoxicity)검정

각 세포(5×10⁴cells/well)를 96-well culture plate에 100μl DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 후, 여러 농도의 CR-C를 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도의 MTT 용액(Sigma)을 50μl씩 넣고 3시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 50μl의 DMEM 용액을 첨가하여 교반기 위에서 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 이를 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 550-600nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 무처리구의 세포생존도(cell viability) 100%를 기준으로 약물처리구의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

세포로부터 생성되는 NO의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO₂⁻의 형태를 Griess 시약반응을 이용하여 측정하였다. 즉, BV2 세포(1×10⁵ cells/ml)를 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 CR-C를 여러 농도로 처리하여 다음 30분간 배양하고 다시 LPS(1μg/ml; E. coli serotype 0128:B12, Sigma)를 처리하여 24시간 배양함으로써 세포 활성화를 유도하였다. 일반 96-well plate에 세포배양액 50μl를 넣고 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 100μl를 넣은 후 15분간 암반응 시킨 다음, microplate reader를 이용하여 흡광도(540nm)를 측정하였다. 생성된 NO의 농도(μM)는 NaNO₂ 표준액을 기준으로 측정된 값을 기준으로 환산하여 계산하였다.

5. 염증사이토카인의 측정(ELISA)

BV2 세포로부터 생성되는 염증사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF-α와 IL-1β의 양을 측정하기 위하여 세포를 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 CR-C를 여러 농도로 처리하여 다음 30분간 배양하고 다시 LPS(1μg/ml)를 처리하여 24시간 배양함으로써 세포 활성화를 유도하였다. 세포로부터 배

양액을 수거한 후 Ready-Set-Go mouse TNF-α/IL-1β Cyto-Sets™ Biosource ELISA kits를 이용하여 측정하였다. 생성된 TNF-α와 IL-1β의 양은 각 recombinant cytokine 표준단백질의 흡광도를 기준으로 농도(pg)를 계산하였다.

6. Reverse transcription(RT)-PCR

iNOS 및 염증사이토카인들의 유전자 발현을 조사하기 위해 세포를 6-well plate에 배양하고 CR-C를 농도별로 30분간 전처리한 후 LPS(1μg/ml)를 처리하여 6시간 동안 배양한 후 세포를 수거하였다. 세포로부터 TRIzol 용액(Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리한 후, oligo-(dT) primer와 ImProm-ITM reverse transcriptase (Promega Bioscience, San Luis Obispo, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1μg에 및 iNOS, TNF-α, IL-1β에 대한 각 specific primers (sense, anti-sense)를 넣은 후 10× buffer, 250μM dNTP, 1U Tag polymerase 등을 혼합하여 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 55~60°C에서 50초 및 extension을 위해 70°C에서 60초 조건에서 25-30 cycles로 PCR을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDH를 사용하였다.

7. Western blot

iNOS 단백질 발현을 조사하기 위해 각 세포(1×10⁶cells/ml)를 6-well plate에 배양하고 CR-C를 농도별로 30분간 전처리한 후 LPS(1μg/ml)를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 수거하였다. 세포를 수거하여 1× ice-cold PBS로 두 번 세척한 다음 lysis buffer(1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) 100μl를 넣어 세포를 lysis시켰다. 이를 14,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 Bradford 용액과 BSA 표준용액을 이용하여 단백질 양을 정량하고 20μg의 단백질을 10% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 gel을 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮기고 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 시켰다. 각 단백질에 대한 일차항체를 150mM NaCl과 0.5% Tween-20이 첨가된 10mM Tris-HCl(TBS-T) 용액으로 희석하여 blocking이 된 membrane에 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 membrane을

TBS-T 용액으로 3회 세척하고 TBS-T로 희석된 HRP-conjugated 이차항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 3회 세척한 다음 enhanced chemiluminescence detection system(Amersham)을 이용하여 X-ray film에 감광시켰다. 각 단백질 발현에 대한 대조군으로 actin에 대한 일차항체를 이용하여 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

8. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균±표준편차(standard error of mean; SEM)로 나타내었으며 통계학적 분석은 Graphpad Prism program의 Student t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

實驗成績

1. 세포독성검정

CR-C의 세포독성을 조사하기 위해서 BV2 세포에 50~1000 μ g/ml의 CR-C를 처리한 후 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1). BV2 세포에서 CR-C 처리에 의한 세포생존도는 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml 및 1,000 μ g/ml 농도에서 각각 101.5 \pm 0.15%(mean \pm SEM), 99.6 \pm 1.83%, 97.4 \pm 1.98%, 72.1 \pm 1.02% 및 24.0 \pm 1.57%로 측정되었다. 즉, BV2 세포에서는 200 μ g/ml의 CR-C 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났다.

2. NO 생성에 대한 억제효과

CR-C가 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포에 여러 농도의 CR-C를 처리한 다음, 세포배양액으로부터 NO 양을 Griess reagent로 측정하였다(Fig. 2). 무처리 대조군에서는 NO가 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리 후세포가 활성화됨으로써 33.6 \pm 0.34 μ M 농도로 증가되었다(Fig. 2). 또한 CR-C 처리농도 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 200 μ g/ml에서 각각 33.4 \pm 0.5 μ M, 27.3 \pm 0.15 μ M, 24.8 \pm 0.09 μ M, 15.7 \pm 0.31 μ M 및 12.9 \pm 0.61 μ M 농도로 검출되었다. 따라서 LPS에 의해 유도된 NO 생성은 CR-C 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. CR-C의 단독처리는 NO 생성에 영향을 주지

않았다(data not shown).

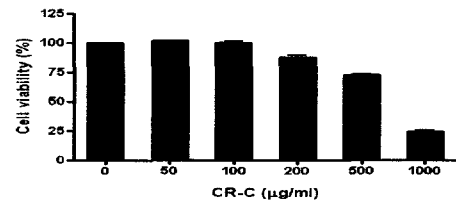


Fig. 1. Cell cytotoxicity of chloroform extract of *Coptidis rhizoma* in BV2 cells. After cells were cultured with various concentrations of CR-C with LPS (1 μ g/ml) for 24h, cell viability was measured by MTT assay. The results show mean values of three independent experiments (SEM-bars).

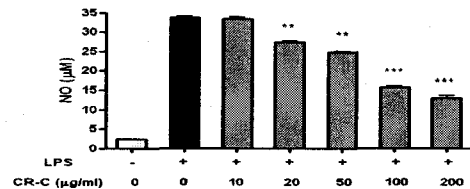


Fig. 2. Inhibitory effect of chloroform extract of *Coptidis rhizoma* on NO production. BV2 cells were pre-treated with various concentrations of CR-C for 30 min and then stimulated with or without LPS (1 μ g/ml) for 24h. NO production was measured in culture supernatants by Griess reagent. The results show mean values of three independent experiments (SEM-bars). * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. LPS-treated group, n=3.

3. iNOS 발현에 대한 억제효과

한편, CR-C가 NO 생성효소인 iNOS의 유전자 및 단백질 발현에도 억제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 여러 농도의 CR-C를 BV2 세포에 처리한 다음, RT-PCR(Fig. 3A) 및 Western blot을 수행하였다(Fig. 3B).

BV2 세포에서 iNOS의 유전자 및 단백질 발현은 무처리군에서는 관찰되지 않은 반면, LPS 처리 후 증가되었다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS의 유전자 및 단백질 발현은 CR-C 처리 후 현저히 억제되었다. 따라서 CR-C에 의한 활성화된 BV2로부터의 NO의 생성 억제효과는 iNOS의 유전자 전사단계의 조절로부터 이루어짐을 알 수 있었다.

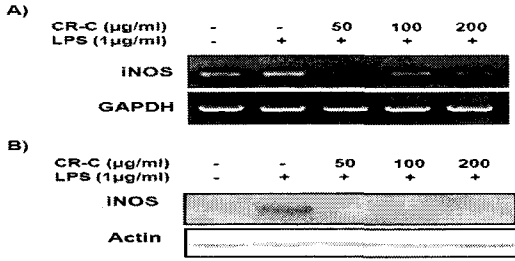


Fig. 3. Inhibitory effect of chloroform extract of *Coptidis rhizoma* on iNOS expression. BV2 cells were pre-treated with various concentrations of CR-C for 30 min and then stimulated with or without LPS(1µg/ml) for 6h (for PCR) and 24h (for Western blot). The mRNA and its protein expressions of iNOS were analyzed by RT-PCR (A) and Western blot (B).

4. 염증사이토카인 생성에 대한 억제효과

CR-C가 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증사이토카인인 TNF-α와 IL-1β 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 여러 농도의 CR-C를 처리한 다음, 세포배양액으로부터 TNF-α와 IL-1β 양을 ELISA로 측정하였으며, 유전자발현을 RT-PCR로 조사하였다(그림 4).

BV2 세포로부터 TNF-α의 생성은 무처리 대조구에서는 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 996.8±10.09pg/ml 농도로 증가되었으며, CR-C 처리농도 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml 및 200µg/ml에서 각각 925.3±1.05pg/ml, 792.1±5.92pg/ml, 567.3± 20.84pg/ml, 342.8±19.88pg/ml 및 96.8±2.37pg/ml로 농도 의존하여 감소되었다(Fig. 4A).

BV2 세포로부터 IL-1β의 생성은 TNF-α에서와 마찬가지로 무처리 대조구에서는 매우 낮게 검출되었으며, LPS 처리에 의해 675.4±8.42pg/ml 농도로 증가되었다. 또한 CR-C 처리농도 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml 및 200µg/ml에서 각각 657.1±3.08pg/ml, 625.4±3.04pg/ml, 530.8±3.24pg/ml, 364.6±1.21pg/ml 및 306.9±2.34pg/ml로 농도 의존하여 감소되었다(Fig. 4B).

따라서 LPS에 의해 생성된 두 염증사이토카인 모두 CR-C 처리농도에 의존적이고 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다.

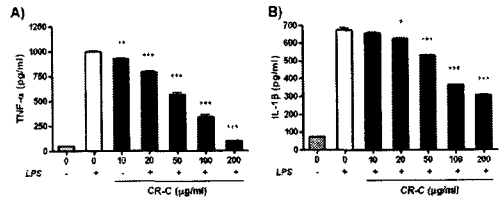


Fig. 4. Inhibitory effect of CR-C on proinflammatory cytokine production in LPS-stimulated BV2 cells. Cells were pre-treated with various concentrations of CR-C for 30 min and then stimulated with or without LPS(1µg/ml) for 24h. The productions of TNF-α (A) and IL-1β (B) were measured in culture supernatants by ELISA kits. The results show mean values of three independent experiments (SEM=bars). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. LPS-treated group, n=3.

5. 염증사이토카인 유전자 발현에 대한 억제효과

한편, CR-C는 BV2세포에서 LPS에 의해 유도된 TNF-α와 IL-1β의 유전자 발현을 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 CR-C에 의한 활성화된 BV2로부터의 TNF-α와 IL-1β의 생성 억제효과는 이들 유전자의 전사단계 조절에 의해 나타남을 알 수 있었다.

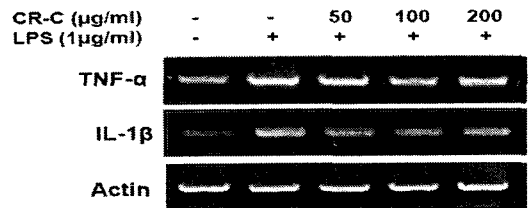


Fig. 5. Inhibitory effect of chloroform extract of *Coptidis rhizoma* on TNF-α and IL-1β mRNA expression. BV2 cells were pre-treated with various concentrations of CR-C for 30 min and then stimulated with or without LPS(1µg/ml) for 6h. The mRNA expressions of TNF-α and IL-1β were analyzed by RT-PCR.

考 察

뇌에서 염증반응에 의한 신경세포 손상을 억제하기 위해서는 활성화된 신경소교세포로부터 다량 분비되는 독성물질인 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 염증사이토카인 및 NO, reactive oxygen species(ROS), prostaglandin E2(PGE2) 등의 생성은 억제되어야 하며, IL-4, IL-10, IL-13, tumor growth factor(TGF)-

β 와 같은 항염증사이토카인들에 의하여 제어되어야 한다.^{17,18)} 예를 들어, 최근 현재 양방에서 사용하고 있는 비스테로이드성 소염제(NSAIDs)의 투여는 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환 증상의 개선 및 그 진행속도를 완화시킨다는 보고가 있다. 한방에서는 한약재 추출물이나 분획물 또는 주요 특정성분의 항염증 및 항산화 효능을 통해 다양한 염증질환이나 난치성 질환의 개선에 대한 연구가 주로 진행되고 있는데¹⁹⁾, 황련의 berberine, saponins, steryl glycoside 성분이 LPS 자극에 의한 대식세포의 염증반응을 억제시키는 효과가 있으며, 항산화 효과가 있는 것으로 보고되어 주목받고 있다.

신경소교세포는 중추신경계에 존재하는 면역세포로서 외부 이물질을 포식하고 탐식하여 죽이는 기능의 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 염증사이토카인이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide (O₂⁻) 등의 염증물질을 분비함으로써 퇴행성 뇌질환 발달에 기여하게 된다.^{13,4)} 따라서 활성화된 신경소교세포의 조절 및 염증물질 분비억제는 퇴행성 뇌질환 치료의 타겟이 되고 있다.^{6,7)}

황련은 민가에서 설사나 위열로 인한 구토에 효과적이며 해열과 해독작용이 뛰어난 약제로 널리 알려져 있고^{9,11)}, 항균작용 및 항염·항암효과가 보고되면서 각 중 염증성 질환의 치료제 개발에 관심을 모으고 있다.^{15,16)} 이에 저자는 이전 연구에서²⁵⁾ 황련의 분획에 따른 퇴행성 뇌질환의 항염증효과를 검증하였으며 본 연구에서는 그 중에서 황련의 chloroform 분획물(CR-C)의 항염효과를 확인하고자 신경소교세포인 BV2 세포로부터 분비되는 염증매개물질들에 대한 억제효과를 조사하였다.

LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 생성되는 염증물질인 NO는 CR-C에 의해 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 2A), CR-C의 NO 생성저해는 NO 합성효소인 iNOS의 유전자 발현억제를 통해 이루어졌다(Fig. 2B,C). 대표적인 염증물질인 NO는 동물의 대식세포 및 간세포에서 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 합성되는 자유라디칼(free radical)로서 세포 내 항상성 유지, 신경전달물질 운반, 항암작용 및 세포독성 등에 관여하는 신호전달자 역할을 한다. 또한 LPS, interferon-gamma(IFN- γ), β -amyloid 등의 자극에 의해 활성화됨으로써 세포독성과 염증을 유발하는 물질들을 분비하게 된다.²⁰⁾ NO의 기능은 양면성을 가지고 있으며, 항균작용과 항암작용을 하는 것 외 조절이 안된 NO 생성은 염증반응을 가속화시킴으로써 병태생리에 악영향을 끼치게 된

다. 따라서 NO 생성을 억제하는 방법은 최근 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다.²¹⁾ CR-C는 iNOS의 유전자 및 단백질 발현을 효과적으로 억제시켰으며(Fig. 2B,C), 이를 통해 NO 생성을 유의적으로 감소시킴으로써 항염효과를 나타내었다. 따라서 본 연구결과를 통해 CR-C가 다양한 염증질환 치료에 매우 효과적일 수 있음을 알 수 있었다.

LPS는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)와 관련하여 특히 대식세포에서 강력하게 염증반응을 유도하는 자극물질로서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등을 포함한 다양한 염증사이토카인 분비를 유도하여 면역반응에 관여하게 된다.¹³⁾ 대표적인 염증사이토카인인 TNF- α 는 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 패혈증(septic shock)이나 류마티스 관절염과 같은 염증질환 발달에 매우 중요한 역할을 하며, 암, 악액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{22,23)} 최근에는 대식세포의 LPS 인식기전 이해 및 염증유발 관련 유전자 발굴 및 이들의 조절을 통한 염증질환 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 TNF- α 를 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다.²⁴⁾ 본 연구결과에서 CR-C는 BV2 세포에서 모두 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 유의적으로 감소시켰으며(Fig. 4), 나아가 이들 유전자 발현을 효과적으로 억제하였다(Fig. 5). 따라서 CR-C는 염증사이토카인의 유전자 발현 단계를 조절함으로써 실제 염증사이토카인 분비를 억제시킬 수 있으며 이는 CR-C가 염증성 질환 치료에 효과적일 수 있음을 시사한다.

결론적으로 황련의 chloroform 분획물은 LPS에 의해 활성화된 신경소교세포로부터 과도하게 생성되는 NO, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증물질을 iNOS 및 염증사이토카인들의 유전자 발현을 억제시킴으로써 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 황련의 chloroform 분획물은 신경소교세포에 대해 강력한 항염증 효과를 나타내는 분획물로서 단독 또는 기타 약물과의 혼합을 통해 퇴행성뇌질환의 염증개선을 위해 사용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

結 論

본 연구에서는 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 한약

재 추출물 및 분획물을 발굴하기 위해 신경소교세포인 BV2 세포를 이용하여 항염증 효과를 조사하였다. 황련의 chloroform 분획물은 200 μ M/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았으며, LPS에 의해 유도된 염증물질인 NO와 염증사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 의 생성을 유의적으로 감소시켰다. 또한 CR-C에 의한 염증물질의 생성억제는 NO 합성효소인 iNOS와 염증사이토카인들의 유전자 발현 조절에 의한 것으로 나타났다. 따라서 황련의 chloroform 분획물은 활성화된 신경소교세포에 대해 항염효과를 보이는 약재분획물로서 앞으로 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 약물개발에 이용되어질 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

参考文献

1. G.W. Kreutzberg, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, Trends Neurosci. 1996;19:312 - 18.
2. Murabe Y. Sano Y. Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development of microglia cells. Cell Tissue Res. 1982;225:469-85.
3. F. Gonzalez-Scarano and G. Baltuch, Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases, Annu Rev Neurosci. 1999;22:219 - 40.
4. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. Vet Q. 2000;22:11-16.
5. P. Eikelenboom and W.A. van Gool, Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease, J Neural Transm. 2004;11:281 - 94.
6. H.M. Gao, B. Liu, W. Zhang and J.S. Hong, Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease, Trends Pharmacol Sci. 2003;24:395 - 401.
7. Liu and J.S. Hong, Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention, J Pharmacol Exp Ther. 2003;304:1 - 7.
8. Lee DU, Kang YJ, Park MK, Lee YS, Seo HG, Kim TS, Kim CH, Chang KC. Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF-alpha, iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Life Sci. 2003;73:1401-12.
9. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울. 영림사. 2004 : 220-23.
10. Talhouk RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W, Barbour EK. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. J Med Food. 2007;10:1-10. Review.
11. Xu JT, Wang LQ, Xu B. [Research development of Coptis chinensis] Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2004;26:704-707. Review.
12. Hson-Mou, Hson-Mou, C., Paul Pui-Hay, B., Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, World Scientific. vol II. 1987 : 1061.
13. Lee DU, Kang YJ, Park MK, Lee YS, Seo HG, Kim TS, Kim CH, Chang KC. Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF-alpha, iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages, Life Science 2003;73:1401 - 12.
14. Kim EK, Kwon KB, Han MJ, Song MY, Lee JH, Lv N, Ka SO, Yeom SR, Kwon YD, Ryu DG, Kim KS, Park JW, Park R, Park BH. Coptidis rhizoma extract protects against cytokine-induced death of pancreatic beta-cells through suppression of NF-kappaB activation. Exp Mol Med. 2007;39:149-59.
15. Enk R, Ehehalt R, Graham JE, Bierhaus A, Remppis A, Greten HJ. Differential effect of Rhizoma coptidis and its main alkaloid compound berberine on TNF-alpha induced NFkappaB translocation in human keratinocytes. J Ethnopharmacol. 2007;109:170-75.
16. Wang X, Xing D, Wang W, Su H, Tao J, Du L. Pharmacokinetics of berberine in rat thalamus after intravenous administration of Coptidis rhizoma extract. Am J Chin Med. 2005;33:935-43.
17. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. Adv. Neurol.

2001;86:83-93.

18. Cross AK, Woodroffe MN. Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc. Res. Tech.* 2001;54:10-17.

19. Ng TB. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *J. Pharm. Pharmacol.* 2006;58:1007-19.

20. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-66.

21. A. Hobbs, A. Higgs and S. Moncada, Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191 - 220.

22. Beutler B, Cerami A. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* 1988;27:7575-82.

23. Takeuchi T. Clinical development and future perspective of biological agents. *Nippon Rinsho.* 2007;65:1185-88. Review.

24. Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2007;13:1925-28. Review.

25. Hyo Won Jung, Yong-Ki Park. Effects of subfractions of *Coptidis Rhizoma* extract on the nitric oxide production in LPS- stimulated BV2 microglial cells. *Kor. J. Herbology* 2007;22(2): 73-78.