

黃連의 주성분인 Berberine의 뇌신경소교세포로부터 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성억제효과

박용기^{1*}, 정효원¹, 김창민¹, 최재수², 김영식³

1: 동국대학교 한의과대학, 본초학교실, 2: 부경대학교 식품생명공학부, 3: 서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

Effects of Berberine on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells

Yong-Ki Park^{1*}, Hyò Won Jung¹, Chang Min Kim¹, Jae Sue Choi², Yeong Shik Kim³

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
2: Gyeongju 780-714, South Korea; 2Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University
3: Busan 608-737, South Korea; 3Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, South Korea

ABSTRACT

Objectives : Berberine, a main alkaloid component of *Coptidis rhizoma*, has an antimicrobial and anti-tumor activities and antiinflammatory effect. In the present study, we investigated effect of berberine on the production of inflammatory mediators such as nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2), TNF- α and IL-1 β in LPS-stimulated BV2 microglial cells.

Methods : BV2 cells were pre-treated with berberine and then stimulated with LPS. The cytotoxicity of berberine was determined by MTT assay. The NO production was measured by Griess assay. The mRNA expression and protein levels of inducible nirtic oxide synthase(iNOS) were determined by RT-PCR and Western blot. The production of PGE2 and cytokines was measured by ELISA.

Results : Berberine inhibited the production of NO, PGE2 and proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-1 β in a dose dependent manner in LPS-stimulated BV2 cells. In addition, berebrine greatly suppressed the mRNA expression and protein levels of iNOS and inflammatory cytokines induced by LPS stimulation. These results indicate that the post-transcriptional regulatory mechanism of iNOS and/or inflammatory cytokine gene expression by berberine is involved in its anti-inflammatory effects, respectively.

Conclusion : The present study suggests that berberine can be useful as a potential anti-inflammatory agent for treatment of various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and stroke.

Key words: Berberine, BV2 cells, inflammation, microglia, nitric oxide, prostaglandin E2.

緒論

신경소교세포(microglia)는 뇌의 대식세포(a resident macrophage-like population)로서 중추신경계(central nervous system; CNS)의 host defence 및 tissue repair에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 즉, microglia는 뇌 조직의 손상 시 활성화(activation)되어 TNF- α , IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 등 염증을 매개하는 염증사이토카인(inflammatory cytokine)이나 fibroblast growth factor(FGF)- β , tumor growth factor (TGF) - β 1, nerve growth factor(NGF) 등의 성장인자, brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) 및 nitric oxide(NO) 등을 분비함으로써 항원을 제거(scavengers)함과 동시에 손상 부위에 염증반응을 유발함으로써 허혈(ischemia), 외상(trauma), 감염(infection), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 파킨슨병(Parkinson's disease)과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병에 기여하게 된다³⁻⁵⁾. 따라서 최근 활성화된 microglia를 조절(regulation)하거나 활성화된 microglia로부터 과도하게 생성되는 염증매개물질들을 억제시킴으로써 퇴행성뇌질환을 경감시킬 수 있는 다양한 연구들이 진행되고 있다⁶⁻¹⁰⁾. 한편, 최근에는 한약재로부터 분리된 다양한 천연성분들을 분리하여 병원균 감염에 의한 염증질환, 관절염이나 신부전증과 같은 만성염증성 질환 및 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease)과 같은 다양한 염증질환을 대상으로 주요 염증매개물질들의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 생리활성효능 및 약물개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다¹¹⁻¹³⁾.

Berberine은 황련(黃連; *Coptidis Rhizoma*)과 황백(黃白; *Phellodendri cortex*)의 주요 알칼로이드(alkaloid) 성분으로서 주요 병균에 대한 항균작용(anti-microbial activity)¹⁴⁾, 항염증(anti-inflammatory activity)¹⁵⁾, 항암(anti-tumor)¹⁶⁾, 장운동억제(anti-motility)¹⁷⁾ 및 지혈작용¹³⁾ 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 중추신경억제작용이나 신장염 치료 및 기관지평활근 확장에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다^{18,19)}. 최근 Berberine의 항염증 활성화에 대한 연구로는 주로 LPS로 활성화된 쥐의 복강대식세포에서의 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)의 유전자 발현억제²⁰⁾, TNF- α 생성억제 및 IL-12 생성유도^{21,22)}가 있으며, 사람폐암세포에서의 IL-1 β 와 TNF- α 생성억제효과²³⁾, 혈관

염증에 기여하는 단핵구세포에서의 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 및 CC-chemokine receptor-2(CCR-2)의 발현억제효과²⁴⁾ 및 지방세포로부터 생성되는 염증물질인 leptin과 다양한 adipogenic factor들의 생성 억제효과²⁵⁾ 등이 보고되고 있다.

한편 뇌질환과 관련하여 최근 알츠하이머병 동물 모델에서의 iNOS 및 IL-1 β 생성억제와 기억장애 개선효과²⁶⁾, amyloid- β 생성억제효과²⁷⁾ 등이 보고되어 있다. Berberine은 퇴행성뇌질환 후보치료물질로 인식되고 있으나, 아직까지 퇴행성 뇌질환에서의 정확한 효능이나 구체적인 작용기전에 대한 연구는 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 berberine이 LPS 자극에 의해 활성화된 신경소교세포인 BV2 세포로부터 생성되는 염증매개물질인 NO, PGE2, proinflammatory cytokine의 생성억제효과 및 그 조절작용을 조사함으로써 berberine의 항염증효과를 검증하고, 나아가 퇴행성뇌질환 치료제로서의 개발가능성을 평가하고자 수행하였다.

材料 및 方法

1. 재료

실험에 사용된 berberine은 황련으로부터 분리된 것을 서울대학교 천연물연구소로부터 제공받았다. LPS(*E. coli*; serotype 0128:B12)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, TNF- α 와 IL-1 β 측정을 위한 ELISA kits를 eBioscience Inc. (San Diego, CA, USA), iNOS와 COX-2 항체를 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA), Horseradish peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG를 Sigma로부터 구입하였다. ECL Western blotting detection reagent는 Amersham(Buckinghamshire, UK)으로부터 구입하였다.

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 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성(cytotoxicity)검정

각 세포(5×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 100 μ l DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 후, 여러 농도의 berberine을 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도의 MTT 용액(Sigma)을 50 μ l씩 넣고 3시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 50 μ l의 DMEM 용액을 첨가하여 교반기 위에서 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 이를 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 550-600nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 무처리군의 세포생존도(cell viability) 100%를 기준으로 berberine 처리군의 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 세포를 1×10^5 cells/ml로 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 berberine을 여러 농도로 처리하여 다음 30분간 배양하고 다시 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양함으로써 세포 활성화를 유도하였다. 일반 96-well plate에 세포배양액 50 μ l를 넣고 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 100 μ l를 넣은 후 15분간 암반응 시킨 다음, microplate reader를 이용하여 흡광도(540nm)를 측정하였다. 생성된 NO의 농도(μ M)는 NaNO₂ 표준액을 기준으로 측정된 값을 기준으로 환산하여 계산하였다.

5. Prostaglandin E2(PGE2)생성량 측정

BV2 세포로부터 생성되는 PGE₂의 양을 측정하기 위해 먼저 세포를 1×10^5 cells/ml로 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 berberine을 여러 농도로 처리하여 다음 30분간 배양하고 다시 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양함으로써 세포 활성화를 유도하였다. 세포로부터 배양액을 수거한 후 PGE₂ EIA kit(Cayman Chemical Company, MI, USA)를 이용하여 PGE₂ 양을 측정하였다. 생성된 PGE₂의 양은 농도(pg/ml)는 PGE₂ EIA standard를 기준으로 환산하여 계산하였다.

6. 염증사이토카인의 측정

BV2 세포로부터 생성되는 염증사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-1 β 의 양을 측정하기 위하여 세포를 1×10^5 cells/ml로 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 berberine을 여러 농도로 처리하여 다음 30분간 배양하고 다시 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양함으로써 세포 활성화를 유도하였다. 세포로부터 배양액을 수거한 후 Ready-Set-Go mouse TNF- α /IL-1 β Cyto-Sets™ Biosource ELISA kits를 이용하여 측정하였다. 생성된 TNF- α 와 IL-1 β 의 양은 각 recombinant cytokine 표준단백질의 흡광도를 기준으로 농도(pg/ml)를 계산하였다.

7. RT-PCR

iNOS, COX-2 및 염증사이토카인들의 유전자 발현을 조사하기 위해 각 세포(1×10^6 cells/ml)를 6-well plate에 배양하고 berberine을 농도별로 30분간 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 6시간 동안 배양한 후 세포를 수거하였다. 세포로부터 TRIzol 용액(Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리한 후, oligo-(dT) primer와 Improm-IT™ reverse transcriptase(Promega Bioscience, San Luis Obispo, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1 μ g에 및 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 에 대한 각 specific primers(sence, anti-sence)를 넣은 후 10 \times buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1U Tag polymerase 등을 혼합하여 denaturation을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing을 위해 55-60 $^{\circ}$ C에서 50초 및 extension을 위해 70 $^{\circ}$ C에서 60초 조건에서 25-30 cycles로 PCR을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.

8. Western blot

iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 조사하기 위해 각 세포(1×10^6 cells/ml)를 6-well plate에 배양하고 berberine을 농도별로 30분간 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 수거하였다. 세포를 수거하여 1 \times ice-cold PBS로 두 번 세척한 다음 lysis buffer(1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) 100 μ l를 넣어 세포를 lysis시켰다. 이를 14,000rpm에서

20분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후 Bradford 용액과 BSA 표준용액을 이용하여 단백질 양을 정량하고 20 μ g의 단백질을 10% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 gel을 분리하여 nitrocellulose(NC) 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(1:1000) blocking이 된 membrane에 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 membrane을 TBS-T 용액으로 3회 세척하고 TBS-T로 희석된(1:5000) horseradish peroxidase-conjugated 이차항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 3회 세척한 다음 enhanced chemiluminescence detection system을 이용하여 X-ray film에 감광시켰다. 각 단백질의 발현에 대한 대조군으로 actin에 대한 일차항체(Sigma)를 이용하여 위와 동일한 방법으로 Western blot을 수행하였다.

9. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균 \pm 평균표준오차(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

Berberine의 세포독성을 조사하기 위해서 BV2 세포에 10~200 μ g/ml의 berberine을 처리한 후 MTT assay를 수행하였다(그림 1).

BV 세포에서 berberine 처리에 의한 세포생존도(cell viability)는 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 200 μ g/ml 농도에서 각각 95.3 \pm 0.15%(mean \pm SEM), 97.3 \pm 1.14%, 95.6 \pm 0.51%, 84.9 \pm 0.55% 및 53.6 \pm 2.53%로 측정되었다. 즉, BV2 세포에서는 50 μ g/ml의 berberine 농도까지 90% 이상의 세포생존도를 나타내어 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 이후 berberine의 항염효과에 대한 모든 실험은 50 μ g/ml 이하의 농도에서 수행하였다.

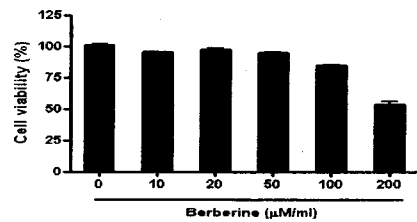


Fig. 1. Cell cytotoxicity of berberine in BV2 cells. After cells were cultured with various concentrations of berberine with LPS (1 μ g/ml) for 24h, cell viability was measured by MTT assay. The results show mean values of three independent experiments (SEM=bars).

2. NO 생성 및 iNOS 발현에 대한 억제 효과

Berberine이 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포에 여러 농도의 berberine을 처리한 다음, 세포배양액으로부터 NO 양을 Griess reagent로 측정하였다(그림 2).

무처리 대조군에서는 NO의 생성이 5.2 \pm 0.18 μ M로 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리 후세포가 활성화됨으로써 39.32 \pm 1.42 μ M 농도로 현저히 증가하였다(그림 2A). 또한 berberine 처리농도 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml 및 50 μ g/ml에서 각각 35.6 \pm 0.22 μ M, 29.5 \pm 0.49 μ M, 16.2 \pm 0.68 μ M, 6.9 \pm 0.42 μ M 및 5.3 \pm 0.04 μ M 농도로 NO가 검출되어 LPS에 의해 유도된 NO 생성이 berberine 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 특히 berberine 농도 20 μ g/ml과 50 μ g/ml을 처리하였을 때 활성화된 BV2로부터 NO의 생성이 대조군 수준으로 억제되는 것을 알 수 있었다. Berberine의 단독처리는 NO 생성에 영향을 주지 않았다(data not shown).

한편, berberine이 NO 생성효소인 iNOS의 유전자 및 단백질 발현에도 억제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 여러 농도의 berberine을 BV2 세포에 처리한 다음, RT-PCR(그림 2B) 및 Western blot을 수행하였다(그림 2C).

BV2 세포에서 iNOS의 유전자(그림 2B) 및 단백질(그림 2C) 발현은 무처리군에서는 관찰되지 않은 반면, LPS 처리 후 현저히 증가하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS의 유전자 및 단백질 발현은 berberine 처리 후 농도 의존적으로 억제되었다. 따라서 berberine에 의한 활성화된 BV2로부터의 NO

의 생성 억제효과는 iNOS의 유전자 전사단계의 조절(post-transcriptional gene regulation)로부터 이루어짐을 알 수 있었다.

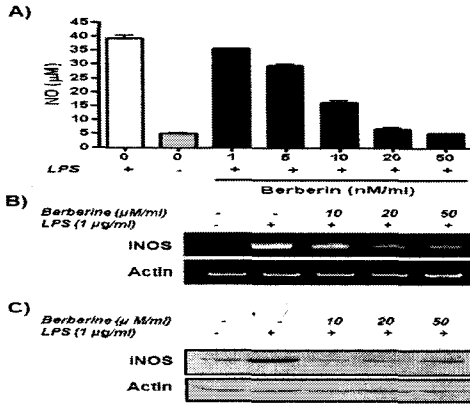


Fig. 2. Inhibitory effect of berberine on NO production and iNOS expression from LPS-stimulated BV2 cells. (A) Cells were pre-treated with various concentrations of berberine for 30 min and then stimulated with or without LPS(1μg/ml) for 24h. NO production was measured in culture supernatants by Griess 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. (B) mRNA expression and protein levels of iNOS were determined by RT-PCR (B) and Western blot (C).

3. PGE2 생성 및 COX-2 유전자와 단백질 발현 억제효과

Berberine이 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 PGE2 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포에 여러 농도의 berberine을 처리한 다음, 세포배양액으로부터 PGE2 양을 EIA kit로 측정하였다(그림 3).

무처리 대조군에서는 PGE2의 생성이 116.2±10.05 pg/ml로 낮게 검출되는 반면, LPS 처리 후세포가 활성화됨으로써 1407±45.49pg/ml 농도로 증가하였다(그림 3A). 또한 berberine 처리농도 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml 및 50μg/ml에서 각각 1229.0±0.51μM, 949.4±20.51μM, 649.4±20.51μM, 511.9±30.16μM 및 375.2±4.63μM 농도로 PGE2가 검출되어 LPS에 의해 유도된 PGE2 생성이 berberine 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 한편, Berberine의 단독처리는 PGE2 생성에 영향을 주지 않았다(data not shown).

Berberine이 PGE2 생성효소인 COX-2의 유전자 및 단백질 발현에도 억제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 여러 농도의 berberine을 BV2 세포에 처리한 다음, RT-PCR(그림 3B) 및 Western blot을 수행하였다(그림 3C).

BV2 세포에서 COX-2의 유전자(그림 3B) 및 단백질(그림 3C) 발현은 무처리군에서는 관찰되지 않은 반면, LPS 처리 후 현저히 증가하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 COX-2의 유전자 및 단백질 발현은 berberine 처리 후 현저히 감소하였다. 따라서 berberine에 의한 활성화된 BV2로부터의 PGE2의 생성 억제효과는 NO/iNOS에서와 마찬가지로 COX-2의 유전자 전사단계의 조절로부터 이루어짐을 알 수 있었다.

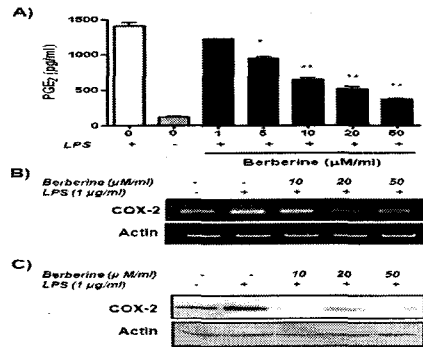


Fig. 3. Inhibitory effect of berberine on PGE2 production and COX-2 expression from LPS-stimulated BV2 cells. (A) Cells were pre-treated with various concentrations of berberine for 30 min and then stimulated with or without LPS(1μg/ml) for 24h. PGE2 production was measured in culture supernatants by EIA kit. 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. (B) mRNA expression and protein levels of COX-2 were determined by RT-PCR (B) and Western blot (C).

4. 염증사이토카인 생성 및 유전자발현에 대한 억제효과

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

BV2 세포로부터 TNF- α (그림 4A)와 IL-1 β (그림 4B)의 생성은 무처구의 경우 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 현저히 증가하였다. 또한 LPS에 의해 생성된 두 염증사이토카인 모두 berberine 처리농도에 의존적이고 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다.

한편, berberine은 BV2세포에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α 와 IL-1 β 의 유전자 발현을 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 4C). 따라서 berberine에 의한 활성화된 BV2로부터의 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성억제효과는 이들 유전자의 전사단계 조절에 의해 나타남을 알 수 있었다.

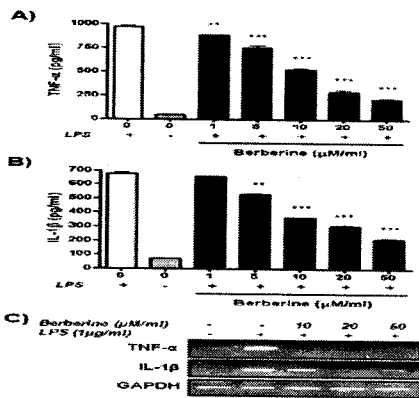


Fig. 4. Inhibitory effect of berberine on proinflammatory cytokine production and its gene expression from LPS-stimulated BV2 cells. Cells were pre-treated with various concentrations of berberine for 30 min and then stimulated with or without LPS (1 μ g/ml) for 24h. The productions of TNF- α (A) and IL-1 β (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. (C) The mRNA expressions of TNF- α and IL-1 β were determined by RT-PCR.

考 察

활성화된 뇌신경소교세포(microglia)는 CNS에 존재하는 대식세포로서 외부 이물질을 포식하고 탐식하여 죽은 세포를 제거하는 고전적인 기능 외 TNF- α , IL-1 등의 염증사이토카인이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide(O $_2^-$) 등의 염증물질을 다량 분비함으로써 퇴행성 뇌질환 발달에 기여하게 된다^{1,4,5}. 따라서 활성화된 microglia의 조절 및 microglia

로부터 생성되는 염증물질의 억제는 퇴행성 뇌질환 치료의 target으로 인식되고 있다⁹.

최근 생리활성이 뛰어난 한약재를 대상으로 각종 염증질환 치료제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 특히 황련(Coptidis rhizoma)은 민가에서 설사나 위열로 인한 구토에 효과적이며 해열과 해독작용이 뛰어난 약제로 널리 알려져 있고, 황련의 주요 alkaloid 성분인 berberine이 강한 항균작용 및 항염·항암효과가 탁월한 것으로 보고되면서 치료제 개발에 주요 관심 대상이 되고 있다^{20,27}. 이에 저자는 이전 연구에서³¹ 황련의 분획에 따른 퇴행성 뇌질환의 항염증효과를 확인하였으며 본 연구에서는 황련의 주성분인 berberine의 퇴행성 뇌질환 치료 가능성을 조사하고자 쥐의 뇌신경소교세포주인 BV2 세포로부터 생성되는 염증매개물질들에 대한 berberine의 억제효과를 조사하였다.

먼저, 활성화된 BV2 세포로부터 생성되는 염증물질인 NO에 대한 berberine의 억제효과를 조사한 결과, berberine 처리 농도에 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것을 확인하였다(그림 2A). 활성산소종인 NO는 일반적으로 대식세포 및 간세포에서 L-arginine으로부터 NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통해 iNOS에 의해 합성되는 작은 분자량의 자유라디칼(free radical)로서 세포내 항상성 유지, 신경전달물질 운반, 항암작용 및 세포독성 등에 관여하는 신호전달자로서, 특히 LPS나 interferon-gamma(IFN- γ), β -amyloid 등의 자극으로 활성화된 대식세포로부터 과도하게 생성됨으로써 세포독성과 염증반응을 유발한다²⁸. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO 생성을 효과적으로 억제하는 억제제 개발에 대한 연구가 최근 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다^{28,29}. 한편, berberine은 NO 합성효소인 iNOS의 유전자 및 단백질 발현을 효과적으로 억제시켰으며(그림 2B,C), 이는 berberine이 iNOS의 발현을 전사단계에서 조절함으로써 iNOS 생성을 억제시키고 나아가 NO 생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 보인다. NO는 전염증성(pro-inflammation) 또는 항염증성(anti-inflammation) 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 NO 생성은 오히려 세포를 파괴하고 shock에 의한 혈관확장 및 염증반응을 촉진하여 조직에 독성으로 작용하여 손상을 유발하게 된다. 따라서 본 연구결과를 통해 iNOS 발현을 차단함으로써 NO 생성을 억제시킬 수 있는 berberine이 다양한 염증성 질환치료에 매우

효과적일 수 있음을 알 수 있었다. 비록 천연물의 iNOS 생성에 대한 세포기전이 정확히 밝혀져 있지 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우 전처리기가 iNOS promoter activity를 억제하거나 iNOS 유전자의 전사(transcription)를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

PGE2는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성되는데, 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하여 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다³³⁾. 따라서 PGE2 생성 억제는 염증과 통증을 완화시킴으로써 염증질환 치료에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다^{11,20,33)}. 즉, NO/iNOS와 마찬가지로 PGE2/COX-2의 생성 억제는 같은 각종 면역질환을 포함한 염증성질환 치료에 중요한 도움이 될 수 있다. 본 연구에서 berberine은 활성화된 BV2 세포로부터 생성되는 PGE2를 효과적으로 억제시켰으며(그림 3A), 나아가 COX-2의 유전자 및 단백질 발현을 현저히 감소시켰다. 즉, berberine이 COX-2의 발현(그림 3B,C)을 차단함으로써 PGE2 생성을 감소시키는 것으로 나타났으며 이는 berberine이 염증질환 치료에 효과적일 수 있음을 알 수 있다.

Bacterial endotoxin인 LPS는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)와 관련하여 강력하게 염증반응을 유도하는 자극물질로서 TNF- α , IL-1 β 를 포함하여 다양한 염증사이토카인 분비를 유도함으로써 면역반응에 기여하게 된다³¹⁾. 특히 TNF- α 는 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 폐혈증(septic shock)이나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환 발달에 매우 중요한 역할을 하는 사이토카인이며, 암, 악액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성 질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다^{32,33)}. 최근에는 대식세포의 LPS 인식기전의 이해 및 염증유발 관련 유전자의 발굴, 나아가 이들의 조절을 통한 염증질환 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 TNF- α 를 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다^{31,32)}. 본 연구결과에서 berberine은 BV2 세포에서 모두 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 유의적으로 감소시켰으며(그림 4A,B), 나아가 이들 유전자 발현을 효과적으로 억제하였다(그림 4C). 따라서 berberine이 유전자 발현

단계를 조절함으로써 염증사이토카인 생성을 억제시킬 수 있으며 이는 berberine이 다양한 염증성 질환 치료에 효과적일 수 있음을 시사한다.

결론적으로 본 연구를 통해 berberine은 LPS에 의해 활성화된 microglia로부터 과도하게 생성되는 NO, PGE2 등의 염증매개물질 및 TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증사이토카인을 iNOS, COX-2 및 염증사이토카인들의 유전자 발현단계의 조절을 통해 효과적으로 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다. 즉, berberine은 신경소교세포에 대해 강력한 항염증 효과를 나타내는 성분으로서, 차후 단독 또는 기타 약물과의 혼합을 통해 차후 퇴행성뇌질환의 염증개선을 위한 치료제로 개발 가능할 것으로 기대된다.

結 論

본 연구에서는 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 항염증 한약성분을 개발하기 위해서 신경소교세포인 BV2 세포를 이용하여 berberine의 항염증 효과를 조사하였다. Berberine은 50 μ M/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았으며, LPS에 의해 유도된 염증매개물질인 NO, PGE2 및 TNF- α , IL-1 β 의 생성을 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소시켰다. 또한 berberine에 의한 이들 염증매개물질의 생성 억제는 iNOS, COX-2 및 염증사이토카인의 유전자 및 단백질 발현 감소에 의한 것으로 나타났다. 따라서 berberine은 활성화된 신경소교세포로부터 염증매개물질 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 강력한 항염증효과를 나타내었으며, 이는 berberine이 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 약물로 이용되어질 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 교내연구비 지원 및 2007년도 식품의약품안전청 한약재 생리활성성분의 효능확인 연구(06082한약효630)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

參考文獻

1. Kreutzberg GW, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, Trends Neurosci. 1996;19:312 - 18.
2. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen

- FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8514-19.
3. Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development of microglia cells. *Cell Tissue Res*. 1982;225:469-85.
4. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:219 - 40.
5. Nakajima K, Kohsaka D. Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res*. 1993;17:187 - 203.
6. Sautebin L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*. 2000;71:S48 - S57.
7. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*. 2000;22:11-16.
8. Eikelenboom P, van Gool WA. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2004;11:281 - 94.
9. Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:395 - 401.
10. Liu JS, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:1 - 7.
11. 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.
12. 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.
13. Xu JT, Wang LQ, Xu B. [Research development of *Coptis chinensis*] *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2004;26:704-707. Review.
14. Hahn FE, Ciak J. Berberine. *Antibiotics* 1975;3: 577 - 84.
15. Akhter MH, Sabir M, Bhide NK. Anti-inflammatory effect of berberine in rats injected locally with cholera toxin. *Indian Journal of Medical Research* 1977;65:133 - 41.
16. Makhey D, Gatto B, Yu C, Liu A, Liu LF, LaVoie EJ. Protoberberine alkaloids and related compounds as dual inhibitors of mammalian topoisomerase I and II. *Medicinal Chemistry Research* 1995;51 - 12.
17. Yamamoto H, Takase K, Abe Y, Saito A, Suzuki, Pharmacological studies on antidiarrheal effects of a preparation containing berberine and geranii herba. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1993;101: pp. 169 - 175.
18. Sin KH, An DK, Woo ER, Park HK, Lee JS, Yun WS. A study on the extracion efficiency of berberine in *Coptidis rhizoma*. *J. Kor. Analytical Sci*. 1997;10:83-91.
19. Hattori T, Furuta K, Nagao T, Nagamatsu T, Ito T, Shzuki Y. Studies on the antinephritic effect of plant components(4): Reduction of protein excretion by berberine and coptisine in rats with original-type anti-GMB nephritis. *Jpn J. Pharmacol*. 1992;59:156-169.
20. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS, Kim CH. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2007;47:99-107.
21. 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.
22. Kim TS, Kang BY, Cho D, Kim SH. Induction of interleukin-12 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinolizine alkaloid, deviates CD4+ T cells from a Th2 to a Th1 response. *Immunology*. 2003;109:407-14.
23. Lee CH, Chen JC, Hsiang CY, Wu SL, Wu

HC, Ho TY. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha productions via the inhibition of IkkappaB degradation in human lung cells. *Pharmacol Res.* 2007;56:193-201.

24. Ko YJ, Lee JS, Park BC, Shin HM, Kim JA. Inhibitory effects of Zoagumhwan water extract and berberine on angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2007;47:189-96.

25. Choi BH, Ahn IS, Kim YH, Park JW, Lee SY, Hyun CK, Do MS. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. *Exp Mol Med.* 2006;38:599-605.

26. Zhu F, Qian C. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2006;7:78.

27. Asai M, Iwata N, Yoshikawa A, Aizaki Y, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease A-beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352:498-502.

28. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Res* 2001;3:535 - 564.

29. Moilanen E, Whittle B, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: J.I. Gallin and R. Snyderman, Editors, *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, Williams and Wilkins, Philadelphia. 1999:787 - 800.

30. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kB. *Mol Pharmacol.* 1996;49:15 - 21.

31. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative

contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273:974-80.

32. Jhun BS, Jin Q, Oh YT, Kim SS, Kong Y, Cho YH, Ha J, Baik HH, and Kang I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses LPS-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/A7a activation in RAW264.7 murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;318:372-380.

33. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2004;203:127-37.

34. 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.