

지질다당류로 유발한 염증성 뇌손상 동물모델에 대한 황금작약탕의 억제효과 연구

김종규* · 임지성* · 안성후[†] · 송용선[‡]

원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실*, 원광대학교 한의과대학 광주한방병원 한방재활의학과[†],
원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과[‡]

Anti-neuroinflammatory Effects of *Hwanggeumjakyak-tang* on Lipopolysaccharide-induced Brain Injury Model *in vivo* and *in vitro*

Jong-gyu Kim, K.M.D.*, Ji-sung Im, K.M.D.*, Sung-Hu An, K.M.D.[†], Yung-sun Song, K.M.D.[‡]

Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Wonkwang University*, Department of Korean Medicine Rehabilitation, Gwangju Medical Center, College of Korean Medicine, Wonkwang University[†], Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University[‡]

RECEIVED September 6, 2021
REVISED September 27, 2021
ACCEPTED September 27, 2021

CORRESPONDING TO

Yung-sun Song, Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

TEL (063) 850-5114
FAX (063) 850-6666
E-mail yssong@wku.ac.kr

Copyright © 2021 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives *Hwanggeumjakyak-tang* (HJT) has traditionally been used to treat gastrointestinal inflammatory diseases; however, its protective effects against neuronal inflammation are still undiscovered.

Methods We investigated the anti-neuroinflammatory effects of HJT water extract on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 mouse microglia cells. BV2 cells were treated with LPS (1 µg/mL) 1 hour prior to the addition of HJT. We measured cell viability using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay and nitrite production using the Griess assay. We performed a reverse transcription-polymerase chain reaction assay to measure messenger RNA expression of inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)-α. Western blot analysis was performed to determine protein expression of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-κB)α.

Results HJT inhibited excessive nitrite release in LPS-stimulated BV2 cells and also significantly inhibited inflammatory cytokines such as IL-1β, IL-6, and TNF-α in LPS-stimulated BV2 cells. Moreover, HJT significantly suppressed LPS-induced MAPK and NF-κB activation and inhibited the elevation of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the brain of LPS-injected mice.

Conclusions Our study highlights the anti-neuroinflammatory effects of HJT via MAPK and NF-κB deactivation. (**J Korean Med Rehabil 2021;31(4):1-11**)

Key words *Hwanggeumjakyak-tang* (HJT), Anti-neuroinflammatory effect, Neuroprotective agents, Pro-inflammatory cytokines Microglia cell

서론»»»»

현대사회에 이르러 사람의 생활수준이 향상되고 평균

수명이 늘어나면서 노화와 관련된 질환이 많이 증가하게 되었다. 특히 세계보건기구(World Health Organization)에 따르면 2030년에 퇴행성 신경 질환을 겪는 사람이

세계적으로 7천만 명을 넘을 것으로 전망하였다¹⁾. 퇴행성 신경 질환에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 파킨슨병 (Parkinson's disease) 등이 포함된다. 이러한 질병들의 발병 원인에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않지만 현재까지 밝혀진 원인으로는 free radical에 의한 산화적 손상, 세포사멸, 염증 등에 의한 신경 세포의 사멸과 기능 장애가 있고 이밖에 유전적, 환경적 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다^{2,3)}.

중추신경계에 존재하는 대식세포의 일종인 미세아교세포(microglia cell)의 염증반응은 퇴행성 신경 질환을 일으키는 다양한 매커니즘 중 하나로 많은 연구가 진행되고 있다. 미세아교세포는 lipopolysaccharide (LPS)를 포함한 다양한 병원체에 의해 활성화되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증성 매개체와 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 등의 전염증성 cytokine의 생성을 유도한다. 이러한 염증 매개체와 cytokine들은 신경 염증을 유발해 신경 세포의 사멸을 야기하고 뇌 손상을 악화시킬 수 있는 원인 중 하나로 작용하므로 미세아교세포의 활성화를 조절하여 염증매개물질들의 방출을 억제하는 것이 퇴행성 신경 질환에서 신경 세포의 손상을 줄여줄 수 있는 방법이 될 수 있다⁴⁻⁷⁾.

한의학적으로 퇴행성 신경 질환을 지칭하는 명칭은 없으나 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증 등의 퇴행성 신경 질환의 증상인 기억력 저하, 인지기능 저하 및 떨림, 강직, 위약 등의 근육기능 저하 등을 健忘, 癡呆, 振顫, 痿證 등으로 진단하고 변증치지를 통해 치료적 접근을 해왔다⁸⁻¹⁰⁾. 하지만 痿證은 대표적인 난치증에 해당하고⁹⁾, 健忘, 癡呆는 병기가 복잡하고 주로 노화와 관련되어 치료가 쉽지 않은 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

최근 뇌장축(brain-gut axis) 이론이 각광받고 있다. 뇌와 관련된 질병에 소화기의 문제가 관련되어 있다는 이론으로서 소화기 질환에 유효한 치료법 혹은 치료약을 이용하여 뇌 질환, 뇌 염증 치료에 응용하려는 시도가 이루어지고 있다¹¹⁾. 소화기 질환에 다용되고 있는 처방 중에서 본 연구에서는 黃芩芍藥湯을 이용하여 연구를 진행하였다.

黃芩芍藥湯은 張仲景의 「傷寒論」¹²⁾에 최초로 수록되어 있고, 「東醫寶鑑」¹³⁾에서는 痢疾로 泄瀉를 하면서 膿

血이 나오고 몸에 열이 나고 腹痛이 있고, 脈이 洪數한 것을 치료한다고 하였으며 治痢腹痛의 기본방으로 實證의 急痢에 활용되어 왔다¹⁴⁾. 또한 黃芩芍藥湯은 黃芩을 君藥으로, 芍藥, 甘草로 구성되어 있으며 구성 약제들의 항염증 및 항뇌염증 효과는 Li 등¹⁵⁾과 Kim¹⁶⁾의 선행 연구에 의해 진행된 상태이며, 黃芩芍藥湯의 항균작용, 항염증 작용은 Kim 등^{17,18)}의 선행 연구에 의해 보고된 바 있다. 하지만 현재까지 LPS로 자극된 미세아교세포에서 黃芩芍藥湯의 뇌염증 억제 및 뇌세포 보호 효과에 대한 선행된 연구가 없다.

이에 본 저자는 LPS로 자극된 BV2 cell과 LPS로 유도한 뇌손상 모델을 사용하여 黃芩芍藥湯의 뇌염증 억제 작용 및 뇌손상 보호 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 시약

세포 배양용 시약인 Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등은 Gibco BRL (Grand Island, NE, USA)에서 구입하였고, 시약 중 TRIzol, chloroform, acrylamide, sodium dodesyl sulfate (SDS), Tris-HCL, LPS 등은 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항체인 anti-phospho p38, anti-phospho ERK1/2, anti-phospho JNK는 Cell Signaling (Danvers, TX, USA)에서 구입하였고, Anti-p38, Anti-JNK, Anti-ERK, Anti- β -actin, Anti-I κ B α 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2) 실험동물

실험에 사용된 C57BL/6 mouse (weight: 15~20 g, aged: 6 weeks, female)는 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하였고, 일주일동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 시행하였다. 모든 실험은 원광대학교의 동물관리규정을 준수하였다(WKU 21-32).

3) 약재 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 黃芩芍藥湯(*Hwanggeumjakyak-tang*, HJT)은 「동의보감」 처방을 기준으로 하였으며 사용된 약재는 황금, 작약, 감초로 전주 보화한약도매에서 구매하여 사용하였고, 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

실험에 사용된 약재는 물을 용매로 한 추출방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 黃芩芍藥湯(100 g) 분량을 물 1 L와 함께 약탕기(Daewoong, Korea)에서 2시간 30분 전탕하여 여과하고 -80°C에서 동결 건조하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말가루는 26.9 g으로 수율은 26.9%였고, 실험 시 분말가루를 3차 증류수에 희석하여 여과 후 실험에 필요한 농도로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 mouse의 microglia 인 BV2 세포를 분양받았다. 세포배양은 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 시행하였다.

2) 세포독성

BV2 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 환원 시약을 활용하여 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10⁵ cells/mL의 밀도로 현탁한 후, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 각각의 농도로 HJT을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 다음, MTT 용액을 각각의 well에 첨가한 후 30분 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 이후 dimethyl sulfoxide를 첨가하여

formazan을 용해하고, 생성된 용해액을 96-well plate에 loading하였다. Spectrophotometer (Molecular Device, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 아무 처리도 하지 않은 군과의 비율로 세포의 생존율을 나타냈다.

3) NO 농도 측정

NO 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다. 그리스 시약(Griess reagent: 2.5%의 phosphoric acid, 0.5%의 sulphanilamide 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)과 아질산염이 화학 반응하여 형성된 보라색의 아조염은 NO의 농도와 일치한다. 이를 이용해 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10⁵ cells/mL의 밀도로 현탁하였고, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 각각의 농도로 HJT을 처리하였다. LPS (1 µg/mL)로 자극한 이후 24시간 동안 배양하고, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 µL의 그리스 시약을 첨가한 뒤, spectrophotometer를 사용해 540 nm에서 혼합물의 흡광도를 측정하였다.

4) RNA 분리 및 quantitative reverse tranion polymerase chain reaction (RT-PCR)

Easy Blue (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea) 시약을 통해 total RNA를 추출하였다. 우선 배양한 세포에 각각 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 농도의 HJT을 1시간 전 처리한 뒤 LPS로 자극하여 다시 24시간동안 배양하였다. 이후 배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고, PBS 1 mL씩 가해 세포를 포집한 이후 원심분리를 하여 바닥에 남은 세포에 Easy Blue 용액을 1 mL를 넣어 세포를 용해시켰다. 여기에 100 µL의 chloroform 용액을 가한 뒤 생성된 용액을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 세척 후 건조시켰다. 마지막으로 침전물에 diethyl pyrocarbonate 처리한 증류수를 15 µL씩 넣어 RNA를 용해시킨 뒤 정량하였다. cDNA는 1 µg RNA와 cDNA synthesis kit (Applied biosystems, Forster City, CA, USA)를 이용해서 합성하였다.

Messenger RNA (mRNA) 발현을 정량적으로 표현하

Table 1. The Prescription of *Hwanggeumjakyak-tang*

| Herbal name | Pharmaceutical name | Dose (g) | Ratio (%) |
|--------------|----------------------------|----------|-----------|
| Hwanggeum | <i>Scutellarie Radix</i> | 7.5 | 40 |
| Jakyak | <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 7.5 | 40 |
| Gamcho | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 3.75 | 20 |
| Total amount | | 18.75 | 100.0 |

기 위해서 정량중합효소반응을 측정하였으며 합성된 cDNA 1 µL, real time PCR master mix 4 µL (Applied biosystems), primer를 넣고 PCR 조건으로 반응시켰다. PCR 조건은 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 forward (f)와 reverse (r) primer는 코스모진텍(Daejeon, Korea)에서 합성한 것을 사용하였다. 사용한 primer는 Table II와 같다.

5) Western blot analysis

BV2 세포를 60 mm culture dish에 5×10⁶ cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640; Grand Island, NE, USA)로 12시간 starvation시켰다. 이후 HJT (0.5 mg/mL)을 전처리하고 LPS (500 ng/mL)로 자극하였다. 30분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (RIPA buffer 1 mL+phosphatase inhibitor 10 µL+protease inhibitor 10 µL)를 넣어 단백질을 용해시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉힌 후 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음, 샘플을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 electrophoresis한 후 membrane에 옮기고 5% skim milk로 2시간 blocking하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 Iκ-Bα를 ECL detection 용액(Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 확인하였다.

Table II The Primer of IL-1β, IL-6, TNF-α, GAPDH

| Gene | Primer |
|-------|--|
| IL-1β | 5'-CCTCGTGCTGTCGGACCCAT-3' (forward) |
| | 5'-CAGGCTTGTGCTCTGCTTGTGA-3' (reverse) |
| IL-6 | 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' (forward) |
| | 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3' (reverse) |
| TNF-α | 5'-GTGGAAGTGGCAGAAGAGGC-3' (forward) |
| | 5'-AGACAGAAGAGCGTGGTGGC-3' (reverse) |
| GAPDH | 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (forward) |
| | 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' (reverse) |

IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

6) Brain injury mouse 모델 설정

Brain injury mouse 모델은 기존의 논문을 참고하여¹⁵⁾, mouse에 LPS (2 mg/kg)를 복강 주사하여 뇌손상을 유발하였다. 실험실 환경에 적응시킨 mouse는 아무 처리도 하지 않은 정상군, LPS 처리한 대조군과 HJT 투여 농도에 따라 0.1 mg/kg 투여군, 0.2 mg/kg 투여군, 두 종류의 실험군으로 설정하였다. 대조군과 실험군을 실험 횟수별로 각각 6마리로 나누어 총 3회, 군별 18마리씩 진행하였다. 연구에서 적용한 HJT 농도는 기존에 진행된 *in-vivo* 연구가 없기에 임의로 설정하였다. 실험군에게는 HJT을 1주일간 하루에 한 번 경구 투여하였고, LPS 주사(2 mg/kg) 24시간 후 동물실험 윤리규정을 준수하여 희생시켰다.

7) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 실시하여 그 평균값을 기초로 mean±standard deviation으로 나타내고, 실험 데이터는 student's t-test로 분석하였다. 분석한 데이터가 p값이 <0.05일 경우 유의한 것으로 판단하였다. 이상의 통계는 SPSS for windows Version 12.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 처리하였다.

결과»»»»

1. 세포독성

BV2 세포에서 HJT이 세포독성에 영향을 주는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 세포독성이 관찰되지 않는 HJT의 처리농도를 확인하기 위해 BV2 세포에 HJT을 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도로 24시간 처리하였다. HJT을 처리하지 않은 대조군(control)과 HJT을 0.1 mg/mL 농도에서 0.5 mg/mL 농도까지 처리한 실험군 사이의 세포생존에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 BV2 세포에 HJT을 1 mg/mL 이상의 농도로 처리할 경우 세포독성을 의미하는 세포생존율의 감소가 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 관찰결과를 토대로 BV2 세포에서 HJT의 처리농도를 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 농도로 결정하였다.

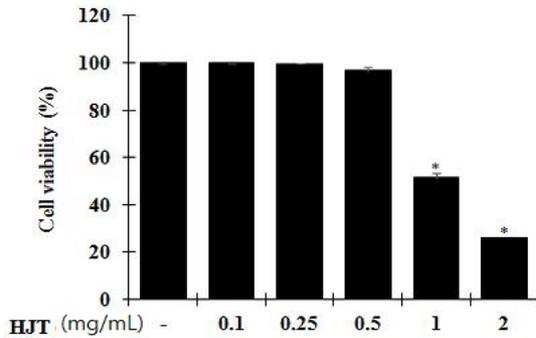


Fig. 1. Effect of HJT on cell viability in BV2 cells. BV2 cells were treated for 24 h with the vehicle (control) or the indicated concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 1, and 2 mg/mL) of HJT. Cell viability was determined by MTT assay, as described in Methods. Data are the mean±standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the vehicle-treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

2. LPS로 자극된 BV2 cell에서 HJT의 NO 생성 억제 효과

NO는 활성 산소 중 하나이며 염증 반응을 촉진, 심화시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 우리는 BV2 세포에서 HJT가 NO의 생성을 억제하는 효과가 있는지 조사하기 위해 BV2 세포에 HJT를 각각 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 처리한 다음 LPS로 자극하였다. LPS로 자극되어 활성화된 BV2 세포의 nitrite의 생성은 LPS로 자극하지 않은 대조군에 비해 큰 값으로 증가하였음을 확인하였다. 이러한 LPS 자극으로 인한 nitrite의 생성은 HJT 처리에 의해 0.1~0.5 mg/mL 농도의 범위에서 농도의존적으로 감소함을 확인하였으며, 특히 HJT 0.25와 0.5 mg/mL 농도에서 유의한 nitrite 생성 억제 효과를 보였다(Fig. 2).

3. LPS로 자극된 BV2 cell에서 HJT의 전염증성 cytokine 억제 효과

BV2 세포에서 HJT의 항염증 효과를 조사하기 위해 BV2 세포에 HJT를 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL의 농도로 각각 처리한 다음 LPS로 자극하여 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) mRNA 발현 정도를 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)을 통해 확인한 뒤 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 기준으로 mRNA

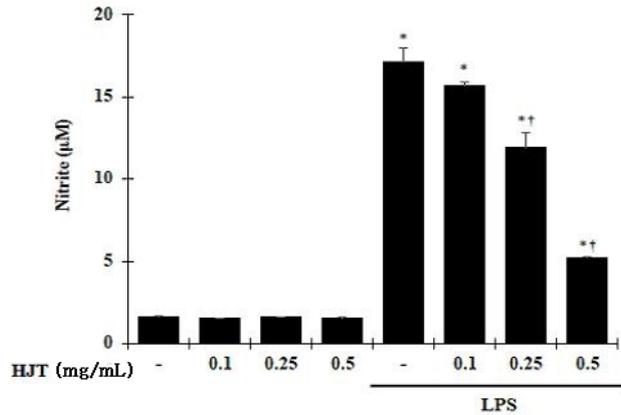


Fig. 2. Effect of HJT on LPS-induced NO production in BV2 cells. BV2 cells were incubated with medium alone (control) or HJT (0.1, 0.25, and 0.5 mg/mL), and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL). The concentrations of the NO metabolite nitrite produced by activated BV2 cells were determined by Griess reagent, as described in methods. Data are the mean±standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the medium alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, LPS: lipopolysaccharide, NO: nitric oxide.

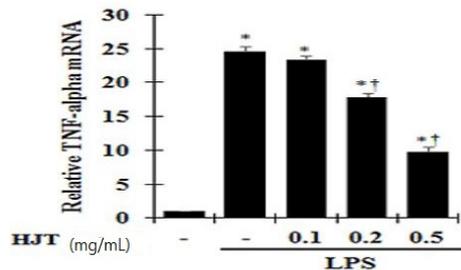


Fig. 3. Effect of HJT on TNF- α expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were incubated for 1 h with medium alone (control) or HJT (0.1, 0.2, and 0.5 mg/mL), and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL). The measurement of the mRNA expression level of TNF- α were used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean±standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the medium alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, TNF: tumor necrosis factor, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

발현을 정량적으로 표현했다. 그 결과 BV2 세포에서 LPS의 자극에 의해 증가한 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현이 HJT의 처리에 의해 모두 농도 의존적으로 발현양이 감소함을 확인하였다. 특히, 0.2와 0.5 mg/mL 농도의 HJT 처리에 의해 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현양이 유의하게 감소했음을 알 수 있다(Figs. 3-5).

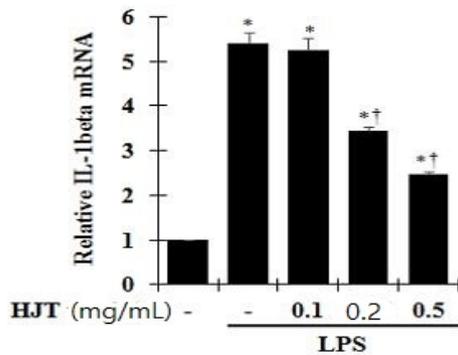


Fig. 4. Effect of HJT on IL-1β expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were incubated for 1 h with medium alone (control) or HJT (0.1, 0.25, and 0.5 mg/mL), and then stimulated for 24 h with LPS (1 μg/mL). The measurement of the mRNA expression level of IL-1β were used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean±standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the medium alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

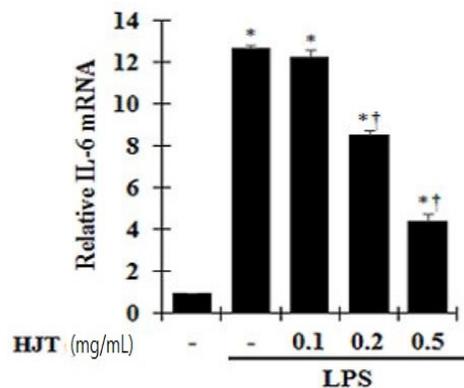


Fig. 5. Effect of HJT on IL-6 expression in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were incubated for 1 h with medium alone (control) or HJT (0.1, 0.2, and 0.5 mg/mL), and then stimulated for 24 h with LPS (1 μg/mL). The measurement of the mRNA expression level of IL-6 were used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean±standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the medium alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

4. LPS로 자극된 BV2 cell에서 HJT의 염증 억제 기전

HJT가 세포의 성장과 분화, cytokine 생성 및 산화스트레스 제어에 중요한 역할을 하는 mitogen-activated pro-

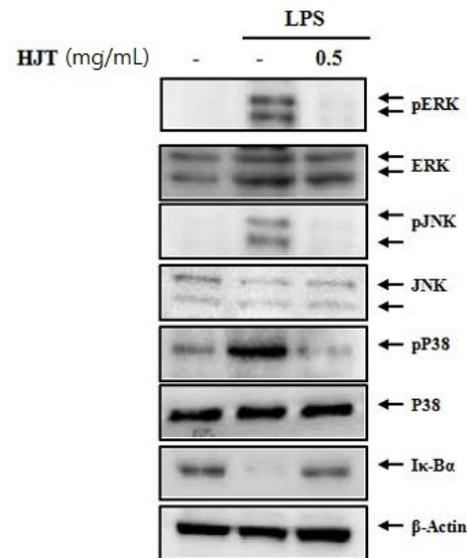


Fig. 6. Effect of HJT on the phosphorylation of MAPKs and the Iκ-Bα in LPS-stimulated BV2 cells. BV2 cells were treated with the indicated concentrations (0.5 mg/mL) of HJT for 12 h, and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed by western blot analysis. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, MAPKs: mitogen-activated protein kinases, LPS: lipopolysaccharide.

tein kinases (MAPKs; ERK, JNK, p38)와 Iκ-Bα 신호전달 경로의 발현에 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위해 MAPKs의 인산화와 Iκ-Bα를 western blot을 통해 확인했다. 그 결과 LPS 자극된 BV2 세포에서 ERK, JNK, p38의 인산화는 모두 증가된 양상을 보였다. 하지만 HJT 0.5 mg/mL의 자극에 의해 상당히 감소했음을 관찰할 수 있었다. LPS 자극된 BV2 세포에서 Iκ-Bα는 감소했음을 확인할 수 있었고, HJT 0.5 mg/mL의 자극에 의해 아무것도 처리하지 않은 군의 수준과 비슷한 양상을 보였다(Fig. 6).

5. LPS로 자극된 뇌손상 마우스 모델에서 HJT의 전염증성 cytokine 억제 효과

LPS로 자극된 뇌손상 마우스 모델의 뇌 조직에서 HJT의 전염증성 cytokine 억제 및 뇌손상 보호 효과에 대하여 조사하기 위해 HJT을 0.1, 0.2 mg/kg의 용량으로 1주일간 하루 한 번 마우스에 경구투여한 후 LPS로 24시간 자극하여 마우스의 뇌조직을 얻었다. 전염증성

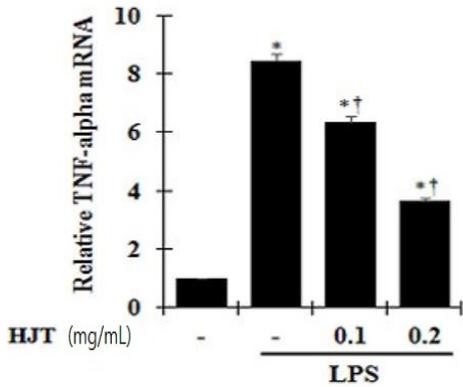


Fig. 7. Effect of HJT on TNF- α expression in LPS-injected brain injury mouse model. The measurement of the expression level of TNF- α on mRNA level used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean \pm standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the saline alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, TNF: tumor necrosis factor, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

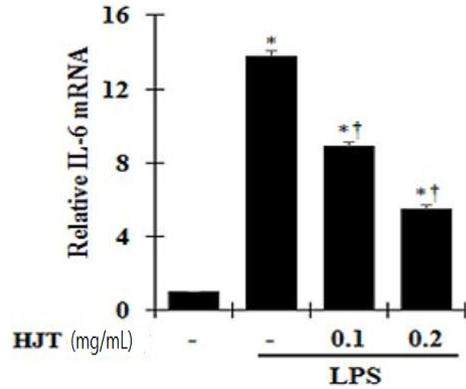


Fig. 9. Effect of HJT on IL-6 expression in LPS-injected brain injury mouse model. The measurement of the expression level of IL-6 on mRNA level used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean \pm standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the saline alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

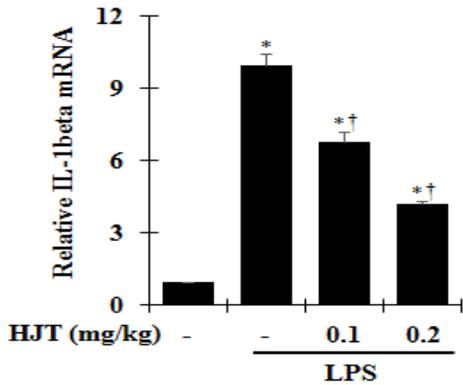


Fig. 8. Effect of HJT on IL-1 β expression in LPS-injected brain injury mouse model. The measurement of the expression level of IL-1 β on mRNA level used qPCR and the corresponding quantification data are shown. Data are the mean \pm standard deviation (n=3). *p<0.05 versus the saline alone condition, †p<0.05 versus the LPS only treatment condition. HJT: *Hwanggeumjakyak-tang*, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, mRNA: messenger RNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

cytokine은 qPCR로 분석하였다. LPS 자극 그룹의 뇌조직에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 cytokine은 정상그룹에 비해 상당히 증가한 양상을 보였고 HJT를 처리한 그룹에서는 LPS 자극 그룹에 비해 농도 의존적으로 전염증성 cytokine의 생성이 유의하게 감소함을 확인하였다(Figs. 7-9).

고찰

퇴행성 신경 질환이란 알츠하이머병, 다발성 경화증, 파킨슨병 등을 포함하며 신경 세포의 사멸 및 기능 장애와 연관되어 점진적인 뇌 기능의 손상으로 인해 야기되는 질환을 의미한다. 발병 원인은 명확하지 않으나, 중추신경계 내에서 면역을 담당하고 있는 미세아교세포의 염증 반응에 의해 신경 세포가 손상되는 것이 퇴행성 신경 질환을 유발하는 다양한 원인 중 하나로 최근 지목되고 있다²⁻⁷⁾.

손상 및 감염 부위에서 미생물 산물의 존재는 주변의 탐식세포가 염증 반응을 시작하도록 자극한다. 탐식세포는 미생물을 확인하고 섭취하여 파괴하는 1차적인 방어 기능을 수행하는 세포들로 호중구와 대식세포 등을 포함하고 골수에서 유래하여 혈액 내 순환되고 성숙하며 다양한 조직에서 활성화되는데, 중추신경계에서 활성화되어 존재하는 탐식세포가 미세아교세포이다¹⁹⁾. 탐식세포가 미생물 산물에 자극을 받으면 toll-like receptors (TLRs)가 활성화 되며, 그 중 TLR4는 LPS에 의해 활성화되어 MAP 키나아제 연쇄반응과 I κ B 키나아제 연쇄반응 경로를 통해 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 다양한 전염증성 cytokine의 전사 및 발현을 유도한다. 그 결과 염증 반응 매개체인 inducible nitric oxide synthase (iNOS),

cyclo-oxygenase-2 등이 발현되며 이 과정으로 NO, PGE2 등이 최종 분비되어 국소부위 염증을 일으킨다²⁰). 정상적인 과정의 염증 반응은 세포의 능동적인 방어 기전으로 훌륭하게 작용하나 미세아교세포를 포함한 국소적 탐식세포가 과도하게 활성화되거나 염증 반응이 지속적으로 장시간 반복될 경우 신경퇴행성 질환, 골관절염 등의 병리적인 결과로 이어질 수 있다^{19,20}). 따라서 미세아교세포의 과도한 활성을 억제하는 것을 통해 신경 세포의 기능 손상이나 사멸을 막아 뇌조직 등의 신경 조직 기능 저하를 방지할 수 있다는 것을 본 연구의 기본 개념으로 삼았다.

한의학적으로 腦와 관련된 문헌들을 살펴보면 「東醫寶鑑」¹³)에서 “腦爲髓海”라 하여 뇌가 골수의 바다이며 모든 골수가 뇌에 속하고 뇌에서 꼬리뼈까지 모두 精髓가 오르내리는 길이라 설명하여 현대의학의 중추신경계와 유사한 형태로 설명하고 있다. 「靈樞·決氣」²¹)에서 “腦髓消, 脛痠, 耳數鳴”이라 하였고, 「靈樞·海論」²¹)에선 “髓海有餘, 則輕勁多力, 自過其度; 髓海不足, 則腦轉耳鳴, 脛痠眩暈, 目無所見, 懈怠安臥.”라고 하여 腦髓가 부족해짐에 따라 인체의 정신, 신체의 활동이 저하되는 것을 설명하였고, 「類經」²²)에서 張景岳은 髓海不足은 결국 精不足 증상과 같은 의미로 보았다. 이것은 나이가 들어 腎氣가 衰함으로 陰精이 虧損되면 精이 缺乏되고 腦에 上衝하지 못해 결국 腦海가 空虛해지는 것과 유사한 의미로 해석이 된다. 이러한 정상생리기능의 감퇴나 실조는 頭痛, 耳鳴, 眩暈, 健忘, 失眠 등의 증상을 나타내고, 악화되면 知能低下, 癡呆 등이 발생하게 된다고 하였다^{23,24}). 이것은 기억력 저하, 인지기능 저하 및 떨림, 강직, 위약 등의 근육기능 저하 등의 증상들로 표현되는 퇴행성 신경질환의 치료가 한의학적으로도 쉽지 않으며, 나이가 들어감에 따라 腎氣가 衰하여 陰精이 虧損되는 것은 퇴행성 신경질환의 주요 치료 방향이 예방 및 악화 방지인 것과 연관될 수 있다고 생각된다.

黃芩芍藥湯은 「傷寒論」¹²)에서 治太陽合少陽病 自下痢腹痛으로 최초로 기록된 이후 「東醫寶鑑」¹³)에서 治下痢膿血, 身熱腹痛, 脈洪數으로 기록되어 있어 痢疾로 인한 급성 실증 복통설사의 기본방으로 활용되어 왔으며, 淸熱燥濕藥의 黃芩을 君藥으로, 補血藥의 芍藥, 補氣藥의 甘草이 2:2:1 비율로 구성되어 있다¹⁴). 黃芩은 肺, 心, 膽, 肝, 大腸 五經에 작용하여 淸熱燥濕, 瀉火解毒·止

血, 安胎 등의 효능이 있으며²⁵), 약리학적으로 baicalin 을 주성분으로 하는 flavonoid 화합물로 항균 및 항바이러스 작용, 항염 및 항과민 작용 등의 약리작용이 연구되었다²⁶⁻³⁰). 芍藥은 肝, 脾 二經에 작용하여 養血和營, 緩急止痛, 斂陰平肝 등의 효능이 있으며²⁵), paeoniflorin 을 주로 함유하여 중추 신경계에 대한 진통과 진경 작용, 항산화 작용 등이 연구되었다^{26,31,32}). 甘草는 脾, 胃, 心, 肺 四經에 작용하여 補脾益氣, 潤肺止咳, 緩急止痛, 淸熱解毒, 調和諸藥 등의 효능이 있으며²⁵) glycyrrhizine 을 주로 함유하고 항염 및 항과민 작용, 항바이러스 작용, 해독 작용 등의 약리작용이 연구되었다^{16,26,33}).

국내의 黃芩芍藥湯에 대한 연구로는 黃芩芍藥湯의 MRSA에 대한 항균활성에 관한 연구¹⁷), 黃芩芍藥湯의 RAW 264.7 대식 세포에서의 항염증 효과에 관한 연구¹⁸) 등이 있어 黃芩芍藥湯이 항균작용, 항염증 작용이 있다는 것이 보고된 바 있다. 이에 黃芩芍藥湯이 뇌염증 억제 효과가 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 LPS로 자극된 BV2 세포에서 黃芩芍藥湯의 항염증 효과와 기전을 조사하였고 LPS로 유도된 뇌손상 동물모델에서 항염증 효과를 확인하였다.

미세아교세포에서 黃芩芍藥湯이 세포 독성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여, BV2 세포에 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도의 黃芩芍藥湯을 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 黃芩芍藥湯을 1 mg/mL 이상의 농도로 처리한 경우 세포 생존율의 감소가 관찰되었으며, 0.5 mg/mL 이하의 농도로 처리한 경우에는 세포 생존율에 유의미한 차이는 없었다. 이것은 0.5 mg/mL 농도 이하의 黃芩芍藥湯은 BV2 세포에 손상을 미치지 않으나 1 mg/mL 농도 이상은 BV2 세포에 손상을 미치는 세포 독성을 나타낸 것을 의미한다.

미세아교세포는 iNOS라고 부르는 유도성 산화질소 합성효소의 작용에 의하여 반응성 질소 중간대사산물 reactive nitrogen intermediates (RNIs), 주로 NO를 생산한다. iNOS에 의해 자유롭게 확산되는 NO는 포식 용해소체 내에서 포식세포의 산화효소에 의하여 발생하는 과산화수소나 과산화물과 결합하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 반응성이 강한 과산화질소 라디칼을 생산한다. 하지만 이러한 세포의 살균물질은 자기 조직과 미생물을 구별하지 못하여, 과도한 NO의 생성은 정상세포를 파괴하고 염증 반응을 과도하게 촉진하여 인체 조직

의 손상을 유발할 수 있다^{19,20}).

LPS로 자극된 미세아교세포에서 黃芩芍藥湯 처리가 NO 생성을 억제하는 효과를 나타내는지 조사하기 위해 본 실험에서는 BV2 세포에 黃芩芍藥湯을 각각 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 처리한 다음 LPS로 자극하였다. 그 결과 LPS로 자극한 세포군은 LPS로 자극하지 않은 대조군에 비해 NO 생성량이 상당히 증가하였음을 확인하였고 LPS로 자극한 세포군에서 黃芩芍藥湯 처리에 의해서 NO의 생성량이 감소함을 확인하였으며 특히 黃芩芍藥湯 0.25와 0.5 mg/mL의 농도에서 유의한 감소 효과를 보였다. 이는 세포독성을 일으키지 않는 농도 내에서 黃芩芍藥湯이 LPS로 자극된 BV2 세포에서 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하며, 결과적으로 염증 반응을 억제하는 것을 시사한다.

전염증성 cytokine은 탐식세포가 분비하여 면역 반응과 염증 반응을 매개하고 조절하는 물질이다. 염증 반응 초기에 대식세포에서 분비되는 전염증성 cytokine으로는 IL-1, IL-6, TNF 등이 있다. TNF는 TNF- α 로 불리며 감염 부위로 호중구와 단핵구의 보충을 촉진시키고, 이들을 활성화시켜서 미생물을 제거하게 유도한다. IL-1은 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 형태가 있으나 동일한 세포 표면 수용체에 결합하며 동일한 생물학적 활성을 갖는다. IL-1 β 은 TNF- α 와 비슷한 생물학적 효과를 가지며 분비된 IL-1 β 의 농도가 낮은 경우엔 국소 염증 반응을 매개하지만 다량으로 분비되는 경우에는 혈류로 들어가 열을 발생하는 등의 내분비 기능을 나타낸다. IL-6는 간세포의 급성단계 단백질 합성을 자극하여 급성단계 반응에 기여하며 골수 전구세포로부터 호중구의 생산을 유도한다. 이러한 전염증성 cytokine은 염증 매개물질로 과도할 경우 세포 손상 등의 병리적 문제를 야기할 수 있다^{19,20,34,35}).

LPS로 자극된 미세아교세포에서 黃芩芍藥湯의 전염증성 cytokine 억제 효과를 조사하기 위해 본 실험에서는 BV2 세포에 0.1 0.2 0.5 mg/mL 농도의 黃芩芍藥湯을 처리한 다음 LPS로 자극하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현 정도를 qPCR을 통하여 확인 후 정량적으로 표현했다. 그 결과 LPS로 자극하지 않은 세포군보다 LPS로 자극한 세포군에서 전염증성 cytokine 발현 정도가 상승하였고, LPS로 자극한 세포군에서 黃芩芍藥湯을 처리한 경우 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA의 발현이 농

도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다. 이것은 黃芩芍藥湯이 LPS로 자극된 BV2 세포에서 염증 반응의 매개 물질인 cytokine을 억제하여 염증 반응을 억제시키는 역할을 수행하는 것을 의미한다.

염증 반응들은 MAPKs와 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 신호 전달 기전에 의해 조절되며 자극 받지 않은 세포에선 NF- κ B subunit들은 I κ -B α 단백질과 결합한 상태로 존재하며 LPS, cytokine 등의 자극에 의해 I κ -B α 의 인산화, 소멸 반응이 발생한다. MAPKs는 serine/threonine 단백질 키나아제로 세포 성장과 분화, 세포 스트레스 및 cytokine 생성과 같은 세포 과정의 조절과 관련이 있으며 자외선, 삼투압 스트레스, TNF와 IL-1 같은 전염증성 cytokine 등의 다양한 형태의 독성 자극에 의해 활성화되며 JNK와 ERK, p38의 3개로 구성된다. MAPKs가 자극되면 전사인자가 인산화되어 활성화되고 대상 유전자가 발현되어 생물학적 반응을 일으킨다^{20,36,37}).

앞선 실험에서 黃芩芍藥湯이 LPS로 자극된 BV2 세포에서 염증 억제 반응 효과를 일으킨다는 것을 확인하였다. 이런 염증 억제 반응이 MAPKs 및 I κ -B α 와 같은 신호전달 경로의 활성화를 통해서 일어나는지에 대해 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과, LPS로 자극된 BV2 세포에서 ERK, JNK, p38의 인산화는 모두 증가하였지만 0.5 mg/mL 농도의 黃芩芍藥湯을 처리한 세포군에선 상당히 감소한 것을 관찰할 수 있었고, LPS로 자극된 BV2 세포에서 I κ -B α 는 감소했으나 0.5 mg/mL 농도의 黃芩芍藥湯을 처리한 세포군에선 정상군과 비슷한 수준의 발현 양상을 확인했다. 이것은 黃芩芍藥湯이 MAPKs 인산화를 억제시키고 I κ -B α 의 분해를 감소시키는 신호전달경로를 통해 전염증성 cytokine의 발현을 억제함을 시사한다.

黃芩芍藥湯의 뇌염증 억제 및 뇌손상 보호 효과가 경구 투여에도 효과가 있는지 조사하기 위하여 黃芩芍藥湯을 0.1, 0.2 mg/kg의 용량으로 1주일간 하루 한 번 마우스에 경구 투여한 후 LPS로 24시간 자극하여 얻은 뇌손상 마우스 모델의 뇌 조직의 전염증성 cytokine을 qPCR로 분석하였다. 그 결과 LPS로 자극된 그룹의 뇌 조직에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA의 발현이 정상그룹에 비해 상당히 증가한 양상을 보였고 黃芩芍藥湯을 처리한 그룹에서는 LPS 자극 그룹에 비해 농도 의존적으로 전염증성 cytokine의 생성이 유의미하게 감소함을

확인하였다. 이것은 세포 수준에서 염증 반응을 억제한 黃芩芍藥湯이 경구 투여 시에도 마우스 뇌조직의 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

이상의 실험결과를 종합해보면 미세아교세포 염증 모델과 LPS로 유도된 brain injury 동물모델에서 黃芩芍藥湯은 미세아교세포의 활성화를 억제시키는 뇌염증 억제 효과를 통해 뇌손상 보호 효과를 나타내는 것으로 생각한다.

결론»»»»

LPS로 자극된 미세아교세포 모델 및 LPS로 유도된 뇌손상 실험동물 모델에서 黃芩芍藥湯의 뇌염증 억제 효과와 뇌손상 보호 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS 자극에 의해 활성화된 미세아교세포 염증 모델에서 黃芩芍藥湯 처리는 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성을 억제하였으며, NO와 같은 염증물질의 분비를 감소시켰다.
2. LPS 자극에 의해 활성화된 미세아교세포 염증 모델에 黃芩芍藥湯 처리는 ERK, JNK, p38 인산화를 억제하였고 I κ -B α 의 분해를 감소시켰다.
3. LPS로 유도된 뇌손상 실험동물 모델에서 黃芩芍藥湯 경구투여는 활성화된 미세아교세포에서 주로 생성되는 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성을 억제하였다.

이상의 결과로 보아 黃芩芍藥湯은 LPS로 자극된 미세아교세포와 뇌손상 동물모델에서 뇌염증 억제 효과를 나타냈고 이로 인해 뇌손상 보호 효과를 나타내는 것으로 생각한다. 따라서 黃芩芍藥湯은 추후에 임상적으로 뇌염증 관련 질환을 치료하고 예방하는 효과적인 후보물질중의 하나로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

References»»»»

1. Pan Y, Shen B, Gao Q, Zhu J, Dong J, Zhang L, Zhang Y. Caspase-1 inhibition attenuates activation of BV2 mi-

- croglia induced by LPS-treated RAW264.7 macrophages. *Journal of Biomedical Research*. 2016;30(3):225-33.
2. Träger U, Tabrizi SJ. Peripheral inflammation in neurodegeneration. *J Mol Med*. 2013;91(6):673-81.
3. Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport*. 1994;5(12):1485-8.
4. Han Q, Yuan Q, Meng X, Huo J, Bao Y, Xie G. 6-shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ . *Oncotarget*. 2017; 8(26):42001-6.
5. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanism. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):57-69.
6. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(4):193-201.
7. Yoon CS. Studies on the anti-neuroinflammatory effects of terpenes from *Nardostachys jatamansi* [dissertation]. Iksan:Wonkwang University; 2017.
8. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. *Korean Medicine Rehabilitation*. 4th rev. Seoul:Koonja Publishing. 2015:165-6.
9. Association of Korean Medicine Professors for Cardiovascular and Neurological Medicine. *Cardiovascular and neurological medicine in Korean medicine*. Seoul: Koonja Publisher. 2013:428.
10. The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry. *Korean medicine neuropsychiatry*. Seoul:Jipmoondang Publisher. 2012:243-5, 332-4.
11. Akshintala VS, Talukdar R, Singh VK, Goggins M. The gut microbiome in pancreatic disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):290-5.
12. Zhang ZG. *Gyeong-agjeonseo*. Taipei:Daelyengookpyung Publisher. 1974:201.
13. Heo J. *Dongyibogam*. Seoul:Bubin Publisher. 1999:450, 488, 576.
14. Yun YG. *Oriental herb medications and explanation*, Seoul:Euseongdang Publisher. 1998:62-3.
15. Li Y, Liu TT, Li YT, Han DY, Hong JS, Yang N, He JD, Peng RH, Mi XN, Kuang CS, Zhou Y, Han YZ, Shi CM, Li ZQ, Guo XY. Baicalin ameliorates cognitive impairment and protects microglia from LPS-induced neuroinflammation via the SIRT1/HMGB1 pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020: 4751349.
16. Kim BW. Anti-inflammatory effect of Jakyakgamcho-tang. *J Korean Oriental Internal Med*. 2010;31(2):365-71.
17. Kim E, Choi C, Kim I, Lee H, Song Y. Antibacterial effect of Huanggeumjakyak-tang against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *J Oriental Rehab Med*. 2013;23(3):15-26.

18. Kim MR, Kang OH, Kim SB, Kang HJ, Kim JE, Hwang HC, Kim IW, Kwon DY. The study of anti-inflammatory effect of Hwanggeumjakyak-tang extract in RAW 264.7 macrophage. *Kor J Herbology*. 2013;28(1):43-50.
19. Thao D, Roger M, Susan V, Carl W. Lippincott's illustrated reviews: immunology. Seoul:Shinilbooks. 2008:179-82.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, 6/E. Seoul:Epublic. 2008: 28-31, 36-7, 210-1, 272-93.
21. Heumjeongsagojeonseo. Huangjenaegyongsomun Yeongchu. Seoul:Daesung Publisher. 1995:369, 371.
22. Zhang JB. LeiJing. Seoul:Bubin Publisher. 2006:1134-5.
23. Kang HS, Park K. A study on the Hae Ron of the Young Chu. *J Traditional Korean Medicine*. 2000;10(1):83-97.
24. Liu DZ. Chinese neurology, Tianjin:Tianjin Science and Technology Publisher. 1988:211-2.
25. Shin MK. Clinical traditional herbalogy. Seoul:Yunglim Publisher. 2010:165, 237, 411.
26. Han JH, Kiim KY. Herbal pharmacology. Seoul: Euseongdang Publisher. 2009:137-44, 474-8, 493-5.
27. Cho SH, Kim YR. Antimicrobial characteristics of scutellariae radix extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2001;30(5):964-8.
28. Lee JK, Song YK, Lim HH. Analgesic and anti-inflammatory effect of Scutellaria Baicalensis. *J Korean Med*. 2007;28(4):124-35.
29. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim MJ, Park SJ, Kim SM. Neuroprotective and cognitive enhancement potentials of Baicalin: a review. *Brain Sciences*. 2018;8(6):104.
30. Fang J, Zhu Y, Wang H, Cao B, Fei M, Niu W, Zhou Y, Wang X, Li X, Zhou M. Baicalin protects mice brain from apoptosis in traumatic brain injury model through activation of autophagy. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;12:1006.
31. Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK, Baek NI. Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. *J Korean Soc Appl Bio Chem*. 1999;42(2):170-5.
32. Hong ND, Kim CW, Shin HD. A study on the analgesic and anti-convulsional effect of paeoniae radix. *Korean J Pharmacogn*. 1979;10(3):119-24.
33. Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, Kim MJ, Shin SJ, Hwang HJ. Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 246.7 murine macrophages. *Journal of Life Science*. 2014;24(3):329-35.
34. Lim NR. Effects of *Boehmeria nivea* on antioxidant, the regulation of neuro-protection and neuro-inflammation [dissertation]. Iksan:Wonkwang University; 2020.
35. Yoon CS, Kim DC, Ko WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, Cho HK, Seo JW, Kim SY, Oh HC, Kim YC. Anti-neuroinflammatory effects of Quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor J Pharmacogn*. 2014;45(1):17-22.
36. Kim DC. Neuroprotective and anti-neuroinflammatory effects of 4-methoxydalbergione and 4'-hydroxy-4-methoxydalbergione from *Dalbergia odorifera* in mouse hippocampal and microglial cells [dissertation]. Iksan: Wonkwang University; 2015.
37. Jin HG, Kim KW, Li J, Im HR, Lee DY, Yoon DH, Jeong JT, Kim GS, Oh HC, An RB, Kim YC. Atractylenoide II isolated from *atractylodes macrocephala* inhibited inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages and BV2 microglia cells. *Kor J Pharmacogn*. 2020;51(4):244-54.