

## LPS로 인해 활성화된 BV2 Microglia에서 발효 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘의 뇌신경염증 보호효과

권빛나<sup>1#</sup>, 오진영<sup>1,2</sup>, 김동욱<sup>1,2</sup>, 장미경<sup>1</sup>, 조준형<sup>3</sup>, 박성주<sup>2,4</sup>, 배기상<sup>1,2\*</sup>

1 : 원광대학교 한의과대학 약리학교실, 2 : 원광대학교 한방심신증후군연구센터  
3 : 미래농업, 4 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실

### Anti-neuroinflammatory effects of cultivated red ginseng with fermented complex mushroom-cereal mycelium on lipopolysaccharide activated BV2 microglial cells

Bitna Kweon<sup>1#</sup>, Jin-Young Oh<sup>1,2</sup>, Dong-Uk Kim<sup>1,2</sup>, Mi-Kyung Jang<sup>1</sup>  
Jun-Hyoung Cho<sup>3</sup>, Sung-Joo Park<sup>2,4</sup>, Gi-Sang Bae<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University,  
2 : Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University, 3 : Future Agriculture,  
4 : Department of Herbology, School of Korean Medicine, Wonkwang University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Neuroinflammation is a common pathological mechanism of neurodegenerative diseases, and the development of therapeutic agents is urgently needed. Red ginseng has been known to be good for the immune stimulation in Eastern Asia. Although the immuno-stimulatory activity of red ginseng are already known, the neuro-protective effects of cultivated red ginseng with fermented complex mushroom-cereal mycelium (RGFM) have not been conducted. Thus, in this study, we tried to investigate the anti-neuroinflammatory effect of RGFM water extract on lipopolysaccharide (LPS) stimulated BV2 cells.

**Methods** : BV2 cells were pretreated with RGFM 1 h prior to LPS exposure. To determine the neuro-protective effects of RGFM water extract, we measured the expression of inflammatory mediators including inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 and nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in LPS-stimulated BV2 cells. In addition, to find out the regulatory mechanism of RGFM water extract, we assessed the protein levels of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and inhibitory  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) by western blotting.

**Results** : In our study, treatment of RGFM reduced the mRNA expression of iNOS and COX-2 and suppressed NO production in LPS-stimulated BV2 cells. Additionally, the secretion of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  but not IL-6 was significantly inhibited by RGFM. Furthermore, RGFM water extract inhibited the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK).

**Conclusions** : Taken together, these findings suggest that RGFM water extract has a protective effect on neuroinflammation through inhibition of JNK.

**Key words** : Neuroinflammation, Red ginseng, Mushroom-cereal mycelium, Microglia, Lipopolysaccharide (LPS)

\*Corresponding author : Gi-Sang Bae, Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

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

#First author : Bitna Kweon, Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6842 · E-mail : kb306@naver.com

· Received : 14 November 2022

· Revised : 16 January 2023

· Accepted : 25 January 2023

## I. 서론

기대 수명이 늘어남에 따라 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병 등 만성 신경퇴행성 질환의 사회, 경제적 비용이 크게 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 신경퇴행성 질환은 진행성 기능 장애 및 신경계 특정 부위의 세포 사멸과 같은 특징을 가지며, 노화와 관련된 유전적, 환경적 및 내인성 요인에 의해 발생한다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. “신경염증 (Neuroinflammation)”은 이러한 신경퇴행의 보편적인 병리 기전으로, 그중 만성 신경염증은 미세아교세포 (microglia)의 지속적인 활성화로 신경조직에 손상을 줘 해롭다고 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 뇌의 도처에 분포되어 있는 미세아교세포는 중추신경계(CNS)의 실질적인 대식세포로, 신경 손상 또는 lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 활성화되어 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine) 분비 및 염증성 효소 (proinflammatory enzyme)인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유전자 발현을 유도한다<sup>4-6)</sup>. 이러한 주기로 지속되는 미세아교세포의 과도한 활성화는 결과적으로 많은 신경퇴행성 질환에서 신경기능장애 및 신경 손상을 유발할 수 있다<sup>4,5)</sup>.

최근 웰빙 (well-being) 트렌드를 맞아 건강 및 면역증진에 대한 수요가 증가하였으며, 그 추세에 맞춰 홍삼 (紅蔘)은 단독 혹은 복합물을 소재로 한 건강기능식품 및 일반 식품의 형태로 다양하게 출시되며 각광을 받고 있다<sup>7)</sup>. 紅蔘은 大輔元氣, 補脾益肺, 生津止渴, 安神增智 하는 효능을 가지며 만성병으로 인한 氣虛의 병증에 주로 사용하는 인삼 (人蔘)의 鬚根을 제거한 후 수증기로 찌서 건조한 뿌리이다<sup>8)</sup>. 紅蔘은 소화 흡수가 용이하며, 蒸熟 과정에서 안정성이 증가하여 저장 기간이 길다는 장점을 가짐과 동시에 면역증진, 항염증을 비롯 비만, 혈당조절, 심혈관계 질환, 간장질환 등 다양한 질병에 개선 효과를 보인다<sup>9-14)</sup>. 물은 한약의 전통적이며 안전한 추출방법으로 紅蔘 제품 제조에도 보편적으로 이용되는 용매지만, 장시간 고온으로 추출할 경우 사포닌 함량이 감소해 약리 효능에 영향을 미칠 수 있다<sup>15,16)</sup>. 이로 인해 많은 연구에서 紅蔘의 생리활성 효과를 높일 수 있는 방법 연구가 진행되고 있다.

그 중에서도 버섯 균사체를 이용하여  $\beta$ -glucan, glucosamine 등의 다당류 함량을 높이는 방법이 면역 증진 및 염증 개선을 위하여 최근에 관심을 받고 있다<sup>17-19)</sup>. 버섯 균사체에서 주요하게 들어있는 다당류는 주로 대식세포나 T, B 세포 등의 면역 체계를 활성화하는 것으로 보고되고 있는데<sup>20)</sup>, 그 중에서도 특히  $\beta$ -glucan는 인체의 면역 시스템에 작용하여 박테리아, 바이러스 및 병원성 미생물로부터의 감염 및 항종양에 탁월한 효과를 보이기 때문에<sup>21,22)</sup>,  $\beta$ -glucan을 첨가제로 사용하여 기존 물질의 생리활성을 증가시키기 위한 연구가 다양한 분야에서 진행되고 있다<sup>19,23,24)</sup>. 이에 본 연구에서는 紅蔘물 추출물이 가진 한계를 발효 복합버섯-곡물 속성균주와의 배양을 통해 극복하고, 나아가 紅蔘의 항염증 작용을 증가시킬 수 있을 것으로 가정하여 연구를 진행하였다.

발효 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘의 항염증 효과를 조사하기 위하여, BV2 microglia에 LPS를 처리하여 신경염증을 유도하였고, 염증 과정에 관여하는 중요 효소인 iNOS와 COX-2의 발현 및 nitric oxide (NO)와 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 이들을 조절하는 주요

경로인 mitogen activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)의 활성을 확인하였다. 이에 발효 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘이 LPS에 의해 유도된 BV2 microglia 염증에서 유의한 항염증 효과가 나타난다는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 발효 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘

본 연구에서 사용된 발효 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘은 미래농업 (서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 발효 복합버섯-곡물 속성균주는 아가리쿠스버섯, 노루궁뎅이버섯, 계종버섯, 표고버섯, 마카뿌리, 꽃송이버섯, 동충하초를 발효 및 숙성하여 얻었고, 홍삼은 (한국인삼공사, Korea ginseng coporation)에서 구입하여 발효 복합버섯-곡물 속성균주와 배양하였다. 발효 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘 분말 100 g을 물 1 L에 넣어 150분 동안 열수 추출하여 전탕한 액을 동결건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터 후 사용하였다. 동결 건조한 후 최종 수율은 18.96% 였다.

#### 2) 시약

Easy-Blue™ total RNA extraction kit는 iNtRON biotechnology (성남, 한국)에서 구입하였다. EZ-western Lumi Pico Alpha는 DOGEN Bio (서울, 한국)에서 구입하였다. RPMI Medium 1640 (11875-093), Fetal Bovine Serum (FBS)(16000-044), Penicillin/streptomycin (15140-122)은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United states)에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

본 연구에서는 mouse 유래 microglial cell인 BV2 세포주를 사용하였다. BV2세포는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. 이들 세포주의 세포 배양액은 RPMI 1640에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 이들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

#### 2) MTT assay

BV2 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well의 수가 되도록 24 well plate에 분주하였다. 복합버섯-곡물 속성균주 배양 紅蔘을 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한다. MTT solution을 처리하고 30분 동안 배양기에 넣어둔 후 상층액을 제거하고 DMSO에 녹인 후 SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, United states)로 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

### 3) Griess assay

Griess 시약은 세포 배양액 내의 NO 농도 측정을 위해 사용되었다. BV2 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고, 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼을 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 1시간 전처리하고 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후 상층액을 취하였다. 그중 100  $\mu$ l를 동량의 Griess 시약과 실온에서 반응시켰다. 이후 SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, United states)를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였으며, sodium nitrate (NaNO<sub>2</sub>)를 이용한 표준액을 기준으로 세포로부터 생성된 NO의 양을 계산하였다.

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

$1 \times 10^6$  cells/well의 세포수로 6 well plate에 분주하고 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼을 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 1시간 전처리하고 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 6시간 배양한 후 세포 상층액을 제거하였다. Easy-Blue 1 ml로 세포를 용해시킨 뒤 chloroform 200  $\mu$ l를 넣고 잘 섞어준 후 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하였다. 상층액과 2-propanol을 동일 비율로 넣고 상온에서 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 침전물을 80% ethanol로 세척 후 건조하였다. 이후 침전물에 DEPC treated water를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시켰다. 추출한 RNA 1  $\mu$ g은 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1  $\mu$ l와 primer (코스모진텍, 대전, 한국)는 SYBR Premix kit (Applied Biosystems, MA, United States)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 1에 나타냈다.

Table 1. Primer sequence of SYBR Green Real-time PCR.

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

### 5) Western blot analysis

$5 \times 10^6$  cells/dish의 세포수로 6 cm dish에 분주하고 0.2 mg/ml의 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼을 1시간 전처리하고 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 15, 30, 60분 동안 처리하였다. RIPA lysis buffer (iNtRON biotechnology, 성남, 한국)를 넣어 1시간 동안 세포를 lysis한 후 이를 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 분리한 후 단백질 양을 측정하였다. 40  $\mu$ g의 단백질을 10% SDS-Polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리시킨 후 nitrocellulose membrane으로 transfer하고 5% skim milk로 실온에서 2시간 blocking하였다. 이후 각 표적 단백질에 대한 항체와 4°C에서 overnight 동안 반응시켰다. Phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (pERK1/2) (#9101), Phospho-c-Jun N-terminal kinase (pJNK) (#9251), phospho-p38 mitogen activated protein kinase (pP38) (#9211), ERK1/2 (#9102), JNK (#9252), P38 (#9212), inhibitory  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (#9242),  $\beta$ -actin (#8457)은 (Cell Signaling Technology; Danvers, MA, United States)에서 구입하여, 1:1000의 농도로 사용하였다. ERK1/2, JNK, P38,  $\beta$ -actin는 각 단백질의 발현에 대한 loading control로 사용하였다.

### 6) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean  $\pm$  S.E.M.로 나타내었다. 실험 결과에 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. BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 세포독성 검증

BV2 세포는 미세아교세포의 특징을 잘 살려 뇌 염증 실험에서 1차 미세아교세포를 대체하여 광범위하게 사용되는 세포주다<sup>25)</sup>. BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 독성이 없으며 생리활성 효능이 최대인 농도를 찾기 위해 MTT assay를 실시하였다. BV2 세포에  $\beta$ -glucan 함유 紅蓼물 추출물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/ml으로 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤 세포 생존율을 측정된 결과, 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼을 0.2 mg/ml의 농도까지 처리하였을 때 세포 독성이 보이지 않음을 확인하였다 (Fig. 1). 위 결과를 바탕으로 실험은 0.5 mg/ml를 제외한 0.2 mg/ml 이하의 농도로 진행하였다.

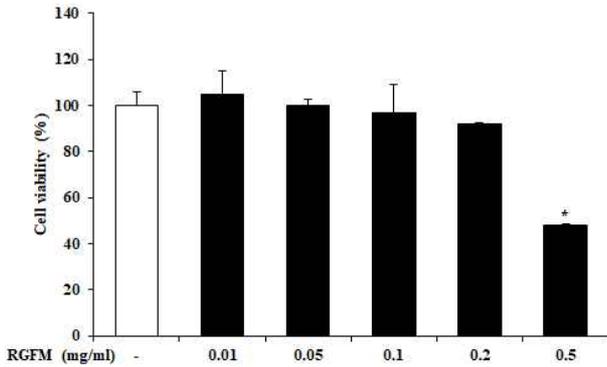


Fig. 1. Effect of cultivated red ginseng with fermented complex mushroom-cereal mycelium (RGFM) in BV2 cells. BV2 cells were incubated with RGFM (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml). After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are presented as the Mean  $\pm$  S.E.M. Results are representative of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs saline treatment alone.

## 2. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘의 iNOS와 COX-2 발현 및 NO 생성 억제 효과

염증 진행과정에서 iNOS 및 COX-2를 포함하는 염증 매개 인자 유도성 효소의 비정상적인 활성화는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>26</sup>). 이를 바탕으로 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 iNOS와 COX-2의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 Real time PCR을 진행하였다. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘을 처리한 군에서 LPS로 인해 증가된 iNOS mRNA 발현을 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml에서 유의성 있게 감소시켰고, COX-2의 mRNA 발현도 0.01 mg/ml부터 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 2A). 또한, 염증 매개 인자 물질인 NO 생성에 미치는 영향도 확인하였다. 그 결과 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘을 처리하였을 때 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도에서 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 NO의 생성이 효과적으로 억제됨을 확인하였다 (Fig. 2B).

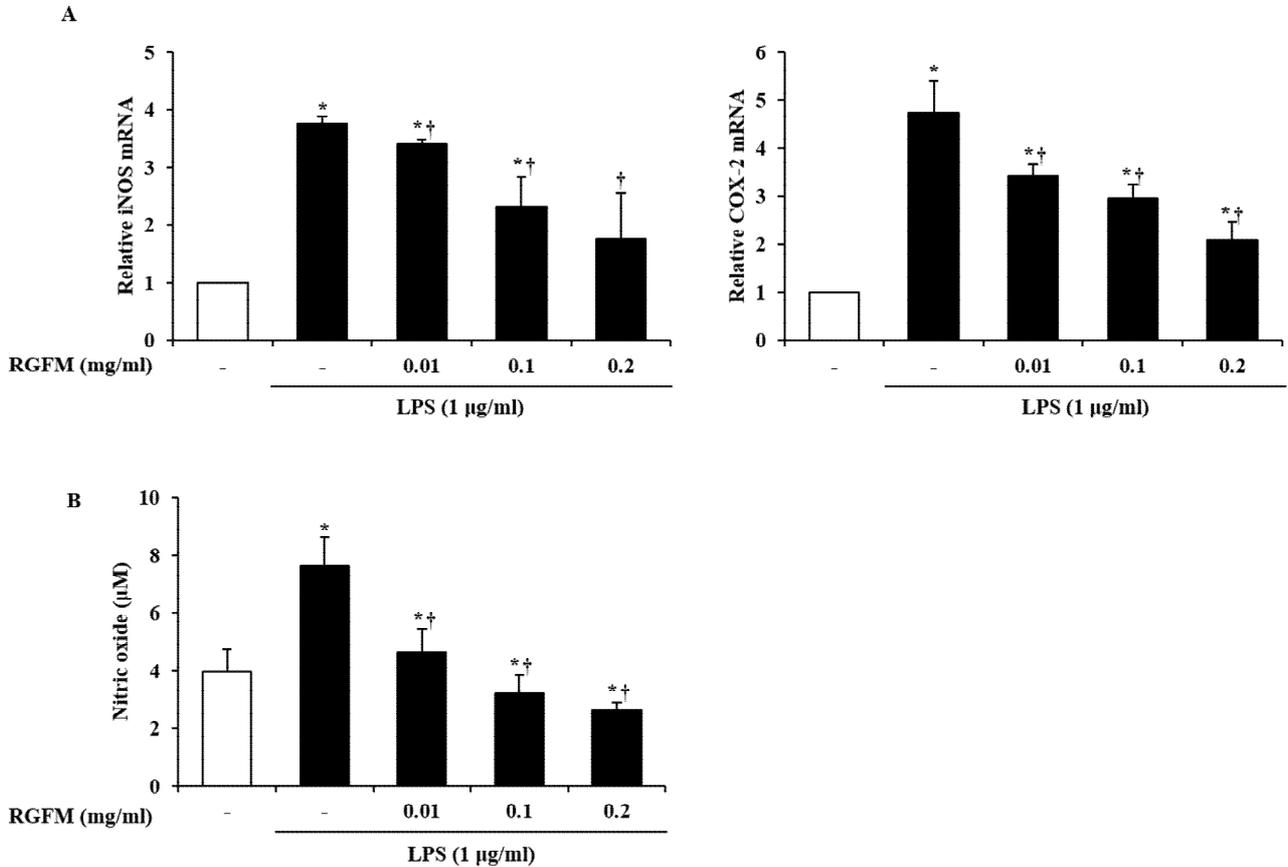


Fig. 2. Effect of RGFM on LPS induced mRNA expression of iNOS and COX-2, and NO production in BV2 cells. (A) BV2 cell was pre-treated with 0.01, 0.1, and 0.2 mg/ml of RGFM for 1 h and then incubated with LPS (1 µg/ml) for 6 h. Then, mRNA levels of iNOS and COX-2 were measured by Real time PCR. (B) BV2 cells were incubated with RGFM (0.01, 0.1, and 0.2 mg/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  $\pm$  S.E.M. Results are representative of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs saline treatment alone. † $p < 0.05$  vs LPS treatment alone.

## 3. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘의 염증성 사이토카인 조절 효과

염증성 사이토카인은 신경염증을 악화시키는 인자로 신경 염증 반응에서 주목해야하는 요소이다<sup>27</sup>). 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 염증성 사이토카인을 효과적으로 조절하는지

확인하기 위해 Real time PCR로 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 의 mRNA 수준 변화를 확인하였다. LPS로 활성화된 BV2 세포군에서 확인하게

IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 양이 증가하였고, 이를 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml이 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 농도의존적으로 감소시켰다. 하지만, IL-6 mRNA 발현은 억제하지 못하였다 (Fig. 3).

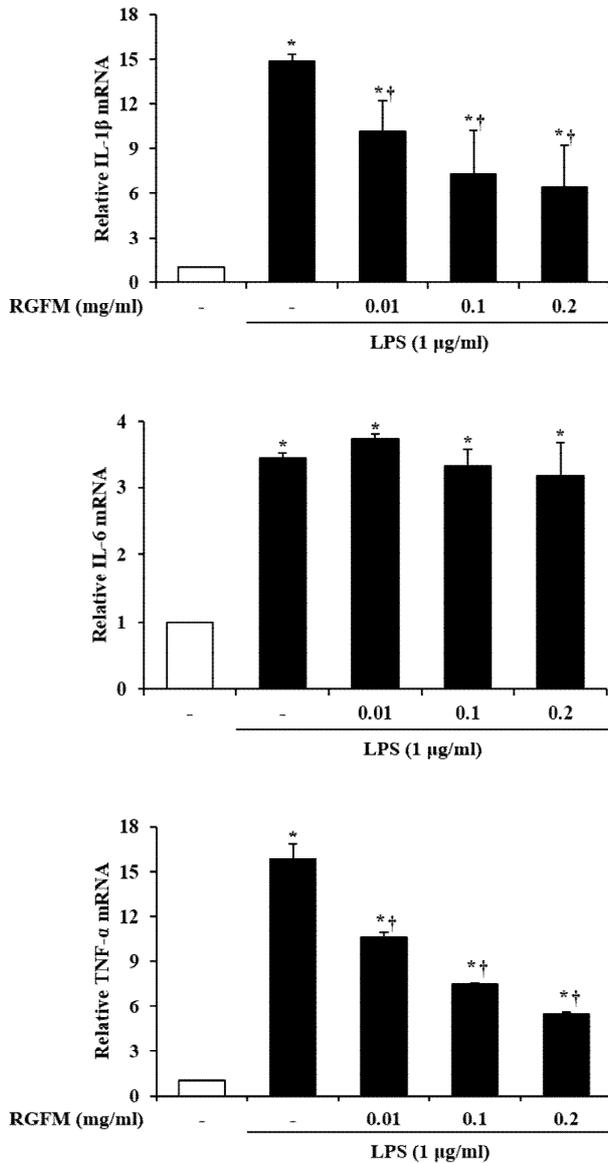


Fig. 3. Effect of RGFM on the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in BV2 cells. The cells were pre-treated with 0.01, 0.1, and 0.2 mg/ml of RGFM for 1 h and then incubated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 6 h. The mRNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were measured by Real time 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.

#### 4. LPS로 활성화된 BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 MAPK 활성화 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 분해에 미치는 영향

복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 항염증 조절 기전을 알아보기 위해 LPS로 인한 염증반응을 조절하는 대표적인 경

로인 MAPK 활성화 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 분해에 대한 영향을 western blot을 통해 단백질 수준에서 확인하였다<sup>28)</sup>. LPS를 처리한 세포군에서 ERK1/2, JNK, P38이 인산화 되며, I $\kappa$ B $\alpha$ 가 분해되는 것을 확인하였다. 하지만 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼를 처리하였을 때, JNK의 인산화를 억제하였고, ERK1/2와 P38의 인산화 및 I $\kappa$ B $\alpha$  분해에는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 4).

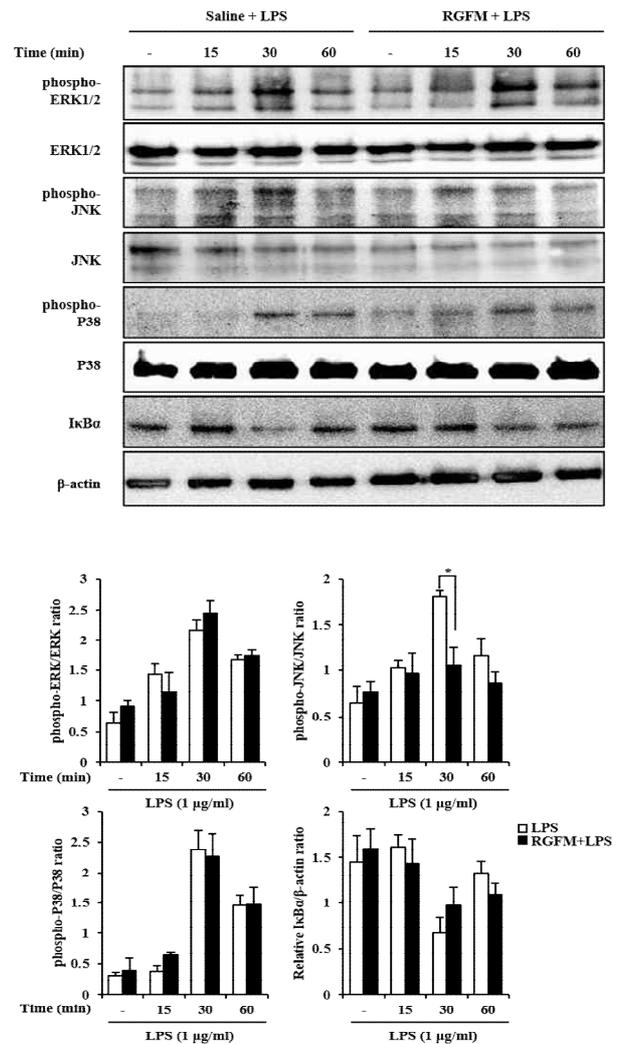


Fig. 4. Effect of RGFM on MAPKs phosphorylation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in BV2 cells. The cells were pre-treated with RGFM (0.2 mg/ml) for 1 h and then incubated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Results are presented as the Mean  $\pm$  S.E.M. Results are representative of three independent experiments. \* $p$  < 0.05 vs LPS treatment alone.

## IV. 고찰

초기 신경염증은 뇌의 보호 반응으로 나타나지만, 과도한 염증반응은 해로울 뿐만 아니라, 실제로 신경재생을 저하시켜 신경 퇴행성 질환 및 기타 신경장애를 유발한다<sup>29,30)</sup>. 신경염

증을 조절하는 미세아교세포는 질병 관련 단백질, 환경 독소, 사이토카인 및 신경 손상에 대한 단회 또는 만성적 노출에 의해서 사이토카인 및 활성 산소종 (reactive oxygen species)를 생성하도록 지속적으로 활성화되어 신경염증을 발생시키고, 이는 신경의 점진적 소실 즉, 신경 퇴행성 질환을 야기한다<sup>31)</sup>. 이와 같이 신경염증은 알츠하이머병, 파킨슨병 및 다발성 경화증과 같은 신경퇴행성 질환의 발병 및 진행에 중요한 역할을 하므로, 이를 효과적으로 억제하여 신경 퇴행 증상을 개선하기 위한 치료제 혹은 보조제의 개발이 시급하다. 紅蓼은 면역증진 및 피로회복을 위해 섭취, 생산되는 건강기능식품소재로 선호도가 높다. 최근 연구 동향에 따르면 紅蓼의 제조 방법, 조성을 변화하여 최대 생리활성을 나타내기 위한 노력이 계속되고 있다<sup>32)</sup>. 버섯과 곡물의 균주를 만들어, 紅蓼과 배양하여 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼을 만들고, 이를 물을 용매로 추출한 후 신경염증 억제 효과를 확인하고자 BV2 세포에 LPS를 처리한 조건으로 실험을 진행하였다. 먼저 세포 독성 실험을 진행하였고, 0.5 mg/ml을 처리하였을 때 세포 생존율이 유의성있게 감소하는 것을 확인하고, 세포독성이 있다고 판단하여 실험은 0.01, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 진행하였다 (Fig. 1).

유도성 isoform인 COX-2와 iNOS는 염증성 환경에서 빠르게 발현하여 사이토카인, prostaglandins (PGs) 및 세포독성 NO 생성을 통해 염증 과정에 관여하는 중요한 효소이다<sup>33,34)</sup>. COX-2는 주로 신경에 위치하고 있으며, 신경 손상을 받으면 글루타메타제 (glutamatergic) 시냅스의 시냅스 후 신경 세포체에서 발현되며, PG 생성을 통해 신경세포 염증 및 사멸을 촉진해 신경퇴행성 질병에 관여한다<sup>28,35,36)</sup>. iNOS는 L-arginine의 산화적 탈아미노화를 촉매하여 강력한 염증 매개체인 NO를 생성할 뿐만 아니라 COX-2의 발현도 조절한다고 알려져 있다<sup>37)</sup>. iNOS를 통한 NO 생산 증가는 신경 퇴행성 질환뿐만 아니라 염증과 같은 병리학적 조건에서 발생하며, 활성화된 미세아교세포에서 증가된 NO는 신경 호흡 (neuronal respiration) 억제를 통해 글루탐산 (glutamate) 분비를 야기하고 이로 인해 염증, 허혈성 및 신경 퇴행성 질환에서 신경세포사를 유발한다<sup>37,38)</sup>. 이에 따라 LPS로 활성화된 BV2 세포에서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼이 iNOS, COX-2 발현 및 NO 생성에 미치는 영향을 확인해 보았다. 그 결과 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼이 iNOS, COX-2의 발현 감소 및 NO 생성을 억제해 통해 신경염증을 조절하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

신경염증은 미세아교세포의 활성화와 면역 신호 분자들을 생성하는데 그 과정에서 염증성 사이토카인의 합성 및 분비를 동반하게 된다<sup>39)</sup>. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 활성화된 미세아교세포에서 합성, 분비되는 대표적인 사이토카인으로 신경퇴행성 질환에서 직, 간접적으로 신경 변성 및 신경 세포 사멸에 영향을 준다고 알려져 있다<sup>30)</sup>. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼은 LPS로 활성화된 BV2 세포에서 IL-6를 제외한 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 를 mRNA 수준에서 감소시키며 항신경염증 효과를 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

신경염증의 신호전달 과정은 다양한 분자들을 포함하며, 그 중 MAPK와 NF- $\kappa$ B를 통한 신호전달 경로는 LPS로 인한 염증 반응에서 대표적으로 나타나는 기전이다<sup>28)</sup>. ERK, JNK 및 P38를 포함하는 MAPK는 신경염증 조절인자의 생성에 관

여하여 세포 생존, 사멸 및 염증을 포함한 세포 기능을 조절하고<sup>40,41)</sup>, NF- $\kappa$ B는 면역 및 염증반응에서 사이토카인 및 케모카인 같은 염증반응을 제어하는 유전자 발현을 조절하는 전사인자이다<sup>42)</sup>. 이번 연구에서 나타난 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 항신경염증의 효과가 MAPK를 통해 조절되는지 확인해 보고자 ERK, JNK 및 P38의 인산화 정도를 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼은 LPS로 활성화된 BV2 세포에서 JNK의 인산화를 효과적으로 억제하였다 (Fig. 4). 최근 미세아교세포에서 JNK를 통한 신경염증으로 인해 퇴행성 뇌질환이 악화됨에 따라 JNK 억제제의 중요성이 대두되는 점에서<sup>41,43)</sup>, 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼의 JNK 인산화 억제는 신경염증 치료제로서의 높은 가능성을 보여준다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 I $\kappa$ B 키나아제로부터 시작하는데, 활성화된 I $\kappa$ B 키나아제는 세포질에서 NF- $\kappa$ B와 결합하고 있던 I $\kappa$ B를 인산화를 통해 분해하며 이로 인해 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동, 염색체의  $\kappa$ B부위에 결합하여 전사인자로서의 역할을 하게 된다<sup>44)</sup>. 이를 바탕으로 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼이 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 통해 염증 매개인자들을 조절하는지 확인해 보았으나, I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제하지 못하였다 (Fig. 4).

신경염증에서 MAPK 활성화와 염증 매개 인자 물질의 효과적인 조절제는 신경염증 치료법 개발에서 중요한 타겟으로 자리잡았다<sup>45)</sup>. 본 연구를 종합하여 보았을 때 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼은 LPS로 인해 활성화된 BV2 세포에서 JNK의 불활성화를 통해 염증 조절 인자의 생성, 분비를 억제하여 항신경염증을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蓼은 중추신경계의 염증으로 나타나는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료제로서의 가능성을 보여줘 좋은 건강기능식품 소재가 될 것으로 사료된다.

또한 홍삼은 면역증진, 항염증 등을 비롯한 다양한 효과가 보고되고 있다<sup>10,13)</sup>. 미세아교세포를 이용한 동일한 연구모델에서 홍삼의 효과를 보고한 논문은 없지만, 최근에는 우울증 및 불안장애 등 뇌질환에서 홍삼의 우수한 효과에 대한 연구가 많아지고 있다<sup>46)</sup>. 홍삼의 추출시간에 따른 ginsenoside의 함량 변화 등 여러 단점이 보고됨에 따라<sup>15,16)</sup>, 홍삼의 효능을 증대할 방법으로 본 연구에서는 복합버섯-곡물 숙성균주 배양법을 제안하였다. 기존 보고에 따르면 버섯 균사체를 이용하여 면역증진과 염증개선에 탁월한 효과를 가진  $\beta$ -glucan, glucosamine 등의 성분 함량이 증가하였다<sup>17-19)</sup>. 이를 토대로 홍삼의 사포닌 외에 항염증 효능을 가진 성분을 더 추가하여 홍삼의 효능을 증대할 수 있는 대안으로 본 연구에서는 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 홍삼을 처음으로 제안하였다. 추후에 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 홍삼에서  $\beta$ -glucan, glucosamine 등의 정량 결과가 제시될 필요가 있기에, 이에 대한 후속 연구를 진행할 필요가 있다고 사료된다.

## V. 결 론

본 실험은 신경염증에 대한 복합버섯-곡물 숙성균주 배양

紅蔘의 보호 효과를 알아보기 위하여 LPS로 활성화시킨 BV2에 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘을 처리한 후 iNOS와 COX-2의 발현 및 NO 생성, 염증성 사이토카인 분비 정도를 측정하였다. 또한, 이를 조절하는 MAPKs의 인산화와 *IκBα* 분해 조절을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 LPS로 인해 증가한 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 NO의 생성을 효과적으로 억제하였다.
3. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘은 대조군에 비해 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 를 유의성 있게 억제하였다.
4. 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 LPS로 인해 활성화된 JNK를 효과적으로 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 복합버섯-곡물 숙성균주 배양 紅蔘이 신경염증에 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## Acknowledgment

본 연구는 2022년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):42.
2. Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of neural transmission.* 2009;116(9):1111-62.
3. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):457-87.
4. Polazzi E, Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):293-315.
5. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2018;18(4):225-42.
6. Santiago AR, Baptista FI, Santos PF, Cristóvão G, Ambrósio AF, Cunha RA, et al. Role of microglia adenosine A2A receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases. *Mediators of inflammation.* 2014;2014.
7. Kwak Y-S, Choi K-H, Kyung J-S, Won J-Y, Rhee M-H, Lee J-G, et al. Effects of high temperature heating on the some physicochemical properties of Korean red ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer) water extract. *Journal of Ginseng Research.* 2008;32(2):120-6.
8. Seo BI, Kwon, D.Y., Choi, H.Y., Lee, J.H., Oh, M.S., Bu, Y.M. *Medicinal Herbology.* Seoul: Younglim-Sa; 2008.
9. Nam K-Y. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* CA Meyer). *Journal of Ginseng Research.* 2005;29(1):1-18.
10. Jo J-Y. Immunomodulatory Effects of Red Ginseng-derived components. *Food preservation and processing industry.* 2009;8(2):6-12.
11. Yoon SJ, Kim SK, Lee NY, Choi YR, Kim HS, Gupta H, et al. Effect of Korean Red Ginseng on metabolic syndrome. *J Ginseng Res.* 2021;45(3):380-9.
12. Hong C-E, Lyu S-Y. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Korean red ginseng extract in human keratinocytes. *Immune network.* 2011;11(1):42-9.
13. Hong M, Lee YH, Kim S, Suk KT, Bang CS, Yoon JH, et al. Anti-inflammatory and antifatigue effect of Korean Red Ginseng in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Ginseng Res.* 2016;40(3):203-10.
14. Song Y-B, Kyung J-S, Park S-B, Wee J-J, Do J-H, Kim Y-S. Influence of Korean red ginseng water extract on recovery of hepatic function in hypercholesterolemic mice fed high cholesterol diet. *Journal of ginseng research.* 2008;32(4):283-90.
15. Li X, Han J-S, Park Y-J, Kang S-J, Kim J-S, Nam K-Y, et al. Extracting conditions for promoting ginsenoside contents and taste of red ginseng water extract. *Korean Journal of Crop Science.* 2009;54(3):287-93.
16. Lee J-M, Ko M-J, Chung M-S. Physicochemical properties and composition of ginsenosides in red ginseng extract as revealed by subcritical water extraction. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 2015;47(6):757-64.
17. Lee H-D, Lee G-S.  $\beta$ -Glucan and glucosamine contents in various cereals cultured with mushroom mycelia. *The Korean Journal of Mycology.* 2009;37(2):167-72.
18. Lee B-E, Ryu S-Y, Kim E-H, Kim Y-H, Kwak K-A, Song H-Y. Immunostimulating effect of

- mycelium extract of *Phellinus linteus*, Korean Journal of Pharmacognosy, 2012;43(2):157–62.
19. Mun H-C, Lee H-S, Park J-H, Kim D-H, Lee S-Y, Seong N-S, et al. Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 2004;12(1):24–30.
  20. Lee JH, Soo MC, Kyung SS, Sang BH, Hwan MK, Nam DH, et al. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1996;6(3):213–8.
  21. Kim HS, Hong JT, Kim Y, Han SB. Stimulatory Effect of beta-glucans on Immune Cells. Immune Netw, 2011;11(4):191–5.
  22. Yan J, Větvíčka V, Xia Y, Coxon A, Carroll MC, Mayadas TN, et al.  $\beta$ -Glucan, a “specific” biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). The Journal of Immunology, 1999;163(6):3045–52.
  23. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. Nutr J, 2014;13:38.
  24. Lee J-S, Lee S-H, Jang Y-M, Lee J-D, Lee B-H, Jung J-Y. Macrophage and anticancer activities of feed additives on  $\beta$ -glucan from *Schizophyllum commune* in breast cancer cells. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2011;40(7):949–55.
  25. Henn A, Lund S, Hedtjárn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. ALTEX: Alternatives to animal experimentation, 2009;26(2):83–94.
  26. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. International journal of cancer, 2007;121(11):2357–63.
  27. Kim Y-K, Na K-S, Myint A-M, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2016;64:277–84.
  28. Bartels AL, Leenders KL. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. Current neuropharmacology, 2010;8(1):62–8.
  29. Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. Science, 2016;353(6301):783–5.
  30. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. J Neurol Neurosurg Spine, 2016;1(1).
  31. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. Neurotherapeutics, 2010;7(4):354–65.
  32. Ryu G. Recent trend in red ginseng manufacturing process and characteristics of extruded red ginseng. Food Engineering Progress, 2007.
  33. Surh Y-J, Chun K-S, Cha H-H, Han SS, Keum Y-S, Park K-K, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$  B activation. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001;480:243–68.
  34. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. J Neuropathol Exp Neurol, 2004;63(9):901–10.
  35. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996;93(6):2317–21.
  36. Teismann P, Tieu K, Choi D-K, Wu D-C, Naini A, Hunot S, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003;100(9):5473–8.
  37. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. Pharmacol Rev, 2005;57(2):217–52.
  38. Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia—inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. J Neurosci, 2001;21(17):6480–91.
  39. Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. J Neuroinflammation, 2008;5:7.
  40. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiology and molecular biology reviews, 2011;75(1):50–83.
  41. Lim HS, Kim YJ, Kim BY, Park G, Jeong SJ. The Anti-neuroinflammatory Activity of Tectorigenin Pretreatment via Downregulated NF- $\kappa$ B and

ERK/JNK Pathways in BV-2 Microglial and Microglia Inactivation in Mice With Lipopolysaccharide. *Front Pharmacol*. 2018;9:462.

42. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*. 1999;45(1):7-17.
43. Wang Q, He Q, Chen Y, Shao W, Yuan C, Wang Y. JNK-mediated microglial DICER degradation potentiates inflammatory responses to induce dopaminergic neuron loss. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):184.
44. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:77.
45. Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M. MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2009;292(12):1902-13.
46. Bui BP, Nguyen PL, Do HTT, Cho J. Anxiolytic effect of Korean Red Ginseng through upregulation of serotonin and GABA transmission and BDNF expression in immobilized mice. *J Ginseng Res*. 2022;46(6):819-29.