

## LPS에 의해 활성화된 미세아교세포에서 미역식 추출물의 신경염증 보호 효과\*

박재현 · 김성훈 · 이선령†

제주대학교 생물학과

## Inhibitory effect of *Petalonia binghamiae* on neuroinflammation in LPS-stimulated microglial cells\*

Park, Jae Hyeon · Kim, Sung Hun · Lee, Sun Ryung†

Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** Neuroinflammation is mediated by activation of microglia implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Inhibition of neuroinflammation may be an effective solution to treat these brain disorders. *Petalonia binghamiae* is known as a traditional food, based on multiple biological activities such as anti-oxidant and anti-obesity. In present study, the anti-neuroinflammatory potential of *Petalonia binghamiae* was investigated in LPS-stimulated BV2 microglial cells. **Methods:** Cell viability was measured by MTT assay. Production of nitric oxide (NO) was examined using Griess reagent. Expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) was detected by Western blot analysis. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling was examined by nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 subunit and phosphorylation of I $\kappa$ B. **Results:** Extract of *Petalonia binghamiae* significantly inhibited LPS-stimulated NO production and iNOS/COX-2 protein expression in a dose-dependent manner without cytotoxicity. Pretreatment with *Petalonia binghamiae* suppressed LPS-induced NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation and phosphorylation of I $\kappa$ B. Co-treatment with *Petalonia binghamiae* and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an NF- $\kappa$ B inhibitor, reduced LPS-stimulated NO release compared to that in PB-treated or PDTC-treated cells. **Conclusion:** The present results indicate that extract of *Petalonia binghamiae* exerts anti-neuroinflammation activities, partly through inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. These findings suggest that *Petalonia binghamiae* might have therapeutic potential in relation to neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

**KEY WORDS:** *Petalonia binghamiae*, neuroinflammation, microglia, nitric oxide, nuclear factor- $\kappa$ B

## 서 론

뇌에서 대식세포의 역할을 하는 미세아교세포 (microglial cell)는 중추신경계 (central nervous system, CNS) 내 면역 반응을 조절하는 중요한 효과세포 (effector cell)이다. 이들의 활성화는 약물이나 독소에 의한 이물질을 제거하고 신경 성장 인자를 분비하여 CNS의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다.<sup>1</sup> 그러나 손상된 뉴런으로부터 발생하는 신호, 외부 자극에 의해 변형된 비정상적인 형태의 단백질의 축적, 병원체의 침투와 같은 유해한 스트레스에 노출 되면 미세아교세포의 활성이 지나치게 증가되어 과도한

신경염증반응을 유도하게 되고 신경세포의 손상을 유발 함으로써 알츠하이머질환, 파킨슨질환, 다발성 경화증, 뇌 경색 등과 같은 신경퇴행성 질환들을 일으킬 수 있다.<sup>2-6</sup> 따라서, 신경세포 손상을 유도하는 신경염증반응의 제어가 신경퇴행성 질환의 치료 및 예방의 주요 요인 중의 하나로 인식되면서 미세아교세포의 과도한 활성 억제를 위한 소재 개발 연구가 다양하게 진행되고 있다. 포도잎에서 분리한 quercetin-3-O-glucuronide<sup>7</sup>와 뽕나무에서 분리한 morin<sup>8</sup>은 신경염증반응을 억제하였고 녹차 유래 폴리페놀인 epigallocatechin gallate (EGCG)<sup>9</sup>의 경우 신경염증반응을 억제함과 동시에 신경세포 손상을 보호하는 효과를

Received: December 8, 2016 / Revised: December 20, 2016 / Accepted: January 18, 2017

\*This work was supported by the project "PoINT" of Jeju National University in 2015.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: 82-64-754-3522, e-mail: srlee@jejunu.ac.kr

© 2017 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나타내었고 미세아교세포의 과도한 활성화로 인한 식균 활성 (phagocytic activity) 또한 억제됨을 보여주어 신경 퇴행성 질환의 제어 가능성을 제시하였다.<sup>10</sup>

미세아교세포의 과도한 활성화는 lipopolysaccharides (LPS),  $\beta$ -amyloid related proteins, human immunodeficiency virus (HIV)의 외부 단백질인 gp120과 같은 물질들에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며, nitric oxide (NO), prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등과 같은 염증성 매개 인자 및 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 분비를 촉진하여 신경독성을 유발한다.<sup>11,12</sup> LPS에 의한 신경염증반응은 Toll-like receptor 4 (TLR 4) 신호전달 경로의 활성화에 의해 조절되거나 독성물질로 작용하는 NO나 PG의 생성에 영향을 미치는 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 조절되기도 하는데 이러한 일련의 과정은 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B와 activator protein (AP)-1의 신호전달 조절 기전과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>9,13</sup>

비타민, 미네랄, 식이섬유 등이 풍부하여 예로부터 medicinal herb로 사용되어 온 해조류는 제주도 연안에 약 520여종이 분포하는 것으로 보고되어 있다.<sup>14</sup> 특히, 갈조류의 경우 fucoidan과 laminarin이라는 성분을 다량 가지고 있으며<sup>15,16</sup> 이는 항암과 항염증 등의 생리활성 뿐 아니라 DNA 손상 및 신경세포 손상을 보호하는 효과를 가지는 것으로 보고되어 있다.<sup>17</sup> 최근 많은 연구자들에 의해 갈조류에 대한 기능성이 알려지면서 기능성 식품으로서의 관심이 점차 증가되었고 생리적 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 갈조류중의 하나인 감태 (*Ecklonia cava*) 분획물은 항산화 및 암세포 증식을 억제하는 효과가 입증되었고<sup>18</sup> 비틀대모자반 (*Sargassum sagamianum*)의 farnesylacetone 유도체는 치매 예방 효능을 보여주었다.<sup>19</sup> 툿이나 파배기 모자반 (*Sargassum siliquastrum*) 추출물 및 셀만모자반 (*Sargassum kjellmanianum*)에서 분리한 phlorotannin의 경우 과산화 지질 생성 억제 효과가 있는 것으로 보고되어져 있다.<sup>20,21</sup>

미역취 (*Petalonia binghamiae*, PB)는 너비 20~30 mm, 길이 250 mm 정도의 잎을 가지고 있는 미역과 (Alariaceae)에 속하는 갈조류이다. 조간대 바위에서 군락을 이루어 서식하며 한국과 일본 등 태평양 연안에 주로 분포한다.<sup>14</sup> 미역취는 예로부터 민간에서 당뇨나 염증성 관련 질환에 긍정적인 효과가 있는 것으로 전해져 오면서 다양한 먹거리로 사용되어 왔으나 최근에 들어서 그 효능이 검증되기 시작하였고 이를 천연물 소재로 활용하기 위해 많은 연구들

이 진행되고 있다. Kang 등<sup>22,23</sup>의 연구에 따르면 미역취는 비만을 저해할 뿐 아니라 지방세포의 분화를 억제하여 당뇨와 같은 대사성 질환을 조절하는데 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었으나 아직까지 염증 유도성 뇌신경혈관계 질환의 효능에 관련된 미역취의 생리활성 연구는 매우 미흡한 실정이다. 그 외, 미역취는 항산화 작용과 함께 타이로시네이즈의 활성을 조절하여 미백 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다.<sup>24</sup> 따라서 본 연구에서는 염증성 관련 퇴행성 뇌질환에 미치는 미역취의 효능을 알아보고자 뇌신경혈관계를 구성하는 미세아교세포인 BV2 세포를 이용하여 LPS에 의한 미세아교세포의 활성화를 유도하여 미역취 추출물이 신경염증에 미치는 효능 및 조절 기전을 조사하였다.

## 연구방법

### 시료

연구에 사용된 미역취는 제주 조간대에서 채취하여 흐르는 물로 씻어 염분을 제거한 후 동결건조 및 분쇄하였다. 미역취 분말 중량의 10배에 해당하는 80% 에탄올을 첨가하여 48시간 상온에서 침출한 후 Whatmann paper (No. 2)로 여과하여 불순물을 제거하였고 위 과정을 2회 반복하였다. 회수된 80% 에탄올 추출물은 회전농축기 (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

### 세포배양

Mouse microglial BV2 세포는 제주의대 생리학 연구실에서 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### MTT assay

세포 독성을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 24 well plate에서 12시간 배양한 세포 ( $2 \times 10^5$  cells/mL)에 LPS 또는 농도별로 희석한 미역취 추출물을 처리하고 24시간 배양한 다음, MTT 용액을 각 well에 0.4 mg/mL의 농도로 처리하였다. 4시간 반응시킨 후, dimethyl sulfoxide (DMSO)로 formazan crystals을 녹여 ELISA reader (Molecular devices, sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## Nitric oxide (NO) assay

NO 생성량은 griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine, 2.5% phosphoric acid)를 이용하여 측정하였다.  $2 \times 10^5$  cells/mL의 밀도로 심은 세포에 각 농도별 미역쇠 추출물을 30분 전처리한 후 100 ng/mL의 LPS를 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지의 상층액 100  $\mu$ L와 Griess 시약 100  $\mu$ L를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )를 이용하여 측정된 표준곡선과 비교하여 분석하였다.

## Western blot analysis

세포 단백질을 추출하기 위해 phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 수세한 세포에 protease inhibitor가 첨가된 RIPA buffer (1 M Tris HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 0.5 M EDTA, 100% NP-40, 20% SDS)를 이용하여 30분간 반응하였고 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 단백질을 얻었다. 세포의 핵 내에 존재하는 핵단백질의 분리는 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. PBS로 수세한 세포를 cytoplasmic extraction reagent (CER) I에서 10분, CER II에서 1분간 반응한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액은 세포질 분획으로 사용하였다. 남은 cell pellet은 nuclear extraction reagent (NER)을 넣어 40분 동안 반응하여 15분간 원심분리 (4°C, 15,000 rpm)를 통해 핵 분획 단백질을 추출하였다. 얻어진 단백질은 Bradford assay를 통해 정량화하였고 30  $\mu$ g의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 anti-mouse COX-2 (BD biosciences, Franklin, NJ, USA), anti-rabbit iNOS (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA), anti-rabbit phospho I $\kappa$ -B, anti-rabbit NF- $\kappa$ B (Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti-mouse  $\beta$ -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 항체를 이용하여 반응하였고 enhanced chemiluminescence kit (ECL) 방법으로 각 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

## 통계처리

모든 실험의 결과는 3회 이상 반복하여 평균치와 표준편차 (mean  $\pm$  SD)로 나타내었고 SPSS (statistical package for social science, ver. 18)를 이용하여 통계처리 하였다. 각 실험군 간의 비교는 one-way ANOVA로 분석한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

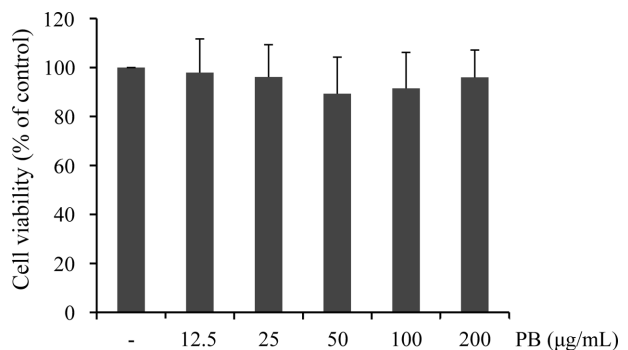
## 결 과

### 미역쇠 추출물의 세포독성

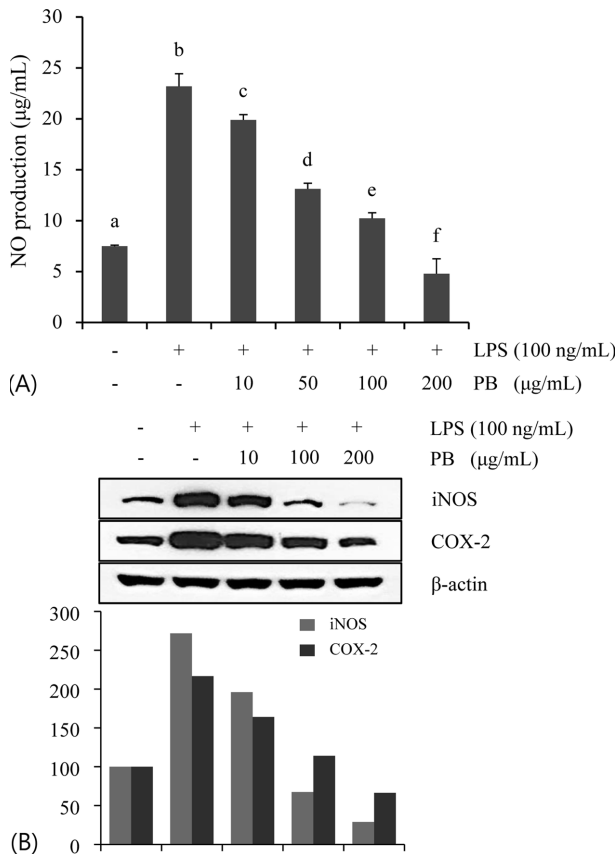
BV2 미세아교세포에서 미역쇠 추출물의 독성 정도를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다.  $2 \times 10^5$  cells/mL의 세포에 미역쇠 에탄올 추출물을 10~200  $\mu$ g/mL 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 농도가 증가하더라도 90% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1).

### 미역쇠 추출물의 항신경염증 효과

미역쇠 추출물이 미세아교세포의 활성화에 의한 신경염증에 미치는 효능을 알아보기 위해 LPS로 미세아교세포의 활성화를 유도한 후 염증반응의 표지 인자로 사용되는 NO의 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현양상을 분석하였다. 먼저, 미역쇠 추출물이 NO 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해 100 ng/mL의 LPS로 활성화된 BV-2 미세아교세포에 세포독성이 나타나지 않는 범위의 미역쇠 추출물을 농도별 (10~200  $\mu$ g/mL)로 처리하여 분비되는 NO 양을 측정하였다. LPS 처리군의 경우 대조군에 비해 약 3배 정도 NO 생성량이 증가되었고 미역쇠 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 NO 분비량이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 2A). 미역쇠 추출물이 NO 및 PG의 분비를 조절하는 효소 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 iNOS와 COX-2의 발현양상을 western blot으로 분석하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 LPS 처리에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현은 미역쇠 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 미역쇠 추출물의 NO 생성 억제 효과와 일치되는



**Fig. 1.** Effect of *Petalonia binghamiae* (PB) on the viability of BV-2 microglial cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of PB for 24 h and cytotoxicity of PB was examined by MTT assay. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

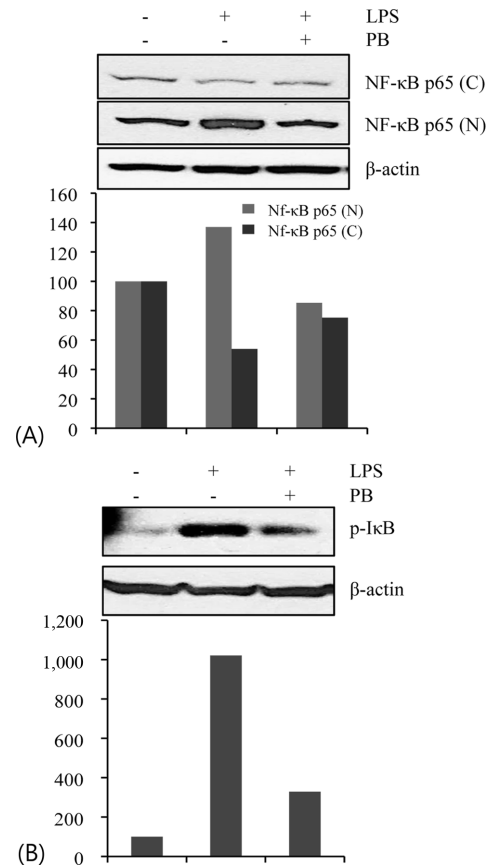


**Fig. 2.** Inhibitory effect of *Petalonia binghamiae* (PB) on LPS-induced NO production (A) and iNOS/COX-2 protein expression (B). The cells were incubated with the indicated concentrations of PB for 30 min before treatment of LPS. Data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Means with different letter in superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

결과로 미역취 추출물이 항신경염증 활성을 가지는 것으로 확인 할 수 있었다.

### NF- $\kappa$ B signaling에 미치는 미역취 추출물의 효과

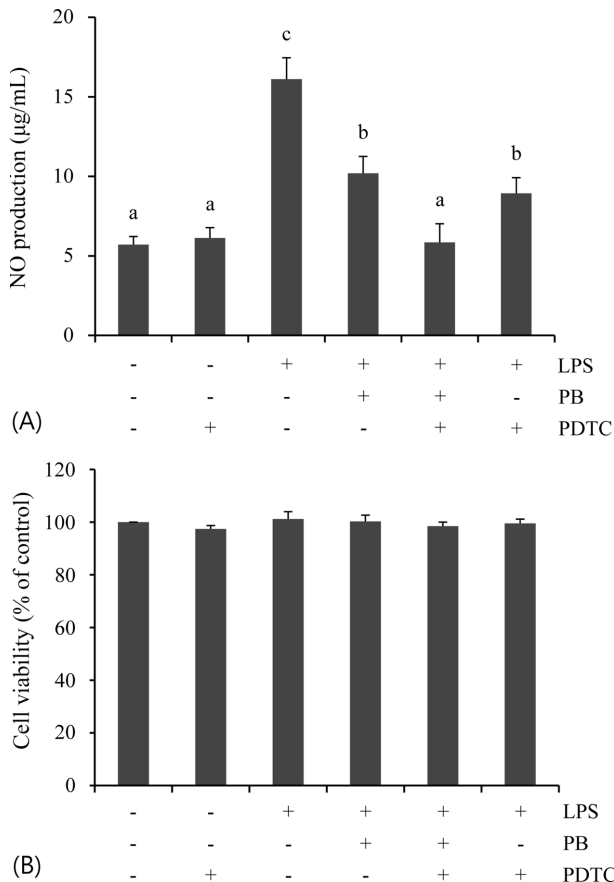
미역취 추출물의 iNOS의 발현 저해에 따른 NO 생성 억제 효과가 항염증 활성의 상위 신호전달 기전으로 작용하는 NF- $\kappa$ B 신호전달과 연관성이 있는지를 알아보기 위해 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B의 활성정도를 분석하였다. NF- $\kappa$ B는 염증성 단백질의 발현을 조절하는 전사인자로 핵으로의 translocation과 I $\kappa$ B의 인산화를 통해 이들의 활성화가 조절된다.<sup>9-14</sup> LPS로 활성화된 BV2 cell에서 NF- $\kappa$ B 단백질의 translocation을 확인하기 위해 LPS와 미역취 추출물이 30분 동안 처리된 세포를 세포질 분획과 핵분획으로 나누어 NF- $\kappa$ B 단백질의 발현량을 조사하였다. 세포질 분획의 경우, 대조군과 비교하여 LPS 처리군에서는 NF- $\kappa$ B 발현량이 감소하였고



**Fig. 3.** Effect of *Petalonia binghamiae* (PB) on the LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B (p65) and I $\kappa$ B. The cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 30 min in the absence and/or presence of PB (100 µg/mL). The cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts were prepared to determine translocation of NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B activity was measured by levels of phosphorylated I $\kappa$ B protein.

미역취 추출물 처리군에서는 LPS 처리군에 비해 NF- $\kappa$ B 발현량이 증가되는 양상을 보였다. 핵 분획의 경우, LPS의 처리는 핵으로의 translocation을 촉진하여 NF- $\kappa$ B의 발현량 증가를 유도한 반면, 미역취 추출물은 LPS 처리군에 비해 NF- $\kappa$ B 발현량이 감소되어 세포질 분획에서의 발현양상과 상반되는 결과를 나타내었다 (Fig. 3A). 이러한 결과는 미역취 추출물의 항신경염증 효능 조절이 LPS에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 translocation을 억제함으로써 이루어지고 있음을 보여주는 것이다. NF- $\kappa$ B의 핵으로의 전이는 I $\kappa$ B의 인산화를 통해 조절되므로 I $\kappa$ B의 인산화에 미치는 미역취 추출물의 효과를 확인한 결과 LPS에 의해 유의적으로 증가한 I $\kappa$ B의 인산화는 미역취 추출물에 의해 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 3B).

미역취 추출물의 신경염증 저해 작용이 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 통해 일어나는지를 검증하기 위해 NF- $\kappa$ B inhibitor인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 사용하



**Fig. 4.** Involvement of NF- $\kappa$ B signaling on LPS-stimulated NO production. The cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 24 h after treatment of PB (100 µg/mL) and/or PDTC (25 µM) for 30 min. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Means sharing the same superscript letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

여 NO 생성에 미치는 효과를 확인하였다. 미역취 추출물 처리군과 PDTC 처리군에서 분비되는 NO의 양은 LPS에 의해 증가된 NO의 분비량과 비교해 볼 때 거의 유사하게 감소하였으며 이들을 동시에 처리하였을 경우 NO 분비량이 현저히 감소하여 대조군과 유사한 NO 생성량을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 또한, 이들의 처리는 세포 생존율에는 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4B).

## 고 찰

염증은 유해물질이나 감염 등 외부자극에 대한 손상을 방어하려는 반응으로 대식세포가 분비하는 사이토카인이나 염증매개 물질에 의해 조절된다.<sup>25</sup> 뇌에서의 대식세포인 미세아교세포는 식세포작용을 통해 죽거나 손상 받은 세포를 제거함으로써 중추신경계를 보호하는 작용을 한다.<sup>1</sup> 감염이나 손상으로 인해 미세아교세포는 활성화되고

세포내 신호전달을 조절하여 NO, COX-2, IL-1, IL-6 등의 전염증 매개체를 분비하여 뇌경색과 같은 뇌손상을 보호한다.<sup>2</sup> 그러나 과도하게 활성화된 미세아교세포로 인한 염증매개인자의 비정상적인 분비는 지속적으로 신경염증을 유발하여 신경세포를 손상시킴으로써 오히려 퇴행성 신경질환을 일으킬 수 있다. 특히, 미세아교세포 활성화에 의해 과도하게 분비되는 NO의 경우 비정상적으로 작용하여 뇌혈관장벽 (blood-brain barrier) 파괴를 촉진하고 산화적 손상을 야기하기도 하여 뇌경색을 악화시키기도 한다.<sup>26,27</sup> 알츠하이머 질환이나 파킨슨 질환을 가진 환자에서 증가된 염증성 사이토카인들 (IL-1 $\beta$ , IL-6)이 발견되기도 하고 파킨슨 질환의 뇌에서 정상보다 높은 iNOS가 발현되기도 한다.<sup>28</sup> 또한, iNOS 발현을 억제하는 동물모델은 dopaminergic neuron의 사멸을 억제하여 신경염증을 완화시켜줌으로써 파킨슨질환의 조절이 가능함을 보여주었다.<sup>29</sup> 따라서 본 연구에서는 미세아교세포의 활성화에 의한 과도한 신경염증반응을 억제하여 신경 퇴행성 질환의 진행을 조절하는데 긍정적인 효과를 가지는 천연물 소재를 발굴하고자 예로부터 먹거리로 활용되는 갈조류의 하나인 미역취의 효능과 그 작용기전을 분석하였다. 미세아교세포의 활성화를 유도하는 것으로 알려진 LPS를 이용하여 BV2세포에서 과도한 신경염증을 유발하였고 미역취의 항신경염증 효능을 확인하기 위해 염증반응의 대표 지표물질인 NO의 생성량을 측정하였다. 정상적인 NO는 신경보호나 뇌발달에 있어서 매우 중요하다.<sup>30,31</sup> 선택적인 NOS inhibitor인 L-NAME의 처리는 NO가 중재하는 신경보호 효과를 저해하였고<sup>30</sup> NO가 중재한 단백질의 s-nitrosylation 과정은 신경세포의 분화 및 성숙을 유도하기도 한다.<sup>31</sup> 그러나 과도한 NO의 생성은 산화적 손상이나 blood-brain-barrier 붕괴와 같은 다양한 과정을 통해 뇌신경 질환에 연관되어 있다. Fig. 2에서 제시한 바와 같이 미역취 추출물은 LPS에 의한 과도한 NO 생성을 현저히 감소시켜 항신경염증 효능이 있음을 보여 주었고 이는 염증 매개 물질인 iNOS와 COX-2의 발현 저해를 통해 이루어짐을 확인하였다. 이러한 결과는 뽕나무에서 분리한 morin, 포도잎으로부터 분리한 quercetin, 녹차의 폴리페놀에서 나타나는 항신경염증 효능<sup>7-9</sup>과 비교하여 볼 때 유사한 효능을 나타내었다. 또한, 미역취에 의한 iNOS의 억제는 iNOS 발현이 억제된 동물모델에서 신경염 완화 효과<sup>29</sup>가 나타나는 이전의 보고와 마찬가지로 뛰어난 항신경염 활성을 가지는 미역취 추출물이 미세아교세포의 활성화를 억제하여 뇌신경질환을 제어할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

LPS에 의한 신경염증반응은 세포막에 존재하는 LPS 특

이 수용체인 TLR-4, MAPKs, NF- $\kappa$ B, AP-1 등의 신호전달 경로의 활성화에 의해 조절된다. p50과 p65라는 2개의 단백질 이량체 형태로 되어 있는 NF- $\kappa$ B는 이들의 활성을 억제시키는 단백질인 I $\kappa$ B와 결합하여 비활성형 상태로 세포질에 존재한다. 염증 반응이 일어나게 되면 I $\kappa$ B는 인산화 되면서 NF- $\kappa$ B와의 결합이 떨어져 분해되며 활성화된 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 핵 내부로 전이되어 염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2 등의 발현과 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인 발현을 유도하여 NO 생성을 조절한다.<sup>32-35</sup> 본 연구에서도 미역식의 신경염증 저해 작용이 I $\kappa$ B의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 전이를 억제시키는 NF- $\kappa$ B의 활성화 조절을 통해 이루어짐을 확인하였다 (Fig. 3과 4). NF- $\kappa$ B의 활성 조절은 알츠하이머 질환을 유발하는 신경염 진행과정에 중요한 역할을 수행한다.<sup>36</sup> 미역식에 의한 NF- $\kappa$ B 활성의 적절한 조절은 염증으로 촉발되는 신경 질환 제어에 효율적으로 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

미세아교세포의 지나친 활성화에 의한 신경염증 반응은 결국 신경세포 사멸을 유도하여 뇌손상과 같은 신경질환으로 이어지게 되므로 신경염증반응의 저해는 뇌손상의 예방과 치료에 있어서 매우 중요한 일이다. 본 연구결과에서 보여준 미역식 추출물의 항신경염 효과는 미역식이 미세아교세포의 활성을 억제하여 신경염증반응을 효율적으로 제어할 수 있는 활용 가능한 잠재적 후보로서의 가능성을 제시하였다. 그러나 향후 보다 더 정확한 검증을 위해 알츠하이머질환이나 파킨슨질환, 뇌경색 등의 신경질환 동물모델을 이용한 미역식 추출물의 효능 검증과 그 작용기전에 대한 추가 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

퇴행성 뇌신경 질환의 원인이 되는 것으로 알려진 미세아교세포의 과도한 활성화에 의한 신경염증반응에 미치는 미역식의 보호 효과를 알아보기 위해 LPS를 처리한 BV2 세포에서 미역식에서 얻은 에탄올 추출물을 이용하여 실험을 수행하였다. 미세아교세포의 활성화를 유도하는 LPS의 처리는 신경염증반응의 지표인 NO의 생성량과 이들을 조절하는 iNOS, COX-2의 발현을 증가시켰다. 미역식 추출물의 처리는 LPS가 유도하는 NO의 생성량을 농도 의존적으로 억제하였고 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하여 NO 생성량 저해와 유사한 양상의 결과를 나타내었다. 미역식 추출물의 신경염증반응 저해 효과가 NF- $\kappa$ B의 활성화 조절을 통해 일어나는지를 알아보기 위해 NF- $\kappa$ B

의 핵으로의 전이, I $\kappa$ B의 인산화, NF- $\kappa$ B 억제제인 PDTC를 이용한 NO의 생성량에 미치는 효과를 확인하였다. 미역식 추출물 처리에 의해 핵분획물에서의 NF- $\kappa$ B 발현은 현저히 감소하였고 I $\kappa$ B의 인산화를 억제하였으며 PDTC의 처리로 NO의 생성량은 감소하였다. 이상의 결과는 미세아교세포의 활성화로 인해 발생하는 신경염증반응에 미역식 추출물이 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통해 NO의 생성을 저해함으로써 항신경염증 효과가 있음을 보여주는 것으로 미역식 추출물이 신경염증 관련 뇌신경 질환의 제어하는데 있어서 치료효과를 가지는 소재로서 이용 가능성에 대한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## References

1. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmacological (Basel)* 2014; 7(12): 1028-1048.
2. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 2010; 87(5): 779-789.
3. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(2): 470S-474S.
4. Chung YC, Ko HW, Bok E, Park ES, Huh SH, Nam JH, Jin BK. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep* 2010; 43(4): 225-232.
5. González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 2014; 274(1-2): 1-13.
6. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2009; 108(6): 1343-1359.
7. Yoon CH, Kim DC, KO WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, Cho HK, Seo J, Kim SY, Oh H, Kim YC. Anti-neuroinflammatory effects of Quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Korean J Pharmacogn* 2014; 45(1): 17-22.
8. Dilshara MG, Jayasooriya RG, Lee S, Choi YH, Kim GY. Morin downregulates nitric oxide and prostaglandin E2 production in LPS-stimulated BV2 microglial cells by suppressing NF- $\kappa$ B activity and activating HO-1 induction. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 44: 62-68.
9. Park E, Chun HS. Green tea polyphenol Epigallocatechin gallate (EGCG) prevented LPS-induced BV-2 microglial cell activation. *J Life Sci* 2016; 26(6): 640-645.
10. Min JS, Lee DS. A screen for dual-protection molecules from a natural product library against neuronal cell death and microglial cell activation. *J Life Sci* 2015; 25(6): 656-662.
11. Galea E, Reis DJ, Fox ES, Xu H, Feinstein DL. CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *J Neuroimmunol* 1996; 64(1): 19-28.
12. Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-

- negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 2001; 15(1): 155-163.
13. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4(4): 399-418.
  14. Lee YP, Kang SY. A catalogue of the seaweeds in Korea. Jeju: Jeju National University Press; 2002.
  15. Noda H, Amano H, Arashima K, Hashimoto S, Nisizawa K. Studies on the antitumour activity of marine algae. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1989; 55(7): 1259-1264.
  16. Schwartzmann G, Brondani da Rocha A, Berlinck RG, Jimeno J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol* 2001; 2(4): 221-225.
  17. Shin DB, Han EH, Park SS. Cytoprotective effects of Phaeophyta extracts from the coast of Jeju island in HT-22 mouse neuronal cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2014; 43(2): 224-230.
  18. Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(7): 1065-1074.
  19. Ryu G, Park SH, Kim ES, Choi BW, Ryu SY, Lee BH. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. *Arch Pharm Res* 2003; 26(10): 796-799.
  20. Park JC, Choi JS, Song SH, Choi MR, Kim KY, Choi JW. Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Korean J Pharmacogn* 1997; 28(4): 239-246.
  21. Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo Y, Park HY. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2005; 48(4): 435-439.
  22. Kang SI, Kim MH, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Park JG, Ko HC, Lee NH, Chung WS, Kim SJ. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2010; 21(12): 1251-1257.
  23. Kang SI, Jin YJ, Ko HC, Choi SY, Hwang JH, Whang I, Kim MH, Shin HS, Jeong HB, Kim SJ. *Petalonia* improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(2): 265-269.
  24. Yoon HS, Koh WB, Oh YS, Kim IJ. The Anti-melanogenic effects of *Petalonia binghamiae* extracts in  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone-induced B16/F10 murine melanoma cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2009; 52(5): 564-567.
  25. Lee SG, Kim MM. Anti-inflammatory effect of scopoletin in RAW264.7 macrophages. *J Life Sci* 2015; 25(12): 1377-1383.
  26. Jiang Z, Li C, Arrick DM, Yang S, Baluna AE, Sun H. Role of nitric oxide synthases in early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. *PLoS One* 2014; 9(3): e93134.
  27. Wang JY, Lee CT, Wang JY. Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia. *Neuroscience* 2014; 281: 164-177.
  28. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202(1-2): 17-20.
  29. Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Chen Y. Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2012; 48(1): 225-233.
  30. Gulati P, Singh N. Pharmacological evidence for connection of nitric oxide-mediated pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *J Pharm Bioallied Sci* 2014; 6(4): 233-240.
  31. Okamoto S, Lipton SA. S-nitrosylation in neurogenesis and neuronal development. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(8): 1588-1593.
  32. Verstrepen L, Beyaert R. Receptor proximal kinases in NF- $\kappa$ B signaling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation. *Biochem Pharmacol* 2014; 92(4): 519-529.
  33. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 2007; 4(1): 31-41.
  34. Hatzieremia S, Gray AI, Ferro VA, Paul A, Plevin R. The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NFkappaB signalling pathways in monocytes/macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 149(2): 188-198.
  35. Gasparini C, Feldmann M. NF- $\kappa$ B as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des* 2012; 18(35): 5735-5745.
  36. Zhou W, Hu W. Anti-neuroinflammatory agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Future Med Chem* 2013; 5(13): 1559-1571.
  37. Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct* 2014; 5(8): 1653-1668.