

# 미세신경교세포 조절을 통한 제주조릿대 추출물의 신경세포 보호작용

이지형<sup>1\*</sup>, 박지연<sup>1</sup>, 최연희<sup>1</sup>, 김세재<sup>2</sup>, 박주민<sup>1</sup>, 정성철<sup>1</sup>, 은수용<sup>1</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 의학전문대학원 생리학교실, <sup>2</sup>제주대학교 생물학과

(Received October 14, 2014; Revised October 21, 2014; Accepted October 28, 2014)

## Abstract

### Neuroprotective effects of *Sasa quelpaertensis* leaf extract against microglia-mediated neurotoxicity

Ji Hyung Lee<sup>1\*</sup>, Jee-Yun Park<sup>1\*</sup>, Yan Ji Cui<sup>1</sup>, Se-Jae Kim<sup>2</sup>, Joo Min Park<sup>1</sup>  
Sung-Cherl Jung<sup>1</sup>, Su-Yong Eun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Jeju National University, Jeju, Korea

*Sasa quelpaertensis* leaf extract (SQE) has shown various biological effects in several tissues. However, the pharmacological effect of SQE has never been investigated yet in the central nervous system. Therefore, we investigated whether the hot water extract from *Sasa quelpaertensis* Nakai suppresses lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml)-induced microglial activation. The results demonstrated that SQE significantly reduced NO production in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. In addition, SQE showed free radical scavenging activity in DPPH assay. Taken together, these results suggest that SQE may have a therapeutic potential against neuroinflammation and neurodegeneration through suppression of excess microglial activation-mediated neuronal cell death. (*J Med Life Sci* 2014;11(2):121-125)

**Key Words** : Neuroinflammation, Microglial activation, Neuronal death, Reactive oxygen species, Nitric oxide, *Sasa quelpaertensis*

## 서론

뇌의 교세포 중 하나인 미세신경교세포 (microglia)는 뇌조직의 면역기능 및 신경세포 보호인자 생성, 신경섬유의 재생에 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 감염이나 물리적인 손상, 뇌조직 내에 베타 아밀로이드와 같은 신경 독성 물질의 축적, 또는 뇌허혈에 의한 신경세포 손상 및 사멸과 같은 병적 상황에서 과도하게 활성화된다. 과도하게 활성화한 미세신경교세포에서 방출한 염증유발인자와 활성산소들 (reactive oxygen species; ROS)은 뇌세포의 사멸과 퇴행을 유발시키는 신경 독작용을 가지고 있어 뇌세포 사멸과 뇌세포 보호라는 양면의 양 측면이 있다고 볼 수 있다. 이는 순기능 및 역기능을 동시에 가진 염증 반응의 양면성에 해당한다<sup>1)</sup>. 어느 방향으로 작용하는지의 결정은 해당 뇌 조직에서 미세신경활성화의 정도와 또 다른 신경교세포인 성상

교세포 (astrocytes)와 신경세포(neurons)의 분포 및 상호 작용에 따라 정교하게 조절이 되고 있다고 본다.

실제로 미세신경교세포의 과도한 활성화로 인한 신경염증은 퇴행성 뇌질환의 직접적인 병인은 아니지만 질병의 발병 초기나 진행과정에 작용하여 질병을 악화시키는 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있어 미세신경교세포의 활성화를 억제하는 기술은 뇌졸중 및 퇴행성뇌질환에서의 신경세포 사멸의 정도를 경감시키고 진행 속도를 늦출 수 있는 치료 전략에서 중요한 기능을 할 수 있는 것으로 보고 있다.

제주조릿대 (*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 벼과 대나무아과에 속하는 다년생 식물로 제주도 한라산에 넓게 분포하여 다량 자생하며 이는 다른 식물의 생태계를 파괴할 정도로 균락을 이룬다. 최근에 조릿대 잎에 p-coumaric acid 라는 화합물이 다량 존재하며 제주조릿대 추출물이나 p-coumaric acid는 항염<sup>2)</sup>, 및 항산화<sup>3)</sup> 작용이 강하며 동물실험에서 심근경색의 손상 크기를 줄이거나<sup>4)</sup> 또는 항비만<sup>5)</sup> 등의 효능이 우수한 것으로 보고되었다. 또한 세포배양 실험에서 근육세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 통하여 포도당과 지방 대사를 조절하였으며<sup>6)</sup> 또한 세포의 지방 축적 (adiposeness)를 억제하는 생리활성이 보

Correspondence to : Su-Yong Eun

Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, Aran 13gil 15, Jeju-si, Jeju Special Self-governing Province, Republic of Korea, 690-767

E-mail : syeon@jejunu.ac.kr

This research was supported by the 2014 scientific promotion program funded by Jeju National University.

고되었다<sup>7)</sup>.

이러한 배경 하에 본 연구에서는 제주조릿대 추출물이 활성화된 미세신경세포의 과도한 활성을 억제하여 신경독성에 의한 신경세포의 사멸로부터 신경세포 보호작용의 효능을 조사하고자 하며 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료제 개발의 표적으로서 가능성을 탐색하고자 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 미세신경교세포에서의 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 신경염증 모델<sup>8)</sup>에서 신경세포퇴행및사멸을 초래하는 것으로 알려진 염증매개인자인산화질소 (nitric oxide; NO)를 미세신경교세포 활성화의 지표로 하여 제주조릿대 열수추출물이 미세신경교세포의 과도한 활성화를 억제하는지를 조사하였다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

본 실험재료인 제주조릿대 열수추출물은 김세재 교수님으로부터 (제주대학교 자연과학대학 생물학과) 제공되었으며<sup>9)</sup>, PBS로 녹여 실험에 사용하였다. 별도로 공급처를 언급하지 않은 시약은 Sigma에서 구입하였다.

### 세포배양

BV-2 미세신경교세포주<sup>9)</sup>는 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco BRL)과 1% penicillin streptomycin (Gibco BRL)이 함유된 Dulecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, BV-2 미세신경교세포주는 매일 계대배양하였고, HT-22 신경세포주는 2일에 한번씩 계대배양하였다.

### Nitric oxide 측정

Nitric oxide (NO)는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 citrulline으로 변화되면서 생성되는 프리라디칼로서 세포 상층액에 방출된 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 간접적으로 측정함으로써 NO 양을 조사한다. 즉, sulfanilamide가 nitrite와 반응을 하게 되고, 여기에 다시 naphthyl ethylene diamine이 결합하게 되면서 색깔 변화가 일어나며 microplate reader (Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 농도 계산은 sodium nitrite를 표준 물질로 사용하여 구하였다.

### DPPH 프리라디칼 소거기능 측정

DCF-DA 측정법처럼 세포 안에서의 ROS 소거작용을 측정하는 방법과는 달리 시험관 수준에서 제주조릿대 추출물 자체의 프리라디칼 제거효과를 알아보기 위하여 DPPH (1,1-dephenyl-2-picrylhydrazyl) assay를 시행하였다. DPPH는 프리라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 프리라디칼이 소멸되고 색깔이 보라색으로부터 노란색으로 변하는데 항산화효과가 클수록 노란색의 강도가 더 증가하게 된다. 제주조릿대 추출물 10 μl와 DPPH (150 μM) 190 μl를 1 시간 반응시켜 DPPH의 색깔 변화를 유도하고 이를 microplate reader (Tecan,

Spectra fluor)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 프리라디칼 소거작용의 측정치(%)는 약물 처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도를 기준으로 아래의 계산식에 의해 구한다. 약물의 ROS 소거작용 (%) = [(약물처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도) - (약물 처치군의 흡광도)] / (약물처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도) x 100(%)

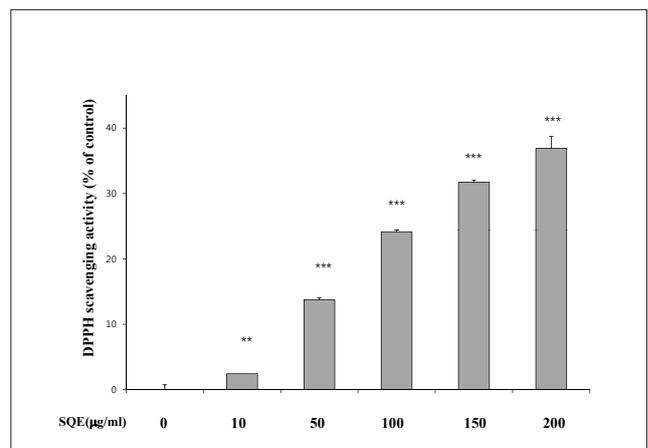
### 통계처리

실험결과는 SigmaPlot8.0 프로그램으로 분석했다. 통계 처리한 후 수치는 평균 ± 표준오차 (standard error)로 나타내었다. 두 집단 사이의 평균을 비교할 때는 Student's t-test를 실시하여 P 값을 비교했다. P<0.05인 경우를 통계적으로 유의 하다고 평가하였다.

## 결 과

### 제주조릿대의 프리라디칼 소거활성 효능 조사

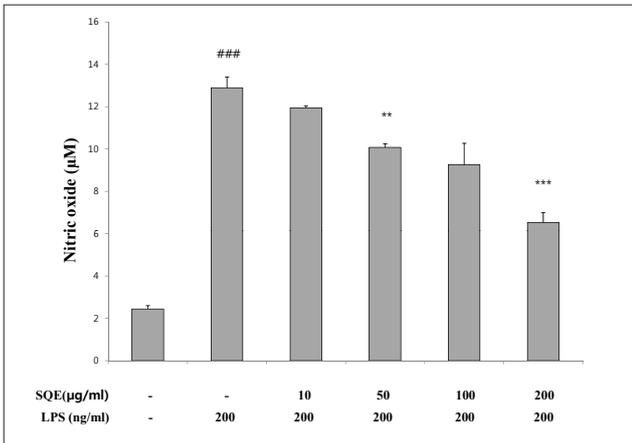
제주조릿대 추출물 자체의 프리라디칼에 대한 소거활성 효능을 조사하기 위하여 DPPH assay를 시행하였다. 실험 결과 제주조릿대 추출물은 농도의존적으로 프리라디칼을 소거하는 효능을 보여주었다. 10 μg/ml 농도에서 2.42 ± 0.24%, 50 μg/ml 농도에서 13.78 ± 0.31%, 100 μg/ml 농도에서 24.15 ± 0.31%, 150 μg/ml 농도에서 31.71 ± 1.82%, 200 μg/ml 농도에서 36.89 ± 1.82% 정도의 프리라디칼에 대한 소거활성을 나타내었다 (Fig. 1).



**Figure 1. 제주조릿대 추출물의 프리라디칼 소거 작용.** 제주조릿대의 프리라디칼 제거 기능을 알아보기 위하여 DPPH assay를 시행하였다. 다양한 농도 (10~200 μg/ml)의 제주조릿대 추출물 10 μl와 DPPH (150 μM) 190 μl를 1 시간 반응시켜 DPPH의 색깔 변화를 유도하고 이를 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 프리라디칼 소거작용의 측정치(%)는 약물 처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도를 기준으로 계산식에 의해 구한다 ('실험재료 및 방법' 참조). \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

### 미세신경교세포 신경염증모델에서의 NO의 생성에 대한 제주 조릿대 추출물의 억제 작용

제주조릿대 추출물이 미세신경교세포의 활성화와 그로 인한 신경 염증에서 중요한 지표인 NO 방출에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 BV-2 미세신경교세포를 24-well plate에 분주 배양 후 제주조릿대 추출물을 농도별 (10, 50, 100, 200 µg/ml)로 6시간 전처리 후 200 ng/ml 농도의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배지에 방출된 NO의 양을 측정된 결과 제주조릿대 추출물은 미세신경교세포에서 LPS에 의한 NO의 생성을 현저하게 억제하였다. SQE 200 µg/ml 처치는 NO의 생성을  $49.33 \pm 4.03\%$  정도 유의하게 감소하는 효과를 보여 주었다 (Fig. 2).



**Figure 2.** 미세신경교세포 신경염증모델에서 NO의 생성에 대한 제주조릿대 추출물의 억제 작용.

미세신경교세포를  $2 \times 10^6$  농도로 24-well plate에 분주하여 배양하였다. 12시간 안정화 시킨 후 제주조릿대 추출물을 농도별로 6시간 전처리 한 다음 200 ng/ml 농도의 LPS를 24시간 처리하여 반응시켜 NO를 측정하였다. ###,  $P < 0.001$ , (LPS를 처리하지 않은 대조군과 비교), \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (LPS를 처리한 대조군과 비교).

## 고찰

본 연구를 통하여 저자들은 제주조릿대 추출물이 미세신경세포의 과도한 활성화를 억제하고, 이를 통하여 미세신경교세포의 활성화에 의한 신경독성 (microglia-mediated neurotoxicity)에 대하여 신경세포 보호작용이 있음을 실험결과로서 제시하고자 하였다. 이를 위하여 미세신경교세포에서의 LPS에 의한 신경염증 모델에서 신경세포 퇴행 및 사멸을 초래하는 것으로 알려진 NO의 생성을 억제하는지 조사하였다 (Fig. 2). 이러한 연구는 천연물에서 추출한 화합물을 대상으로 하여 뇌질환의 예방 및 치료제 개발의 타겟으로서 가능성을 탐색하고자 하는 노력의 일환으로 이루어졌다.

미세신경교세포는 LPS<sup>6)</sup>, glutamate<sup>10)</sup>, thrombin<sup>11)</sup>, ganglioside<sup>12)</sup>,

betaamyloid<sup>13)</sup>와 같은 여러 가지 내인성, 외인성 자극물질에 의해 활성화된다고 알려져 있다. LPS에 의한 미세신경교세포의 활성화가 신경염증과 퇴행성뇌질환에서는 실제로 흔하고 보편적이지는 않지만 미세신경교세포를 분명하게 활성화시킬 수 있고 이미 많은 문헌정보를 참조할 수 있어서 가장 많이 사용되는 신경염증의 실험모델이다.

LPS에 자극되어 미세신경교세포 활성화하기 위해서는 Toll-like receptor 4 (TLR4)의 존재가 필수적이다. TLR4가 활성화 되었을 때 미세신경교세포에서는 신경염증의 신호전달계가 활성화한다. 즉, LPS가 LPS 결합단백질 (LPS binding protein; LBP)과 결합한 후 CD14, MD-2가 작용하여 TLR4의 활성화가 이루어진다<sup>14)</sup>. 따라서 LPS는 TLR4와 직접 결합하는 것은 아니고 LBP, CD14, MD-2의 작용을 거치지만 큰 맥락에서 TLR4의 외인성 리간드(ligand)라고 받아들여지고 있다. 그러나 최근에 TLR4의 내인성 리간드가 존재할 것이고 그것은 신경조직 손상과 관련된 물질로 추정하는 연구보고들이 제시되고 있다<sup>15,16)</sup>. 이와 관련하여 TLR4가 신경조직의 손상에 의한 통증질환인 신경병증성 통증 (neuropathic pain) 발생에 있어서 매우 주요한 역할을 하는 것으로 보고가 되고 있다<sup>15)</sup>. TLR4 뿐만 아니라 TLR2도 신경손상과 관련하여 신경병증성 통증에 비슷하게 기여하는 것으로 보고되고 있다<sup>17)</sup>.

신경손상시 신경세포에서 방출될 수 있는 glutamate, ATP, hyaluronan 등이 이러한 염증 수용체들의 내인성 리간드로서 제시되고 있다<sup>17)</sup>. 본 논문의 저자들은 이러한 물질들이 TLR4 혹은 TLR2의 내인성 리간드일 수 있다는 최근에 제시되는 가설에 관련하여 이러한 물질들의 수용체, 즉, 글루타메이트 수용체(glutamate receptor) 등이 활성화되었을 때 작동하는 후속 신호전달계와 TLR4/2가 활성화되었을 때 작동하는 후속 신호전달계 간의 상호작용 (cross-talk)이 주요할 것으로 보고 있다. 이러한 배경하에 볼 때, 본 논문에서 사용한 바와 같이 LPS로 미세신경교세포를 활성화시키는 실험모델은 단지 세균감염에 의한 신경염증 모델에 국한하는 것이 아니라 사고로 인한 뇌조직의 손상, 뇌허혈, 베타 아밀로이드와 같은 독성 물질의 축적에 의한 신경세포의 손상 등에 광범위하게 기여할 수 있는 실험모델이 될 수 있어서 그 임상적 의미가 확장적이라는 점이 고무적이다.

한편, LPS 자극 모델 혹은 TLR4 활성화 모델에 있어서 천연물을 포함한 다양한 항산화제는 이러한 신경염증 신호전달계를 조절할 수 있는 후보물질로 작용할 수 있다. 따라서 본 연구에서 제주조릿대 추출물이 직접적인 프리라디칼 소거 작용이 있는 것을 DPPH assay로 확인하였고 (Fig. 1) 산화질소인 NO 방출도 경감시키는 작용이 있음을 결과로서 제시하였다 (Fig. 2). Fig. 1에서 확인한 추출물의 항산화 작용은 미세신경교세포의 활성화의 증폭제에 해당할 수 있는 활성산소를 소거하여 활성산소 레벨을 낮춤으로서 미세신경교세포의 활성화를 억제한다고 볼 수 있다. 즉 항산화작용 자체가 항염 작용의 근간이 된다는 점을 주목할 필요가 있다.

LPS/TLR4 신호전달계에서 중요한 mitogen-activated

protein kinases (MAPKs)나 Akt, apoptosis-regulating signal kinase 1 (ASK1), nuclear factor kB (NF-kB) 등은 N-acetyl cysteine (NAC)으로 세포내 ROS를 소거하면 유의하게 억제되는 연구결과가 보고되어 왔다(18-22). 즉, 종합하여 볼 때, 이들 염증 유발 신호전달 단백질들이 ROS에 의해 증폭이 되는 것을 알 수 있고 따라서 미세신경교세포에서 주로 Nox2에 의해 발생하는 ROS는 TLR4/2로 매개되는 염증 신호전달계의 증폭제에 해당한다고 볼 수 있을 것이다.

따라서, 뇌의 신경염증 및 퇴행성뇌질환의 예방 및 치료제로서 항산화제는 다양한 원인에서 오는 신경세포의 산화적 손상을 방지할 수 있고, 동시에 미세신경교세포의 활성화, 즉 신경염증도 억제할 수 있다. 즉, 항산화제는 뇌조직에서 신경세포와 미세신경교세포에 이중으로 각각 작용하여 신경세포를 보호할 수 있는 것이다. 이러한 점에서 항산화제는 신경염증과 퇴행성뇌질환의 예방 및 치료제, 기능개선제의 후보로서 매우 우수하다고 볼 수 있다.

그러나 ROS 자체는 생리적인 상태에서는 그 자체가 이차전령처럼 작용하기 때문에 무조건 ROS를 소거한다면 부작용이 발생할 수 있을 것이다. 따라서 과도한 ROS의 경우를 조정하여 정상 수준의 ROS 평형상태를 유지하는 ROS의 항상성 (homeostasis)이 관건이라 본다.

노인 인구가 급속도로 증가하고 이에 따라 퇴행성 뇌질환 치료제에 대한 수요와 의료시장은 확장되어 가지만 아직까지 퇴행성 뇌질환에 대한 확실한 치료제는 개발되지 못한 실정이다. 이러한 현실을 감안할 때 신경세포의 손상 및 사멸을 유발시키고 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 발병 초기부터 진행과정에서 직접적으로 관여하는 신경염증 및 산화적 손상 반응을 제어할 수 있는 신약개발물질의 탐색은 매우 중요한 치료제 개발 전략이 될 수 있을 것이다.

제주조릿대 추출물에는 p-coumaric acid가 독보적으로 다량 존재하며 제주조릿대 추출물이 나타내는 생리활성의 많은 부분이 p-coumaric acid에서 오는 것으로 보인다. 제주조릿대의 신경세포 보호 기능과 관련하여 보다 구체적이고 전략적인 연구를 위해서는 p-coumaric acid를 포함한 단일 화합물의 연구가 정밀하게 이루어져야 할 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 2014년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의해 연구되었음.

### 참고문헌

- 1) Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001;21:2580-8.
- 2) Hwang JH, Choi SY, Ko HC, Jang MG, Jin YJ, Kang SI, Park JG, Chug WS, Kim SJ. Anti-inflammatory effect of the hot water extract from *Sasa quelpaertensis* leaves. *Food Sci Biotechnol* 2007;5:728-33.
- 3) Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:954-60.
- 4) Roy AJ, Stanely Maizen Prince P. Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food Chem Toxicol* 2013;60:348-54.
- 5) Kang SI, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Ko HC, Kim SJ. Anti-obesity properties of a *Sasa quelpaertensis* extract in high-fat diet-induced obese mice. *Biosci Biotechnol biochem* 2012;76:755-61.
- 6) Yoon SA, Kang SI, Shin HS, Kang SW, Kim JH, Ko HC, Kim SJ. P-coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432:553-7.
- 7) Kang SW, Kang SI, Shin HS, Yoon SA, Kim JH, Ko HC, Kim SJ. *Sasa quelpaertensis* Nakai extract and its constituent p-coumaric acid inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells through activation of the AMPK pathway. *Food Chem Toxicol* 2013;59:380-5.
- 8) Ock J, Han HS, Hong SH, Lee SY, Han YM, Kwon BM, Suk K. Obovatol attenuates microglia-mediated neuroinflammation by modulating redox regulation. *Br J Pharmacol* 2010;159:1646-62.
- 9) Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 1990;27:229-37.
- 10) Eun SY, Hong YH, Kim EH, Jeon H, Suh YH, Lee JE, JoC, JoSA, Kim J. Glutamate receptor-mediated regulation of c-fos expression in cultured microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:320-7.
- 11) Choi SH, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 2003;5877-86.
- 12) Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 2004; 48: 197-206.
- 13) Coombs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNKalpha-dependent expression of inducible nitric

- oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001;21:1179–88.
- 14) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145–51.
  - 15) Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;102:5856–61.
  - 16) Cao CX, Yang QW, Lv FL, Cui J, Fu HB, Wanf JZ. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:509–14.
  - 17) Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, Choi SY, Park K, Kim JS, Akira S, Na HS, Oh SB, Lee SJ. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem* 2007;282:14975–83.
  - 18) Oh YT, Lee JY, Lee J, Kim H, Yoon KS, Choe W, Kang I. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF-kappaB signaling pathways. *Neurosci Lett* 2009;464:93–7.
  - 19) Sun HN, Kim SU, Lee MS, Kim SK, Kim JM, Yim M, Yu DY, Lee DS. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways is required for lipopolysaccharide-induced microglial phagocytosis. *Bio Pharm Bull* 2008;31:1711–5.
  - 20) Zhang L, Wu C, Zhao S, Yuan D, Lian G, Wang X. Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol* 2010;10:331–8.
  - 21) Tsai HH, Lee WR, Wang PH, Cheng KT, Chen YC, Shen SC. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF-B and AP-1 activation in macrophages. *J Dermatol Sci* 2012;69(2):122–31.
  - 22) Zhang H, Wang ZW, Wu HB, Li Z, Li LC, Hu XP, Ren ZL, Li BJ, Hu ZP. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF-B pathways. *Mol Cell Biochem* 2013;375:11–21.