

遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究

원광대학교 한의과대학 신경정신과 교실

황시영 · 강형원 · 류영수

I. 緒 論

腦에 관한 記錄은 《素問·五臟別論篇》²⁴⁾에 “或而腦髓爲臟 或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府”라고 하여 6개의 奇恒之府 중의 하나로 보았으며, 또한 內經에서는 “腎生骨髓”²⁴⁾, “腦爲髓之海”²⁵⁾라 하여 腦를 腎의 生理作用의 發現 場所로 認識하였다^{8,19,37,67)}. 後世에 이르러 腦의 機能에 대한 認識이 進一步하여 李³⁶⁾는 “腦爲元神之府”라 하여 腦가 神을 總括하는 主體의인 器官임을 처음으로 主唱한 이래^{19,63)}, 王⁶⁴⁾은 “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 腦의 記憶作用을 말하였으니 오늘날 西洋醫學의인 腦와 類似한 概念으로 認識하였다^{19,27)}.

腦의 病理에 對해서는 《靈樞·海論篇》²⁵⁾에 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩暈……”라고 하여 腦髓의 充足與否에 따라 精神 및 人體의 五臟六腑와 四肢百骸 그리고 五官九竅 活動의 盛衰도 關係됨을 말하였으며^{19,27,63)}, 腦의 이런 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 臨床症狀이^{30,54,62)} 나타나고 그 主要原因에 對해서는 肝腎虛弱과 痰瘀라고 하였다^{4,69)}.

西洋醫學에서 腦의 認識은 人間이 가진 高度의 感覺 및 知覺, 運動과 技術, 思考力, 想像力, 言語能力 등을 主管하는 것으로 알려져 있다^{3,51)}. 한편 腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變成과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로서 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾

患과 不可分의 關係를 가지고 있다^{10,17,31,46)}. 이 밖에도 流行性 腦炎과 같은 腦의 炎症性 病變 등도 腦의 退行性 變化로 因한 痴呆의 原因 疾患으로 認識되고 있다^{33,50)}.

遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 乾燥한 것으로서⁴³⁾, 그 歸經^{22,23)}은 心·腎이고 性味는 苦辛·溫 등^{9,22,23,35,43,57,66,73)}으로 分類되어 있으며, 藥效에 對해서는 神農本草經 上品⁶⁶⁾에 “……補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”로 記載된 以後로 寧心安神, 祛痰利竅劑로 使用되어 오고 있다⁴³⁾.

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는, 李³⁴⁾는 麝香이 損傷된 생쥐 腦組織에 對한 保護作用을, 崔⁵⁰⁾는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果를, 우²⁵⁾는 調胃升清湯을 白鼠에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 效果가 있음을 報告하였다. 그러나 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質을 利用한 具體的인 實驗報告는 아직 未洽한 實情이다¹⁾.

神經傳達物質 및 神經由來의 炎症媒介物質로서 잘 알려져 있는 substance P (SP)는^{89,90)} 炎症性 細胞活性物質인 腫瘍괴사인자 알파 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1 (Interleukin -1, IL-1)^{88,91)}, 및 인터루킨-6 (Interleukin-6, IL-6)⁹¹⁾의 生成을 刺戟하고 中樞神經系의 損傷에 의한 SP 수용체 數의 增加에 影響을 미친다⁹⁴⁾.

따라서 本 研究에서는 腦 星狀細胞를 利用하여 SP와 LPS에 의해 誘導되는 TNF- α 의 分泌量의 調節을 檢討하였다. 이어서 腦 星狀細胞에 SP와 LPS를 同時에 刺戟할 때 遠志 수침액의 첨가에 의한 炎症性 細胞活性物質인 TNF- α 및 IL-1의 抑制 效果 및 그 기전 규명을 위한

實驗을 修行하여 臨床의 重要性을 暗示하는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗材料

(1) 試藥 : SP, LPS, penicillin/streptomycin, LiCl, Urea 는 Sigma Chemical Co. (Chicago, IL)에서 구입하였다. Mouse rTNF- α , polyclonal anti-mouse IL-1 α 및 antimouse TNF- α 는 Genzyme (Cambridge, MA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 우태아혈청, agarose, phenol, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, RNase inhibitor, Taq polymerase 는 Life Technologies (Grand Island, NY)에서 구입하였다.

(2) 實驗動物 : 一次 神經膠細胞 (primary glial cell) 培養을 위한 實驗動物은 6~8주령의 Balb/c계 妊娠한 생쥐를 대한실험동물센터(음성, 충북)에서 구입한 다음 출산된 지 2~3일이 經過된 생쥐를 使用하였다.

(3) 遠志 수침액의 調製 : 本 實驗에 使用한 遠志(Polygonatum tenuifolium)는 圓光大學校 韓醫科大學 附屬 益山韓方病院에서 75g을 구입한 後 精選하여 藥湯器에 適量의 蒸溜水(200cc)를 넣고 약 3시간 달여서 調製하였다. 調製한 수침액은 濾過하여(약10g) 冷凍乾燥한 다음 4°C에 保管하여 實驗時 적당량의 증류수에 희석한 다음 멸균 처리 (autoclave 121°C, 15분)하여 使用하였다.

2. 實驗方法

(1) 생쥐 腦의 星狀細胞 培養 : 一次 腦의 神經膠細胞 培養은 Fontana 등⁸¹⁾의 方法에 따랐다. 즉 生後 2~3일째 되는 새끼 생쥐의 腦膜을 除去한 後 腦를 摘出하여 파이펫으로 攪拌하며 잘게 부수어 分離하였다. 分離하여 얻은 細胞는 20% 우태아혈청을 包含하는 DMEM 培養液에 浮游시켜 直徑 100 mm의 細胞培養用 petri-dish에 分住하

여 3일마다 새로운 培養液을 첨가해 주면서 3주 동안 37°C, 5% CO₂ 條件의 培養基에서 培養하였다. 培養 10일째에, 培養 dish에 부착된 神經膠細胞는 0.25% Trypsin-0.05% EDTA를 처리하였다. 상정액을 除去한 後 組織 培養 plate에 한 well당 4 × 10⁷ cell을 分住하여 CO₂ 培養器에서 3일 동안 培養하였다. 以上の 條件으로 分離한 細胞는 95%以上이 星狀細胞로 構成되어 있다.

(2) 腦 小膠細胞의 培養 : 培養 神經膠細胞로부터 小膠細胞를 分離하기 위하여 培養 플라스크를 회전 교반기에서 800 rpm으로 1시간 동안 혼든 다음, 새로운 플라스크에서 15분 동안 培養하였다. 플라스크에 부착된 細胞만을 회수하여 10% 우태아혈청을 함유한 DMEM에 재현탁하여 實驗에 使用하였다.

(3) SP 製造 : SP 溶液에 LPS 汚染이 되지 않도록 特別한 注意를 하면서 다음과 같이 製造하였다. 펩타이드 SP를 0.01% acetic acid에 溶解하였다. Acetic acid는 glacial acetic acid를 1/10,000로 稀釋한 다음 0.2- μ m filter로 濾過하였다. SP 貯藏溶液 (1 mM)은 -20°C에 保管하여 使用 直前に 內毒素가 없는 蒸溜水에 稀釋하여 使用하였다.

(4) TNF- α 測定 : 星狀細胞 培養液에 LPS (1 μ g/ml), SP (1 μ M) 또는 遠志 수침액을 處理하여 實驗하였는데 培養液內 生成된 TNF- α 의 測定은 Scuderi 등⁹⁷⁾이 記述한 方法에 準하여 약간 變形된 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 實施하였다. 즉 anti-murine TNF- α capture mAb 는 flat-bottomed 96-well plate (Corning, Rochester, NY)에 coating buffer (0.02% sodium azide를 함유한 PBS, pH = 7.2)를 利用하여 각 well당 最終濃度 6.25 ng으로 처리한 後 4°C에서 12시간 동안 코팅하였다. 코팅 後, 비특이적 결합부위를 막기 위하여 2% BSA를 함유한 PBS로 구성된 blocking buffer를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 blocking하였다. 다시 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 조성된 washing buffer로 4회 세척 後 recombinant mouse TNF- α 표준액과 각 sample의 培養상정액을 각 well에 100 μ l씩 가하여 37°C에서 2시간 동안 培養하였다. 다시 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척 後 rabbit anti-murine

TNF- α 를 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 7.8 ng/ml 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37°C에서 2시간 동안培養하였다. 다시 washing buffer로 7회 세척 후 phosphatase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Sigma Co.)를 100 ng/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C에서 2시간培養한 후 7회 세척하였다. 마지막 세척 후 0.05 M NaHCO₃와 0.05 mM MgCl₂로 조성된 buffer에 용해시킨 p-nitro phenyl phosphate (PNPP) 발색제를 100 μ 씩 각 well에 가하여 10분간 발색을 誘導한 다음 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 TNF- α 의 양을 측정하였다.

(5) IL-1 測定 : 생물학적으로 활성있는 IL-1의 양은 TNF- α 測定法과 같은 方法으로 測定하였다.

(6) RNA 分離 : RT-PCR을 위한 total RNA는 LiCl-urea 법으로 분리하였다⁸⁶⁾.

(7) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) : RT-PCR 방법으로 TNF- α mRNA 전사물을 검출하기 위하여 TNF- α cDNA¹⁰²⁾의 암호영역에 대한 sense 및 antisense oligonucleotide primer (5'-CCA-CGT-CGT-AGC-AAA-CCA-CCA-AG-3' 및 5'-CAG-GTA-CAT-GGG-CTC-ATA-CC-3')를 제작하여 PCR기계를 이용하여 316-bp 크기의 절편을 증폭하였다.

(8) HPLC 分析 : Chromatographic system 은 펌프 (Waters Assoc. 600 HPLC), UV 검출기 (Waters Assoc. 486 tunable absorbance detector), 자동검체주입기 (Waters Assoc. 717 plus autosampler), 자료분석기 (Waters Assoc. 746 data modulator) 및 nucleosil C18 AB column (4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel)을 사용하였다. 이동상은 methanol-0.005 M sodium octane sulfonate (50 : 50 v/v, flow-rate : 1.0ml/min)로 하였다.

3. 統計學的 分析

모든 자료는 means \pm S.E.로 나타내었으며, 통계학적

분석은 student's t-test로 행하였다. 유의수준은 P < 0.05로 하였다.

III. 實驗成績

1. 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 分泌에 對한 LPS와 SP의 上昇 效果

저자는 맨 먼저 腦 神經膠細胞로부터 분리한 腦 星狀細胞의 TNF- α 의 분비 조건을 확립하였다(Table I). 腦 星狀細胞에 SP 단독 처리에 의해서는 星狀細胞로부터 TNF- α 의 분비에 큰 影響을 미치지 못하였다. LPS 단독 처리시에는 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 의 분비를 약간 刺戟했지만 유의성이 없었고, LPS와 SP를 同時に 처리했을 때 LPS 단독 처리시 보다 현저하게 TNF- α 의 분비량이 增加하였다 (P < 0.05). Table I에 나타난 바와 같이 腦 小膠細胞도 神經膠細胞이지만 LPS를 처리하였을 경우에 약간의 TNF- α 의 분비만을 刺戟했으며, LPS와 SP를 同時に 가하여 培養했을 때에도 TNF- α 의 분비량은 현저하게 增加하지 않았다. 따라서 本 研究에서는 腦 星狀細胞만을 분리하여 遠志 수침액에 의한 TNF- α 의 분비에 미치는 影響을 研究하였다(Table I).

Table I. Effect of LPS and/or SP on TNF- α secretion by mouse astrocytes or microglia

Treatment		TNF- α secretion (ng/ml)	
LPS	SP	astrocytes	microglia
-	-	0.42 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02
+	-	1.780 \pm 0.03	0.93 \pm 0.07
-	+	0.95 \pm 0.03	0.36 \pm 0.09
+	+	5.18 \pm 0.41*	0.83 \pm 0.12

Astrocytes and microglia fraction (4 \times 10⁵ cells/well) were isolated as described in Materials and methods. The fractions were incubated for 18 h in medium alone or in medium containing LPS (1 μ g/ml)

and/or SP (1 μ M). The supernatants were collected and frozen at -80°C until assayed for TNF- α bioactivity. Each datum value indicates the mean \pm S.E. of three separated experiments. *: statistically significant differences from the control values (medium alone values) at $P < 0.05$.

2. 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP에 의하여 誘導되는 TNF- α 에 對한 遠志 수침액의 抑制 效果

腦 星狀細胞로부터 TNF- α 의 分泌에 있어서 遠志 수침액의 效果를 관찰하기 위해서 腦 星狀細胞에 LPS, SP 및 다양한 농도의 藥물을 부가하여 18 시간 동안 培養한 다음 TNF- α 의 分泌量을 측정하였다(Fig. 1). Fig. 1에 나타낸 바와 같이 遠志 수침액은 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP에 의해 誘導되는 TNF- α 의 分泌를 용량의존적으로 감소시켰는데, 遠志 수침액의 抑制 效果는 10^0 - 10^3 μ g/ml 농도에서 현저하였다 ($P < 0.05$).

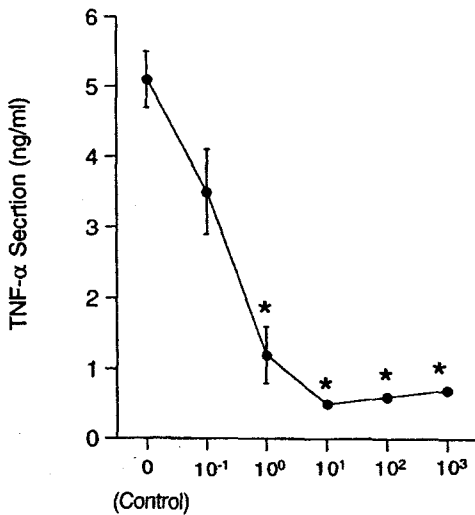


Fig. 1. Effect of PTAE on LPS and SP induced TNF- α secretion in astrocytes.

The cells (4×10^5 cells/well) were incubated for 18 h in medium containing LPS (1 μ g/ml) plus SP (1 μ M)

with various concentrations of PTAE and the supernatants were collected and frozen at -80°C until assayed for TNF- α bioactivity. Each datum value indicates the mean \pm S.E. of five separated experiments. *: statistically significant differences from the control values at $P < 0.05$.

3. 腦 星狀細胞로부터 IL-1分泌에 대한 LPS와 SP의 上昇 效果

Bethea 등은 中樞神經系에서 IL-1에 의한 TNF- α mRNA의 誘導 및 分泌調節能力을 報告하였다.⁷⁶⁾ 저자는 腦 星狀細胞에 LPS 및 SP를 첨가하여 培養한 상정액에서 또 하나의 炎症性 細胞活性物質로 알려진 IL-1의 分泌量을 測定하였다. Table II에 보인 것처럼, SP는 LPS로 刺戟한 星狀細胞로부터 IL-1의 分泌를 上昇적으로 增加시켰는데, 이러한 結果는 Luber-Narod 등의 報告와 일치하고 있다.⁹²⁾

Table II. Effect of LPS and/or SP on IL-1 secretion by astrocytes

Treatment		IL-1 secretion (ng/ml)
LPS	SP	
-	-	0.16 \pm 0.02
+	-	0.47 \pm 0.02
-	+	0.16 \pm 0.01
+	+	5.12 \pm 0.21*

The cells (4×10^5 cells/well) were incubated for 18h in medium alone or in medium containing LPS (1 μ g/ml) and/or SP (1 μ M). The supernatants were collected and frozen at -80°C until assayed for TNF- α bioactivity. Each datum value indicates the mean \pm S.E. of three separated experiments. *: statistically significant differences from the control values (medium alone values) at $P < 0.05$.

4. 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP에 의하여 誘導되는 IL-1에 對한 遠志 수침액의 抑制 效果

다음은 직접적으로 遠志 수침액이 腦 星狀細胞로부터 IL-1의 分泌에 미치는 影響을 실험하기 위해 LPS와 SP 및 약물을 다양한 농도로 처리한 다음에 IL-1의 양을 측정하였다. 遠志 수침액(10^{-1} - 10^3 $\mu\text{g/ml}$)은 腦 星狀細胞로부터 용량존적으로 IL-1의 分泌를 抑制하였는데(Fig. 2), 이러한 遠志 수침액의 抑制 效果는 10^0 - 10^3 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 顯著하였다 ($P < 0.05$).

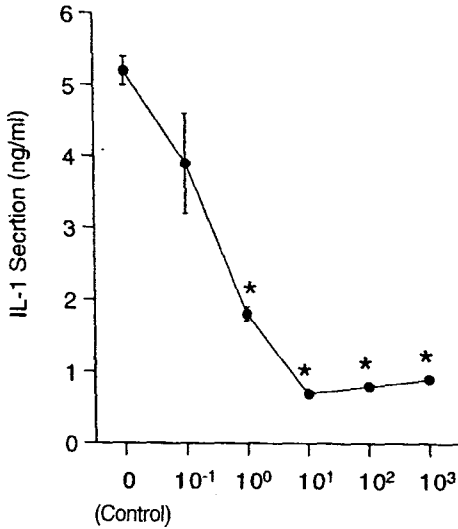


Fig. 2. Effect of PTAE on LPS and SP induced IL-1 secretion in astrocytes.

The cells (4×10^5 cells/well) were incubated for 18h in medium containing LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) plus SP (1 μM) with various concentrations of PTAE and the supernatants were collected and frozen at -80°C until assayed for IL-1 bioactivity. Each datum value indicates the mean \pm S.E. of five separated experiments. *: statistically significant differences from the control values at $P < 0.05$.

5. 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 의 分泌에 對한 IL-1 抗體의 抑制 效果

腦 星狀細胞로부터 遠志 수침액에 對한 TNF- α 의 分泌 抑制 效果가 IL-1 매개성 경로인가를 分析하기 위하여, 腦 星狀細胞에서 IL-1 β 항체의 效果를 실험하였다. 腦 星狀細胞 培養액에 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)와 SP (1 μM)를 처리한 다음 IL-1 β 항체를 첨가하여 18시간 후에 TNF- α 分泌量을 測定하였다(Fig. 3). Fig. 3에 나타낸 바와 같이 IL-1 β 항체를 처리한 군은 농도 의존적으로 TNF- α 分泌量이 減少하였는데, IL-1 β 항체의 抑制 效果는 10^0 - 10^2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 顯著하였다 ($P < 0.05$).

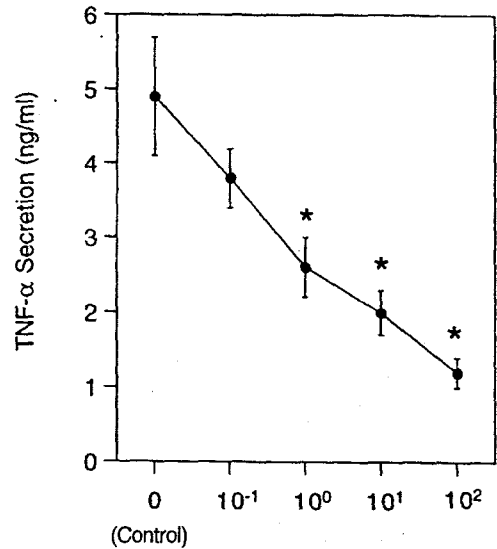


Fig. 3. Effect of IL-1 antibody on LPS and SP induced TNF- α secretion in astrocytes.

The cells (4×10^5 cells/well) were incubated for 18h in medium containing LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) plus SP (1 μM) with various concentrations of IL-1 antibody. The supernatants were collected and frozen at -80°C until assayed for TNF- α bioactivity. Each data value indicates the mean \pm S.E.

of three separated experiments. *: statistically significant differences from the control values at $P < 0.05$.

6. 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP에 의하여 誘導되는 TNF- α 유전자 발현에 對한 遠志 수침액의 抑制 效果

遠志 수침액이 腦 星狀細胞에서 TNF- α 의 分泌를 抑制하기 때문에 동일한 조건에서 TNF- α 유전자의 발현에 미치는 影響을 실험하였다. TNF- α 유전자의 발현량이 미약하여서 腦 星狀細胞를 다양한 조건으로 刺戟한 다음 각각의 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 腦 星狀細胞를 刺戟하지 않았을 때는 TNF- α 를 암호화하고 있는 mRNA가 검출되지 않았으나, LPS 및 SP로 刺戟했을 때 TNF- α mRNA의 발현량이 增加한 다음, 遠志 수침액의 처리에 의해 시간 의존적으로 그 발현량이 감소하였다(Fig. 4). 또한 G3PDH primer를 이용한 RT-PCR에서는 거의 동일한 크기의 밴드 양상을 보였다.

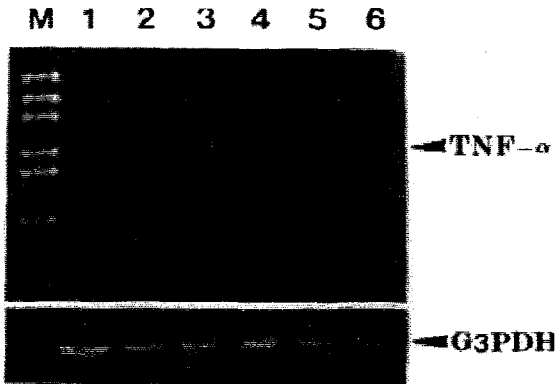


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNA for TNF- α and G3PDH in astrocytes.

The cells were incubated without (resting) or with (stimulated) SP plus LPS or with PTAE. Lanes; M, Marker; 1, LPS only; 2, LPS plus SP 1 h after; 3, LPS plus SP 6 h after; 4, LPS plus SP with PTAE 6 h after; 5, LPS plus SP with PTAE 12 h after; 6, LPS

plus SP with PTAE 24 h after. In all experiments the level of expression of mRNA for the house keeping gene (G3PDH) was not influenced by activation of the cells with stimulators.

7. 遠志 수침액의 기본적인 成分 特性

本 研究를 계속적으로 진행하는데 도움이 되고자 HPLC를 이용하여 本 研究에 사용한 遠志 수침액의 기본적인 成分을 표준화 하였는데, Fig. 5는 遠志 수침액의 크로마토그램이다.

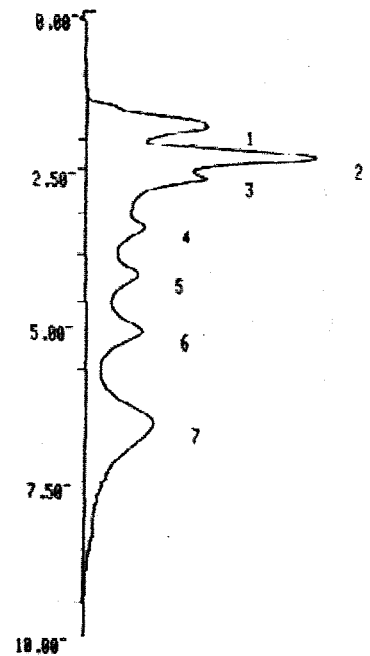


Fig. 5. HPLC chromatogram of the PTAE.

Standard solution of PTAE was prepared by dissolving in distilled water (1 mg/ml). The injection volume was 10 μ l and the detection was made at 254 nm with the detector range of 0.50 AUFS.

IV. 考 察

韓醫學에서 腦에 대한 認識은 內經에서 奇恒之府²⁴⁾ 또는 髓之海²⁵⁾라 하여 獨立된 器官이 아닌 臟腑의 機能이 발현되는 被動的인 器官으로 照明되어 왔다¹⁹⁾. 그러나 以後 시대적인 變遷過程을 걸치면서 精神·意識·思惟活動과 腦와의 關係에 對한 研究가 深化되면서 腦가 神을 總括하는 主體的인 器官으로도 理解되는 趨勢이다¹⁹⁾.

腦의 生理機能에 關하여 《靈樞·經脈篇》²⁵⁾에 “人始生, 先成精, 精成而腦髓生”이라 하여 腦髓의 生成이 先天之精에 根源을 두고 있음을 말하였고, 韓醫學에서 腎은 先天之本으로 精을 藏하고 主骨生髓하므로 결국 腦는 腎精의 부단한 生化에 依存하여 成長·發育·老化한다는 것을 알 수 있다^{27,53,67)}. 또한 《靈樞·五癯津液別論》²⁵⁾에 “五穀之津液 和合爲膏者, 內滲之于骨空, 補益腦髓……”라 하여 腎의 先天之精 뿐만 아니라 水穀精微의 後天之精도 腦髓의 盛衰에 重要하게 作用하고 있음을 말하였다^{63,67)}.

한편 腦의 精神機能에 對해서는 《素問·脈要精微論》²⁴⁾에 “頭者 精明之府”라 하였는데 즉 精明이란 神明을 意味하며 頭는 腦의 外廓을 말하고 腦는 頭의 中心處로 神명을 藏하기 때문에 “精明之府”라 하였다^{27,59,71)}. 아울러 後世에 腦에 對한 認識이 進一步하여 明代 李時珍³⁶⁾은 “……腦爲元神之府 而鼻爲命門之竅”라 하여 腦가 神을 總括하는 主體的인 器官임을 처음으로 主唱하였고^{19,63)}, 清代 王清任⁶⁴⁾은 “人之記性 皆屬腦中”, “小兒無記性者 腦髓未滿 高年無記性者 腦髓漸空”이라 하여 사람의 精神·思惟活動과 腦의 記憶과의 關係가 關連이 있음을 말하여 오늘날 西洋醫學의인 腦와 類似한 認識을 하였다^{19,27)}. 이와같은 意味는 腦를 精髓의 集合處로 보아 腎에 歸屬시켰으며 記憶作用을 腎 또는 腎에서 藏하는 精에 歸屬시키는 韓醫學에서 腦의 理論과 記憶 등 精神活動의 中樞로 認識하고 있는 西醫學의인 腦의 理論 사이의 間隔을 說明하고 있는 것이다⁸⁾.

그러므로 腦는 全身을 統管하고 人體의 五臟六腑와 四肢百骸 및 五官九竅^{19,63)}의 機能活動과 生理·病理變化를 主宰하므로 腦의 機能의 正常與否가 整體生命活動의 進行과 關係가 깊다. 따라서 腦의 病變은 위와 같은 生理機能

의 障礙나 失調로 나타나는데 이는 腦髓가 腎精으로부터 化生한 것에 依存하므로 나이가 많아지면 腎精의 虧虛로 髓海不足을 惹起하여 腦髓가 漸次로 空虛해져 腦의 機能이 失調되거나 減退되어 神識衰弱, 智力減退, 視·聽 및 言語應答遲鈍, 肢體活動不便 或 痿弱不用 등의 病理表現이 나타난다^{10,12,27)}. 즉 《素問·脈要精微論》²⁴⁾에서 “頭傾視深 精神將奪”이라 하고, 《靈樞·海論篇》²⁵⁾에서 “髓海有餘 輕徑多力 自過其度 髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懶怠安臥”라고 하여 腦髓의 充足與否에 따라 精神 및 身體의 生理活動의 盛衰도 關係됨을 말하였으며^{19,27)}, 腦의 이런 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘 등의 症狀^{30,54,62)} 나타나고甚하면 知能低下, 痴呆 등을 發한다고 하였으며^{30,62,67)}, 그 主要原因에 對해서는 肝腎虛弱과 痰瘀라고 하였다^{4,12,69)}.

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는 健忘⁴⁹⁾, 記憶障礙²⁸⁾, 痴呆^{4,18,33,44,52)} 등을 中心으로 활발히 進行되고 있다. 이 가운데 최근 社會問題로 대두되고 있는 痴呆에 對한 臨床研究로는, 鄭 등⁴⁴⁾이 痰瘀同治로 善忘, 痴呆 등의 腦萎縮에 有效한 效果를 보았다고 하였고, 徐⁵⁸⁾는 補腎活血化痰法으로 老年性 痴呆 患者의 記憶力과 認知機能을 改善했다고 하였으며, 襄¹⁶⁾는 體質醫學의인 研究를 통해 老年性 痴呆 환자 중 少陽人이 四象體質 中에 최고의 有病率을 보인다고 發表한 바 있고, 최근 黃 등⁵²⁾이 痴呆에 對한 體質醫學의 治療로 우수한 治療效果를 보았다고 하였다. 또한 이를 뒤받침하는 實驗報告^{1,17,21,26,50)}들이 있지만 아직 未洽한 實情이다.

大腦皮質을 侵犯하는 代表的인 退行性 疾患은 알츠하이머병과 피크병이고, 이들은 包括적으로 痴呆라고 부른다. 痴呆는 意識이 淸明한 狀態에서 全般的인 認知機能의 障礙를 나타내는 疾患으로 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되며 記憶, 思考, 指南力, 理解, 計算, 學習, 言語, 判斷 등 多數의 高位大腦機能에 障礙가 나타나는 症候群이다¹⁵⁾. 痴呆는 여러 原因에 의해 發病할 수 있는데 痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 萎縮性 變化, 腦血管障礙, 梅毒이나 流行性 腦炎과 같은 腦의 炎症性障礙, korsakoff 症候群과 같은 代謝性 內分泌疾患, 腫瘍, 外傷, 中毒 등이며 이중 腦萎縮性變化에 의한 老年性 痴呆와 腦

血管性 痴呆가 많은 比率을 차지하고 있다.⁴²⁾

韓醫學에서 痴呆라는 病名은 張景岳의 《景岳全書》雜病謨⁴¹⁾에서 처음 言及된 이후, 呆病^{42,47,48)}, 癡狂^{39,53)}, 健忘^{2,38,39)}, 虛勞²⁰⁾ 등의 範疇에서 다루어졌으며⁵⁾ 主要原因으로는 鄭 등⁴⁴⁾이 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등⁵⁴⁾은 年老氣衰, 久病, 或은 內風卒中, 外傷頭腦, 或은 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀을 發한다고 하였다. 陳⁴⁷⁾은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 최근 張⁶⁸⁾도 呆從痰治으로 治痰하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였다. 이와 같이 人間의 老化와 腦의 退行性 病變과 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 臟腑의 肝腎不足이 重要하게 作用하고 痰의 生成이 腦에 滯留됨으로 인해 各種 症狀이 나타나는 것임을 알 수 있다⁴⁾.

遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 乾燥한 것으로서⁴³⁾ 그 歸經^{22,23)}은 心·腎이고 性味는 苦辛 溫 등^{9,22,23,35,43,57,66,73)}으로 分類되어 있고, 藥效에 대해서는 神農本草經 上品에 “……補不足, 益智慧, 耳目聰明, 不忘, 強志倍力……”⁶⁶⁾로 記載된 以後로 寧心安神, 祛痰利竅⁴³⁾로 使用되어 오고 있다. 遠志를 利用한 實驗 및 文獻報告는 朴¹³⁾은 遠志 Saponin이 利尿效果和 中樞抑制 效果가 있다고 하였으며, 李⁴⁰⁾는 遠志의 安神作用에 對한 藥理解析 研究에서 祛痰說이 가장 可能한 說明으로 認定될 수 있다고 하였다. 그러나 腦炎을 비롯한 腦의 退行性 病變에 대한 實驗의 報告는 아직 접해 보지 못했다.

일반적으로 알츠하이머병, 다발성 경화증, 에이즈, 梅毒이나 流行性 腦炎과 같은 腦의 炎症性障礙 등은 腦의 退行性 變化로 인한 痴呆의 原因 疾患들로 認識^{33,50)}되고 있는데 이런 다양한 神經病理疾患에는 細胞活性物質들이 關與하는 것으로 알려져 있다^{77,79,104)}. 萎縮性變化에 의한 神經病理疾患 中에서 알츠하이머병은 TNF- α 와 IL-1이 腦脊髓液에 增加되어 있고^{77,79,84,104)}, 구조적 적합항원의 비정상적 발현이 나타나며⁶⁵⁾, 또한 IL-1은 알츠하이머병 발병과 관계가 깊은 β -amyloid 유전자의 발현을 촉진시킨다⁸²⁾. SP는 中樞神經系에 광범위하게 분포되어 있는데 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 炎症性 細胞活性物質의 生成을 刺戟하여 中樞神經系의 炎症進行에 影響을 미치는 것

으로 알려져 있다⁹⁰⁾.

腦에서 가장 많은 神經膠細胞인 星狀細胞는 中樞神經系에서 균형된 항상성 환경의 유지를 위하여 중요한 기능을 하고 있는데⁸⁰⁾, 그 이유는 星狀細胞가 면역 적응세포로서 기능을 수행할 수 있는 것은 다양한 면역조절 細胞活性物質을 합성하고 또 그들과 반응할 수 있는 능력이 있기 때문이다^{75,85)}. 腦 星狀細胞는 리포다당질, 바이러스 등에 반응하여 TNF- α , IL-1등을 分泌한다. 다발성경화증에서 TNF- α 는 乏枝神經膠(oligodendrocyte)를 사멸시키고 髓鞘(myelin)를 파괴시킬 것으로 생각하고 있다⁸⁸⁾. 에이즈와 관련된 痴呆(dementia)患者에 있어서도 腦脊髓液에 이들 物質이 역시 增加되어 있고⁹⁵⁾ 비정상적인 구조적 적합항원의 발현이 일어나며⁸⁷⁾ TNF- α 는 培養한 腦 小膠細胞에서 HIV-1의 발현을 增加시킨다¹⁰⁴⁾.

따라서 臨床에서 寧心安神, 祛痰利竅 등의 精神·神經系統 疾患에 多用하고 있는 遠志의 腦 疾患에 對한 作用 與否를 알아보고자 먼저 本 實驗에 착수하게 되었는데, 遠志 수침액이 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP의 同時刺戟에 의해 生成되는 炎症性 細胞活性物質인 TNF- α 및 IL-1의 分泌를 유의성있게 抑制하는 것을 觀察하였다. 아울러 遠志 수침액은 TNF- α 및 IL-1의 分泌에 있어서 농도의존적인 抑制 效果를 나타내었다(Fig. 1, 2). 또한 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 및 IL-1의 分泌에는 LPS의 刺戟이 필요하고 SP에 의해 刺戟이 더욱 增加되는 것을 확인하였다. Torrens 등¹⁰³⁾의 보고와 같이 本 實驗에서도 一次 混合 神經膠細胞에서 SP의 결합부위를 발견했으나, 腦 小膠細胞에서는 SP의 수용체를 검출할 수 없었다. 이러한 結果는 SP 수용체가 腦의 星狀細胞에 있다는 것을 意味한다(Fig. 6). 本 研究의 結果는 小膠細胞에서는 SP의 반응성이 관찰되지 않았기 때문에 이들 結果와 일치하고 있다. 그러나 SP 단독으로는 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 및 IL-1의 分泌에 影響을 미치지 못하였다. 腦 星狀細胞로부터 SP에 의한 IL-1의 分泌 增加 역시 LPS의 同時刺戟에 의해서 上昇의인 效果를 나타내었다(Table I).

IL-1은 신경성장인자(nerve growth factor) 및 SP 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다^{78,83)}. 또한 IL-1과 TNF- α 는 星狀細胞에 대한 강력한 mitogen이고

glial fibrillary acidic protein 유전자 발현을 조절할 것으로 豫想하고 있다^{85,99,100}. 이러한 結果들은 IL-1과 TNF- α 가 이들 세포에서 paracrine 및 autocrine 效果에 의한 것일 것이다.

遠志 수침액에 의한 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 의 分泌 抑制 效果가 IL-1 매개성 경로인가를 分析하기 위하여 腦 星狀細胞에서 IL-1 β 항체의 效果를 實驗하였는데, IL-1 β 항체의 抑制 效果는 10^0 - 10^2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 현저하였다($P < 0.05$). IL-1 항체에 의해 SP 誘導性 TNF- α 分泌의 增加가 抑制되기 때문에 IL-1은 TNF- α 增加를 매개하는 役割을 하는 것으로 사료된다(Fig. 3). 이와같은 結果는 SP가 中樞神經系의 神經에서 生成되는 神經傳達物質로서 炎症反應에 關與하는 중요한 분자임을 의미하는 증거이다. 최근 Sharief 등¹⁰¹은 활성화상태(active) 다발성경화증 환자의 腦脊髓液에 存在하는 TNF- α 의 양이 안정상태(stable) 다발성경화증 환자 및 정상 대조군보다 현저히 높은 수준인 것을 報告하였고, 이러한 발견은 활성화상태(active) 다발성경화증에서 병리학적인 변화를 TNF- α 의 측정에 의해 인식할 수 있는 중요한 지표를 제공해준다. 또한 TNF- α 는 탈수초화(demyelination)에 있어서 중요한 役割을 하고 있음을 예상할 수 있다.

本 研究에서는 遠志 수침액에 의한 TNF- α 단백질 수준의 감소되는 이유를 알아보기 위하여 TNF- α mRNA의 발현 수준을 RT-PCR 법으로 다양한 시간대에서 分析하였다. 著者は 腦 星狀細胞를 LPS와 SP로 刺戟했을 때 TNF- α 分泌의 增加에 따라 TNF- α mRNA 발현 수준도 현저히 增加하였고 遠志 수침액 부가에 의하여 TNF- α mRNA의 발현량이 감소하는 것을 발견하였다(Fig. 4). 이러한 結果는 遠志 수침액이 TNF- α 유전자에 影響을 미쳐 抑制 效果를 나타내는 것을 의미한다. 특히 本 研究에서 HPLC를 이용한 本 實驗에 사용된 遠志 수침액의 표준화는 이 藥物에 의한 유전자 수준에서의 결합활성 및 成分 分析을 위한 基本 資料에 利用될 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 5).

이같은 實驗 結果를 종합해보면, 遠志 수침액은 腦 星狀細胞에서 TNF- α 生成 및 TNF- α mRNA의 발현을 抑制하는 것으로 추정되는 바 이에 대한 보다 더 많은 研

究가 進행된 다음 痴呆 등 다양한 腦疾患의 臨床 應用이 可能할 것으로 생각된다.

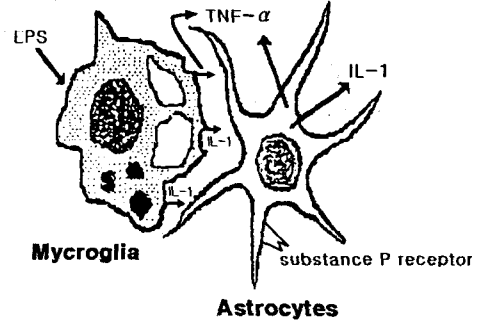


Fig. 6. Schematic representation of cytokine network in glial cells, a hypothesis based on the results summarized in Table I and Table II.

V. 結 論

遠志 수침액이 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質의 生成 調節에 미치는 影響을 研究한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 腦의 炎症을 유발하는 중요한 炎症性 細胞活性物質로 알려진 TNF- α 와 IL-1이 腦 星狀細胞에서 LPS와 SP의 刺戟에 의해 上昇적으로 分泌되는 것을 觀察하였다.
2. 遠志 수침액은 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP의 刺戟에 의하여 分泌되는 TNF- α 및 IL-1의 分泌를 용량의 존적으로 抑制하였다.
3. 遠志 수침액에 의한 腦 星狀細胞로부터 TNF- α 의 分泌 抑制 效果는 IL-1의 媒介에 의한다는 것을 證明하였다.
4. 遠志 수침액은 腦 星狀細胞로부터 LPS와 SP의 刺戟에 의해 유도되는 TNF- α mRNA의 발현을 처리시간 의존적으로 감소시켰다.

5 本 實驗에 사용된 遠志 수침액의 크로마토그램을 HPLC로 分析하여 藥물의 표준화에 의한 더욱 상세한 研究가 계속될 수 있도록 하였다.

따라서 遠志 수침액은 腦 星狀細胞에 作用하여 炎症을 일으키는 주요한 細胞活性物質의 生成을 抑制하기 때문에 各種 炎症性 腦疾患 및 이로 인한 腦의 退行性 病變인 痴呆에 對해서도 臨床的인 活用이 可能할 것으로 생각되지만, 向後 이에 대한 계속적인 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 강형원 : 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果, 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
2. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
3. 金基錫譯, Richard F. Thompson著 : 腦, 서울, 星苑社, pp.28, 35, 1989.
4. 金利和外 : 痴呆治療의 最近 研究動向에 關한 考察, 大韓鍼灸學會誌 14(2): 115-126, 1997
5. 金保岡外 : Alzheimer型 痴呆患者 2例에 對한 臨床的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):97-106, 1997.
6. 金승엽 : 치매, 알츠하이머병, 서울, 삶과 꿈, pp.53-54, 57-62, 1997.
7. 金영균외 : 痴呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 대한한방 내과학회지 18(2): 177-194, 1997.
8. 金完熙外 編著: 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, p.384, 1993.
9. 金晝壽 : 標準本草學, 서울, 進明出版社, pp.282-283, 1975.
10. 金진수 : Alzheimer's disease의 神經 화학적 變化에 關한 高찰, 大韓神經科學會誌, 3(1):10-15, 1985.
11. 大韓神經정신의학회 : 神經精神醫學, 서울, 하나의학사, p.213, 1997.
12. 文淸典外 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.73, 215-216, 1990.
13. 朴大圭 : 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制 作用에 關한 研究, 成均館大學校 大學院 博士學位論文, 1983.
14. 朴貞五外 : 臨床生理學, 서울, 大學書林, pp.346-349, 1990.
15. 배영철外 : 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.193-209, 1996.
16. 裴旣星 : 老人性 痴呆에 關한 體質醫學的 研究, 大韓韓醫學會誌, 13(2): 101-106, 1992.
17. 徐敏華 : 聰明湯이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1997.
18. 徐政烈外 : 痴呆에 對한 東西醫學的 文獻的 考察, 서울, 大韓鍼灸學會誌, 14(1):226-238, 1997.
19. 成彊慶 : 腦의 機能에 對한 臟象論的 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16 (1):468-474, 1995.
20. 孫思邈 : 備急千金要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
21. 손정석 : 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):25-38, 1997.
22. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.370-371, 1995.
23. 楊東喜 : 本草備要解析, 서울, 醫聖堂, pp.43-44, 1993.
24. 楊維傑編 : 黃帝內經素問(素問), 서울, 成輔社, pp.1-12, 42-61, 100- 103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
25. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.
26. 우주영 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(1): 69-79, 1997.
27. 柳道坤 : 東醫生理學講義, 益山, 圓光大學校出版局, pp.267-270, 365- 377, 413-415, 506-507, 1996.
28. 柳泳秀外 : 記憶障礙에 關한 東·西醫學的 比較, 研究, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):155-166, 1996.
29. 의학교육연구원 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.595, 1997.
30. 李京燮外 : 東醫心系內科學(上), 서울, 書苑堂, pp.36-37, 43-44, 1995.
31. 이근후 : 精神科 영역에서의 痴呆, 大韓神經科學會誌, 3(1):25-27, 1985.

32. 이근후 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, pp.138, 216-228, 1988.
33. 李東垣外 : 痴呆에 關한 東西醫學의 比較 考察, 大韓韓方內科學會誌, 16(1): 2-5, 11, 14, 1995.
34. 李保英·姜錫峯 : 麝香이 생쥐이 腦損傷에 미치는 影響, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(2):299-311, 1995.
35. 李尙仁外 : 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.419-420, 1990.
36. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
37. 이원철外 : 內經에 나타난 腦의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 4(2):73- 77, 1983.
38. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
39. 李槿 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
40. 李棣熙 : 遠志의 安神作用에 對한 藥理의 解析의 研究, 서울, 大韓本草學會誌, 12(1): 1-6, 1997.
41. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
42. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
43. 全國韓醫科大學 本草學教材共編著 : 本草學, 서울, 永林社, pp.496-497, 1991.
44. 鄭仁哲外 : 痴呆에 對한 文獻의 考察, 東醫神經精神科學會誌, 7(1): 77- 94, 1996.
45. 鄭仁哲外 : 痴呆患者 17例에 對한 臨床의 考察, 大韓韓醫學會誌, 7(1): 70-84, 1998.
46. 지제근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3(1):5-9, 1985.
47. 陳士鐸 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, pp.102, 1984.
48. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
49. 崔龍竣 : 健忘의 辨證分型에 對한 研究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 17(1): 374-406, 1996.
50. 崔龍竣 : 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗의 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1996.
51. 黃義完外 : 東醫神經醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp. 256-257, 262- 264, 266, 269-271, 1987.
52. 黃義完外 : 치매에 대한 한의학적 임상연구, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996.
53. 龔信 : 古今醫鑑, 江西, 江西科學技術出版社, pp.193-194, 1990.
54. 郭宇鵬外 : 謝海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 38(10):586-587, 1997.
55. 大友英一 : 老年期痴呆의 對應, 日本, 永井書店, p.1, 1993.
56. 董蓮榮等 編著 : 中醫形神病學, 北京, 光明日報出版社, pp.22-23, 1991.
57. 上海中醫學院編, 中草藥學, 香港, 商務印書館, pp.325-326, 1981.
58. 徐恒旺 : 補腎活血化痰法治療老年性痴呆 32例, 廣州省, 《新中醫》編輯部, 29(5):55, 1997.
59. 孫其新·孫其然 : 謙齋醫學辨證論治의 三位一體觀, 北京, 北京中醫學學報 19(6):13, 1996.
60. 楊思澎外 : 中醫臨床大全, 北京, 北京科學技術出版社, pp.224-230, 814- 816, 1991.
61. 楊連合 : 中醫治療腦萎縮近況, 遼寧省, 遼寧中醫雜誌, 23(3):141-142, 1996.
62. 王乃石 : 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變의 體會, 湖北中醫雜誌, 18 (124): 41, 1996
63. 王彩霞 : 論腦爲元神之府, 中醫函授通訊, 16(2):11-12, 1997.
64. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.
65. 袁立人外 : 中醫老年病學, 上海, 上海中醫學院出版社, pp.317-320, 1992.
66. 劉文泰等纂 : 本草品彙精要, 北京, 人民衛生出版社, p.252, 1982.
67. 李清福·劉渡舟 編著 : 中醫精神醫學, 天津, 天津科學技術出版社, pp. 211-212, 1988.
68. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 3:20-21, 1995.
69. 張明准外 : 心-腦-神志病辨證論治, 黑龍江科學技術出版社出版, pp.5-10, 100-112, 1988.
70. 傅仁杰外 : 老人性 腦病의 中醫診斷治療, 中醫雜誌, 35(3):79-84, 1994.
71. 程如海 : 略論張錫純心腦共主神明說, 北京, 北京中醫學大學學報, 19(6): 12, 1996
72. 洪亨炤 : 腦萎縮의 中醫康復治療, 福建省, 福建中醫藥,

- 25(1):13, 1994.
73. 黃宮繡纂 : 本草求真, 臺北, 宏業書局有限公司印行, pp.27-28, 1981
74. 黃大東外: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社. pp.378-381, 1989.
75. Benveniste, E. N., Saparcio, S. M., Norris, J. G., Grenett, H. E. and Fuller, G. M. (1990) Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 30, 201.
76. Bethea, J. R., Chung, I. Y., Sparacio, S. M. Gillespie, G. Y. and Benveniste, E. N. (1992) Interleukin-1 beta induction of tumor necrosis factor alpha gene expression in human astrogloma cells. *J. Neuroimmunol.* 36, 179.
77. Brosnan, C. F., Selmaj, F. K. and Raine, C. S. (1988) Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-related demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 18, 87.
78. Carman-Krzan, M., X. Vige, and B. C. Wise. (1991) Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J. Neurochem.* 56, 636
79. Fillit, H., Ding, W. H., Buce, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B. and Wolf-Klein, G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Lett.* 129, 318D.
80. Fontana, A., Frei, K., Bodmer, S. and Hofer, E. (1987) Immune-mediated encephalitis: on the role of antigen-presenting cells in brain tissue. *Immunol. Rev.* 100, 185.
81. Fontana, A., Kristensen, F., Dubs, R., Gemsa, D. and Webew, E. (1982) Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C-6 glioma cells. *J. Immunol.* 129, 2413.
82. Forloni, G., Demicheli, F., Giorgi, S., Bendotti, C. and Angeretti, N. (1992) Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Res. (Mol. Brain Res.)* 16, 128.
83. Freidin, M., and J. A. Kessler. (1991) Cytokine regulation of substance P expression in sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3200
84. Giffin, W. S., Stanley, L. C., Lung, C., White, L., MacLeod, V., Perott, L. J., White, C. L. and Araoz, C. (1989) Brain interleukin-1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7611.
85. Giulian, D., J. Woodward, D. G. Young, J. F. Krebs, and L. B. Lachman. (1998) interleukin-1 injection into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.* 8, 2485
86. Kim, H. M., Hirota, S., Chung, H. T., Ohno, S., Osada, S. I., Shin, T., Ko, K. I., Kim, J. B., Kitamura, Y. and Nomura, S. (1994) Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cells derived from normal and mast-cell-deficient mice and mast cell lines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 258.
87. Koenig, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Dal Canto, M. C., Pezeshkpour, G. H., Yungbluth, M., Janotla, F., Aksamit, A., Martin, M. A. and Fauci, A. S. (1986) Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089.
88. Laurenzi, M. A., Persson, M. A. A., Dalsgaard, C. -J. and Haegerstrand, A. (1990) The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand. J. Immunol.* 31, 529.
89. Lembeck, F. and Holzer, P. (1979) Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310, 175.
90. Ljungdahl, A., Hokfelt, T. and Nilsson, G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity

- in the central nervous system of the rat-I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3, 861.
91. Lotz, M., Vaughan, J. H. and Carson, D. A. (1988) Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241, 1218.
92. Luber-Narod, J., Kage, R. and Leeman, S. E. (1994) Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor- α from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152, 819.
93. Malipiero, U. V., Frei, K. and Fontana, A. (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J. Immunol.* 144, 3816.
94. Mantyh, P. W., Johnson, D. J., Boehmer, C. G., Catton, M. D., Vinters, H. V., Maggio, J. E., Too, H.-P. and Vigna, S. R. (1989) Substance P receptor binding sites are expressed by glia in vivo after neuronal injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5193.
95. Perrella, O., Carrieri, P. B., Guarnaccia, D. and Soscia, M. (1992) Cerebrospinal fluid cytokines in AIDS dementia complex. *J. Neurol.* 239, 387.
96. Rogers, J. and Luber-Narod, J. (1988) Immune actions in the nervous system: a brief review with special emphasis on Alzheimer's Disease. *Drug Devel. Res.* 15, 227.
97. Scuderi, P., Sterling, K. E., Lam, K. S., Finley, P. R., Ryan, K. J., Ray, C. G., Petersen, E., Slymen, D. J. and Salmon, S. E. (1986) Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 2, 1364.
98. Selmaj, K. W. and Raine, C. S. (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 23, 339.
99. Selmaj, K. W., M. Farooq, W. T. Norton, C. S. Raine, and C. F. Brosnan (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines: a primary role for tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 144, 129.
100. Selmaj, K., B. Shafit-Zagardo, D. Aquino, M. Farooq, C. S. Raine, W. T. Norton and C. F. Brosnan. (1991) TNF-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of GFAP mRNA. *J. Neurochem.* 51, 823.
101. Sharief, M. K. and Thompson, E. J. (1992) In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 38, 27.
102. Shirai, T., Shimizu, N., Horiguchi, S. and Ito, H. (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for rat tumor necrosis factor. *Agric Biol Chem* 53, 1733.
103. Torrens, Y., Beaujouan, J. C., Saffroy, M., Daguat de Montety, M. C., Bergstrom, L. and Glowinski, J. (1986) Substance P receptors in primary cultures of cortical astrocytes from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9216.
104. Vitkovic, L., Kalevic, T., de Cunha, A. and Fauci, A. S. (1990) Astrocyte conditioned medium stimulates HIV-1 expression in a chronically infected promonocyte clone. *J. Neuroimmunol.* 30, 153.

=Abstract=

Studies on Inhibitory Effect of Inflammatory Cytokines Secretion from Brain Astrocytes by *Polygala Tenuifolia*

Si-young Hwang
Yeong-Su Lyu

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

We investigated whether an aqueous extract of *Polygala*

tenuifolia root (PTAE) inhibits secretion of inflammatory cytokines from primary cultures of mouse astrocytes. PTAE dose-dependently inhibited the Tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion by astrocytes stimulated with substance P (SP) and lipopolysaccharide (LPS). Interleukin-1 (IL-1) has been shown to elevate TNF- α secretion from LPS-stimulated astrocytes while having no effect on astrocytes in the absence of LPS. We therefore also investigated whether IL-1 mediated inhibition of TNF- α secretion from primary astrocytes by PTAE. Treatment of PTAE to astrocytes stimulated with both LPS and SP decreased IL-1 secretion to the level observed

with LPS alone. Moreover, incubation of astrocytes with IL-1 antibody abolished the synergistic cooperative effect of LPS and SP. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis demonstrated the significantly reduced level of the TNF- α mRNA was expressed in astrocytes treated with PTAE. These results suggest that PTAE has an antiinflammatory activity on the central nervous system curing some pathological disease states.

Keywords: Polygala tenuifolia root; Tumor necrosis factor- α ; Astrocytes; Interleukin-1; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction