

# 附子가 Lipopolysaccharide의 뇌실 주입으로 유발된 생쥐의 혈중 IL-6와 TNF- $\alpha$ 변화에 미치는 영향

고동균, 윤정문, 이태희  
경원대학교 한의과대학 방제학교실

## Abstract

### Effects of Aconiti Tuber on the Change of Interleukin-6 and TNF- $\alpha$ Level induced by LPS I.C.V. Injection in Mice

Dong Kyun Koh, Jeong-Moon Yun, Tae-Hee Lee  
Formulae Pharmacology Dept, Oriental Medical School, Kyungwon University,

**Objective** : This study was conducted to investigate the effects of Aconiti Tuber on the plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  level in mice stimulated by intracerebroventricular(I.C.V.) Injection of Lipopolysaccharide(LPS).

**Method** : 6 mice were assigned to each of the normal group, the control group, and the experimental group. In the normal group only saline was administered

---

교신저자 : 이 태 희

경기도 성남시 수정구 복정동 산65, 461-701

Tel : 031) 750-5418 e-mail : ompm5418@mail.kyungwon.ac.kr

접수 : 2004/ 5/ 8 채택 : 2004/ 5/ 11

intragastrically, and in the control group LPS was injected intracerebro-ventricularly 1 hr after intragastric administration of saline. In the experimental groups (Aconiti Tuber 0.5g/kg, Aconiti Tuber 1.0g/kg, Aconiti Tuber 3.0g/kg) each sample was administered intragastrically to mice 1 hr prior to the stimulation by LPS I.C.V. Injection. To measure the plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  level of mice, their blood samples were collected from retro-orbital plexus, immediately centrifuged at 4°C, and plasma was removed and stored frozen at -83°C for later determination of plasma IL-6 and TNF- $\alpha$ .

### Result :

1. LPS I.C.V. Injection increased plasma IL-6 level significantly in a dose-dependent manner compared with normal group ( $P < 0.01$ ). The plasma IL-6 concentration reached a significant maximal level about 1 hr after LPS I.C.V. Injection ( $P < 0.001$ ).

LPS I.C.V. Injection increased plasma TNF- $\alpha$  level significantly in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The plasma TNF- $\alpha$  concentration reached a significant maximal level about 1 hr after LPS I.C.V. Injection ( $P < 0.001$ ).

2. Sample A group to which Aconiti Tuber (0.5g/kg) was administered intragastrically 1 hr prior to the stimulation by LPS I.C.V. Injection showed insignificant lower plasma IL-6 level in 1 hr than control group ( $P < 0.0635$ ), and sample B group (Aconiti Tuber 1.0g/kg) showed significant lower plasma IL-6 level in 1 hr than control group ( $P < 0.05$ ), and sample C group (Aconiti Tuber 3.0g/kg) showed significant lower IL-6 plasma level in 1 hr than control group ( $P < 0.01$ ).

3. sample A group to which Aconiti Tuber (0.5g/kg) was administered intragastrically 1 hr prior to the stimulation by LPS I.C.V. Injection showed insignificant lower plasma TNF- $\alpha$  level in 1 hr than control group ( $P > 0.05$ ), and Both sample B (1.0g/kg) and sample C (3.0g/kg) groups showed significant lower TNF- $\alpha$  plasma level in 1 hr than control group ( $P < 0.01$ ).

These data revealed that Aconiti Tuber might have the anti inflammatory effect by reducing the plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  level in a dose dependent manner in mice LPS I.C.V. Injection.

**Key Word :** Aconiti Tuber, LPS ICV, plasma IL-6 and TNF- $\alpha$ ,

## I. 서 론

附子(Aconiti Tuber)는 烏頭(Aconitum

Carmichaeli DEBX)의 차근(子根)을 가공한 것으로 性은 熱 有毒하고 味는 辛甘하다. 心, 脾, 腎經으로 들어가고 回陽救逆, 補火助陽, 溫經散寒, 除濕止痛, 散寒通絡의 효능이 있고, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷

痛, 脾泄冷痢, 脚氣水腫, 小兒慢驚, 風寒濕痺, 踠臂拘攣, 陰疽瘡漏, 일체의 沈寒痼冷 질환에 사용한다.<sup>1)</sup> 附子は 利尿·強心작용을 가지고 있고, 代謝機能失調의 회복 효과가 크며, 사지관절마비 및 疼痛의 회복, 허약체질의 腹痛, 下利, 失精 등 내장 제거관 이완증을 회복시키는데 많이 사용하여 왔다.<sup>2)</sup> 주요 성분은 알칼로이드로 aconitine, hyaconitine, mesaconitine, aconine등이다.<sup>3)</sup>

박테리아 내독소인 Lipopolysaccharide (LPS)는 大食細胞등의 강력한 활성제로서, 뇌실 안쪽으로 주입하여 大食細胞나 星狀細胞등에 노출이 되면 cytokine의 합성과 방출이 일어나고 급격한 염증반응을 자극한다. 이러한 염증반응은 LPS의 직접적인 침투의 결과라기보다는 cytokine에 의한 것으로 생각된다.<sup>4)</sup>

지주막하 공간은 뇌와 척수, 시신경을 둘러싼 연속적인 구조물이기 때문에 어느 한 부분에서 감염이 일어나면 다른 부위로 쉽게 퍼지게 되어 뇌척수액, 뇌실등 모든 구조물에서 염증반응을 일으킨다. 세균이나 독소가 자극물질로 작용하여 혈관의 충혈을 일으키고, 세정맥과 모세혈관의 투과성을 증가시키고, 이어 연막과 지주막하 공간으로 호중구의 이동이 나타나는데, 이때 백혈구 증가와 호중구의 이동은 뇌막사에서 cytokine의 형성과 연관이 있으며, cytokine은 세균과 독소를 파괴시키기 위해 이 세포들과 작용하는 것으로 생각된다.<sup>4,5)</sup>

Cytokine들 - Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), 그리고 Interleukin-6 (IL-6)등 - 은 동물에서의 발열반응을 유발하고, 감염과 손상에 대한

염증이나 Stress대응과 같은 인체 방어기전에서 중요한 매개체로 작용하는 것으로 알려지고 있다. 치매를 야기하는 뇌의 퇴행성질환인 알츠하이머병이나 파킨슨, 다발성 경화증 등의 신경병리질환에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6등의 cytokine들이 관여하는 것으로 알려지고 있다.<sup>6)</sup>

鄭<sup>7)</sup>은 결핵균 유성 현탁액을 접종하여 유발한 쥐의 adjuvant 관절염에서 附子の 약침이 효과를 나타냄을 보고하였고, 李<sup>8,9)</sup> 등은 附子 전탕액의 경구투여나 附子 약침의 족삼리 시술이 척추손상을 야기한 Rat의 운동성 회복에 유의한 효과가 있는 것을 보여주었다. 姜<sup>10)</sup>은 麻黃附子細辛湯, 桂枝加附子湯, 葛根加附子湯등이 NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>등으로 유발한 호흡기 손상에서 유의한 효과가 있는 것을 확인하였다.

이상의 논문들에서 염증상황에서의 운동성 회복이나 대식세포군의 활성화 정도에 附子が 미치는 효과를 확인하였으나 염증성 cytokine에 대해 附子が 어떤 영향을 미치는지에 관한 보고는 아직 없었다.

저자는 염증에 대한 附子の 효과를 확인해 보기 위해 먼저 附子 전탕액을 투여한 생쥐에게 뇌실내로 LPS를 주입한 후 혈액에서 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 附子(*Aconitum crami-*

*chaeli* Debx.)는 京炮附子를 정한유통약업사에서 구입하여 경원대학교 한의학과 방제학교실에서 엄선한 것을 사용하였다

## 2) 동물

실험동물은 명진 동물실험센터에서 분양받은 4~5週齡 (體重 20~25g)의 ICR계 수컷 mice를 사용하였으며 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있게 하였고, 12시간을 주기로 밤과 낮이 구분 되도록 조명을 조정하였으며 실내온도는  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 한 cage에 6마리의 생쥐를 사육하였다.

## 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Lipopolysaccharide(LPS), NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 Sigma(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, Tween 20은 BIO-RAD(U.S.A.) 제품을 사용하였다. 약물 추출액은 Rotary Evaporator (Eyela Co., Japan)를 사용해서 추출 건조하였고, 혈액 채취시 사용된 tube는 heparinized capillary tubes(Chase Inc., U.S.A.)를 사용하였다. Plasma의 원심 분리는 Centrifuge(Micro 17R, Hanil Co. Korea)를 사용, Cytokine은 DuoSet ELISA Kit(R&D., U.S.A.)을 사용하여 ELISA Reader(Merck Co., Germany)로 측정하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액 조제

附子 300g을 취하여 정제수로 3000ml 등근 플라스크에서 냉각기를 부착한 상태에서 열추출 하였다.

### 2) 실험군 및 검액 투여

LPS를 1, 10, 50, 100, 1000ng/mouse의 농도로 생쥐의 뇌실에 주입한 1시간 후에 IL-6 와 TNF- $\alpha$ 의 농도변화를 측정하였다.

LPS(100ng/mouse)를 생쥐의 뇌실에 주입한 후 0.5 hr, 1 hr, 1.5 hr, 2 hr, 3 hr, 6 hr 에서 시간경과에 따른 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도변화를 측정하였다.

다음으로 실험동물을 정상군(Normal), 대조군(Control), 약물투여군(Sample)으로 구분하였고, 약물투여군은 附子 0.5g/kg(Sample A), 附子 1.0g/kg(Sample B), 附子 3.0g/kg(Sample C) 군으로 다시 분류하였다. LPS 주입 1시간 전에 정상군과 대조군은 생리식염수를 투여하고, 약물투여군에는 각 약물을 생리식염수에 용해하여 경구투여 하였다. 대조군과 약물투여군에 LPS(100ng/mouse)를 뇌실 내로 주입한 1시간 후, 모든 분류군의 혈액을 채취하여 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정하였다.

### 3) 혈액 중 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 측정

생쥐의 retro-orbital venous plexus에서 heparinized capillary tube로 혈액을 채취한후  $4^\circ\text{C}$ 상태로 4,000 r.p.m으로 15분간 원심 분리하여 plasma를 분리하였으며, 분리된 plasma는  $-83^\circ\text{C}$ 의 deep freezer에 보관하였다가 24시간 후 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하였다.

측정 방법은 다음과 같다.

Capture antibody를 PBS에 녹여서 96 well plate에  $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 다음 plate를 paraffin film으로 봉한 후  $4^\circ\text{C}$  냉장고에 보관하였다.

24시간 후에 각 well을 wash buffer로 3회 세척한 다음 300 $\mu$ l의 block buffer를 가하고 1시간 동안 실온에 방치한 후 다시 wash buffer로 3회 세척하였다.

여기에 standard와 sample을 100 $\mu$ l씩 각 well에 가한 다음 실온에 2시간 동안 방치하였다. 2시간 후 detection antibody를 reagent diluent에 희석하여 각 well에 100 $\mu$ l씩 가한 후 실온에서 다시 2시간 동안 방치한 후 wash buffer로 3회 세척하였다. 그 다음 streptavidin-horseradish-peroxidase를 역시 reagent diluent로 희석하여 각 well에 100 $\mu$ l씩을 넣고 20분간 실온에 방치한다. 이를 다시 wash buffer로 3회 세척하고 substrate solution을 100 $\mu$ l씩 가하고 20분간 방치하였다. 20분 후 각 well에 stop solution을 50 $\mu$ l씩 가하고 plate를 가볍게 두드려서 섞은 다음 optical density를 ELISA Reader로 측정하였다.

#### 4) 통계 처리

성적은 Graphpad Prism 3.0(USA) 으로 Student's t-test를 이용해 감정하였으며, P값이 0.05미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

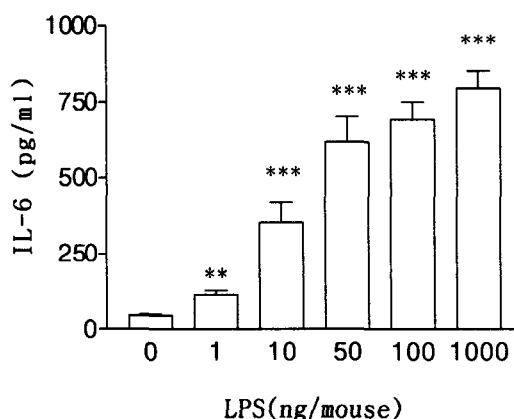
### Ⅲ. 성 적

#### 1. LPS 주입량에 따른 혈중 IL-6 농도 변화

정상군의 혈중 IL-6 농도는 12.43pg/ml 이었는데 LPS를 주입한 결과 mouse당 1ng을 주입했을 때는 114.9pg/ml 이었고

(P<0.01), 10ng에서는 353.4pg/ml(P<0.001), 50ng에서는 620.5pg/ml(P<0.001), 100ng에서는 694.4pg/ml을(P<0.001), 1000ng에서는 796.0pg/ml (P<0.001) 로 각각 유의성 있는 변화를 나타내었다. (Fig. 1.)

Fig. 1. The change of IL-6 level in plasma according to dose after LPS I.C.V. Injection (n=6)



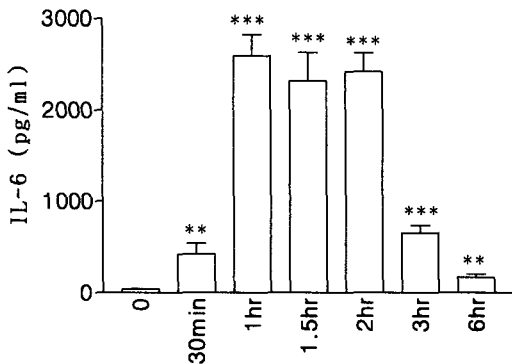
\* : Statistically significant as compared with Normal Group (\*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)

#### 2. LPS(100ng/mouse) 주입 후 Time Course별 혈중 IL-6 농도 변화

LPS(100ng/mouse)를 뇌실내 주입한 후 시간 경과에 따른 mouse의 혈중 IL-6의 농도 변화를 측정된 결과, 주입 직후의 생쥐의 혈중 IL-6 농도는 42.43pg/ml 이었고, 주입 후 30분이 경과한 군은 IL-6 농도는 425.5pg/ml로 증가하였고(P<0.01), 주입 후 1시간이 경과한 군은 2588pg/ml로 더욱 현저하게 증가한 것을 알 수 있었다 (P<0.001). LPS 주입 후 1시간 30분 경과한 경우도 2318pg/ml로 뚜렷한 증가를 보였으며(P<0.001), 2시간 경과 후 2419pg/ml

까지 증가하다가, 3시간 경과 후 654.1pg/ml로 감소, 6시간 경과 후에는 172.4pg/ml로 현저한 감소를 보였다. (Fig.2.)

Fig. 2. The change of IL-6 level in plasma according to time-course after LPS (100ng/mouse) I.C.V. Injection (n=6)



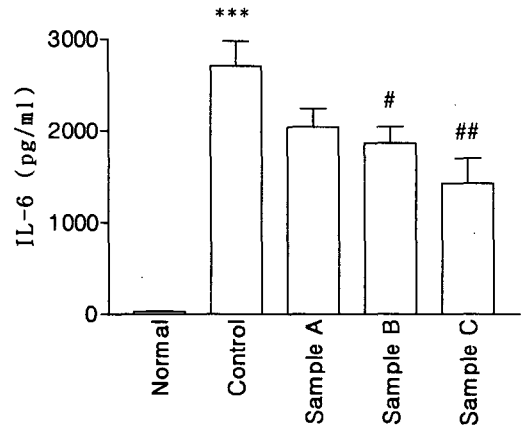
\* : Statistically significant as compared with Normal Group  
 (\*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)

### 3. 附子가 혈중 IL-6 농도 변화에 미치는 영향

LPS(100ng/mouse)를 뇌실 내 주입하기 1시간 전 附子를 각각 0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg씩 투여하였다. LPS를 주입하기 전 생쥐의 혈중 IL-6 농도는 29.9±5.529ug/dl 이었고, 생리 식염수를 경구투여한 대조군은 2073±272.2ug/dl로 유의성 있는 증가가 나타 났다. 附子 0.5g/kg을 투여한 실험군에서 IL-6의 농도는 2041±202.2ug/dl로 대조군에 비해서 약간의 감소를 보였으며 (P<0.0635), 附子 1.0g/kg를 투여한 실험군에서는 1871±174.3ug/dl로 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(P<0.05). 附

子를 3.0g/kg 투여한 실험군에서는 IL-6의 농도가 1428±270.1ug/dl로 역시 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(P<0.01). (Fig. 3)

Fig. 3. The effect of Aconiti tuber(0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg) on the change of IL-6 level at 1 hr after LPS (100ng/mouse) I.C.V. Injection (n=12)



\* : Statistically significant as compared with Normal Group (\*\*\*) : P<0.001)

# : Statistically significant as compared with Control Group (# : P<0.05, ## : P<0.01)

Normal Saline and Aconiti Tuber was administered intragastrically 1hr prior to LPS I.C.V. injection

Blood was collected from the retro-orbital venous plexus 1hr after LPS I.C.V. Injection

Normal : Normal Saline treated Group

Control : LPS I.C.V. and Normal Saline Treated Group

Sample A : Aconiti Tuber (0.5g/kg) treated Group

Sample B : Aconiti Tuber (1.0g/kg) treated Group

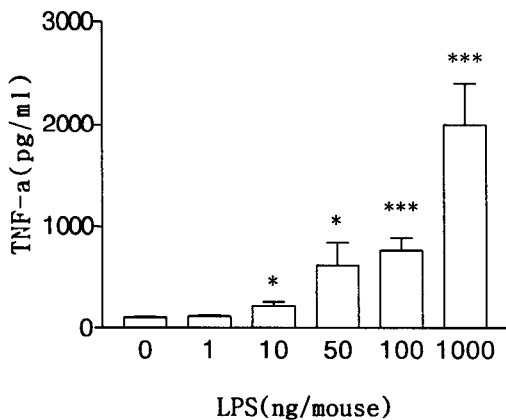
Sample C : Aconiti Tuber (3.0g/kg) treated Group

### 4. LPS 주입량에 따른 혈중 TNF-α 농도 변화

정상군의 혈중 TNF-α 농도는 105.8pg/ml

이었는데 LPS를 주입한 결과 mouse당 1ng을 주입했을 때는 118.9pg/ml로 증가가 보였으나 유의성은 없었고, 10ng에서는 221.9pg/ml로 유의성 있는 농도의 증가가 보였다( $P < 0.05$ ). 50ng에서는 616.4pg/ml ( $P < 0.05$ ), 100ng에서는 764.4pg/ml을( $P < 0.001$ ), 1000ng에서는 2003pg/ml( $P < 0.001$ )로 각각 유의성 있는 변화를 나타내었다. (Fig. 4.)

Fig. 4. The change of TNF- $\alpha$  level in plasma according to dose after LPS I.C.V. Injection (n=6)



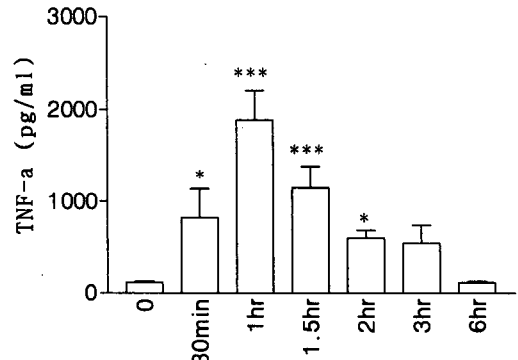
\* : Statistically significant as compared with Normal Group (\* :  $P < 0.05$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ )

### 5. LPS(100ng/mouse) 주입 후 Time Course별 혈중 TNF- $\alpha$ 농도 변화

LPS(100ng/mouse)를 주입한 후 mouse의 혈중 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화를 측정된 결과, 주입 직후의 생쥐의 혈중 TNF- $\alpha$  농도는 115.8pg/ml 이었고, 주입 후 30분이 경과한 군에서 TNF- $\alpha$  농도는 825.9pg/ml로 증가하였고( $P < 0.05$ ), 주입 후 1시간이 경과한 군에서는 1888pg/ml로 보다 급격

한 증가를 보였다( $P < 0.001$ ). LPS 주입 후 1시간 30분 경과한 경우는 1148pg/ml로 감소의 추세를 보이다가 2시간 경과 후 609.3pg/ml로 감소, 3시간 경과 후 547.0pg/ml, 6시간 경과 후에는 117.2pg/ml로 현격한 감소를 보였다. (Fig. 5)

Fig. 5. The change of TNF- $\alpha$  level in plasma according to time-course after LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection (n=6)



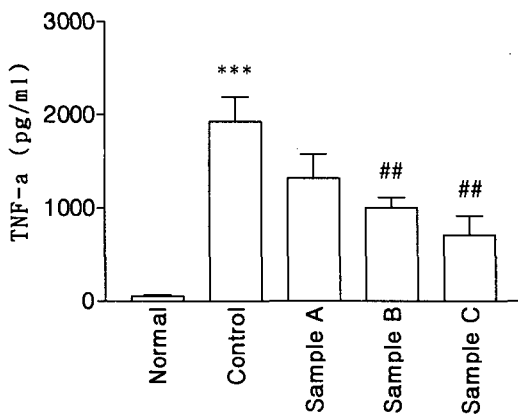
\* : Statistically significant as compared with normal Group (\* :  $P < 0.05$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ )

### 6. 附子가 혈중 TNF- $\alpha$ 농도 변화에 미치는 영향

LPS(100ng/mouse)를 뇌실내 주입하기 1시간 전에 附子를 0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg로 각각 경구투여한 결과 LPS를 주입하기 전 생쥐의 혈중 TNF- $\alpha$ 의 농도는  $56.36 \pm 12.91 \mu\text{g/dl}$  이었는데, 생리 식염수 투여후 LPS I.C.V.를 주입한 대조군의 농도는  $1930 \pm 263.4 \mu\text{g/dl}$ 로 크게 증가하여 유의성 있는 증가를 보였고( $P < 0.001$ ), 약물 투여군의 경우는 0.5g/kg를 투여한 군은  $1315 \pm 261.0 \mu\text{g/dl}$ 로 유의성은 나타나지 않았지만 약간의 감소를 보였고, 1.0g/kg

을 투여한 群은  $1005 \pm 107.5 \mu\text{g}/\text{dl}$ 로 유의성 있는 감소를 보였고( $P < 0.01$ ), 3.0g/kg 群의 경우도 유의성 있는 농도의 감소를 보였다( $P < 0.01$ ). ( Fig. 6)

Fig. 6 The effect of Aconiti tuber(0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg) on the change of TNF- $\alpha$  level at 1 hr after LPS (100ng/mouse) I.C.V. Injection (n=12)



\* : Statistically significant as compared with Normal Group (\*\*\*) :  $P < 0.001$ )

# : Statistically significant as compared with Control Group (## :  $P < 0.01$ )

Normal Saline and Aconiti Tuber was administered intragastrically 1hr prior to LPS I.C.V. injection

Blood was collected from the retro-orbital venous plexus 1hr after LPS I.C.V. Injection

Normal : Normal Saline treated Group

Control : LPS I.C.V. and Normal Saline Treated Group

Sample A : Aconiti Tuber (0.5g/kg) treated Group

Sample B : Aconiti Tuber (1.0g/kg) treated Group

Sample C : Aconiti Tuber (3.0g/kg) treated Group

## IV. 고찰

附子(Aconiti Tuber)는 미나리아재비과

(Ranunculaceae)에 속한 다년생 초본인 烏頭(*Aconitum Carmichaeli* DEBX.)의 자근(子根)을 가공한 것으로 性은 熱 有毒하고 味는 辛甘하다 心, 脾, 腎經으로 들어가고 回陽救逆, 補火助陽, 溫經散寒, 除濕止痛, 散寒通絡의 효능이 있고, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 脾泄冷痢, 脚氣水腫, 小兒慢驚, 風寒濕痺, 踠躄拘攣, 陰疽瘡漏, 일체의 沈寒痼冷질환에 사용한다. 陰虛陽盛, 眞熱假寒의 증상과 孕婦에게는 사용을 금한다. 주요 성분은 alkaloid로 aconitine, hypaconitine, mesaconitine등이 있고, diterpen alkaloid계열 구조를 가지고 있는 aconitine은 강한 독성을 가지고 있으나 쉽게 가수분해되는 특성이 있어, 제조 방법에 따라 aconitine에 비해 독성이 매우 작은(1/50~1/200) aconine으로 바뀐다. 특히 京炮附子의 경우는 aconitine이 검출되지 않는 것이 실험에서 확인된바 있다. 附子는 利尿·強心작용을 가지고 있고, 代謝機能失調의 회복 효과가 크며, 사지관절마비 疼痛의 회복, 허약체질의 腹痛, 下利, 失精 등 내장제기관 이완증을 회복시키는데 많이 사용되어진다.<sup>1-3,11)</sup>

附子는 辛熱燥烈하고 純陽의 성질로서<sup>12)</sup> 醫學入門에서 “陽中陽也 其性浮而不沈 走而不守 能治 六腑沈寒 五臟痼冷”이라 하였는데,<sup>13)</sup> 이렇듯 溫熱性이 강한 약재임에도 불구하고 관절염, 기관지염등 火熱의 형태로 볼 수 있는 염증성 질환에도 응용되는 경우가 있다.

鄭<sup>7)</sup>은 결핵균 유성 현탁액을 접종하여 유발한 쥐의 adjuvant 관절염에서 附子의 약침이 백혈구, 적혈구, 혈색소등 지표에서 유의성 있는 효과를 나타냄을 보고하였고, 李<sup>8-9)</sup>등은 附子 전탕액의 경구투여나 附子



약침의 足三里 시술이 척추손상을 야기한 Rat의 운동성 회복에 유의한 효과가 있는 것을 보여주었다. 박<sup>14)</sup>은 附子에 포함된 alkaloid중 neoline을 분리하여 scopolamine에 의해 유발된 콜린성 신경전달 차단으로 인한 세포괴사를 79% 수준까지 막을 수 있음을 확인하였다.

또 附子가 포함된 처방의 염증적용에 있어서 姜<sup>10)</sup>은 麻黃附子細辛湯, 桂枝加附子湯, 葛根加附子湯등이 NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>등으로 유발한 호흡기 손상에서 유의한 효과가 있는 것을 확인하였고, 金<sup>15)</sup>은 adjuvant 관절염에 대해서 三氣飲이 三氣飲去附子보다 더 현저한 효과를 나타냄을 보고하였다. 李<sup>16)</sup>는 문헌연구에서 附子가 熱症에 사용되는 경우의 특징을 살핀바 있다.

염증과 면역반응에서 대식세포는 중추적인 역할을 하게 되는데 염증부위에서 대식세포들은 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6(IL-6)와 같은 염증성 cytokine을 생성하기도 하고, 역으로 이 cytokine들에 의해 자극되어 활성화되기도 한다고 알려져 있다.<sup>17)</sup>

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균(Gram's negative bacterium)의 외막에 들어있는 지방산, 칠탄당, 팔탄당을 포함한 다당류의 복합화합물인데, 설사, 출혈, 백혈구 변동, 발열, 면역기능, B-cell에 대한 영향등 동물에게서 강한 독성을 나타낸다.<sup>18)</sup> LPS는 대식세포의 세포 내부 신호체계를 활성화 시키면서 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 등을 포함하는 많은 cytokine 들을 분비하도록 하여 급격한 염증반응을 유도한다.<sup>19)</sup>

LPS를 뇌실내 주입 했을 때의 표현은 뇌척수액 내의 급성 수막염을 일으키는 것인데, 감염이 지주막하 공간에서 지주막과

연막에 염증을 일으키고 뇌척수액의 흐름을 따라 지주막하 공간에 염증이 파급된다.<sup>5)</sup> 지주막하 공간은 뇌와 척수, 시신경을 둘러싼 연속적인 구조물이기 때문에 어느 한 부분에서 감염이 일어나면 다른 부위로 쉽게 퍼지게 되어 뇌척수액, 뇌실 등 모든 구조물에서 염증반응을 일으킨다. 세균이나 독소가 자극물질로 작용하여 혈관의 충혈을 일으키고, 세정맥과 모세혈관의 투과상을 증가시키고, 이어 연막과 지주막하 공간으로 호중구의 이동이 나타나는데, 이때 백혈구 증가와 호중구의 이동은 뇌막사에서 cytokine의 형성과 연관이 있으며, cytokine은 세균과 독소를 파괴시키기 위해 이 세포들과 작용하는 것으로 생각된다.<sup>4)</sup>

중추신경계에서는 성상세포, 소교세포가 cytokine을 주로 생산하며 세균성 감염의 경우는 뇌척수액에서 감염초기부터 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성이 현저히 증가하는 반면 무균성 염증발현의 경우는 24시간 이후부터 IL-6의 증가가 보이고 TNF- $\alpha$ 는 증가현상을 보이지 않는다고 알려져 있다.<sup>20)</sup>

IL-6는 B세포의 증식, 분화, 항체형성에 관여하는 물질로 B세포 분화단계의 후기에 주로 작용하여 IgM, IgG, IgA의 증식을 유도하고, T세포 분화 증식에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 뇌에서는 소교세포, 성상세포, 신경세포, 혈관세포 등에서 IL-6가 생성되며 LPS 자극으로 인한 염증의 초기에 관여하지만, 다른 염증성 cytokine류(TNF- $\alpha$ , IL-1)에 비해 늦게 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> IL-6는 IL-1이나 TNF- $\alpha$ 에 비해서 치명성은 덜하지만, LPS 감염상황에서 분비되고 염증반응에 직접적인 연관을 가지고 있다.<sup>17)</sup>

TNF- $\alpha$ 는 중앙부위에서 출혈성 괴사를 유도하는 인자로 발견된 이래 염증을 통한 생체 방어기구로 널리 관여하는 cytokine으로 알려져 있다. TNF- $\alpha$ 는 뇌에서는 상세포, 소교세포, 내피세포, 신경세포 등에서 생성한다.<sup>20)</sup> LPS의 자극은 이런 세포들이 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 하는데 TNF- $\alpha$ 는 여러 세포에 영향을 주나 특히 혈관내피세포에 중요한 영향을 준다. 프로스타사이클린의 분비를 증가하여 부분적인 혈관확장을 유발하여 혈관혈류를 증가시키고, 림프구와 단핵구의 흡착을 증진시키는 접착분자인 ELAM-1의 표현을 증가시키는 물질이다.<sup>5)</sup>

치매 등을 야기하는 뇌의 퇴행성질환인 알츠하이머병이나 피크병, 다발성 경화증 등의 신경병리질환에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6등의 cytokine들이 관여하는 것으로 알려지고 있는데,<sup>6)</sup> 다발성 경화증(Multiple sclerosis:MS)에서 TNF가 실험적으로 수초나 펄프 세포에 선택적으로 독성이 있다는 것이 발견된 뒤였고, MS 병소에서 TNF가 존재하고 MS 활성도와 CSF에서의 TNF 농도가 비례하며 TNF 항체가 급성 알리지성 뇌수막염을 차단한다는 보고가 있다.<sup>21)</sup>

저자는 먼저 LPS를 각 1ng, 10ng, 50ng, 100ng, 1000ng/mouse의 단위로 각각 쥐의 뇌실에 주입하고 1시간 후에 쥐의 혈액을 채취하여 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 혈중 농도를 측정된 결과 IL-6는 1ng 이상에서, TNF- $\alpha$ 는 100ng 이상에서 유의하게 증가하였고 농도 비례적으로 증가함을 확인할 수 있었다( $P < 0.001$ ).

다음으로 100ng/mouse의 농도로 LPS를 생쥐의 뇌실에 주입한 후 시간에 따른

IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도변화를 측정한 결과 LPS 주입 후 IL-6의 농도가 상승하기 시작하여 1시간까지 매우 유의성 있게 증가하였고 이후 현격하게 감소하기 시작하여 6시간 이후로는 정상군에 가깝게 감소하였다. 또 TNF- $\alpha$ 의 농도도 마찬가지로 1시간까지 매우 유의성 있게 증가하였고 이후 감소하여 6시간 이후로는 정상군에 가깝게 감소하는 결과를 얻었다( $P < 0.001$ ).

LPS를 사람이나 동물에게 투여했을 경우 IL-6나 TNF- $\alpha$ 의 생성 변화는 실험환경 조건에 따라 다르게 나타나는 경향이 있는 것으로 보인다. 일반적으로 IL-6와 TNF- $\alpha$ 는 염증반응 초기에 관여하며 염증 유발 초기에 급격히 분비가 증가하였다가 감소하는 경향을 보이는 것으로 알려져 있고, 宋<sup>22)</sup>, L<sup>23)</sup>, O<sup>24)</sup>, 윤<sup>25)</sup> 등은 쥐, 소, 사람 등에게 LPS를 각각 정맥주입, 복강주입, 관절강내 주입하여 실험한 결과 IL-6나 TNF- $\alpha$ 의 농도가 1-3시간 내에 급격히 증가하다가 6-12시간 이후 정상군에 가깝게 감소하여 본 실험과 비슷한 결과를 낸 것을 확인할 수 있었다.

그러나 J<sup>26)</sup>, 박<sup>27)</sup>, 주<sup>28)</sup>, F<sup>29)</sup>, 정<sup>30)</sup> 등의 실험에서 사람의 단핵구, 섬유모세포 등을 배양하여 LPS를 투여하여 실험하는 경우에는 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도가 LPS농도의존적으로 약 4시간까지 급격히 증가하다가 감소하지 않고 꾸준히 증가하는 경향을 나타냄을 볼 수 있다

이런 차이가 발생하는 원인에 대해 정<sup>30)</sup> 등은 혈청의 유무라는 실험환경의 차이에서 결과의 차이가 발생하는 것이 아닐까 가정하였는데, 정확히는 알수 없으나 혈청이 존재할 때 생기는 탈감작현상, 즉 일차 자극된 대식세포는 같은 자극에 이차 노출

시 반응이 감소되는 현상이 혈청이 없는 경우 관찰되지 않는 것으로 설명하고 있다. 이상의 결과는 실험상의 염증모델 선택에 고려할 필요가 있는 것으로 보이며, 또한 본 실험은 附子 전탕액 투여가 생쥐의 염증성 cytokine에 미치는 영향을 조사하기 위한 것으로 LPS를 쥐 뇌실내에 직접 투여한 방법이 적합한 것으로 사료된다.

IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화에서 모두 유의성 있게 변화한 LPS의 농도 100ng/mg와, Time Course 실험에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  모두에서 유의성 있게 농도변화를 보인 1시간을 기준으로 하여 附子 전탕액 투여가 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도에 미치는 영향을 조사하였다.

실험전 附子 전탕액을 각각 0.5g/kg, 1g/kg, 3g/kg 경구투여한 생쥐에 LPS를 뇌실에 주입한 후 대조군과 IL-6 및 TNF- $\alpha$  농도의 변화를 비교하였다.

IL-6농도에 대한 실험에서는 0.5g/kg을 투여한 실험군에서는 유의성이 없었으나 IL-6의 농도가 감소하고, 1g/kg, 3g/kg을 투여한 실험군에서 투여량에 비례하여 유의성 있게 감소하였다.

TNF- $\alpha$ 농도에 대한 실험에서는 0.5g/kg을 투여한 실험군에서는 유의성이 없었으나 TNF- $\alpha$ 의 농도가 감소하고, 1g/kg, 3g/kg을 투여한 실험군에서 투여량에 비례하여 유의성 있게 감소하였다.

金<sup>31)</sup>은 腦성상세포에 대한 LPS자극에 대해 치매등 정신질환에 응용된 처방인 洗心湯을 투여하여 TNF- $\alpha$ 억제에 효과가 있음을 보여주었는데, 洗心湯은 附子 외에 人蔘, 白茯苓, 半夏, 神曲, 甘草, 石菖蒲, 酸棗仁 등의 약재로 구성이 되어 있어 실험

결과 LPS 염증자극에 대한 洗心湯과 附子의 TNF- $\alpha$  억제효과에 연관성이 있는 것으로 보인다.

이상의 실험 결과와 같이 附子 전탕액은 LPS를 뇌실에 주입 한 생쥐의 염증반응에서 IL-6 및 TNF- $\alpha$  분비에 대한 억제 효과를 나타내는 것으로 思料된다.

## V. 결 론

附子 전탕액의 염증 Stress에 대한 효과를 살피기 위해 쥐에게 LPS를 뇌실내로 주입한 후의 혈중 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 농도별로 LPS를 뇌실내에 주입했을 때, 혈중에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도가 정상군에 비하여 LPS농도에 비례적으로 유의성 있게 증가하였고, 100ng/mouse의 농도 이상에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  모두 매우 높은 유의성이 있었다( $P < 0.001$ ). 시간 경과에 따라 혈중에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정된 결과는 1시간이 경과했을 때 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 농도가 정상군에 비하여 가장 유의성이 있는 증가를 나타내었다( $P < 0.001$ ).
2. IL-6의 농도는 附子 0.5g/kg을 투여한 실험군은 대조군에 비해서 감소를 보였으며( $P < 0.0635$ ), 附子 1.0g/kg을 투여한 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소 하였고( $P < 0.05$ ), 附子를 3.0g/kg 투여한 실험군은 역시 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다( $P < 0.01$ ). 또한 附子 농도에 의존적으로 감소하는 경향

을 보였다.

3. TNF- $\alpha$  농도는 附子 0.5g/kg을 투여한 실험군은 유의성은 나타나지 않았지만 약간의 감소를 보였고, 附子 1.0g/kg의 실험군은 유의성 있게 감소하였고 (P<0.01), 附子 3.0g/kg 실험군의 경우도 농도가 유의성 있게 감소하였다 (P<0.01). 또한 附子 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

이상과 같이 생쥐에게 LPS를 뇌실로 주입했을 때 혈중 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도가 증가하였고, 附子 경구투여시 IL-6와 TNF- $\alpha$ 가 유의성 있게 억제 되었다.

## 參考文獻

- 1) 전국한의과대학 본초학교수 공편저, 본초학, 도서출판 영림사, 1994
- 2) 김형국, 백완숙, 김경희, 이소영, 임정희: 1998년도 한약재 품질관리에 관한 조사연구(규격 및 기원 중심으로), 보건복지부: pp145-8, 1999
- 3) 원봉필, 강신복, 조정희, 김혜수, 신지현, 고정현, 박상애, 육창수, 노영수, 김일혁: 생약 및 생약제제의 규격에 관한 연구(XIII), 국립고건원보 제32권 제 2호: pp590-6, 1995
- 4) 김용재, 이광수역: 신경계감염(세균성, 진균성, 스피로헤타성, 기생충성) 및 사르코이도시스, 정담, 신경과학 한글 제1판 2권: pp646-683, 1998
- 5) 대한병리학회: 감염질환, 고문사, 병리학 제5판: p113, pp1002-17, 2003
- 6) Mancy J. Rothwell, Giamal Luheshi, Sylvie Toulmond: Cytokines and Their Receptors in the Central Nervous System: Physiology, Pharmacology, and Pathology, Pharmacol. Ther. Vol. 69, No 2: pp.85-95, 1996
- 7) 鄭善喜, 朴東錫, 附子藥鍼이 鎮痛 및 消炎作用에 미치는 影響, 東西醫學研究所 論文集 Vol.1997 No.1: pp15-27, 1997
- 8) 이진목, 김경식, 이강창: 附子の 경구투여가 RAT의 척수손상에 미치는 영향 및 비교, 대한침구학회지 제15권 2호: pp105-116, 1998
- 9) 이진목, 황우준, 조기용, 김기영: 附子약침이 RAT의 척수손상에 미치는 영향 및 비교, 대한침구학회지 16권 1호: pp 283~296. 1999
- 10) 姜名石: 麻黃附子細辛湯, 桂枝加附子湯, 葛根湯加附子のSO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>유발 호흡기 손상에 미치는 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 2000
- 11) 申俊湜: 韓藥의 溫熱性藥의 成分과 化學的 特性에 關한 研究, 경희대학교 대학원, 1999
- 12) 김호철: 한약약리학. 서울, 집문당 :249p, 2001
- 13) 李梴, 編註醫學入門, 서울, 대성문화사, 1990
- 14) 박미정: 일차배양 뇌세포를 이용한 콜린성 신경계에 작용하는 附子 알칼로이드 성분의 분리 및 그 작용기전, 서울대학교 대학원, 1994
- 15) 金荀中: 三氣飲과 三氣飲去附子가 adjuvant關節炎 誘發時 活性酸素에 미치는 影響, 대전대학교, 1996

- 16) 이경애,권정남: 심계영역질환 화열증에 사용된 附子の 활용에 대한 문헌적 연구, 동국대학교 한의학 연구소, 1998
- 17) 김종성 역: 열, 불명열, 서울, 정담, 해리순내과학 한글 제1판 1권: pp81-91, 1997
- 18) 新太陽社, 新太陽社, GME 원색최신의 료대백과사전 6권: p96, 1994
- 19) 김명선: The Role of Cbl complex in LPS-induced adherence of murine macrophages, 전주, 전북대학원, 2001
- 20) 조동, 강경희, 장명웅: 뇌수막염 환자의 뇌척수액에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 의 변화, Korean J. Immunol. 21, 2: 99-107, 1999
- 21) 김진수 역: 다발성 경화증 및 다른 탈수초성 질환들, 서울, 정담, 해리순내과학 한글 제1판 2권: pp2471-2481, 1997
- 22) 宋美善: 康寧湯의 經口와 直腸投與의 抗炎症效果 比較研究, 성남, 경원대학교 대학원, 2003
- 23) Lenczowski MJ, Van Dam AM, Poole S, Larrick JW, Tilders FJ: Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosteron response to intraperitoneal LPS, Am J Physiol. 273(6 Pt 2): pp1870-7, 1997.
- 24) Ohtsuka H, Ohki K, Tanaka T, Tajima M, Yoshino T, Takahashi K.: Circulating tumor necrosis Factor and interleukin-1 after administration of LPS in adult cows, J Vet Med Sci. 59(10): pp927-9, 1997
- 25) 윤덕상: 마우스에서 IL-1 $\beta$ 가 염증의 발현에 미치는 영향에 관한 연구, 서울, 경희대학교 대학원. 1997
- 26) Jansky L, Reymanova P, Kopecky J.: Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by Borrelia, Physiol Res. 52(5): pp593-8, 2003
- 27) 박찬제: 수산화칼슘 처리된 Porphyromonas endodontalis Lipopolysaccharide가 다형핵백혈구의 IL-1과 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향에 관한 연구, 서울대학교 대학원, 2002
- 28) 주재학, 기신영, 문승형, 정성환, 김현태, 어수택, 김용훈, 박춘식: 섬유모세포에서 내독소 자극에 따른 Interleukin-6 생성의 신호전달과정, 대한내과학회지 제54권 제3호: pp415-22, 1998
- 29) Frank R. Jirik, Thomas J. Podor, Toshio Hirano, Tadimitsu Kishimoto, David J. Loskutoff, Dennis A. Carson, Martin Lotz: Bacterial Lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells, The journal of Immunology Vol. 142 No. 1: pp144-7, 1989
- 30) 정성환, 박춘식, 김미호, 김은영, 장현수, 기신영, 어수택, 문승혁, 김용훈, 이희발: 내독소에 의한 말초혈액 단핵구의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$  생성에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환 Vol. 45, No. 4: pp846-60, 1998
- 31) 金兌憲: 洗心湯에 의한 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질의 분비 억제 효과, 원광대학교 한의과대학, 2000

- 32) 서울대학교 천연물과학연구소: 新東醫藥寶鑒전통동양약물데이터베이스, 동방미디어주식회사, 1999
- 33) 이진목, 김경식, 장종덕, 김기영: 附子 경구투여 및 족삼리 약침이 정상 백서의 체중, 혈청 변화에 관한 연구, 대한침구학회지 제16권 제1호:pp269-282, 1999
- 34) 許俊, 東醫寶鑑, 여강출판사, 1994
- 35) 新編 中藥大辭典, 중권, 중국, 신문농출판공사, 中華民國71年
- 36) 김영남 역, 국역 景岳全書 제5권, 일지사 :pp63-68 , 1992
- 37) 임진석 역, 대성의학사, 본경소증 하권:pp391-405, 2001