

黃連이 Lipopolysaccharide 뇌실 주입으로 유발된 생쥐의 IL-6와 TNF- α 변화에 미치는 영향

심은영, 윤정문, 이태희
경원대학교 한의과대학 방제학교실

Abstract

Effects of Coptidis Rhizoma on the Change of Interleukin-6 and TNF- α Level induced by LPS I.C.V. Injection in Mice

Eun-Yeong Sim, Jeong-Moon Yun, Tae-Hee Lee

Formulae Pharmacology Dept, Oriental Medical School, Kyungwon University,

Objective : This study was conducted to investigate the effects of Coptidis Rhizoma on the plasma IL-6 and TNF- α level in mice 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 individual Experimental groups. 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/ 12

intragastrically, and in the Control group LPS was injected intracerebroventricularly 1 hr after intragastric administration of saline. In the Experimental groups *Coptidis Rhizoma*(0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg) was administered intragastrically to mice 1 hr prior to LPS (100ng/mouse) I.C.V. Injection. To measure the plasma IL-6 and TNF- α level of mice, their blood samples were collected from retro-orbital venous 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- α .

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(100ng/mouse) I.C.V. Injection. ($P < 0.001$)
2. Both the 0.5g/kg(Sample A) and 1.0g/kg(Sample B) groups to which *Coptidis Rhizoma* was administered intragastrically 1 hr prior to LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection showed insignificant lower plasma IL-6 level in 1 hr than Control group($P > 0.05$), and 3.0g/kg group(Sample C) conversely showed higher plasma IL-6 level than Control group.
3. LPS I.C.V. Injection increased plasma TNF- α level significantly in a dose-dependent manner compared with Normal group. ($P < 0.05$)
The plasma TNF- α concentration reached a significant maximal level about 1 hr after LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection. ($P < 0.001$)
4. All Sample groups(0.5g/kg, 1.0g/kg, and 3.0g/kg) to which *Coptidis Rhizoma* was administered intragastrically with each constituent-dose 1 hr prior to LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection showed significant lower TNF- α plasma level in 1 hr than Control group. ($P < 0.001$)
These data revealed that *Coptidis Rhizoma* might have anti inflammatory effect by reducing the plasma TNF- α level in a dose dependent manner in mice LPS I.C.V. Injection.

Key Word : *Coptidis Rhizoma*, LPS ICV, plasma TNF- α and IL-6

I. 서 론

黃連은 性味が 大苦 大寒 無毒하여 清熱燥濕, 清熱除煩, 寫火解毒시키는 효능이¹⁾ 있으며 黃連이 항균 및 소염 작용이 있다 하였고 주성분은 isoquinoline계 alkaloid인

berberine으로 그람 양성 및 음성균과 곰팡이 등에 대한 광범위한 항균 작용을 가지며 항염증 작용, 지혈작용, 혈압강화작용, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있어 피부염증, 화농증, 구내염, 비출혈, 기관지염, 외음과 질강의 염증성 질환 등에 내복과 외용으로 사용된다.²⁻⁵⁾

병원균의 대표적 내독소인 Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성 세균의 막구조를 형성하며 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있고⁶⁾, 金⁷⁾의 실험을 보면 뇌의 정상세포에 염증을 유발하는 매개물로 LPS를 사용하였으며, 주⁸⁾ 등의 실험에서도 섬유모세포에 LPS 자극으로 Interleukin-6(IL-6) 생성의 신호 전달 과정을 밝혔다. LPS는 다양한 염증세포 및 조직 구성세포들에서 생산되는 가용성 매개물을 총칭한 Cytokine의 생산을 촉진한다고 알려져 있어 염증 반응을 연구하는 실험 모델로 확립되어 있다.⁹⁻¹⁰⁾

Cytokine은 감염성 질환의 병인에 중요한 역할을 수행하며¹¹⁾ 면역 반응과 염증 반응에 작용한다.

이는 항체가 아닌 폴리펩타이드로서 특이한 항원, 비특이적 항원 또는 비특이적인 수용성 자극 물질(예, 내독소, 다른 Cytokine)과의 상호작용에 의하여 단핵구와 림프구에서 분비된다.¹²⁾ 최근의 연구에서 대부분의 Cytokine이 다기능성임이 밝혀졌으며, 여러 가지 종류가 동일한 target cell에 유사한 효과를 가지고 있음이 밝혀졌다.¹³⁾

黃連에 관련된 연구 보고로는 金¹⁴⁾등은 五味子와 黃連이 염증과 알레르기 반응에 관여하는 IL-6, IL-16, GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)의

발현 억제에 대한 효과를 실험하였고, 朴¹⁵⁾등은 陰戶病의 外用藥으로 응용되는 黃芩, 黃連, 大黃의 항균과 소염 효과를 관찰하였으며, 李¹⁶⁾등은 黃連과 甘草 共沈物의 항균 효과와 생체이용률에 대한 연구를 보고하였고, 송²⁾등은 黃連이 LPS를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향을 관찰하였다.

이에 본 실험에서는 염증 유발 물질인 LPS를 뇌실내에 주입(Intracerebroventricular Injection)하고 Cytokine중 전신 염증 반응으로 중요한 기능을 담당하는 매개물인 Interleukin-6(IL-6) 와 Tumor necrosis factor(TNF- α)의 농도 변화를 비교함으로써 清熱解毒의 聖藥인 黃連의 항 염증 효과를 알아보려고 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 黃連(Coptidis Rhizoma)은 정한 유통 약업사에서 구입한 후, 경원대학교 한의과대학 방제학 교실에서 엄선하여 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 낮의 구분이 되도록 조명을 조정하였으며 실내온도는 22±0.5℃를 유지하였고 한 쥐장에 6마리의 생쥐를 사

육하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Lipopoly-saccharide(LPS), NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄를 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

黃連 300g을 취하여 정제수로 3000ml 등근 플라스크에서 냉각기를 부착한 상태에서 끓인 후 건조하여 추출물 29g을 얻었다.

2) 실험군 및 검액 투여

생쥐 6마리를 한 군(Group)으로 하여 정상군(Normal Group), 대조군(Control Group), 약물투여군(Sample Group)으로 구분하였고, 약물 투여군은 다시 黃連 0.5g/kg(Sample A), 黃連 1.0g/kg(Sample B), 黃連 3.0g/kg(Sample C)군으로 다시 분류하였다. 대조군에는 생리 식염수를 경구 투여하고, 약물 투여군에는 黃連을 농도별로 생리 식염수에 용해하여 경구 투여하였다. 1시간 후에 대조군과 약물 투여군

에 LPS (100ng/mouse)를 뇌실내로 주입하였다. 정상군은 생리식염수만 강제 복용시켰다.

3) 혈액 중 IL-6와 TNF- α 측정

생쥐의 retro-orbital venous plexus에서 heparinized capillary tube로 혈액을 채취한 후 4°C상태로 4,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 plasma를 분리하였으며, 분리된 plasma는 -83°C의 deep freezer에 보관하였다가 24시간 후 IL-6와 TNF- α 의 양을 측정하였다.

측정 방법은 다음과 같다.

Capture antibody를 PBS에 녹여서 96 well plate에 100 μ l씩 넣은 다음 plate를 paraffin film으로 봉한 후 4°C 냉장고에 보관하였다.

24시간 후에 각 well을 wash buffer로 3회 세척한 다음 300 μ l의 block buffer를 가하고 1시간 동안 실온에 방치한 후 다시 wash buffer로 3회 세척한다.

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

4) 통계 처리

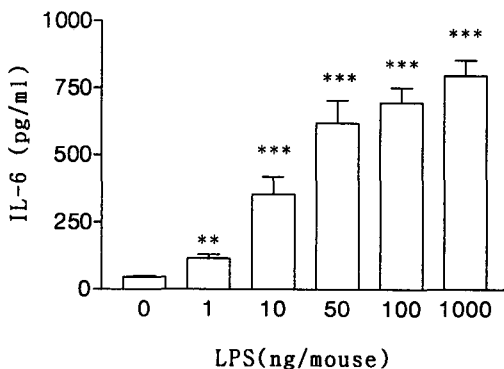
성적은 Graphpad Prism 3.0(U.S.A.) 으
로 Student's t-test를 이용해 감정하였으
며, P값이 0.05미만일 때 유의한 차이가
있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. 농도별 LPS 주입에 따른 혈중
IL-6 농도 변화

정상군의 혈중 IL-6 농도는 12.43pg/ml
이었는데 LPS를 주입한 결과 1ng의 농도
에서는 114.9pg/ml 이었고(P<0.01), 10ng
의 농도에서는 353.4pg/ml(P<0.001), 50ng
의 농도에서는 620.5pg/ml(P<0.001), 100ng
의 농도에서는 694.4pg/ml을(P<0.001),
1000ng의 농도에서는 796.0pg/ml(P<0.001)
로 각각 유의성 있는 변화를 나타내었
다.(Fig. 1)

Fig. 1. The change of IL-6 level in
plasma according to dose after
LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection(n=6)

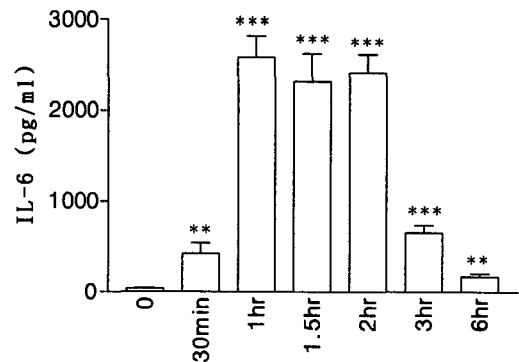


* : Statistically significant as compared with
Normal Group (** : P<0.01, *** : P<0.001)

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

100ng/mouse 농도의 LPS를 주입한 후
mouse의 혈중 IL-6의 농도 변화를 측정하
는 결과, 주입 직후의 혈중 IL-6 농도는
42.43pg/ml 이었고, 30분이 경과한 군의
IL-6 농도는 425.5pg/ml로 증가(P<0.01)하
였고, 1시간이 경과한 군은 2588pg/ml로
더욱 현저하게 증가(P<0.001) 하였다
는 것을 알 수 있었다. LPS 주입 후 1시간 30
분 경과했을 때도 2318pg/ml로 뚜렷한 증
가(P<0.001)를 보였으며 2시간 경과 후
2419pg/ml까지 증가하다가, 3시간 경과 후
654.1pg/ml로 감소하였고, 6시간 경과 후
에는 172.4pg/ml로 현격한 감소를 보였
다.(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)

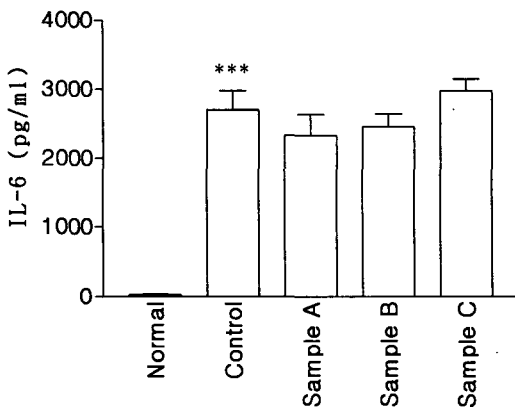


* : Statistically significant as compared with
Normal Group (** : P<0.01, *** : P<0.001)

3. 黃連이 혈중 IL-6 농도 변화에 미치는 영향

정상군의 혈중 IL-6 농도는 29.9±5.529ug/dl 이었고, 대조군은 2073±272.2ug/dl로 유의성 있는 증가가 나타 났다. 약물 투여군의 경우 黃連 0.5g/kg 투여군은 2328±308.7ug/dl로 유의성은 없지만 대조군에 비해서 약간의 감소를 보였으며, 黃連 1.0g/kg 투여군은 2460±188.6ug/dl로 여전히 대조군에 비해 약간의 감소가 보이는 하지만 黃連 0.5g/kg 투여군 보다는 농도의 증가가 보였다. 黃連 3.0g/kg 투여군은 IL-6의 농도가 2978±172.1ug/dl로 유의성이 없었다.(Fig. 3)

Fig. 3. The effect of Coptidis Rhizoma (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)



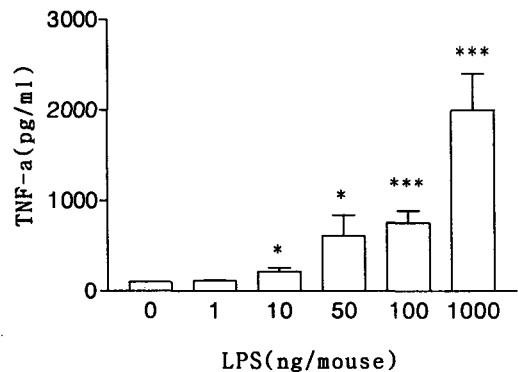
* : Statistically significant as compared with Normal Group (***) : P<0.001)
 Normal Saline and Coptidis Rhizoma was administered intragastrically 1hr prior to LPS I.C.V. Injection
 Blood was collected from the retro-orbital venous plexus 1 hr after LPS I.C.V. Injection
 Normal : Normal Saline treated Group
 Control : LPS I.C.V. and Normal Saline treated Group

Sample A : Coptidis Rhizoma(0.5g/kg) treated Group
 Sample B : Coptidis Rhizoma(1.0g/kg) treated Group
 Sample C : Coptidis Rhizoma(3.0g/kg) treated Group

4. LPS 주입량에 따른 혈중 TNF-α 농도 변화

정상군의 혈중 TNF-α 농도는 105.8pg/ml이었는데 LPS를 주입한 결과 mouse당 1ng을 투여했을때는 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-α level in plasma according to dose after LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection(n=6)

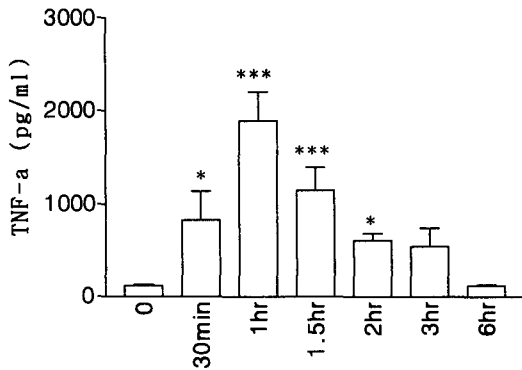


* : Statistically significant as compared with Normal Group (* : P<0.05, *** : P<0.001)

5. LPS(100ng/mouse) 주입 후 Time Course별 혈중 TNF-α 농도 변화

LPS(100ng/mouse)를 주입한 후 mouse 혈중 TNF- α 농도 변화를 측정된 결과, 주입 직후의 혈중 TNF- α 농도는 115.8pg/ml 이었고, 30분이 경과한 군에서는 TNF- α 농도는 825.9pg/ml로 증가(P<0.05)하였고, 1시간이 경과한 군에서는 1888pg/ml로 더욱 현저한 증가(P<0.001)를 보였다. LPS 주입 후 1시간 30분 경과했을 때는 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- α level in plasma according to time-course after LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection(n=6)



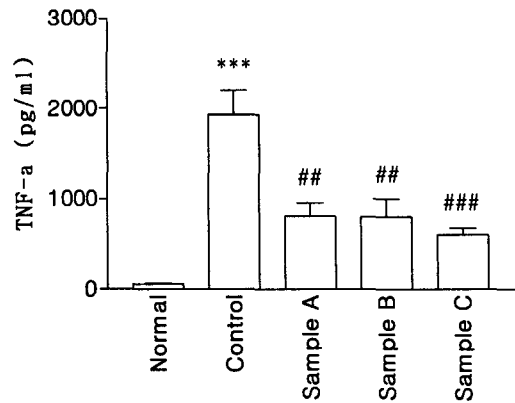
* : Statistically significant as compared with normal Group (* : P<0.05, *** : P<0.001)

6. 黃連이 혈중 TNF- α 농도 변화에 미치는 영향

정상군의 혈중 TNF- α 농도는 56.36 \pm 12.91ug/dl 이었는데, 대조군의 TNF- α 의 농도는 1930 \pm 263.4ug/dl로 크게 증가하여 정상군보다 유의성 있는

(P<0.001) 증가를 보였고, 약물 투여군의 경우 黃連 0.5g/kg 투여군은 810.1 \pm 145.0ug/dl로 유의성 있는(P<0.01) 농도의 감소를 보였고, 黃連 1.0g/kg 투여군은 805.1 \pm 195.1ug/dl로 역시 대조군에 비해 유의성 있는 감소(P<0.01)를 보였다. 黃連 3.0g/kg 투여군의 경우도 대조군에 비해 유의성 있는(P<0.001) 농도의 감소를 보였다.(Fig. 6)

Fig. 6. The effect of Coptidis Rhizoma (0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg) on the change of TNF- α 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, ### : P<0.001)

Normal Saline and Coptidis Rhizoma was administered intragastrically 1hr prior to LPS I.C.V. Injection

Blood was collected from the retro-orbital venous plexus 1 hr after LPS I.C.V. Injection
Normal : Normal Saline treated Group

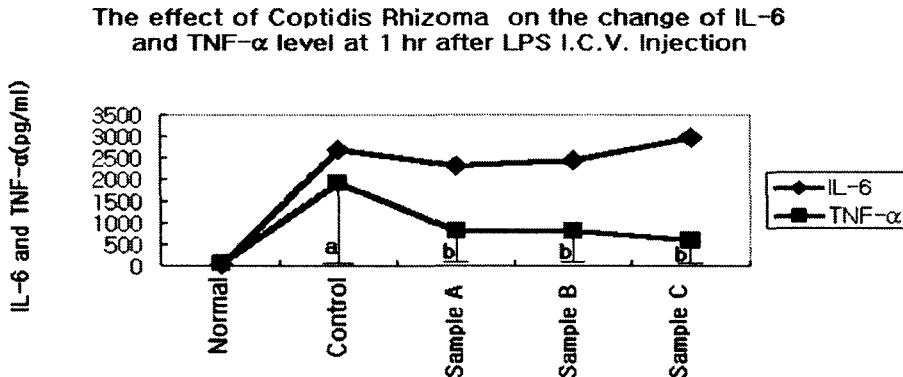
Control : LPS I.C.V. and Normal Saline treated Group

Sample A : Coptidis Rhizoma(0.5g/kg) treated Group

Sample B : Coptidis Rhizoma(1.0g/kg) treated Group

Sample C : Coptidis Rhizoma(3.0g/kg) treated Group

Fig. 7. The effect of Coptidis Rhizoma(0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg) on the change of IL-6 and TNF- α level at 1 hr after LPS(100ng/mouse) I.C.V. Injection(n=6), All Sample Groups(0.5g/kg, 1.0g/kg, and 3.0g/kg) to which Coptidis Rhizoma was administered showed significant lower TNF- α plasma level at 1 hr than Control Group.(P<0.001)



a : Statistically significant as compared with Normal Group

(a : P<0.001)

b : Statistically significant as compared with Control Group

(b : P<0.001)

Normal Saline and Coptidis Rhizoma was administered intragastrically 1 hr prior to LPS I.C.V. Injection

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

Normal : Normal Saline treated Group

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

Sample A : Coptidis Rhizoma(0.5g/kg) treated Group

Sample B : Coptidis Rhizoma(1.0g/kg) treated Group

Sample C : Coptidis Rhizoma(3.0g/kg) treated Group

IV. 고 찰

黃連은 毛茛科(미나리아재비과 : Ranunculaceae)에 속한 多年生 草本인 黃連(Coptidis Rhizoma)의 根莖을 乾燥한 것으로, 가을에 採取하여 鬚根과 泥沙를 제거하고 건조한 것으로, 性味가 大苦 大寒 無毒하며, 心, 肝, 胃, 大腸經에 들어가 清熱燥濕, 清熱除煩, 瀉火解毒시키는 효능이 있어 心火가 亢盛하여 煩熱神昏하고 또는 心煩不眠하며, 血熱妄行으로 인한 吐血衄血을 治療하고, 腸胃에 濕熱로 인한 痞滿嘔

吐와 寫痢腹痛 등 證을 治療하는 要藥이 된다.

本品은 心火를 寫하고 熱毒을 解毒시키므로 外科의 疔毒癰腫과 口舌赤爛 등 증상에 常用하며, 內服과 外用을 莫論하고 良好한 효과가¹⁾ 있으며 특히 上焦의 熱을 寫하여 實熱에 의한 喘息 및 염증에 응용할 수 있다.^{17,18)} 東醫寶鑑에는 明目 止淚하고 肝을 清정하며 熱毒을 除하여 赤眼이 昏痛한 것에 點하고 腹瀉의 膿血을 下痢하는 것을 다스리고 消渴을 그치며 驚悸와 煩燥를 다스리고 膽을 더하며 口瘡를 고치며 소아의 疳蟲을 죽인다고¹⁹⁾ 하였다.

黃連은 항균 및 소염작용이 있으며 주

성분은 isoquinoline계 alkaloid인 berberine(黃連, 黃栢 및 히드라스티스-Hidrastis canadensis 등과 그 동속 식물에 함유되어 있음)으로 그람 양성 및 음성균과 곰팡이, 원충류 등에 대한 광범위한 항균 작용을 가지며 항염증작용, 지혈작용, 혈압강하작용, 高味建胃작용, 淨腸.止瀉작용, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있어 피부염증, 화농증, 구내염, 비출혈, 기관지염, 외음과 질강의 염증성 질환 등에 내복과 외용으로 사용된다.^{2-5,16,20)}

항균 효과로는 항균 spectrum이 비교적 넓고 赤痢菌에 대한 항균 작용이 가장 강하여 sulfa제보다 우수하며 황색 포도구균, typhus균, 폐렴상구균, 대장균, 뇌막염구균, 백일해균, diphtheria균, 연쇄구균, 人型結核菌도 뚜렷하게 억제한다. 그밖에 in vitro에서 berberine 煎汁은 spirochaeta를 강력히 억제한다.

항virus로는 여러 가지 influenza virus, new castle virus를 억제한다. 抗原虫 효과로는 시험관내와 생체내에서 煎汁. berberine에는 항amoeba작용이 있으므로 amoeba 赤痢에도 사용한다. 抗真菌 작용은 黃芩과 유사한데 효력은 약간 약하다. 煎液. 水浸液 모두 다 피부진균에 대하여 넓은 억제작용이 있다.²¹⁾

병인균의 대표적 내독소인 Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성 세균의 막구조를 형성하며 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있고⁶⁾, 김⁷⁾의 실험을 보면 뇌의 정상세포에 염증을 유발하는 매개물로 LPS를 사용하였으며, 주⁸⁾ 등의 실험에서도 조직 손상에 따른 염증 반응에 깊이 관여하는 Interleukin-6(IL-6) 생성에 LPS를 이용하여 섬유모세포에서 LPS에 의한

IL-6생성의 신호전달과정이 G단백질과 연관된 수용체를 통하여 일어나고 이차 전달자로 칼슘을 통한 경로가 중요한 역할을 담당함을 밝힌 바 있다.

LPS는 그람음성 세균의 세포외벽에 존재하며, 세균이 성장하는 동안이나 세포분해의 결과로 세포벽에서 떨어져 나오며²²⁾, 세균이 죽은 후에도 강력한 염증 매개물질로 작용하여 다양한 염증세포 및 조직구성세포들에서 생산되는 가용성 매개물을 총칭한 Cytokine의 생산을 촉진한다고 알려져 있어 염증 반응을 연구하는 실험 모델로 확립되어 있다.⁹⁻¹⁰⁾

LPS는 O-specific polysaccharide, common core, lipid A 의 3부분으로 구성되어 있으며²³⁾, 독성은 주로 lipid A 에 의해 나타나고, lipid A 의 구조가 변화되면 발열성, 대식세포 활성화, 그리고 보체 활성화 등의 독성이 사라진다는 연구도 있다.^{24,25)} LPS는 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, complement 3a와 5a, IL-1, TNF- α 등의 다양한 염증 매개 물질을 활성화시키며, 이로 인해 혈관투과성 증가, 백혈구의 margination, 백혈구의 chemotaxis, collagenase 분비, 발열, lymphocyte 활성화 등을 야기하여 골 흡수와 만성 육아종의 형성과 같은 다양한 생물학적 효과를 나타내게 된다.²⁶⁾

Cytokine은 25kD 정도의 작은 단백질로, 특이적 항원, 비특이적 항원, 또는 비특이적인 수용성 자극 물질(예, 내독소, 다른 Cytokine)과 상호 작용에 의해 단핵구와 림프구에서 분비되어¹⁹⁾ 특이한 수용체와 결합한 후 효과를 나타내게 되는데, 이는 다른 세포들에 대해서도 여러 작용을 일으키며, 또한 기능들이 서로 얽혀 있거

나 중복되어 있어 다른 Cytokine의 생성과 작용에도 영향을 미치게 된다.

주로 세균에 의해 활성화된 대식세포가 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, 그리고 TNF- α 를 분비하는데, TNF- α 는 주로 국소 염증 반응에 관여해서 염증 반응이 더 이상 퍼지는 작용을 막게 된다. TNF- α 는 IL-1의 분비를 유도하고, IL-1은 IL-6분비를 유도하여 결국 형성된 IL-6는 주로 간에서 급성 단백 물질의 생성을 유도하게 된다.

IL-1, IL-6 그리고 TNF- α 는 간에서 염증에 대한 급성기 반응을 유도하여 시상하부에 작용해 체온을 상승시키며, 근육과 지방 세포에 작용해 에너지 대사를 변화시켜 체온을 높이게 되는데, IL-6는 림파구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키고, TNF- α 는 혈관 내피세포를 활성화시켜 혈관 투과성을 높여 염증세포, 이미 형성된 Ig-G항체, 그리고 보체의 유입을 용이하게 하고 림파선으로 보체의 유입을 증가시키게 하는데, 이런 작용을 모두 미생물의 증식을 억제하고 특이면역을 효과적으로 작용하게 하여 인체내의 감염을 제거하는데 중요한 역할을 하게 된다.²⁷⁾

TNF- α 는 단핵세포나 대식 세포로부터 유리되어 다양한 면역학적 염증 현상을 야기하는 물질로 알려져 있으며 특히 파골 세포를 활성화시키고 조골 세포에 의한 골 형성을 억제하는 주요 물질로 보고되고 있다.^{28,29)}

염증 반응을 초래하는 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 Cytokine은 발열 효과, 행동 변화 유발, 그리고 식욕억제 등의 효과를 초래하며, IL-1, TNF- α 는 산화질소(Nitric oxide)의 분비를 유도하여 수면 등의 효과를 초래하고, IL-1, IL-6는 치매

(Alzheimer's disease)효과를 나타낸다. 또한 선천성 다운 증후군(Down's syndrome), 간질(epilepsy)과 기타 신경장애(다발성 경화증, 파킨슨씨 병), 그리고 후천성 면역 결핍증(AIDS)등에서도 뇌에서 특정 Cytokine 농도가 증가하였다.^{30,31)}

특정 Cytokine을 많이 함유하고 있는 대식세포와 중성 백혈구의 말초 면역 세포들은 인체 감염이나 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier)이 손상된 상황에서는 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier)을 통과해 중추신경계 뇌 조직 안으로 소량 유입되어 늦게나마 효과를 나타내는 것으로 사료되지만, 병태학적인 변화가 없는 정상적인 상황에서는 이러한 Cytokine이 중추신경계 뇌 조직 안으로 유입될 수 있는지에 대해선 많이 논란이 있어왔다.

대부분의 국소 뇌 손상이나 감염, 전신적인 조직 손상, 심지어는 정신적인 스트레스가 특정 Cytokine(IL-1, IL-6, TNF- α , 그리고 많은 성장 인자와 신경자극물질)의 분비를 초래하여, 뇌 척수액이나 뇌 조직에서 Cytokine 농도의 증가를 볼 수 있으며, 중추 신경계에서는 미세아교세포나 별아교세포의 신경아교세포(glia cell)에서 IL-1, IL-6, 그리고 TNF- α 등의 Cytokine 발현 증가를 보고한 바 있으며,³²⁾ 뇌 내피세포(endothelial cell)도 LPS나 IL-1자극 후나 바이러스 감염 후 또는 TNF- α 가 IL-6를 증가시키는 주요한 공급원이 된다.

Jirik FR등의 실험에서는 인체의 체대혈에서 추출된 내피세포를 LPS로 자극하여 각 Cytokine의 농도를 조사하였는데, IL-6의 분비가 IL-1, TNF- α , 그리고 TNF- β 등에 의해 증가되는 것을 확인하였고 LPS에 의해 자극된 IL-6의 상승을

polymyxin-B를 통해 억제할 수 있었다.³³⁾ 주⁸⁾ 등의 실험에서도 바이러스 감염, IL-1, TNF- α 등의 Cytokine이 IL-6의 생성을 직접적으로 유발시킨다고 하였다. 이 내용은 본 실험에서 黃連이 TNF- α 의 농도만 선택적으로 감소시킨 결과를 설명할 수 있겠다.

또한 Vedder H 등의 실험에서도 TNF- α 의 혈중 농도가 주로 120분경에 최고로 상승하였고, IL-6의 혈중 농도는 TNF- α 가 최고 상승한 시간 30분 후, 즉 150분경에 최고 혈중 농도를 보였는데, 이는 TNF- α 가 IL-6의 방출을 직접적으로 자극하는 것임을 시사해 준다고 하겠다.³⁴⁾

또한 시간 경과에 따른 변화를 살펴 보았을 때, LPS, 즉 내독소는 체온, IL-6, 그리고 cortisol의 혈중 농도를 상승시켰으며, cortisol의 경우는 IL-6에 의하여 자극되는 사실이 생체와 시험관 실험에서 밝혀졌다. 스트레스 호르몬의 일종인 cortisol은 LPS에 의해 자극된 후 생성되는 TNF- α 의 생합성 과정을 억제하는 것으로 관찰되었다.³⁴⁾

IL-1은 I.C.V.나 I.V.로 Injection하는 경우 혈장의 IL-6농도에는 유의한 차이가 없다는 사실이 증명된 바 있어, Gottschall PE 등은 LPS를 I.C.V.와 I.V.로 Injection하여서 IL-1과 IL-6의 혈장 농도를 각각 비교하였는데, IL-1의 경우는 LPS를 I.C.V.나 I.V. Injection한 경우 혈장 농도의 차이가 없었으나, IL-6의 경우에는 LPS를 I.V. Injection한 경우가 I.C.V. Injection한 경우보다 더 IL-6 level을 상승시켰다. TNF- α 는 보통 IL-1의 분비를 자극하고 이는 IL-6의 분비를 유도하는데, 이 실험에서는 LPS를 국소적인 I.C.V.로 투여하여

중추 신경손상을 일으켜 전신적인 IL-6농도 변화에 주는 영향을 조사하였으며, 또한 결과적으로 중추 신경계에서는 IL-6의 분비가 일반적인 신호 전달 체계가 아닌, 다른 신호 전달 경로를 통해서 유도된다는 사실을 유추해 볼 수 있었다.¹⁸⁾

黃連에 관련된 연구 보고로는 金¹⁴⁾ 등은 五味子和 黃連이 염증과 알레르기 반응에 관여하는 IL-6, IL-16, GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)의 발현 억제에 대한 효과를 실험하였고, 朴¹⁵⁾ 등은 陰戶病의 外用藥으로 응용되는 黃芩, 黃連, 大黃의 항균과 소염 효과를 관찰하였으며, 李¹⁶⁾ 등은 黃連과 甘草 共沈物의 항균 효과와 생체이용률에 대한 연구를 보고하였고, 송²⁾ 등은 黃連이 LPS를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향을 관찰하였다.

이에 본 실험에서는 염증 유발물질인 LPS를 뇌실내에 주입(Intracerebroventricular Injection)하고 Cytokine중 전신 염증 반응으로 중요한 기능을 담당하는 매개물인 Interleukin-6(IL-6)와 Tumor necrosis factor(TNF- α)의 측정변화를 비교함으로써 淸熱解毒의 聖藥인 黃連의 항 염증 효과를 알아보려고 하였다.

黃連을 0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg을 경구 투여하여 1시간 후에 LPS(100ng/mouse)를 뇌실내로 주입하고 다시 1시간 후 IL-6, TNF- α 농도 변화를 관찰하였다. 먼저, 黃連 0.5g/kg, 1.0g/kg을 경구 투여한 군에서 IL-6농도 변화는 약간의 감소만을 보여 유의성이 없었으며, 黃連3.0g/kg을 경구 투여한 군에서는 오히려 IL-6농도가 대조군보다 더 증가하여 역시 유의성이 없었다. 반면에 黃連 0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg을

경구 투여한 실험군에서 TNF- α 농도 변화는 유의성이 있게 감소하였다.($P < 0.001$)

본 실험에서 LPS(100ng/mouse)를 각각 뇌실내로 주입한 후 시간 경과에 따른 혈중 IL-6와 TNF- α 의 농도 변화를 측정하였을 때, 각각 주입 후 1시간이 경과한 경우에 유의성 있게 확실히 증가하여 ($P < 0.001$) IL-6와 TNF- α 의 농도 상승시간이 거의 일치했는데, 이는 hCG(human chorionic gonadotropin)의 방출과 함께 IL-6와 TNF- α 간의 동시 상호작용으로 인한 결과로서 Spangelo 등의 실험 결과와 비슷한 결과이다.³⁵⁾

본 실험 결과는 대식세포의 배양을 통해 Oxpentifylline이 대식세포에서의 IL-6의 생성은 억제하지 못했으나, TNF- α 의 생성은 억제하는 결과를 보여준 Zabel P 등의 실험과도 비슷하다. 이는 LPS에 의해 유도된 IL-6의 생성에는 선행하는 TNF- α 와는 독립적으로 분비 작용이 이루어지는 것으로 추측해 볼 수 있고, Oxpentifylline이 黃連과 비슷하게 선택적으로 TNF- α 의 생성을 억제한 것으로 생각할 수 있다.³⁶⁾ 향후 연구에서는 LPS와 黃連의 양을 각각 높였을 때 IL-6와 TNF- α 의 농도 변화를 측정해 보는 것이 필요하리라 사료된다.

LPS를 뇌실내로 주입하고 1시간 후 黃連을 경구 투여했을 경우 IL-6 농도 변화에 대한 후속 연구가 필요하며, TNF- α 의 농도 변화에 대해서는 黃連의 투여 용량(0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg)에 각각 다른 결과를 나타내었는데 이는 약물의 투여 용량이 효능의 발현에 상당한 영향을 준다는 것으로 추론할 수 있다. 따라서 이후 약물의 투여 용량에 따른 효능 발현의 차이 또

는 변화에 대한 연구도 후속 되어야 한다고 사료된다.

본 실험은 黃連에 의한 IL-6와 TNF- α 의 생산에만 국한된 실험으로 다른 한약재와 여러 가지 염증 매개 물질에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

결론적으로 본 실험을 요약하면 LPS를 뇌실내로 주입하여 혈중 IL-6와 TNF- α 의 농도가 증가하도록 염증 반응을 일으켜 黃連의 항 염증 효과를 알아본 결과 TNF- α 가 IL-6생성에 직접적으로 영향을 주는 것과 LPS에 의한 두 Cytokine의 신호전달과정이 다른 것을 감안할때 黃連은 선택적으로 TNF- α 의 농도 감소에 영향을 미쳐 염증 생성 억제에 유효함으로 사료되며, 이 결과는 이전의 여러 실험과 비슷한 항 염증 효과에 유효함을 나타내었다.

V. 결 론

黃連의 항 염증 효과를 살피기 위해 LPS를 뇌실내로 주입한 생쥐의 혈중 IL-6, TNF- α 의 농도 변화를 관찰하여 다음과 같은 효과를 얻었다.

1. 농도별로 LPS를 뇌실내에 주입했을 때, 혈중 IL-6의 농도가 LPS의 모든 농도에서 정상군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며, LPS(100ng/mouse)를 뇌실내로 주입한 후 시간 경과에 따른 혈중 IL-6의 농도 변화는 1시간이 경과했을 때, 정상군에 비하여 가장 유의성 있는 증가를 나타내었다.($P < 0.001$)
2. LPS를 뇌실내로 주입하기 1시간 전에 黃連 0.5g/kg, 1.0g/kg을 경구 투여한

군의 혈중 IL-6농도를 측정 한 결과, 대조군에 비해 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았고 황련 3.0g/kg을 경구 투여한 군의 혈중 IL-6의 농도는 대조군에 비해 오히려 증가하였다.

3. 농도별로 LPS를 뇌실내에 주입했을 때, 혈중 TNF- α 의 농도가 LPS의 모든 농도에서 정상군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며, LPS(100ng/mouse)를 뇌실내로 주입한 후 시간 경과에 따른 혈중 TNF- α 의 농도 변화는 1시간이 경과했을 때, 정상군에 비하여 가장 유의성 있는 증가를 나타내었다.($P < 0.001$)
4. LPS를 뇌실내로 주입하기 1시간 전에 黃連 0.5g/kg, 1.0g/kg, 3.0g/kg을 경구 투여한 군의 혈중 TNF- α 농도를 측정 한 결과, 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. ($P < 0.001$)

이상과 같은 실험 결과로 볼 때, 黃連이 LPS를 뇌실내로 주입했을 때 선택적으로 혈중 TNF- α 농도를 감소시킴으로 항염증 효과를 나타냈는데 이는 TNF- α 가 IL-6 생성에 직접적으로 영향을 주는 것과 LPS에 의한 두 Cytokine의 신호전달과정이 다른 것으로 설명할 수 있겠다. 향후 黃連의 항염증 작용에 대한 계속된 연구와 변화에 대한 후속 연구 및 약물의 투여용량에 따른 효능 변화에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 전국 한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1975:501-3.
2. 송기범. 황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6생산에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1996.
3. 內炭精一. berberine의 약리작용 지견보유. 日藥理誌. 1957;53:63-74.
4. 山原條二. berberine형 알칼로이드의 행동약리학적 연구(제1판), 황련 및 그의 함유성분의 중추억제작용. 日藥理誌. 1976;72:899-908.
5. Fukuda H, Watanabe K, Kudo Y. Some observations on the cardiovascular Effects of 9-substituted berberine. Chem Pharm Bull. 1970;18:1299-1304.
6. Morrison DC, Cuncan Jr JL, Goodman SA. In vitro biological activities of endotoxin. In Bacterial Endotoxin. Alan R.Liss Inc. 1985:81-98.
7. 金兌憲. 洗心湯에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質의 分泌 抑制 效果. 圓光大學校 韓醫學專門大學院. 2000.
8. 주재학, 기신영, 문승혁, 정성환, 김현태, 어수택, 김응훈, 박춘식. 섬유모세포에서 내독소 자극에 따른 Interleukin-6 생성의 신호전달과정. 대한내과학회지. 1998;54(3):415-422.
9. Lindemann RA, Economou JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans

- and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Periodontol.* 1988;59:728-730.
10. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes : Activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988;67:1131-1135.
 11. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption : Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol.* 1991;15:239-250.
 12. 강병철. 머크 매뉴얼. 서울: 도서출판 한우리. 2002:1070, 1168.
 13. Dinarello CA. Biology of interleukin-1. *FASEB J.* 1988;2:108-115.
 14. 金東鎰. 吳味子, 黃連이 BEAS-2B 人間 氣管支 上皮細胞의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 影響. 慶熙大學敎 大學院. 2001.
 15. 朴賢淑. 陰戶病의 外用藥으로 응용되는 黃芩, 黃連, 및 大黃의 抗菌과 消炎效果. 慶熙大學校 大學院. 1995.
 16. 李南禧. 黃連과 甘草 共沈物의 抗菌效果와 生體利用率에 관한 研究. 全州又石大學敎 大學院. 1995.
 17. 李龍城. 經藥分類典. 서울: 壽文社. 1979:28, 62.
 18. Gottschall PE, Komaki G. Increased circulating interleukin-1 and interleukin-6 after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide. *Neuroendocrinology.* 1992;56(6): 935-8.
 19. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1951:1185, 1951.
 20. A. H. Amin, K. M. abbasi T. V. subbaiah. Berberine Sulfate, antimicrobial activity, bioassay and mode of action. *Can. J. Microbiol.* 1976;15:1067-1076, 1976.
 21. 李尙仁, 安德均, 辛民教. 漢藥臨床應用. 서울: 成輔社. 1978:132-3.
 22. Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin shedding by enterobacteria : free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Inf & Immun.* 1991;59:689-695.
 23. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Seydel U, Di Padova F, et al.. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994;8(2):217-225.
 24. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxin and disease mechanisms. *Ann Rev Med.* 1987;38:417-432.
 25. Niwa M, Milner KC, Ribl E, Rudbach JA. Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J Bacteriol.* 1969;97:1069-1077.
 26. Pitts DI, Williams BL, Morton TH

- Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod.* 1982;8(1):10-18.
27. Janeway, Charles A, editorts. *Immunobiology*. 5th ed.. Churchill-Livingstone. 2001:3-80.
28. Le J, VilceK J. Tumor necrosis factor and interleukin 1. Cytokines with multipul overlapping biological activities. *Laboratory Investigation*. 1987;56:234-248.
29. Nguyen L, Dewhirst FE, HauschkaPA, Stashenko P. Interleukin 1 β stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine Cytokine Res* 10. 1990;15-21.
30. Nancy J. Rothwell, Giamal Luheshi, and Sylvie Toulmond. Cytokine and Their Receptors in theCentral Nervous System : Physiology, Pharmacology and Pathology. *Pharmacol. Ther.* 1996;69(2):85-95.
31. Rothwell NJ, Busbridge NJ, Lefeuve RA, Hardwick AJ, Gauldie J, Hopkins SJ. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69(10):1465-9.
32. Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes., *Neuroimmunol*. 1990;30(2-3):201-12.
33. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(1):144-7.
34. Vedder H, Schreiber W, Yassouridis A, Gudewill S, Galanos C, Pollmacher T. Dose-dependence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) effects on peak response and time course of the immune-endocrine host response in humans, *Inflamm Res*. 1999;48(2):67-74.
35. Spangelo BL, Judd AM, Call GB, Zurwalt J, Gorospe WC. Role of the cytokines in the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes. *Neuroimmunomodulation*, 1995;2:299-312.
36. Zabel P, Wolter DT, Schonharting MM, Schade UF. Oxpentifylline in endotoxaemia, *Lancet*. 1989;2(8678-8679):1474-7.