

단천환가감이 중풍 환자의 말초 단핵구에서 LPS 및 DFX 유도성 사이토카인 생성에 미치는 영향

이성근 · 이기상*

원광대학교 산본한방병원 내과

Effects of *Danchunwhangagam* on LPS or DFX-induced Cytokine Production in Peripheral Mononuclear Cells of Cerebral Infarction Patients

Seoung Geun Lee, Key Sang Lee*

Department of International Medicine of Oriental Medicine Hospital, Wonkwang University

This study was to investigate the effect of *Danchunwhangagam*(DCWGG) extract on the production of proinflammatory cytokines in peripheral mononuclear cells (PBMCs) from Cerebral infarction(CI) patients. Methods: We examined that the inhibition rate of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 productions in DCWGG pretreatment PBMCs culture supernatant in the lipopolysaccharide(LPS)- or desferrioxamine(DFX)-treated cells compared to unstimulated cells. DCWGG inhibited the productions of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 induced by LPS in a dose-dependent manner. DCWGG might have regulatory effects on LPS or DFX-induced cytokine production, which might explain its beneficial effect in the treatment of CI.

Key words : *Danchunwhangagam*, Cerebral Infarction, Cytokine

서 론

단천환은 단삼과 천궁으로 구성되어 활혈거어, 행기지통 등의 효능이 있어 어혈로 인한 각종 질환과 동맥경화증, 대동맥증, 허혈성 뇌혈관 질환 및 심혈관 질환 등의 예방 및 치료제로 활용하고 있는 처방이다¹⁾. 단천환가감은 이러한 단천환에 활혈통락하는 계혈등, 통경탁하는 구인, 해기를 통해 관상 동맥을 확장시키는 효과가 있는 갈근을 가미하여 단삼, 천궁, 계혈등, 구인, 갈근 5종의 약제로 구성된 처방이다.

지난 10여년간 분석 실험 및 증거 해부학의 발달은 뇌손상의 기전에 있어 Cytokine의 중요성을 지적해왔으며 염증 반응이 뇌경색의 병리 기전에 중요한 역할을 하는 증거들이 속속 발견되고 있다. 뇌경색에서의 병리 기전 중 나타나는 대부분의 염증 반응은 proinflammatory cytokine을 매개하여 나타난다²⁻⁴⁾. Proinflammatory cytokine은 뇌손상이 확대되면서 나타나는 지

혈 반응과 면역학적 불균형에서 나타나며 이러한 proinflammatory cytokine 중 중앙 과사 세포 알파(TNF- α)의 분비가 증가하게 된다^{5,6)}. TNF- α 는 Nitric Oxide와 다른 염증 매개체의 합성을 자극하며, 만성적, 지연성으로 병리적으로 반응성을 과민하게 하는 주요 염증성 사이토카인이다⁷⁾. Interleukin(IL)-1은 설치류에 대한 실험 결과, 뇌허혈, 흥분성, 사고성 뇌손상에 의한 신경 퇴화를 유도하는 것으로 밝혀진 proinflammatory cytokine이다^{8,9)}. IL-1 α , IL-1 β 은 뇌허혈에 노출된 설치류의 뇌에서 빠르게 생성 된다¹⁰⁻¹²⁾. IL-6은 염증과 관계된 주요한 사이토카인 중 하나로, 중추 신경계의 여러 세포들로부터 분비되고¹³⁾, 급성 허혈성 뇌졸중 환자에서 발견되며, IL-6레벨이 높을수록 심각한 신경학적 결손이 발견 된다¹⁴⁾. 단핵구 세포에 의한 염증성 사이토카인의 갑작스러운 생성물과 혈청내 사이토카인의 레벨은 뇌경색 환자에서 명백하게 증가 된다. IL-8은 뇌의 재관류의 중추적인 매개체로서 뇌조직(brain tissue)에서 증가된다. Anti IL-8 antibody의 중화 반응은 항체 컨트롤과 대조군 토끼 사이의 비교군에서 명백하게 뇌부종과 뇌경색의 사이즈를 줄인다¹⁵⁾. 이러한 결과는 IL-8이 손상에 관여하는 새로운 target 이라는 것을 의미한다. 철을 킬레이트화 하는 화합물인 DFX

* 교신저자 : 이기상, 경기도 군포시 산본동 1126-1 원광대 산본 한방병원

· E-mail : keysang@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2670

· 접수 : 2006/07/13 · 수정 : 2006/07/28 · 채택 : 2006/08/14

(desferrioxamine)는 유전 전사 요소와 유전 형질에 기인한 저산소증(hypoxia)에 영향을 줄 수 있다. 몇몇 조사자들이 DFX가 특정 염증성 매개체를 조절하거나 염증 진행 과정을 조절할 수 있다고 보고하고 있다^{16,17}.

이에 저자는 cytokine에 의한 염증 반응의 활성화에 대한 연구를 통해 단천환가감이 뇌경색 환자의 말초단핵구에서 세포 활성 물질 생성의 변화에 관여한다는 사실을 입증하기 위하여 LPS 및 DFX에 의해 자극된 뇌경색 환자의 말초 혈액 단핵구 세포에서 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8의 생산에 미치는 단천환가감의 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

Ficoll-Hypaque, LPS, DFX, avidin-peroxidase, and 2-AZINO-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) tablets substrate(ABTS)의 시약은 Sigma사로부터 구입하였다. 세포배양액 RPMI 1640, penicillin G, streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Anti-human TNF- α , IL-1 α , IL-1 β antibody(Ab), biotinylated anti-human TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and recombinant human TNF- α , IL-1 α , IL-1 β 은 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Anti-human IL-6, IL-8, biotinylated anti-human IL-6, IL-8, recombinant (r) human IL-6, IL-8 Pharmingen(Sandiego, CA, USA)로부터 구입하였다.

2. 실험 대상(뇌경색 환자)

2004년 7월부터 2004년 10월까지 원광대학교 의과대학 신경과에서 뇌경색을 진단 받은 환자를 대상으로 하였다. 뇌경색은 CT, MRI 소견 및 임상 증상(편마비, 어둔, 안면마비 등)을 통해 확진하였다. 사이토카인 정량을 위해, 12명의 환자(남자 5명, 여자 7명, 55~70세)에서 혈액을 채취 하였다.

3. 단천환가감의 준비

단천환가감은 단삼, 천궁, 계혈등, 구인, 갈근의 5종 약제로 구성된 처방이다. 약제는 원광대학교 한의과대학 익산 한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다. 실험에 사용할 단천환가감의 추출액 준비를 위해 처방에 따라 준비된 각각의 한약재를 증류수에 넣고 3시간 정도 끓인 뒤 여과지로 여과하여 실험에 사용하기까지 4°C에 보관하였다. 산출된 추출액의 농도는 10.3%(w/w)이었다. 사용된 한약제의 용량은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. The ratio of the component in DCWGG.

Componentis	Amounts (g)
1. <i>Radix salviae miltiorrhiza</i> (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bung)	30
2. <i>Rhizoma chuanxion</i> (<i>Lingustieum chuangxiong</i> Hort)	15
3. <i>Caulis spatholobi</i> (<i>Spatholobus suberectus</i> Dun)	30
4. <i>Lumbricus</i> (<i>Lumbricidae</i>)	10
5. <i>Benth, Radix puerariae</i> (<i>Pueraria thunbergiana</i> (Sieb. Et Zucc.))	15

4. 말초혈액 단구 세포의 분리 및 배양

Ficoll-gradient centrifugation을 이용해 해파린 처리된 뇌경색 환자의 정맥 혈액으로부터 PBMCs를 분리하였다. 분리된 세포는 phosphate-buffered saline(PBS)에 3번 washing한 후 2mM L-glutamin, 100U/ml penicillin G, 100 μ l/ml streptomycin, 10% FBS를 넣어서 준비한 RPMI 1640 배양액에 30분간 56°C에서 배양하였다. PBMCs는 30ml falcon tube에서 세포 현탁액을 일정 농도(3×10^6 cells/ml)로 맞춘 다음 100 μ l 씩 4-well plate에 옮겨 담고 24시간 동안 5% CO₂, 95% humidity(37°C)에서 배양한 후 LPS 및 DFX가 각각 포함된 군과 포함되지 않은 군의 세포의 상층액만을 각각 원심분리하여 얻고 이것을 정량하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

5. MTT Assay

세포 생존율은 MTT assay에 의해 결정되었다. 500 μ l의 PBMCs의 세포 현탁액 (3×10^5 cells)을 각각의 농도의 단천환가감을 처리한 후 24시간 동안 4-well plate에 배양한 뒤 50 μ l의 MTT 용액(5mg/ml)을 첨가하여 다시 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. Washing하여 상층의 부유물을 제거하고 용해되지 않은 formazan 생산물을 DMSO에 용해시켰다. 그후 96-well plates의 광학적 밀도를 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader를 통해 540nm 파장에서 측정하였다. 비교군의 formazan 광학 밀도는 100% 생존율로서 설정되었다.

6. Cytokines Assay

ELISA를 통한 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8의 검출을 위해 anti-human TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 monoclonal antibodies(1.0 μ g/ml)로 100 μ l씩 코팅된 96-well plate를 pH 7.4, 4°C에서 하룻밤 배양하였다. 다음날 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS로 washing한 다음 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃가 포함된 PBS로 1시간 동안 blocking하였다. plate를 washing하고, sample이나 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 standards를 추가하여 37°C에서 2시간 배양하고, 다시 washing한 후 biotinylated anti-human TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8을 각각 0.2 μ g/ml 씩 추가하여 37°C에서 다시 2시간 배양한다. 접시를 씻은 후 avidin-peroxidase를 추가하여 37°C에서 20분 배양한 후 washing하고 발색하는 기질 ABTS를 첨가하고 색깔이 나타나면 반응을 멈춘 다음 405nm 파장을 사용하여 automated microplate ELISA reader에서 흡광도를 측정하였다.

7. HPLC Analysis

HPLC system은 pump(Waters Assoc., USA: 501 HPLC pump), a 2996 PDA detector(Water Assoc., USA: 2996 PDA detector), an autosampler(Water Assoc., USA: 746 computing integrator)로 구성되었다. YMC-Pack ODS-AQ 303 column(4.6mmx250nm, 5 μ m) 2695 을 사용하였다. Buffer(25mM phosphoric acid, pH 2.25): Acetonitrile(80:20)를 mobile phase (이동상)으로 썼다. 각 peak는 201nm에서 측정하였으며

Sensitivity는 1.0 AUFs에서 맞췄다. injection volume은 20, land flow rate는 1.0 이었다. 표준 검액은 증류수(10g/100)에 용해하여 준비하였다. 검액은 0.45L membrane filter를 통해 filtering 하여 HPLC로 분석하였다.

8. 통계 분석

각각의 data들은 같은 조건의 다른 실험 평균값±SEM을 의미한다. Students t-test는 그룹간의 통계적 비교를 위해 사용했으며 결과는 P값이 0.05 이하인 것만 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 세포 생존율에 대한 단천환가감의 효과

먼저 MTT assay를 이용하여 말초혈액단핵구의 생존율에 대한 단천환가감의 효과를 시험하였다. 세포는 각 0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml 농도의 단천환가감으로 30분간 처리한 후, 각각 24시간 동안 LPS와 DFX로 자극하였다. LPS와 DFX로 처리된 세포 생존율은 대조군(100.0±5.4%)에 비교하여 각각 95.36±4.6%과 94.36±2.99%로 감소되었으나 단천환가감(0.01-1mg/ml)은 각각의 상황에서 세포 생존율에 영향을 주지 않았으며 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구에 독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

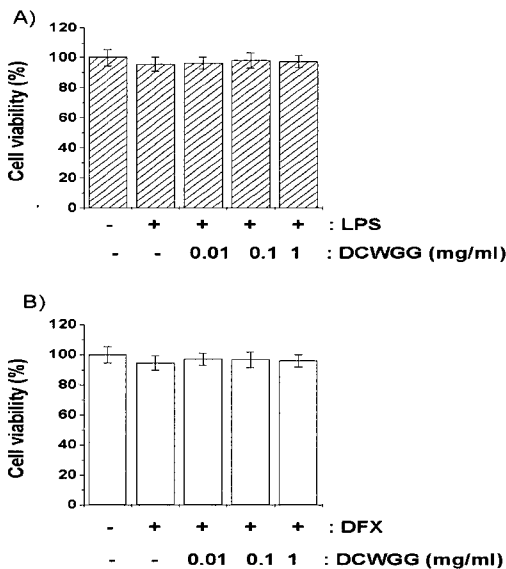


Fig. 1. Effects of DCWGG on the cell viability in PBMC from CI patients. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay for 24h incubation after stimulation of LPS(1µg/ml) or DFX(100µM) in the absence or presence of DCWGG(0.01-1mg/ml). The percentage of viable cells was over 94%. Data represent mean ± SEM of six independent experiments.

2. LPS 및 DFX로 유발된 TNF-α 생성물에 대한 단천환가감의 효과

TNF-α 생성물에 대한 단천환가감의 조절 능력을 평가하기 위해 뇌경색 환자의 말초 단핵구에 단천환가감을 30분간 전처리

한 후 각각 24시간 동안 LPS와 DFX로 처리하고 상층액을 ELISA 분석법을 이용해 분석하였다. 저자는 단천환가감의 양에 따라 LPS에 의해 증가된 TNF-α의 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 2A), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 50.32±2.5%이다(P<0.05). 또한 단천환가감의 양에 따라 DFX에 의해 증가된 TNF-α의 생성도 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 2B), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 57.02±2.5%이다(P<0.05).

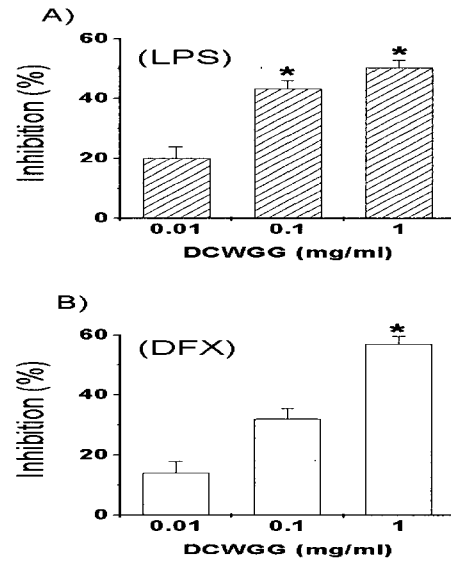


Fig. 2. Effects of DCWGG on LPS- or DFX-induced TNF-α production in PBMC from CI patients. 3×10⁵ PBMCs were pretreated with DCWGG(0.01-1mg/ml) for 30min, and then stimulated with LPS(1µg/ml) or DFX(100µM) for 24h. TNF-α concentration was measured in cell supernatants using the ELISA method. All data represent the mean ± SEM of four independent experiments. *P < 0.05, significantly different from the LPS or DFX-stimulated cells(non-treated with DCWGG).

3. LPS 및 DFX로 유발된 IL-1α 생성물에 대한 단천환가감의 효과

IL-1α 생성물에 대한 단천환가감의 조절 능력을 평가하기 위해 뇌경색 환자의 말초 단핵구에 단천환가감을 30분간 전처리한 후 각각 24시간 동안 LPS와 DFX로 처리한 후 상층액을 ELISA 분석법을 이용해 분석하였다. 저자는 단천환가감의 양에 따라 LPS에 의해 증가된 IL-1α의 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 3A), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 42.02±3.5%이다(P<0.05). 또한 단천환가감의 양에 따라 DFX에 의해 증가된 IL-1α의 생성도 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 3B), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 38.12±3.2%이다(P<0.05).

4. LPS 및 DFX로 유발된 IL-1β 생성물에 대한 단천환가감의 효과

단천환가감이 LPS와 DFX에 의해 유발된 IL-1β 생성물에 대한 조절능력이 있는지 여부를 확인하기 위해, 뇌경색 환자의 말초단핵구에 단천환가감을 30분간 전처리한 후 각각 24시간 동안 LPS와 DFX로 처리하였다. 상층액을 ELISA 분석법을 이용해 분석하였다. 저자는 단천환가감의 양에 따라 LPS에 의해 증가된 IL-1β의 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 4A), 최대 억제

율은 1mg/ml에서 보인 43.02±2.7%이다(P<0.05). 또한 단천환가감의 양에 따라 DFX에 의해 증가된 IL-1β의 생성도 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 4B), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 50.02±3.2%이다(P<0.05).

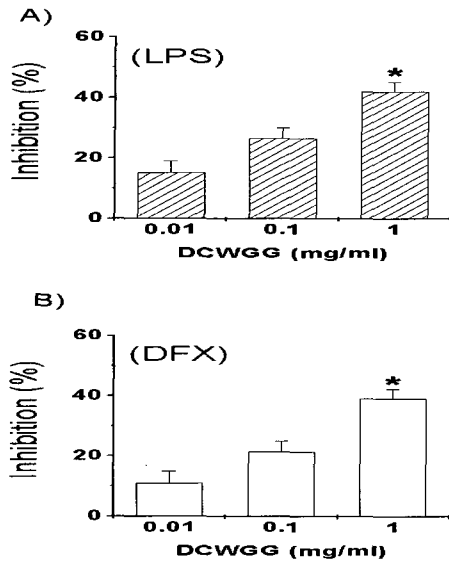


Fig. 3. Effects of DCWGG on LPS or DFX Induced IL-1α Production in PBMC from CI patients. 3×10⁵ PBMCs were pretreated with DCWGG(0.01-1mg/ml) for 30min, and then stimulated with LPS(1μg/ml) or DFX(100μM) for 24h. IL-1α concentration was measured in cell supernatants using the ELISA method. All data represent the mean ± SEM of four independent experiments. *P < 0.05, significantly different from the LPS or DFX-stimulated cells(non-treated with DCWGG).

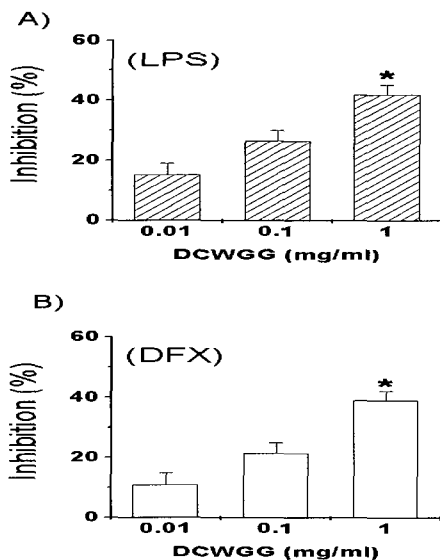


Fig. 4. Effects of DCWGG on LPS- or DFX-Induced IL-1β production in PBMC from CI patients. 3×10⁵ PBMCs were pretreated with DCWGG(0.01-1mg/ml) for 30 min, and then stimulated with LPS(1μg/ml) or DFX(100μM) for 24h. IL-1β concentration was measured in cell supernatants using the ELISA method. All data represent the mean ± SEM of four independent experiments. *P < 0.05, significantly different from the LPS or DFX-stimulated cells(non-treated with DCWGG).

5. LPS 및 DFX로 유발된 IL-6 생성물에 대한 단천환가감의 효과
단천환가감이 LPS와 DFX에 의해 유발된 IL-6 생성물에 대한 조절능력이 있는지 여부를 확인하기 위해, 뇌경색 환자의 말초 단핵구에 단천환가감을 30분간 전처리한 후 각각 24시간 동안 LPS 또는 DFX로 처리하고 상층액을 ELISA 분석법을 이용해 분석하였다. 저자는 단천환가감의 양에 따라 LPS에 의해 증가된 IL-6의 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 5A), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 50.02±3.1%이다(P<0.05). 또한 단천환가감의 양에 따라 DFX에 의해 증가된 IL-1β의 생성도 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 5B), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 48.12±3.2%이다(P<0.05).

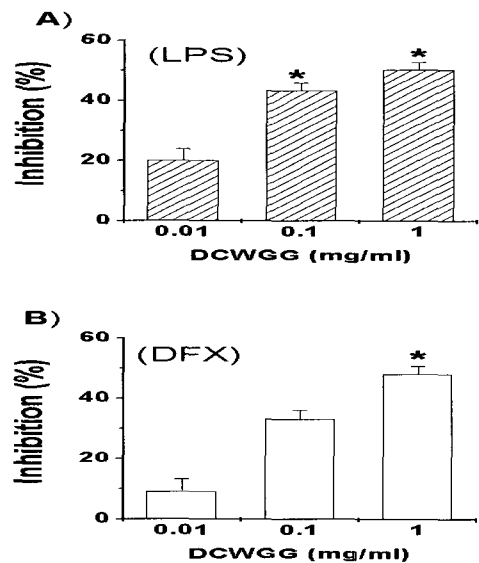


Fig. 5. Effects of DCWGG on LPS- or DFX-induced IL-6 production in PBMC from CI patients. 3×10⁵ PBMCs were pretreated with DCWGG(0.01-1mg/ml) for 30 min, and then stimulated with LPS(1μg/ml) or DFX(100μM) for 24h. IL-6 concentration was measured in cell supernatants using the ELISA method. All data represent the mean ± SEM of four independent experiments. *P < 0.05, significantly different from the LPS or DFX-stimulated cells(non-treated with DCWGG).

6. LPS 및 DFX로 유발된 IL-8 생성물에 대한 단천환가감의 효과
단천환가감이 LPS와 DFX에 의해 유발된 IL-8 생성물에 대한 조절능력이 있는지 여부를 확인하기 위해, 뇌경색 환자의 말초 단핵구에 단천환가감을 30분간 전처리한 후 24시간 동안 LPS 또는 DFX로 처리하고 상층액을 ELISA 분석법을 이용해 분석하였다. 저자는 단천환가감의 양에 따라 LPS에 의해 증가된 IL-8의 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 6A), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 46.11±3.1%이다(P<0.05). 또한 단천환가감의 양에 따라 DFX에 의해 증가된 IL-8의 생성도 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 6B), 최대 억제율은 1mg/ml에서 보인 50.12±3.2%이다(P<0.05).

7. 단천환가감의 주요 구성물의 특성

단천환가감의 구성은 HPLC로 분석하였다. 단천환가감의

Chromatogram은 Fig. 7과 같다. 이번 연구에서 주요 구성물의 Peak는 밝히지 않았다.

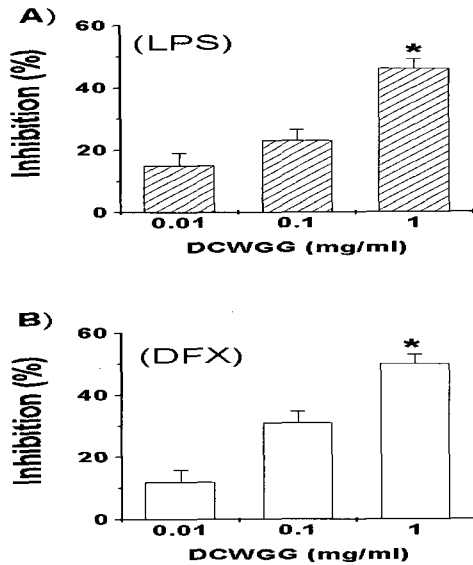


Fig. 6. Effects of DCWGG on LPS or DFX induced IL-8 Production in PBMC from CI patients. 3×10^5 PBMCs were pretreated with DCWGG(0.01-1mg/ml) for 30 min, and then stimulated with LPS(1 μ g/ml) or DFX(100 μ M) for 24h. IL-8 concentration was measured in cell supernatants using the ELISA method. All data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. *P < 0.05, significantly different from the LPS or DFX-stimulated cells(non-treated with DCWGG).



Fig. 7. HPLC chromatogram of the DCWGG. Standard solution of DCWGG was prepared by dissolving in distilled water(10 μ g/100ml). The injection volume was 20 μ l and the detection was made at 254nm. Fig. 7. HPLC chromatogram of the DCWGG.

고찰

단천환가감은 단삼과 천궁으로 구성된 단천환에 활혈통락하는 계혈등, 통경락하는 구인, 해기를 통해 관상 동맥을 확장시키는 효과가 있는 갈근을 가미한 처방으로, 각각의 약제의 약성은 다음과 같다. 단삼은 순형과(꿀풀과; Labiatae)에 속한 다년생초본인 단삼 및 동속 근연 식물의 근이다. 성미는 고, 미한, 무독하고, 심, 심포, 간 삼경에 작용하여 활혈조경, 행기, 거어, 양혈소응, 생신혈 등의 효능이 있으며, 혈체경폐, 혈허혈허, 징하적취, 심계실면, 혈사십번 등의 병증을 치료한다. 천궁은 산형과(미나리과; Umbelliferae)에 속한 다년생초본인 천궁 및 일천궁의 근경

이다. 성미는 신, 온, 무독하고 간, 담, 심포 삼경에 작용하여 활혈행기, 개울, 양신혈, 거풍지통 등의 효능이 있으며, 일절혈병, 기울혈울, 지체마비, 일절심통 등의 병증을 치료한다. 계혈등은 두과(콩과; leguminosae)에 속한 반원성관목인 밀화두, 흰담장아재비, 개과두덩굴 및 산계혈등의 등경이다. 성미는 고미감, 온 무독하고 간, 신 이경에 작용한다. 활혈, 서근통락 등의 효능이 있어 월경부조, 경폐, 통경, 지체마목탄탄, 풍습비통, 요슬산통 등의 병증을 치료한다. 구인은 거인과(큰지렁이과; Megascolecidae)에 속한 환절동물인 큰지렁이 및 정인과(지렁이과; Lumbricidae)에 속한 지렁이의 총체이다. 성미는 합, 한, 무독하고 간, 비, 방광 삼경에 작용한다. 청열식풍, 통경락, 평천, 이수 등의 효능이 있어 장열광조, 경간추축, 전간, 풍습열비, 풍한습비, 중풍반신불수, 골종통, 폐열천해, 효천, 백일해, 열결방광, 석립 등의 병증을 치료한다. 갈근은 두과(콩과; leguminosae)에 속한 다년생낙엽등본 식물인 칩 및 동속 근연 식물의 근이다. 성미는 감, 신, 량 무독하고 비위 이경에 작용하여 발표해기 투발마진, 생진지갈, 승양지사 등의 효능이 있어 감모, 두항강통, 마진투발불창, 열병번갈, 소갈, 습열사리, 비허구사 등의 병증을 치료 한다¹⁸⁾.

각 약제에 대한 연구로는 단삼의 고혈압 백서 혈압에 미치는 영향¹⁹⁾에 대한 보고 및 뇌혈류에 미치는 천궁의 효능에 대한 연구²⁰⁾가 있으며, 계혈등 추출물이 Jurkat 입과구의 세포고사 및 세포주기 억제에 미치는 효과²¹⁾에 대한 연구와 구인 엑기스 및 다당체 분획이 염증 및 면역 반응에 미치는 영향²²⁾ 및 갈근은 macrophage RAW264.7 cells에서 TNF- α 생성물을 억제하여 항염증효과²³⁾에 대한 보고가 있다. 단천환에 대한 연구로는 단천환이 Hydrogen peroxide에 의한 심근세포 독성에 미치는 영향¹⁾ 및 사람 뇌세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과에 대한 보고²⁴⁾가 있었으나 단천환가감에 대한 정확한 약리학적인 기전에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

최근 몇 년간 중풍 환자에서 Cytokines에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 급성 뇌경색 후 생검한 뇌에서 proinflammatory cytokine의 up-regulation을 통해 염증 반응이 유발된다²⁵⁾. 종양괴사세포 알파(TNF- α)는 단핵백혈구에 의해 활성화되는 proinflammatory 혹은 prothrombotic reaction의 촉발제로 알려져 있다. IL-1은 CI에 노출된 설치류의 뇌에서 빠른 속도로 생성되어 허혈 및 여러 형태의 손상을 강화한다. 몇몇 연구자들은 중추신경 허혈과 IL-1RA treatment 치료적 이점을 찾기 위해 TNF- α , IL-1의 작용을 연구하였다^{26,27)}. IL-6는 뇌허혈 이후 뇌에서의 다른 proinflammatory cytokine 급성기 활동을 조절하는 역할을 한다. 이러한 Cytokine들은 염증을 유발하며 병리생리학적인 효과를 나타낸다. 동물 및 사람 뇌세포 모두에서 뇌졸중 후 염증 반응 동안 chemokine이 생성된다. 백혈구를 활성화시키는 주요 chemokine으로 알려진 IL-8은 뇌경색의 진행에 관여하는 가능성 때문에 많은 연구가 진행^{28,29)}되었다.

이에 본 연구는 단천환가감이 뇌경색 환자에 있어서 LPS 및 DFX에 의해 자극된 말초혈액 단핵구세포에서 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 사이토카인 생성 억제에 효과가 있는지 밝히는 것을 목표로 하고 있으며, 실험 결과 단천환가감이 TNF- α , IL-1 α , IL-1

β, IL-6의 생성을 유의성 있게 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 단천환가감이 사이토카인 분비의 조절을 통해 항염증 반응에 강력한 효과가 있음을 보여주며, 아울러 단천환가감이 뇌경색의 좋은 치료효과가 있음을 시사하고, 이는 cytokine의 조절을 통해 이루어짐을 나타낸다고 사료됩니다.

결 론

대조군과 비교하여 LPS와 DFX로 처리된 각 세포의 세포 생존율이 감소되었다. 단천환가감은 각각의 상황에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으며 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.

LPS와 DFX로 각각 처리된 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 단천환가감 처리가 TNF-α의 증가를 억제하였다.

LPS와 DFX로 각각 처리된 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 단천환가감 처리가 IL-1α의 증가를 억제하였다.

LPS와 DFX로 각각 처리된 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 단천환가감 처리가 IL-1β의 증가를 억제하였다.

LPS와 DFX로 각각 처리된 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 단천환가감 처리가 IL-6의 증가를 억제하였다.

LPS와 DFX로 각각 처리된 뇌경색 환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 단천환가감 처리가 IL-8의 증가를 억제하였다.

단천환가감의 구성물 profile은 HPLC로 분석하였다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Na, Y.H. Effects of Dancheonhwan on Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyoblasts. *Wonkwang Univ.* 1, 2001.
2. Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology.* 56:149-171, 1998.
3. Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine.* 340:115-126, 1999.
4. Woods, A., Brull, D.J., Humphries, S.E., Montgomery, H.E. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *European Heart Journal.* 21:1574-1583, 2000.
5. Shohami, E., Ginis, I., Allenbeck, J.M. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 10:119-130, 1999.
6. Hallenbeck, J.M. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nature Medicine.* 8:1363-1368, 2002.
7. Kawamata, T., Dietrich, W.D., Schallert, T., Gotts, J.E., Cocks, R.R., Benowitz, L.I., Finklestein, S.P. Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America.* 94:8179-8184, 1997.
8. Touzani, O., Boutin, H., Chuquet, J., Rothwell, N. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *J Neuroimmunol.* 100:203-215, 1999.
9. Rothwell, N.J., Luheshi, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23:618-625, 2000.
10. Wang, X., Yue, T.L., Barone, F.C., White, R.F., Gagnon, R.C., Feuerstein, G.Z. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol.* 23:103-114, 1994.
11. Hillhouse, EW, Kida, S., Iannotti, F. Middle cerebral artery occlusion in the rat causes a biphasic production of immunoreactive interleukin-1beta in the cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 249:177-179, 1998.
12. Zhang, Z., Chopp, M., Goussev, A., Powers, C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 784:210-217, 1998.
13. Benveniste, E.N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: Sources, function, and mechanism of action. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 263:116-122, 1992.
14. Vila, N., Reverter, J.C., Yague, J., Chamorro, A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 20:325-329, 2000.
15. Matsumoto, T., Ikeda, K., Mukaida, N., Harada, A., Matsumoto, Y., Yamashita, J., Matsushima, K. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Laboratory Investigation.* 77:119-125, 1997.
16. Weiss, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Wachter, H. Iron modulates interferon-gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol.* Jun, 20(5):605-610, 1992.
17. Jeong, H.J., Chung, H.S., Lee, B.R., Kim, S.J., Yoo, S.J., Hong, S.H., Kim, H.M. Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1α and NF-κB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 11, 306(4):805-811, 2003.
18. Shin, M.K. Clinical traditional herbarology. Seoul: Younglim.

- pp 519-521, 518-519, 699-701, 1997.
19. Ryu, J.H. Effect in *Salviae Radix* Extract on Blood Pressure in Hypertensive Rat. Wonkwang Univ. 2001.
 20. Choi, B.H. Effect of *Cnidii Rhizoma* Water Extract on the Cerebral Blood Flow. Wonkwang Univ. 2003.
 21. Jo, N.S. *Spatholobus suberectus* Water Extract induces Apoptotic Cell Death via Inhibition of Cell Cycle in Jurkat Human Leukemia Cell Line. Wonkwang Univ. 2002.
 22. Choi, Y.S. Effects of *allobophora caliginosatrapezoides* extracts and polysaccharide fraction on the inflammation and immune reaction. Chungang Univ. 1989.
 23. Kim, I.T., Park, Y.M., Shin, K.M., Ha, J., Choi, J., Jung, H.J., Park, H.J., Lee, K.T. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol.* 94:165-173, 2004.
 24. Han, S.H. Effects of Danchunhwan Water Extract on Oxidative Damage of Human Neural Cell. Wonkwang Univ. 2000.
 25. Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H., Kinoshita, A., Ikemoto, A., Nakamura, S., Kimura, J. Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta Neuropathologica.* 92:281-287, 1996.
 26. Ferrarese, C., Mascarucci, P., Zoia, C., Cavarretta, R., Frigo, M., Begni, B. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 6:1004-1009, 1999.
 27. Fassbender, K., Rossol, S., Kammer, T., Daffertshofer, M., Wirth, S., Dollman, M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *Journal of Neuroscience.* 19:135-139, 1994.
 28. Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., Longo, D.L., Taub, D.D., Oppenheim, J.J. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/Azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *Journal of Biological Chemistry.* 271:2935-2940, 1996.
 29. Taub, D.D., Anver, M., Oppenheim, J.J., Longo, D.L., Murphy, W.J. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). *Journal of Clinical Investigation.* 97:1931-1941, 1996.