

< Original Article >

Lipopolysaccharide로 유도한 패혈증 모델에서 *Ginkgo biloba* extract 투여가 생존율에 미치는 영향

이기종¹ · 김현철² · 정배동^{2*}

¹연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²강원대학교 수의과대학

Effect of *Ginkgo biloba* extract on the survival rate in lipopolysaccharide-induced sepsis model mice

Ki-Jong Rhee¹, Hyeon-Cheol Kim², Bae Dong Jung^{2*}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea
²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 2 July 2012; revised 6 August 2012; accepted 13, August 2012)

Abstract

Accumulated evidence indicate that *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) acts as an antioxidant and scavenger of free radicals as well as influencing apoptotis. Earlier studies have employed the inflammatory agent lipopolysaccharide (LPS) to induce severe sepsis. In the present study, we examined whether the intraperitoneal injection of EGb 761 increases the survival rate of mice in the LPS-induced severe sepsis model. The survival rate was significantly increased by 30% in mice administered with 100 mg/kg of EGb 761 but not in mice administered with 50 mg/kg EGb 761. In addition, pre-treatment with EGb 761 increased the survival rate (30%) but post-treatment with EGb 761 did not. These results suggest that EGb 761 may have clinical potential in preventing sepsis induced mortality.

Key words : Sepsis, Lipopolysaccharide, EGb 761

서 론

패혈증(sepsis)은 세균이 혈관 내에서 번식하여 독소를 생산함으로써 사망을 유발하는 질병이다. 패혈증 초기에는 과염증(hyperinflammatory) 상태를 보이고 시간이 지남에 따라서 면역억제로 인한 저염증(hypoinflammatory) 상태가 나타난다(Freise 등, 2001). 패혈증의 증상은 이 질병을 일으키는 세균의 종류에 따라서 다양하지만, 사망에 이르게 하는 주요 원인은 전신적, 국소적 혈액 순환 변화에 의한 다발성 장기부전(multiple organ failure)이다(Di Giantomasso 등, 2003). 패혈증의 증세는 여러 장기에서 동시에 다발적으로 급속하게 진행되기 때문에 이 질병을 효과적으

로 치료하기는 매우 어렵다(Pittet 등, 2003). 그러므로 최근에 패혈증을 예방하고 효과적으로 치료하기 위해 새로운 방법과 새로운 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Poli-de-Figueiredo 등, 2008).

Ginkgo biloba extract (EGb) 761은 항산화 기능을 가지고(Ilhan 등, 2006) tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 염증 관련 인자들의 발현을 억제함으로써 항염증 효과가 있는 것으로 알려졌다(Sener 등, 2006). EGb 761의 투여는 심장세동, 빈맥 등의 심장질환 관련 질병(Haines 등, 2000), 대장염 등의 염증관련 질병(Kotakadi 등, 2008) 그리고 알츠하이머와 같은 신경계 관련 질병 등(Kasper와 Schubert, 2009)에 대해 예방 효과가 있다고 보고되었다. 패혈증은 과다 염증반응과 혈액순환 장애 등에 의한 다발성 장기부전을 동반하기 때문에 치료와 예방을 위해서는 염증반응과

*Corresponding author: Bae Dong Jung, Tel. +82-33-250-8674,
Fax. +82-33-244-2367, E-mail. bdjung@kangwon.ac.kr

혈액순환을 조절하는 것이 필수적인 요건이다(Freise 등, 2001; Moore 등, 2008). 패혈증의 모델은 다양하다. 최근에 lipopolysaccharide (LPS)로 유발한 패혈증 mouse에서 mouse의 종류에 따라 생존율이 달라질 수 있다고 알려졌다(Moore 등, 2008). 그래서 동물 품종, LPS 용량 등에 의해 결과가 상이하므로 자체모델을 확립해야 할 필요가 있다.

최근, EGb 761은 대식세포의 작용을 감소시켜 염증 억제 효과를 유도하고(Kotakadi 등, 2008) 세포사를 억제한다고 보고되었다(Smith 등, 2002; Smith와 Luo, 2004). 또한, EGb 761은 PAF 수용체에 대해서 억제능력을 갖추고 있기 때문에 혈액순환에 도움을 주는 기능도 가지고 있다(Haines 등, 2000). 그러므로 EGb 761은 패혈증 예방 또는 치료제로 가능성이 있는 물질로 생각하였다.

이번 연구에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 유발한 mouse 패혈증 모델을 확립하고 이 패혈증 모델에 대한 EGb 761의 예방 및 치료 효과를 살펴보았다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 20±2 g의 BALB/C mouse (오리엔트 바이오, 한국)를 구입하여 사육상자에 넣어 사육하였다. 실험 동안의 사육환경은 온도 22±2°C, 상대습도 50±5%, 인공조명(12시간 light/dark cycle) 조건을 유지하였다. 사료는 실험동물 전용 고형사료로, 음수와 식이는 자유 섭식토록 하였다. 동물 실험은 동물 실험의 관리와 사용에 관한 NIH 지침을 엄격하게 적용하여 실시했다.

LPS 투여에 의한 severe sepsis model 유도 및 EGb 761 효과 실험

BALB/c mouse에 정상 대조군(saline)과 실험군으로 각각 10마리씩 구성하였다. 정상 대조군에는 saline (0.9% NaCl, 중의제약, 한국)을 복강 투여하였고, 패혈증 유도 실험군에는 lipopolysaccharide (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 농도별로 복강투여 하였다. 그리고 복강투여 후 5일에서 6일간 mouse의 관찰을 통해서 생존율(%)을 측정하여 survival rate로 명시하였다(Moore 등

2008).

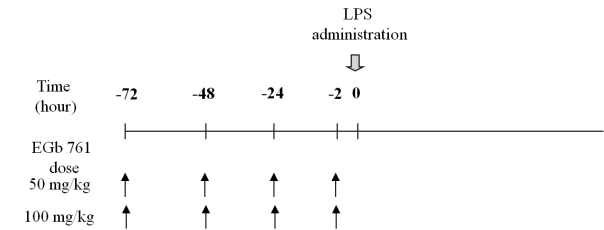
패혈증에 대한 EGb 761의 효과를 측정하기 위하여 EGb 761 비치리 대조군과 2개의 실험군으로 각각 10마리씩 구성하였다. 2개의 실험군에는 각각 EGb 761 50 mg/kg, 100 mg/kg을 LPS 투여 전에 복강투여 하였고, 비치리 대조군은 LPS만 32.5 mg/kg 복강 투여하였다(Fig. 1A). 패혈증에 대한 EGb 761의 투여 양식 효과 실험을 위하여 EGb 761 비치리 대조군과 LPS 투여 전 EGb 761 투여군(pre-treatment), LPS 투여 후 EGb 761 투여군(post-treatment), 그리고 LPS 투여 전 및 투여 후 EGb 761 투여군(all-treatment)으로 하여 각각 10마리씩 구성하였다. EGb 761은 mouse에 100 mg/kg을 복강 투여하였다(Fig. 1B).

결 과

패혈증 모델

BALB/c mouse에 정상 대조군에는 saline을 복강 투

A. Schedule to evaluate dose dependent effect of EGb 761



B. Schedule to evaluate treatment time dependent effect of EGb 761

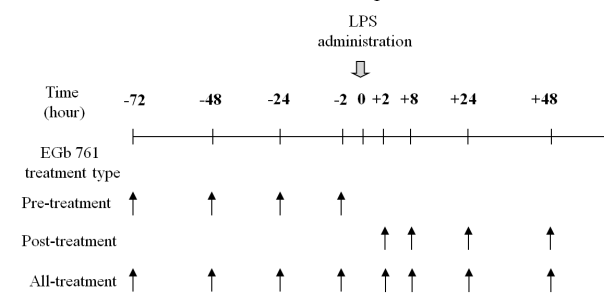


Fig. 1. Experimental schedule to evaluate the effect of EGb 761 on survival of BALB/c mice after intraperitoneal challenge with lipopolysaccharide (LPS). Each animal received one intraperitoneal injection of LPS. (A) EGb 761 (50 mg/kg or 100 mg/kg) was intraperitoneal injected four times spanning three days. (B) EGb 761 (100 mg/kg) was intraperitoneal injected four times before LPS injection (pre-treatment), four times after LPS injection (post-treatment), or eight times before and after LPS injection (all-treatment).

여하였고, 패혈증 모델 실험군에는 LPS를 10.0 mg/kg, 17.5 mg/kg, 25.0 mg/kg, 32.5 mg/kg, 그리고 40.0 mg/kg씩 복강 투여하였다. LPS 투여 후 관찰기간은 5일간 실시하였다. Saline을 투여한 정상 대조군과 LPS를 10.0 mg/kg 농도로 투여한 군에서 생존율은 100%였으나 17.5 mg/kg 투여군에서는 80%로 생존율이 감소하였다. LPS 25.0 mg/kg 투여군에서는 생존율이 60%로 보다 더 낮아졌다. LPS를 32.5 mg/kg 농도 또는 40.0 mg/kg 농도로 투여한 군에서는 LPS 투여 후 3일째 모두 사망하는 것으로 나타났다. 이번 실험에서 패혈증 모델로 LPS를 32.5 mg/kg 복강 투여하는 것으로 결정하였다(Fig. 2).

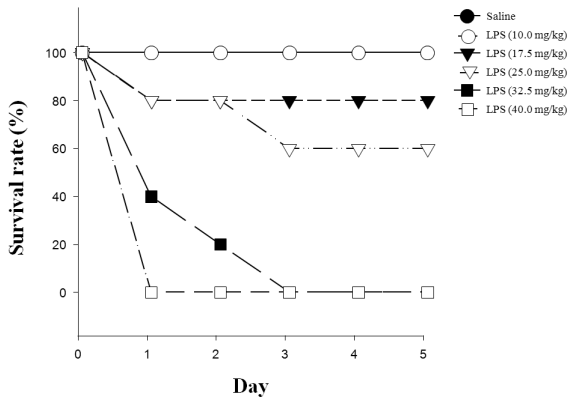


Fig. 2. Survival rate of mice injected in the peritoneum with varying dose of LPS (n=10). Mice received one intraperitoneal injection of LPS (10.0 mg/kg, 17.5 mg/kg, 25.0 mg/kg, 32.5 mg/kg or 40.0 mg/kg) (n=10).

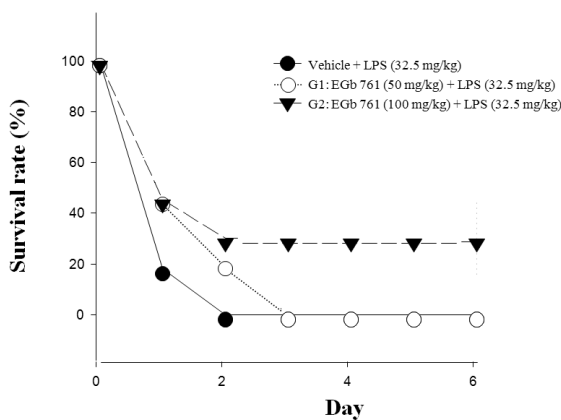


Fig. 3. Dose-dependent protection of EGb 761 in LPS injected mice. Mice were administered EGb 761 (50 mg/kg or 100 mg/kg) four times in one day prior to LPS injection (n=10).

패혈증 모델에 대한 EGb 761 용량 의존성 효과

패혈증 모델에 대한 EGb 761의 용량 의존성 효과를 시험하기 위하여 LPS를 32.5 mg/kg 단독 투여한 군을 EGb 761 비치리 대조군으로 하였다. LPS를 투여하기 전 EGb 761을 50 mg/kg, 100 mg/kg 농도로 하루에 한 번 총 4회 복강 투여를 하였고 LPS를 투여한 후 생존율을 조사하였다. EGb 761을 투여하지 않은 대조군에서 LPS를 투여한 후 2일에 10마리 모두 사망하였고, EGb 761을 50 mg/kg 농도로 투여한 개체군에서도 LPS 투여 3일에 생존율 0%로 나타났다. 그러나 EGb 761을 100 mg/kg 농도로 투여한 군의 경우 10마리 중 3마리가 살아남아 30%의 생존율을 보였다(Fig. 3).

패혈증 모델에 대한 EGb 761 투여 양식의 효과

패혈증 모델에 대한 EGb 761의 투여 양식의 효과를 조사하고자 LPS를 32.5 mg/kg 단독 투여한 군을 대조군으로 하였고 EGb 761은 100 mg/kg 농도로 복강 투여하였다. EGb 761 투여 양식은 전 투여군(pre-treatment), 후 투여군(post-treatment) 그리고 전·후 모두 투여군(all-treatment)으로 하여 조사하였다. EGb 761을 투여하지 않은 대조군은 LPS 투여 후 3일에 모두 사망하여 생존율이 0%로 나타났다. LPS를 먼저 투여하고 EGb 761을 후 투여군에서도 LPS 투여 4일째에 모든 mouse가 사망함에 따라 생존율이 0%가

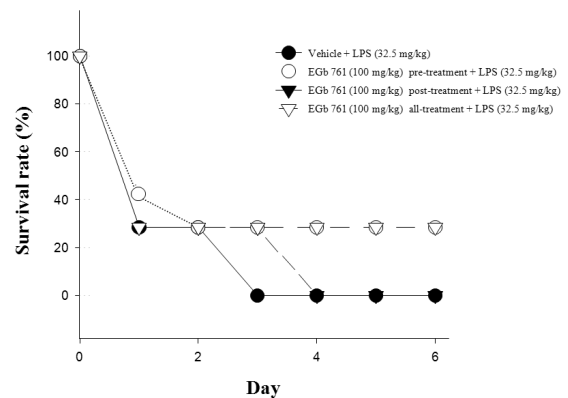


Fig. 4. Effect of treatment pattern-dependent protection of EGb 761 in LPS injected mice. EGb 761 (100 mg/kg) was intraperitoneal injected four times before LPS injection (pre-treatment), four times after LPS injection (post-treatment), or eight times before and after LPS injection (all-treatment) (n=10).

되었다. 그러나 EGb 761 전 투여한 군과 전·후 모두 투여한 군에서 10마리 중 3마리씩 살아남아 생존율이 30%로 나타났다(Fig. 4).

고 찰

이번 연구에서 LPS 투여로 유발되는 패혈증 모델의 개발과 EGb 761 투여에 의한 예방 및 치료 효과를 살펴보고자 하였다. LPS를 32.5 mg/kg, 40.0 mg/kg 복강 투여할 경우에서 100% 사망률을 보였다. 그리고 이 모델에 대하여 EGb 761은 100.0 mg/kg을 복강 투여하였을 때 생존율이 30%로 나타났고 이 생존율은 LPS를 투여하기 전에 EGb 761을 전 투여하는 경우 및 전, 후 모두 투여하는 경우에서만 패혈증을 예방하고 치료하는 것으로 나타났다.

대체약물은 기존 화학적 약물의 작용을 보완하고 대체하는 자연 친화적인 물질을 말한다. 대체약물은 현대화가 진행 될수록 더욱더 많은 관심을 받고 있는데, 이유로는 대체약물을 사용할 경우, 비용이 적게 들 가능성이 있고 화학약물 사용으로 인한 부작용을 감소시킬 수 있다는 장점이 있기 때문이다. 또한, 다량의 항생제 사용과 여러 항생제의 복합사용으로 인한 세균의 내성 증가로 패혈증은 병원에서조차 문제가 되어 상당한 사회적 문제를 일으키고 있다. 그래서 항생제를 대체할 물질의 개발이 중요한 의·약학적 쟁점이 되고 있다. EGb 761은 최근까지 특정 질병의 치료 및 예방 목적으로 널리 사용되고 있다(Smith 등, 2002). EGb 761의 생리학적, 약학적 특성을 밝혀내기 위한 많은 연구가 진행됐는데 EGb 761은 항산화(Ilhan 등, 2006), 항염증(Sener 등, 2006), PAF 수용체에 대한 억제 작용(Haines 등, 2000) 등의 특징을 가지고 있다. 이러한 이유 때문에 염증에 대한 여러 분야에서 임상적 접근을 위한 연구가 진행되고 있다. 특히 EGb 761 효과의 다양성에 비해 부작용이 거의 없기에 여러 질병에 대한 예방 및 치료제 목적으로 많은 연구가 실시되었다.

그러나 아직 패혈증에 대한 연구는 전무한 상태에 있다. 이번 실험에서는 LPS로 유발한 mouse 패혈증 모델을 이용하여 EGb 761 투여가 패혈증 예방 및 치료에 효과가 있는지를 연구하였다. LPS를 투여하기 전 EGb 761을 100 mg/kg 복강투여 하였을 경우 mouse에 대해서 각각 30%의 생존율이 나타났다. 최근에 LPS로 유발한 패혈증 mouse에서 eukaryotic

translation inhibition factor 5A (eIF5A)의 siRNA를 복강 투여하였을 경우, serum 내 interleukin (IL)-1, IL-6 등의 cytokine 농도를 감소시켜서 생존율을 증가시키고(Moore 등, 2008), LPS로 유발한 패혈증 모델 mouse에 ethyl pyruvate를 복강투여 했을 경우, pro-inflammatory 전사 인자인 NF-kB와 TNF- α 등의 pro-inflammatory cytokine의 활성을 억제해서 패혈증을 치료할 수 있다고 보고되었다(Fink, 2007).

또한, Chen 등(2005)은 LPS로 유발한 패혈증 mouse에 lysophosphatidylcholine를 복강투여 했을 때 pro-inflammatory cytokine인 high-mobility group box 1 (HMGB1)의 분비를 억제함으로써 패혈증을 치료할 수 있다는 보고를 하였다. 그러나 이들은 화학적 합성에 의해서 만들어진 화합물이기 때문에, 생리학적 부작용을 일으킬 가능성이 크다. 이번 실험에서 사용한 EGb 761은 macrophage의 세포성 면역에 관여하는 T cell 조절자들인 CD4+, CD25- (Kotakadi 등, 2008), 그리고 Foxp3- 발현을 감소시켜서 항염증 효과를 나타내며, 세포사멸 조절자인 Bcl-2, Caspase-12, TNF- α , 그리고 p53의 발현을 억제시킴으로써 세포사를 조절하는 능력이 있다(Smith 등, 2002). 또한, EGb 761은 PAF 수용체에 대해서 억제능력을 갖추고 있기 때문에 혈액 순환에 도움을 주는 효과가 있다(Fink, 2007). 이를 통해 EGb 761의 투여가 세포사의 억제, 염증유발인자의 감소, 그리고 항산화 효소 체계의 항진 등에 관여하여 패혈증 모델에서 예방을 통한 생존율을 높이리라 생각되지만 이번 실험을 통해서 EGb 761 투여가 LPS 투여로 유발된 패혈증 모델의 생존율을 어떻게 증가시켰는지는 알 수 없다. 이에 대해서는 앞으로의 활발한 연구가 필요하리라 생각한다.

EGb 761의 투여는 심장질환 관련 질병(Haines 등, 2000), 염증관련 질병(Kotakadi 등, 2008) 그리고 신경계 관련 질병(Kasper와 Schubert, 2009)의 예방에 효과적임이 증명되었다. 이번 실험에서 투여 양식을 통한 결과를 볼 때 예방을 위한 투여는 30%의 패혈증 억제 효과를 보였으나 치료 목적으로 투여한 후 투여 양식 실험에서는 모두 사망하였기에 치료제로서는 부적합한 것으로 생각한다. 이 결과는 이 전의 다른 질병에 대한 EGb 761의 연구와 유사하게 패혈증의 경우에도 예방 목적으로 사용하면 유의성 있는 효과를 얻을 수 있음을 증명하였다.

패혈증 모델은 다양하다(Poli-de-Figueiredo 등, 2008). 특히 실험동물의 종류와 LPS의 종류 및 투여 용량에

따라 사망률이 변화될 수 있다. Moore 등(2008)은 5 mg/kg LPS를 복강 내 투여했을 때 100% 치사율이 나타난다고 보고하였지만 이번 연구에서는 같은 종류의 LPS를 32.5 mg/kg 농도 이상의 LPS를 투여했을 경우만 100% 사망했다. 또한, Fink(2007)와 Chen 등(2005)의 연구에서도 보이는 것과 같이 LPS의 종류에 따라 사망률이 다를 수 있다. 이유는 실험동물 개체의 생체 변화와 미묘한 사육 조건 차이 그리고 실험 동물을 다루는 연구자의 기술 등이 요인이라 생각되지만 이에 관해서는 좀 더 자세한 연구가 필요하다. 이번 연구의 결과를 통해 패혈증의 모델을 이용하여 실험을 할 경우 반드시 LPS의 용량과 종류에 따른 생존율의 변화를 측정할 필요가 있다고 생각한다.

결 론

LPS 투여로 유발한 패혈증 모델에서 EGb 761 투여의 예방 및 치료 효과를 살펴보았다. LPS를 32.5 mg/kg 이상을 복강 투여한 mouse에서 100% 사망률을 보였다. 이 모델에서 LPS 투여 전 EGb 761을 100.0 mg/kg 씩 하루에 한 번 4회 복강 투여하였을 때 생존율이 30%로 나타났다. 또한, EGb 761 투여 양식 실험의 결과를 통해 EGb 761의 투여는 패혈증의 예방 목적으로 사용할 때만 효과적인 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Chen G, Li J, Qiang X, Czura CJ, Ochani M, Ochani K, Ulloa L, Yang H, Tracey KJ, Wang P, Sama AE, Wang H. 2005. Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 46: 623-627.
- Di Giammasso D, May CN, Bellomo R. 2003. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest* 124: 1053-1059.
- Fink MP. 2007. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis. *Curr Drug Targets* 8: 515-518.
- Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. 2001. Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 14: 195-212.
- Haines DD, Bak I, Ferdinandy P, Mahmoud FF, Al-Harbi SA, Blasig IE, Tosaki A. 2000. Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 37-44.
- Ilhan A, Iraz M, Kamisli S, Yigitoglu R. 2006. Pentylentetrazol-induced kindling seizure attenuated by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1504-1510.
- Kasper S, Schubert H. 2009. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in the treatment of dementia: evidence of efficacy and tolerability. *Fortschr Neurol Psychiatr* 77: 494-506.
- Kotakadi VS, Jin Y, Hofseth AB, Ying L, Cui X, Volate S, Chumanevich A, Wood PA, Price RL, McNeal A, Singh UP, Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Matesic LE, Auclair K, Wargovich MJ, Hofseth LJ. 2008. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Carcinogenesis* 29: 1799-1806.
- Moore CC, Martin EN, Lee G, Taylor C, Dondero R, Reznikov LL, Dinarello C, Thompson J, Scheld WM. 2008. Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. *J Infect Dis* 198: 1407-1414.
- Pittet JF, Pastor CM, Morel DR. 2003. Spontaneous high systemic oxygen delivery increase survival rate in awake sheep during sustained endotoxemia. *Crit Care Med* 28: 496-503.
- Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* 30: 53-59.
- Sener G, Omurtag GZ, Sehirli O, Tozan A, Yüksel M, Ercan F, Gedik N. 2006. Protective effects of *ginkgo biloba* against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Mol Cell Biochem* 283: 39-45.
- Smith JV, Burdick A, Golik P, Khan I, Wallace D, Luo Y. 2002. Anti-apoptotic properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol* 48: 699-707.
- Smith JV, Luo Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 465-472.