

Tetramethylpyrazine이 LPS의 뇌실주입에 따른 생쥐 뇌조직의 Pro-Inflammatory Cytokines 발현에 미치는 영향

최용석[#], 원종우, 유인우, 신정원, 김성준, 손낙원^{*}

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

Effect of Tetramethylpyrazine on Pro-Inflammatory Cytokine Expressions in Mouse Brain Tissue following Intracerebroventricular Lipopolysaccharide Treatment

Yong-Seok Choi[#], Jong-Woo Won, Inwoo Yoo, Jung-Won Shin, Seong-Joon Kim, Nak-Won Sohn^{*}

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : Tetramethylpyrazine (TMP) is an active ingredient in *Ligusticum wallichii* and has a wide range of neuroprotection effects. This study investigated anti-neuroinflammatory effect of TMP on brain regions in intracerebroventricular (i.c.v.) lipopolysaccharide (LPS)-treated C57BL/6 mice.

Methods : TMP was administered intraperitoneally at doses of 10, 20, and 30 mg/kg at 1 h prior to LPS (3 mg/kg) i.c.v. injection. mRNA level of pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6, was measured in the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus tissue using real-time polymerase chain reaction at 24 h after the LPS injection. Cyclooxygenase-2 (COX-2) positive cells in the hypothalamus was also observed using immunohistochemistry at 24 h after the LPS injection.

Results : At a dose of 30 mg/kg TMP significantly attenuated up-regulation of TNF- α and IL-1 β mRNA in the cerebral cortex and IL-1 β mRNA in the hippocampus. In the hypothalamus, doses of 20 mg/kg and 30 mg/kg TMP significantly attenuated up-regulation of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA induced by the LPS injection. In addition, TMP (30 mg/kg) significantly reduced the number of COX-2 positive cells in the hypothalamus.

Conclusion : These results indicate that TMP has an anti-inflammatory effect on neuroinflammation, especially in the hypothalamus, induced by LPS i.c.v. injection and suggest that TMP-containing *Ligusticum wallichii* may play a modulatory role on the systemic responses following hypothalamic inflammation.

Key words : *Ligusticum wallichii*, Tetramethylpyrazine, Neuroinflammation, Pro-inflammatory cytokine, Hypothalamic inflammation

서론

사이토카인 (cytokine)은 다양한 세포들에서 분비되어 손상이나 감염에 대한 면역반응의 조절과 세포간 신호전달을 담당하는 물질로 면역체계에 대한 결과적 반응에 따라 기능적으

로 염증유발 (pro-inflammatory) 사이토카인과 항염증 (anti-inflammatory) 사이토카인으로 구분된다¹⁾. 면역체계를 자극하는 염증유발사이토카인에는 interleukin (IL)-1, IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF) 등이 있으며, 이들은 중추신경계의 염증반응을 확장시키는 역할을 한다¹⁾. 말초

* 교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 전자정보관 444호
· Tel : (031) 201-2747 · Fax : (031) 204-6832 · E-mail : sohnw@khu.ac.kr
제1저자 : 최용석, 경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 전자정보관 444호
· Tel : (031) 201-2747 · Fax : (031) 204-6832 · E-mail : itouchu81@daum.net
· 접수 : 2012년 12월 24일 · 수정 : 2013년 1월 9일 · 채택 : 2013년 1월 12일

세포들에서 생성 분비된 염증유발사이토카인들은 혈액뇌관문 (blood-brain barrier, BBB)을 통과하여 뇌세포들에서 이차적으로 염증유발사이토카인들을 생성 분비하게 하며²⁾, 중추신경계 내에서 생성 분비된 사이토카인은 발열, 수면, 섭식, 배란 등 다양한 중추신경계 작용과 식이 및 수분 섭취 감소, 활동량 감소 등의 sickness behavior 유발에 관여하고³⁾, 나아가 인지기능, 학습과 기억 등에도 영향을 미친다⁴⁾. 그러므로 뇌조직에서 염증유발사이토카인 발현을 유의하게 억제하는 약물에 대한 연구는 다양한 중추신경계 작용에 관련된 약물의 효능을 탐색하는데 중요한 의의가 있다.

Tetramethylpyrazine (TMP)은 川芎 (*Ligusticum wallichii* Franchat)의 주요 활성성분 중 하나로 *in vitro*의 신경세포 손상 보호효능⁵⁻⁸⁾과 *in vivo*의 뇌허혈 손상에 대해 매우 많은 연구가 이루어졌다⁹⁻¹⁷⁾. 또한 뇌출혈¹⁸⁾과 척수의 허혈과 압박 손상에 대해서도 유의한 효능이 있다고 하였다¹⁹⁻²²⁾. 이들 연구보고에서 TMP가 뇌허혈 및 척수손상에서 유의한 효능을 나타내는 것은 염증유발 물질들을 억제하는 항염증 효능에 의한다고 하였다^{9,10,21,22)}. 이러한 TMP의 중추신경계 손상의 보호효능과 항염증 효능들로 살펴볼 때 중추신경염증 (neuroinflammation)에도 유의한 효능을 발휘할 것으로 추측되지만 중추신경염증 상태에서 각 부위별 뇌조직의 염증유발사이토카인 발현에 대한 연구는 미흡한 현실이다.

그러므로 본 연구에서는 중추신경염증에서 뇌의 각 부위별 염증반응에 대한 TMP의 작용을 관찰하기 위해서 lipopolysaccharide (LPS)의 뇌실주입 (intracerebroventricular injection)으로 중추신경염증을 유발시키고, 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현의 변화를 real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 방법으로 관찰하였으며, 시상하부에서 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과 뇌 부위별로 TMP 작용의 특성을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Korea)에서 구입한 25-28 g의 수컷 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 경희대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험에 사용한 생쥐는 온도 (21-23°C), 습도 (40-60%)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물 및 시약

본 실험에 사용한 2,3,5,6-tetramethylpyrazine (C₈H₁₂O₂; molecular weight, 136.20; Fig. 1)과 lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* O55:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rabbit anti-COX-2 antibody는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서, Cy2-conjugated donkey

anti-rabbit IgG는 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Real-time polymerase chain reaction (PCR)에 필요한 kit와 시약들은 Bio-Rad Korea Customer Service (Seoul, Korea)로부터 공급받았으며, 그 이외의 시약들은 전문제조회사의 실험실용 최고 품질의 시약을 구입하여 사용하였다.

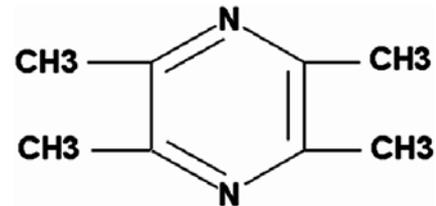


Fig. 1. Chemical structure of tetramethylpyrazine

3. 실험군의 구분 및 처치

생쥐를 무작위로 6개 군으로 구분하였다. 정상군 (Normal)은 약물처치 없이 통상적으로 사육하였으며, Sham군 (Sham)은 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골 천공 과정은 시행하였으나 LPS를 주입하지 않았고, 대조군 (LPS)은 Sham군과 같은 수술 후 뇌실에 LPS를 주입하였다. TMP를 투여한 군은 투여용량에 따라 10 mg/kg 투여군 [LPS+TMP(10)], 20 mg/kg 투여군 [LPS+TMP(20)] 및 30 mg/kg 투여군 [LPS+TMP(30)]으로 구분하였으며, 각각의 용량을 생리식염수에 녹여 LPS의 뇌실주입 1시간 전에 1회 복강주사 하였다. 실험동물은 염증유발사이토카인 측정에 각 군 당 6마리씩 30마리를 사용하였고, 면역조직화학염색은 Sham군과 LPS군 및 유의한 효과를 보인 30 mg/kg의 TMP 투여군에서 각 군 당 6마리씩 18마리를 사용하였다.

4. LPS의 뇌실주입

LPS의 뇌실주입은 Xu 등²³⁾이 사용한 방법을 변형하였으며, 그 과정은 아래와 같다. 생쥐를 tiletamine과 zolazepam (50:50, Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France)을 18 mg/kg의 용량으로 복강주사하여 마취하고 electronic temperature controller (CMA150, CMA, Sweden)를 통하여 정상체온 (37±0.5°C)이 유지되는 상태에서 머리를 뇌정위고정장치 (Stoelting, USA)에 고정하고 다음 두정부의 정중선을 따라 피부를 절개하고 두개골이 드러나게 하였다. 두개골의 bregma로부터 전방으로 0.2 mm, 우측으로 3.5 mm 위치에 전기드릴을 사용하여 약 1 mm 직경으로 두개골을 천공하고, 뇌정위고정장치에 장착된 Hamilton 주사기 (10 μ L, Hamilton, USA)의 바늘 (26-gauge)을 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 측뇌실 (lateral ventricle)에 삽입하였다. 이어서 Hamilton 주사기에 연결된 micropump (Model 310, Kd Scientific Inc, USA)를 작동하여 5 μ L의 LPS (5 μ g/animal)를 0.5 μ L/min의 속도로 주입하였다. LPS의 주입이 끝난 후에도 약 10분간 Hamilton 주사기를 유지하여 LPS 용액의 역류를 방지하였으며, 이후 Hamilton 주사기를 제거하고 두개골의 구멍은 bone wax로 메운 다음 절개한 두정부의 피부를 봉합하고 마

취에서 깨어나게 하였다.

5. 염증유발사이토카인 mRNA의 real-time PCR 측정

염증유발사이토카인 중 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현을 뇌조직에서 정량적인 real-time PCR 방법으로 측정하였다. LPS 뇌실 주입 24시간 후에 생쥐를 단두로 희생시키고 뇌를 적출한 다음, 대뇌피질과 해마 및 시상하부의 뇌조직으로 분리하고 각각의 뇌조직으로부터 Trizol (Qiagen, Germany)을 사용하여 total RNA를 추출하였다 (Fig. 2). 이후 1 μ g의 total RNA와 Script cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 DNA로 역전사하였으며, 정량적 real-time PCR은 CFX 96 REAL-TIME PCR Detection System (Bio-Rad, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, USA)와 preoptimized primer/probe mixture를 사용하여 측정하였다. Housekeeping gene으로는 β -actin을 사용하였으며, 측정에 사용된 gene의 primer sequence는 아래 Table 1과 같다. 이외 측정방법은 제조사의 사용설명서에 따랐으며, 각 자료로부터 측정된 mRNA 발현량은 Normal군의 측정치를 1로 하여 그 배수 (fold change)를 자료로 사용하였다.

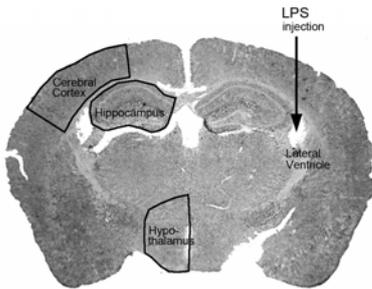


Fig. 2. Diagram of LPS injection site and brain regions collected for real-time PCR.

Table 1. Primer Sequences

TNF- α	forward	5'	-TGA GAA GTT CCC AAA TGG C-3'
	reverse	5'	-GCT ACA GGC TTG TCA CTC-3'
IL-1 β	forward	5'	-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3'
	reverse	5'	-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'
IL-6	forward	5'	-AGA CTT CAC AGA GGA TAC CA-3'
	reverse	5'	-GCA TCA TCG TTG TTC ATA CA-3'
β -actin	forward	5'	-TTT CCA GCC TTC CTT GGG TAT G-3'
	reverse	5'	-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC-3'

6. 뇌조직의 처리

염증유발사이토카인 mRNA 측정과는 별도로 Sham군, LPS군 및 30 mg/kg의 TMP투여군 (LPS+TMP)의 생쥐를 LPS 뇌실 주입 24시간 후에 tiletamine과 zolazepam으로 깊게 마취한 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시킨 다음 뇌조직을 -40 $^{\circ}$ C의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30 μ m 두께의 횡단 절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

7. COX-2의 면역조직화학염색 및 세포 수 측정

뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 후, anti-COX-2 (1:200, 160106, Cayman, USA)를 일차항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 2차항체로 Cy2-conjugated IgG를 사용하여 형광 발색시킨 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다. 면역형광염색된 뇌조직은 confocal laser-scanning microscopy (Carl Zeiss, LSM 510 META, Germany)를 사용하여 관찰하였다. COX-2 양성반응 세포 수 측정을 위해서 각각의 영상을 영상분석시스템에 저장하고, ImageJ software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 시상하부 구역의 일정한적 (6 \times 10⁴ μ m²)에서 관찰되는 양성반응 세포 수를 측정하여 자료로 사용하였다.

8. 통계처리

본 연구에서 제시된 자료들은 Mean \pm Standard error로 표시되었으며, 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test와 ANOVA 분산분석을 사용하여 Sham군과 LPS군 및 LPS군과 LPS+TMP군들 사이에서 p<0.05 이상의 유의수준으로 검정하였다.

결 과

1. TNF- α mRNA 발현의 변화

염증유발 사이토카인의 일종인 TNF- α mRNA 발현을 LPS 주입 24시간 후 대뇌피질에서 real-time PCR 방법으로 측정한 결과, Normal군의 1.3 \pm 0.2 배에 비해 Sham군은 30.9 \pm 2.5 배로 증가하였고, LPS군은 149.6 \pm 18.9 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 117.8 \pm 23.3 배, LPS+TMP(20)군은 105.6 \pm 19.5 배, LPS+TMP(30)군은 96.1 \pm 14.0 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으며, LPS군에 비해 LPS+TMP(30)군은 p<0.05의 유의성 있는 TNF- α mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 3-A). 해마에서 Normal군은 0.6 \pm 0.1 배 이었고 Sham군은 35.8 \pm 2.9 배로 증가하였으며, LPS군은 167.2 \pm 31.7 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 121.4 \pm 12.9 배, LPS+TMP(20)군은 100.9 \pm 15.2 배, LPS+TMP(30)군은 94.9 \pm 14.2 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으나 모두 LPS군에 비해 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 3-B). 또한 시상하부에서 Normal군은 1.1 \pm 0.2 배였고 Sham군은 28.7 \pm 3.0 배로 증가하였으며, LPS군은 108.5 \pm 16.7 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 70.4 \pm 29.9 배, LPS+TMP(20)군은 64.8 \pm 17.3 배, LPS+TMP(30)군은 49.9 \pm 7.6 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였고, LPS군에 비해 LPS+TMP(30)군

은 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 TNF- α mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 3-C).

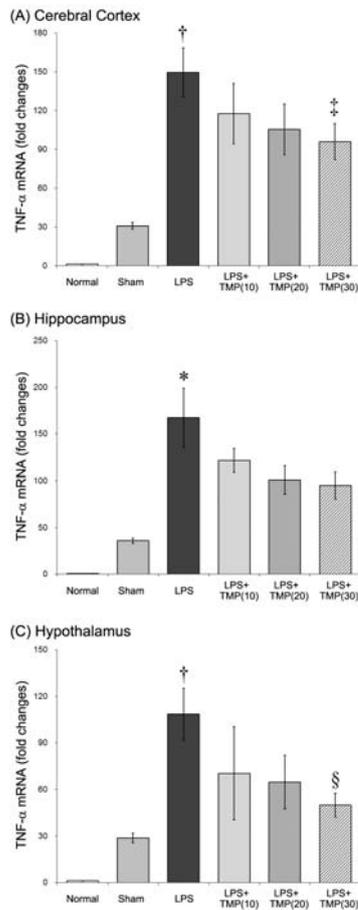


Fig. 3. Effect of TMP on TNF- α mRNA in the brain tissue. TNF- α mRNA was significantly increased in the cerebral cortex (A), the hippocampus (B), and the hypothalamus (C) by LPS injection compared to the Sham group. TMP reduced significantly the up-regulation of TNF- α mRNA expression at dose of 30 mg/kg in the cerebral cortex and the hypothalamus compared to the LPS group. It was not different statistically at all doses of TMP in the hippocampus. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared between Sham and LPS group (*, $p < 0.01$; †, $p < 0.001$) or between LPS and LPS+TMP group (‡, $p < 0.05$; §, $p < 0.01$).

2. IL-1 β mRNA 발현의 변화

대표적인 염증유발 사이토카인인 IL-1 β mRNA 발현을 LPS 주입 24시간 후 대뇌피질에서 real-time PCR 방법으로 측정된 결과, Normal군의 1.4 ± 0.2 배에 비해 Sham군은 40.5 ± 5.1 배로 증가하였고, LPS군은 241.3 ± 34.7 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 174.5 ± 27.3 배, LPS+TMP(20)군은 160.8 ± 28.6 배, LPS+TMP(30)군은 139.5 ± 22.2 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으며, LPS군에 비해 LPS+TMP(30)군은 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 4-A). 해마에서 Normal군은 0.9 ± 0.1 배였고 Sham군은 64.4 ± 15.6 배로 증가하였으며, LPS군은 198.8 ± 28.8 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은

144.3 ± 22.8 배, LPS+TMP(20)군은 126.5 ± 27.0 배, LPS+TMP(30)군은 117.6 ± 20.7 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으며, LPS군에 비해 LPS+TMP(30)군은 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 4-B). 또한 시상하부에서 Normal군은 1.1 ± 0.2 배였고 Sham군은 31.1 ± 3.8 배로 증가하였으며, LPS군은 148.9 ± 22.5 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 99.3 ± 20.2 배, LPS+TMP(20)군은 71.0 ± 12.7 배, LPS+TMP(30)군은 59.7 ± 8.7 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였고, LPS군에 비해 LPS+TMP(20)군은 $p < 0.05$, LPS+TMP(30)군은 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 IL-1 β mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 4-C).

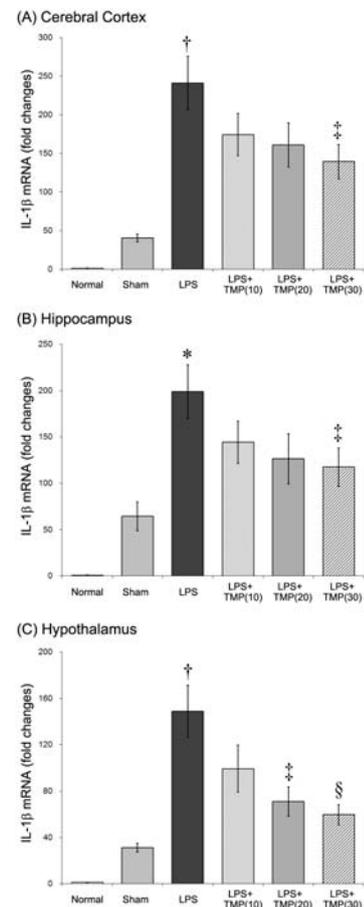


Fig. 4. Effect of TMP on IL-1 β mRNA in the brain tissue. IL-1 β mRNA was significantly increased in the cerebral cortex (A), the hippocampus (B), and the hypothalamus (C) by LPS injection compared to the Sham group. TMP reduced significantly the up-regulation of IL-1 β mRNA expression at dose of 30 mg/kg in the cerebral cortex and the hippocampus, at doses of 20 and 30 mg/kg in the hypothalamus compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared between Sham and LPS group (*, $p < 0.01$; †, $p < 0.001$) or between LPS and LPS+TMP group (‡, $p < 0.05$; §, $p < 0.01$).

3. IL-6 mRNA 발현의 변화

염증유발 사이토카인인 IL-6 mRNA 발현을 LPS 주입 24시간 후 대뇌피질에서 real-time PCR 방법으로 측정된 결과,

Normal군의 1.07 ± 0.13 배에 비해 Sham군은 2.08 ± 0.49 배로 증가하였고, LPS군은 10.32 ± 2.06 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 9.83 ± 1.48 배, LPS+TMP(20)군은 7.89 ± 1.75 배, LPS+TMP(30)군은 6.26 ± 1.27 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으나 모두 LPS군에 비해 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 5-A). 해마에서 Normal군은 0.97 ± 0.17 배 이었고 Sham군은 2.09 ± 0.66 배로 증가하였으며, LPS군은 11.73 ± 1.39 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 9.30 ± 1.47 배, LPS+TMP(20)군은 8.87 ± 1.54 배, LPS+TMP(30)군은 7.70 ± 1.58 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였으나 모두 LPS군에 비해 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 5-B). 또한 시상하부에서 Normal군은 1.09 ± 0.33 배 이었고 Sham군은 2.08 ± 0.35 배로 증가하였으며, LPS군은 9.56 ± 1.29 배로 현저하게 증가하였다. 이에 비하여 TMP를 투여한 LPS+TMP(10)군은 7.87 ± 1.23 배, LPS+TMP(20)군은 5.74 ± 1.41 배, LPS+TMP(30)군은 4.56 ± 0.76 배로 TMP의 투여용량 증가에 따라 비례적으로 감소하였고, LPS군에 비해 LPS+TMP(30)군은 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 IL-6 mRNA 발현의 감소를 나타내었다 (Fig. 5-C).

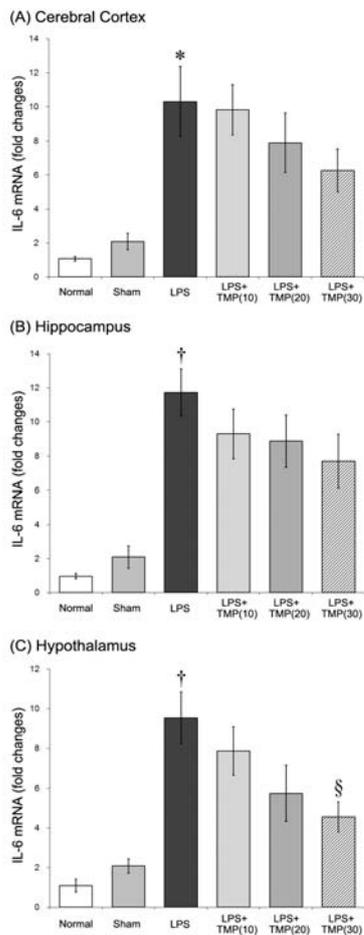


Fig. 5. Effect of TMP on IL-6 mRNA in the brain tissue. IL-6 mRNA was significantly increased in the cerebral cortex (A), the hippocampus (B), and the hypothalamus (C) by LPS injection compared to the Sham group. TMP reduced significantly the up-regulation of IL-6 mRNA expression at dose of 30 mg/kg in

the hypothalamus compared to the LPS group. It was not different statistically at all doses of TMP in the cerebral cortex and the hippocampus. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared between Sham and LPS group (*, $p < 0.01$; †, $p < 0.001$) or between LPS and LPS+TMP group (§, $p < 0.01$).

4. COX-2 양성반응 세포 수의 변화

시상하부 구역에서 COX-2 양성반응 세포를 관찰한 결과, Sham군에 비해 LPS군은 COX-2 발현 강도의 증가는 물론 양성반응 세포 수가 현저하게 증가하였으며, 30 mg/kg의 TMP를 투여한 LPS+TMP군은 COX-2의 발현 강도는 큰 차이가 없었으나 양성반응 세포 수가 감소한 것이 관찰되었다. 일정면적 ($6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)에서 그 수를 측정한 결과, Sham군의 4.8 ± 1.0 개에서 LPS군은 25.3 ± 1.7 개로 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, 이에 비해 LPS+TMP군은 16.2 ± 2.0 개로 LPS군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 COX-2 양성반응 세포 수의 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

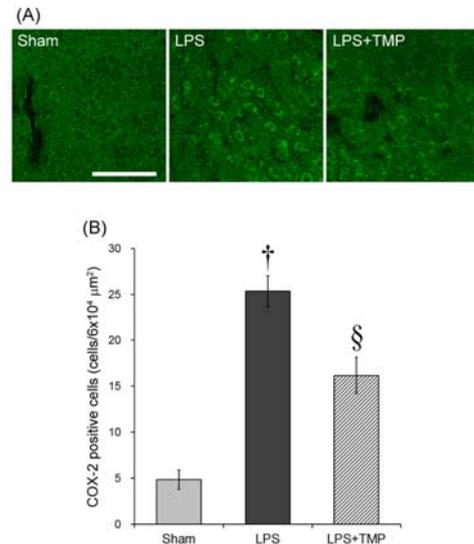


Fig. 6. Effect of TMP on COX-2 positive cells in hypothalamic region of LPS-treated mice. (A) Representative photographs showing COX-2 positive cells in the hypothalamic tissue. Scale bar is 100 μm , applicable to all sections. (B) The number of COX-2 positive cells in the hypothalamic region was significantly reduced by 30 mg/kg TMP treatment compared to the LPS group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared between Sham and LPS group (†, $p < 0.001$) or between LPS and LPS+TMP group (§, $p < 0.01$).

고찰

중추신경염증은 미세아교세포의 활성화와 염증유발사이토카인의 과발현을 특징으로 하며, 각종 중추신경계 질환에서 이차적으로 신경세포 손상과 임상 증상을 악화시키는 주요 인자이다²⁴). LPS는 Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분인 endotoxin으로 중추신경계 조직 내의 미세아교세포, 별아교세포, 신경세포 및 뇌혈관세포 등 다양한 세포들에 위치한 toll-like receptors (TLRs)에 의해 인지되며²⁵), TLRs가 세포내 신호전달체계인 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 활동을 증강시키는 기전에 의해 미세아교세포와 별아교세포를 활성화시키고, 이들로부터 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 염증

유발사이토카인이 분비되어 뇌조직의 염증을 확산시키고 신경세포를 손상시킨다²⁶⁾. LPS에 의해 급성적으로 유발된 중추신경염증에서 염증유발사이토카인의 mRNA 및 단백질 발현은 4-8시간 내에 나타나며 1-3일 동안 지속된다고 하였다²⁷⁾. 그러므로 본 실험에서는 TMP를 사전 복강주사한 상태에서 LPS를 뇌실에 주입한 다음 24시간 후에 염증유발사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 real-time PCR 방법으로 측정하였다.

본 실험의 결과, 30 mg/kg 투여용량의 TMP는 대뇌피질에서 TNF- α 와 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였고, 해마 조직에서 TMP는 30 mg/kg 투여용량에서 IL-1 β mRNA 발현 증가만을 유의하게 억제하였다. 시상하부 조직에서는 TMP 20 mg/kg 투여용량에서 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하고, 30 mg/kg 투여용량에서는 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현 증가 모두를 매우 유의성 있게 억제하였다. 이러한 결과는 TMP가 시상하부의 염증반응에 대해 효과적인 항염증 효능을 나타낸다는 것을 보여주는 것이다. 이전의 연구에서 TMP는 신경세포 손상 보호효능과 관련하여 대뇌피질과 해마의 신경세포손상에 대해 유의한 효능을 발휘한다고 보고되었다^{5,8,14,17)}. 그러나 본 실험의 결과에서 TMP의 항중추신경염증 효능은 해마 조직에서는 상대적으로 미약하였으며, 오히려 시상하부의 중추신경염증에 대해 보다 더 효과적인 억제 효능을 나타내었다.

시상하부는 신체의 기본적인 생리기능을 조절하는 중추로서 매우 다양한 특성의 신경세포들로 구성되어 있다. 탄수화물과 지질 대사, 영양물질의 감지, 식욕 조절, 에너지 소모 등 에너지대사의 동적평형 (homeostasis)에 직접적으로 관여하고 있으며, 신경내분비 (neuroendocrine)의 조절과 생성 및 분비에 관여한다²⁸⁾. 그러므로 LPS에 의한 시상하부의 염증유발사이토카인 증가는 sickness behavior를 나타나게 하고^{29,30)}, prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성을 통해 통증과 발열을 일으킨다고 하였다²⁹⁾. 또한 시상하부는 스트레스반응과 그에 따른 면역조절 작용에 관여하는 hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA)의 일부로서³¹⁾, 사이토카인이 시상하부를 자극하면 corticotropin-releasing hormone이 분비되고, 이들이 뇌하수체를 자극하여 adreno-corticotropic hormone (ACTH)을 분비하며, 분비된 ACTH는 부신에서 glucocorticoid를 분비하여 염증을 억제한다³²⁾. 그러므로 시상하부의 염증유발사이토카인 증가는 단순히 중추신경계 내에서 염증반응의 확산과 신경세포 손상을 넘어 통증과 발열, sickness behavior, 스트레스에 의한 면역반응 조절장애, HPA와 glucocorticoid의 변화 등 전신적인 영향을 유발하게 된다.

이러한 TMP의 항염증 효과를 감안하면, TMP가 시상하부의 염증유발사이토카인 증가를 유의하게 억제하는 효능이 있음을 관찰한 본 실험의 결과는 TMP가 중추신경계의 통증과 발열, sickness behavior, 면역반응 조절장애 등에 유의한 효능이 있을 것을 제시하는 결과이다. 또한 이러한 TMP의 작용은 川芎이 行氣止痛과 活血消腫의 효능으로 風寒頭痛에 사용한다고 한 본초학적 효능³³⁾과의 관련성을 추측하게 한다.

한편으로 통증과 염증반응을 일으키는 주된 물질인 PGE₂는 COX-2 효소단백질에 의해 생성된다³⁴⁾. 시상하부 조직에

서 COX-2 발현을 면역조직화학염색을 통해 관찰한 결과에서 30 mg/kg의 TMP 투여는 LPS에 의해 증가된 COX-2 양성반응 세포 수를 유의하게 억제하였다. 이전의 *in vitro*와 *in vivo* 연구에서 TMP가 COX-2 발현을 억제하였다는 보고가 있고^{35,36)}, TMP가 PGE₂에 의한 통증을 완화하는 작용이 있음도 보고된바 있다³⁷⁾. 이러한 이전의 연구보고들과 본 실험의 결과들을 함께 살펴보면 TMP의 시상하부 염증반응에 대한 항염증 효능은 명확한 것으로 판단된다.

본 실험의 결과를 총괄하면, TMP는 LPS의 뇌실주입에 의해 유발된 중추신경염증에서 대뇌피질과 해마 및 시상하부의 염증반응에 대해 일정한 항염증 효능을 나타내었다. 특히 시상하부에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 염증유발사이토카인 발현 증가를 효과적으로 억제하였으며, COX-2 양성반응 세포 수를 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 TMP의 효능에 대한 연구 대상을 신경세포손상 보호효능에서부터 시상하부 중추신경염증에 따른 전신적인 영향을 대상으로 확장하는 실험적 근거를 제시하는 것으로 생각한다. 나아가 시상하부 염증반응에 따른 제반 전신적인 증상들을 함께 관찰하는 진전된 연구를 통해 TMP 및 TMP를 주성분으로 포함하고 있는 川芎 등 한약물의 효능을 재조명할 수 있을 것으로 생각한다.

결론

川芎의 성분인 TMP가 LPS의 뇌실주입에 의해 유발된 중추신경염증 상태에서 뇌조직의 염증유발사이토카인 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해, TMP를 10, 20 및 30 mg/kg의 용량별로 사전에 복강주사하고 LPS (3 mg/kg)를 뇌실에 주입한 24시간 후에 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 측정하였다. 또한 TMP 30 mg/kg의 투여용량에서 시상하부 조직의 COX-2 양성반응 세포를 면역조직화학염색으로 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TMP는 30 mg/kg 투여용량에서 대뇌피질의 TNF- α 와 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
2. TMP는 30 mg/kg 투여용량에서 해마 조직의 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
3. TMP는 20 mg/kg 투여용량에서 시상하부 조직의 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, 30 mg/kg 투여용량에서는 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현 증가 모두를 매우 유의성 있게 억제하였다.
4. TMP는 30 mg/kg 투여용량에서 시상하부의 COX-2 양성세포의 증가를 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 TMP가 시상하부의 중추신경염증을 유의하게 억제하는 작용이 있음을 보여주는 것이며, 나아가 TMP를 포함한 川芎이 시상하부 염증반응에 따른 전신적인 영향에 유의한 효능이 있을 수 있음을 추측하게 한다.

참고문헌

1. Szelényi J. Cytokines and the central nervous system, *Brain Res Bull.* 2001 ; 54 : 329-38.
2. Banks WA, Kastin AJ. Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: Assessment with species-specific enzyme immunoassays. *J Neuroimmunol.* 1997 ; 79 : 22-8.
3. Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest.* 1997 ; 100 : 2641-7.
4. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry.* 2005 ; 17 : 503-14.
5. Shih YH, Wu SL, Chiou WF, Ku HH, Ko TL, Fu YS. Protective effects of tetramethylpyrazine on kainate-induced excitotoxicity in hippocampal culture. *Neuroreport.* 2002 ; 13 : 515-9.
6. Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, Xin W. Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol.* 2003 ; 467 : 41-7.
7. Cheng XR, Zhang L, Hu JJ, Sun L, Du GH. Neuroprotective effects of tetramethylpyrazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Biol Int.* 2007 ; 31 : 438-43.
8. Li SY, Jia YH, Sun WG, Tang Y, An GS, Ni JH, Jia HT. Stabilization of mitochondrial function by tetramethylpyrazine protects against kainate-induced oxidative lesions in the rat hippocampus. *Free Radic Biol Med.* 2010 ; 48 : 597-608.
9. Liao SL, Kao TK, Chen WY, Lin YS, Chen SY, Raung SL, Wu CW, Lu HC, Chen CJ. Tetramethylpyrazine reduces ischemic brain injury in rats. *Neurosci Lett.* 2004 ; 372 : 40-5.
10. Kao TK, Ou YC, Kuo JS, Chen WY, Liao SL, Wu CW, Chen CJ, Ling NN, Zhang YH, Peng WH. Neuroprotection by tetramethylpyrazine against ischemic brain injury in rats. *Neurochem Int.* 2006 ; 48 : 166-76.
11. Hsiao G, Chen YC, Lin JH, Lin KH, Chou DS, Lin CH, Sheu JR. Inhibitory mechanisms of tetramethylpyrazine in middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced focal cerebral ischemia in rats. *Planta Med.* 2006 ; 72 : 411-7.
12. Chang Y, Hsiao G, Chen SH, Chen YC, Lin JH, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Tetramethylpyrazine suppresses HIF-1alpha, TNF-alpha, and activated caspase-3 expression in middle cerebral artery occlusion-induced brain ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 ; 28 : 327-33.
13. Zhu XL, Xiong LZ, Wang Q, Liu ZG, Ma X, Zhu ZH, Hu S, Gong G, Chen SY. Therapeutic time window and mechanism of tetramethylpyrazine on transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Neurosci Lett.* 2009 ; 449 : 24-7.
14. Xiao X, Liu Y, Qi C, Qiu F, Chen X, Zhang J, Yang P. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia. *Neurol Res.* 2010 ; 32 : 547-55.
15. Yang J, Li J, Lu J, Zhang Y, Zhu Z, Wan H. Synergistic protective effect of astragaloside IV-tetramethylpyrazine against cerebral ischemic-reperfusion injury induced by transient focal ischemia. *J Ethnopharmacol.* 2012 ; 140 : 64-72.
16. Sun Y, Yu P, Zhang G, Wang L, Zhong H, Zhai Z, Wang L, Wang Y. Therapeutic effects of tetramethylpyrazine nitron in rat ischemic stroke models. *J Neurosci Res.* 2012 ; 90 : 1662-9.
17. Tang Q, Han R, Xiao H, Shen J, Luo Q, Li J. Neuroprotective effects of tanshinone IIA and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury in vivo and in vitro. *Brain Res.* 2012 ; 1488 : 81-91.
18. Gao C, Liu X, Liu W, Shi H, Zhao Z, Chen H, Zhao S. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats. *Auton Neurosci.* 2008 ; 141 : 22-30.
19. Fan LH, Wang KZ, Cheng B, Wang CS, Dang XQ. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits. *BMC Neurosci.* 2006 ; 7 : 48.
20. Liang Y, Yang QH, Yu XD, Jiang DM. Additive effect of tetramethylpyrazine and deferoxamine in the treatment of spinal cord injury caused by aortic cross-clamping in rats. *Spinal Cord.* 2011 ; 49 : 302-6.
21. Fan L, Wang K, Shi Z, Die J, Wang C, Dang X. Tetramethylpyrazine protects spinal cord and reduces inflammation in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg.* 2011 ; 54 : 192-200.
22. Hu JZ, Huang JH, Xiao ZM, Li JH, Li XM, Lu HB. Tetramethylpyrazine accelerates the function recovery of traumatic spinal cord in rat model by attenuating inflammation. *J Neurol Sci.* 2013 ; 324 : 94-9.
23. Fu X, Zunich SM, O'Connor JC, Kavelaars A, Dantzer R, Kelley KW. Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal

- slice cultures. *J Neuroinflammation*, 2010 ; 7 : 43.
24. Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 ; 4 : 1265–77.
25. Konat GW, Kielian T, Marriott I. The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J Neurochem*. 2006 ; 99 : 1–12.
26. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 ; 55 : 453–62.
27. Jeong HK, Jou I, Joe EH. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Exp Mol Med*. 2010 ; 42 : 823–32.
28. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2011 ; 1243 : E1–39.
29. Granger JI, Ratti PL, Datta SC, Raymond RM, Opp MR. Sepsis-induced morbidity in mice: Effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 ; doi : 10.1016/j.psyneuen.2012.10.010.
30. Harden LM, du Plessis I, Roth J, Loram LC, Poole S, Laburn HP. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanooids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2011 ; 36 : 608–22.
31. Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem*. 2010 ; 113 : 563–75.
32. Grinevich V, Ma XM, Herman JP, Jezova D, Akmayev I, Aguilera G. Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats. *J Neuroendocrinol*. 2001 ; 13 : 711–23.
33. Kim HC. Herbal Pharmacology. Seoul Gipmoon-Dang. 2001 : 318–20.
34. Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 ; 30 : 174–81.
35. Zheng CY, Xiao W, Zhu MX, Pan XJ, Yang ZH, Zhou SY. Inhibition of cyclooxygenase-2 by tetramethylpyrazine and its effects on A549 cell invasion and metastasis. *Int J Oncol*. 2012 ; 40 : 2029–37.
36. He X, Zheng Z, Yang X, Lu Y, Chen N, Chen W. Tetramethylpyrazine attenuates PPAR- γ antagonist-deteriorated oxazolone-induced colitis in mice. *Mol Med Report*. 2012 ; 5 : 645–50.
37. Liang SD, Gao Y, Xu CS, Xu BH, Mu SN. Effect of tetramethylpyrazine on acute nociception mediated by signaling of P2X receptor activation in rat. *Brain Res*. 2004 ; 995 : 247–52.