

人間 腦 星狀細胞에서 鎭肝熄風湯의 사이토카인 조절 효과

유현희 · 이성근 · 이기상*

원광대학교 군포한방병원 내과

The Regulatory Effect of *Zhengan Xifeng-tang* on Pro-inflammatory Cytokine in Human Brain Astrocytes

Hyun Hee Ryu, Seoung Geun Lee, Key Sang Lee*

Department of International Medicine of Oriental Medicine Hospital, Wonkwang University

Brain cells produce cytokines and chemokines during the inflammatory process of many neuronal diseases both in animal models and in patients. Inflammatory cytokines are the main responsible for the onset of inflammatory cascade. During the past decade, a growing corpus of evidence has indicated an important role of these cytokines in the development of brain damage. *ZhenganXifeng-tang* (*ZGXFT*) is a Korean herbal prescription, which has been successfully applied for the treatment of various neuronal diseases. However, its effect in experimental models remains unknown. Astrocytes are predominant neuroglial cells of the central nervous system and are actively involved in cytokine-mediated events in inflammatory disease. An inflammatory response associated with β -amyloid ($A\beta$) and interleukin (IL)-1 β is responsible for the pathology of inflammation disease. To investigate the biological effect of *ZGXFT*, the author examined cytotoxicity, effect of cytokines (IL-6 and IL-8) secretion and expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) on human astrocytoma cell line U373MG stimulated with IL-1 β plus $A\beta$ fragment 25-35 ($A\beta$ [25-35]). *ZGXFT* by itself had no effect on cell viability on human astrocytoma cells. The secretion of IL-6 and IL-8 was inhibited by pre-treatment with *ZGXFT* in human astrocytoma cells. In addition, the expression of COX-2 was induced by IL-1 β plus $A\beta$ [25-35] and was partially inhibited by treatment with *ZGXFT*. The author demonstrates the regulatory effects of inflammatory reactions by *ZGXFT* in human astrocytes for the first time and suggest the anti-inflammatory effect of *ZGXFT* may reduce and delay pathologic events of inflammatory disease.

Key words : *ZhenganXifeng-tang*(鎭肝熄風湯), cytokine, chemokine, human astrocytoma cell, cyclooxygenase-2, human astrocytoma cell

서 론

鎭肝熄風湯은 청대말기의 張錫純의 <醫學衷中參西錄>에 최초로 수록된 처방으로 “頭目時常眩暈, 腦中時作疼熱, 目脹耳鳴, 心中煩熱, 肢體漸却不利, 口眼漸形歪斜昏不知人, 移時始醒, 或醒後不能復原, 精神短少, 或肢體萎廢, 或成偏枯, 其脈弦長有力” 등의 징후에 쓰인다고 하였다¹⁾. 그 후 진간식풍탕은 임상에서 肝風內動, 肝陽上亢으로 인한 中風의 치료에 효과적으로 사용되고 있다. 하지만 적합한 실험모델에서의 과학적 연구는 많지 않은 상

태이다. 진간식풍탕에 대한 실험 보문으로 박²⁾은 Glucose Oxydase에 의한 척수감각세포의 산화적 손상에 대한 방어에, 김³⁾은 가토의 혈압강하작용 및 혈청 total cholesterol치의 감소에, 윤⁴⁾은 항장요법을 통하여 뇌부종 및 신경장애에 효과가 있음을 실험하여 밝힌바 있다.

뇌 염증 질환은 주요한 병리 인자로 알려진 β -amyloid ($A\beta$) peptide의 침착에 의한 노인성 반점과 여러 사이토카인 (cytokine)들에 의해 일어나는 질병이다⁵⁻⁶⁾. 염증 질환의 병리에는 반응성있는 microglia, astrocytes와 전염증성 사이토카인들을 포함한 필수 조인자들이 관련될 수 있고, 특히 astrocytes는 중추 신경내의 주요한 신경교 세포로 여러 사이토카인들, 케모카인들 및 효과분자들 (effector molecules)을 생성하여 면역 및 염증 반

* 교신저자 : 이기상, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 군포한방병원
· E-mail : omdsang@unitel.co.kr Tel : 031-390-2669
· 접수 : 2004/01/29 · 수정 : 2004/02/17 · 채택 : 2004/03/30

응을 조절하는 중요한 세포이다⁷⁻⁹). 전염증성 사이토카인은 뇌경색뿐만 아니라 다른 많은 뇌신경질환을 포함한 중추신경계의 염증 반응을 조절한다. Interleukin (IL)-1은 중추 신경계에서 다양한 기능을 수행하는 전염증성 사이토카인의 하나로, 지난 10여년간 뇌손상 과정 중 이 사이토카인의 중요성을 암시하는 많은 증거들이 제시됐다. 뇌경색의 초기 및 만성기에 뇌에서 IL-1의 발현이 극적으로 증가하는 것이 그 한 예이다⁹). 케모카인은 저분자량 물질로 microglia와 astrocytes를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되는 전염증성 단백질로, 염증성 자극 반응으로 국소적으로 발현되며, 활성화 및 화학주성 활성을 통해서 뒤이어 연속적 조직 반응을 증폭시킨다¹⁰⁻¹¹). Aβ peptide는 뇌에서 TNF-α 또는 IL-6의 분비를 통해서 염증 반응을 유도할 수 있다¹²). Aβ peptide는 흰쥐의 astrocytes와 인간의 astrocytoma cell에서 전염증성 사이토카인과 케모카인의 분비를 촉진시킨다¹³). 한편 활성화된 microglia에서 분비되는 IL-1β는 astrocytes의 활성화에 관여할 수 있음을 밝힌 보고도 있다¹⁴). 또한 Aβ fragment 25-35 (Aβ [25-35])는 신경교세포에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 분비를 유도할 수 있으며, Aβ 주위의 astrocytes에서 COX-2 생성의 증가는 뇌에서 신경 독성 및 손상을 반영한다. COX-2는 arachidonic acid를 염증 반응 동안 수많은 생물학적 반응 매개 인자로서 잘 알려진 prostanoids로 전환시키는 촉매 작용을 한다. 자극이 없을 때 대부분의 조직에서 COX-2는 검출되지 않지만, mitogens, endotoxins 및 전염증성 사이토카인을 포함한 많은 인자들에 의해서 다양한 종류의 세포 형태에서 명료한 핵전사 활동이 관찰된다. COX-2는 시냅스 활동으로 조절될 것이 예상되는 특이적 신경 개체군의 뇌에서 항상적으로 발현된다¹⁵). 그러나 염증 병리 상황에서 중추 신경계의 면역 적응 세포, astrocytes 및 microglia는 COX-2 유도에 따른 prostaglandin의 주요 생성원이 되는 것 같다¹⁶⁻¹⁷).

한편 COX-2는 기억, 감각의 통합, 자율 신경의 조절과 같은 중추 신경계의 생리적 기능 수행에 기여하는 뚜렷한 신경군에서 항상적으로 발현하고¹⁸) 있어 COX-2의 이런 역할을 예상할 수 있다¹⁹). COX-2의 발현증가는 유해한 prostanoids와 자유기들의 과잉 생성을 유도하여 신경 손상을 매개할 것으로 생각된다. 알츠하이머질환의 뇌에서도 COX-2 mRNA와 단백질의 발현 상승이 보고됐다²⁰⁻²¹).

본 연구에서 저자는 진간식풍탕이 인간 astrocytoma에서 Aβ peptide와 IL-1β의 자극에 의해 유도되는 염증성 사이토카인들 (IL-6, IL-8)과 COX-2에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약

세포 배양액인 RPMI 1640은 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), Aβ[25-35] 및 기타 주요 시약들은 Sigma (St. Louis, MO)에서, 재조합 human IL-1β는 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Anti-human IL-6 항체, biotinylated anti-human IL-6 항체, 그리고 재조합 human

IL-6 들은 PharMingen (Cambridge, UK)에서 구입하였다.

2. 진간식풍탕의 추출

진간식풍탕은 우슬 10 g, 대자석 10 g, 용골 5 g, 모려 5 g, 귀관 5 g, 백작약 5 g, 현삼 5 g, 천문동 5 g, 천련자 2 g, 맥아 2 g, 인진 2 g, 감초 1.5 g으로 구성돼 있으며 각 약재는 원광대학교 군포 한방병원에서 준비하였다. 약탕기에 약재와 증류수를 적량 넣고 약 3시간 동안 달인 후, 여과 및 냉동 건조하여 4 °C에서 보관하면서 실험 시 0.45 μm 여과지로 여과하여 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay로 결정하였다. 간단히하면, 500 μl의 U373MG astrocytoma 현탁액 (3 × 10⁵ cells)에 농도 별 진간식풍탕을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 20 μl의 MTT 용액 (5 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 37 °C에서 배양한 후, 상등액을 제거하고 용해되지 않은 포르마잔 색소물을 DMSO에 용해시켰다. OD (optical density)를 540 nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 계측기를 이용하여 측정하였다. 비교군의 OD는 100 % 생존율로 설정하였다.

4. 사이토카인 정량

사이토카인은 상기 언급한 ELISA 방법으로 정량하였다. IL-6, IL-8의 정량을 위해 plate에 정제된 rat anti-human IL-6, IL-8 단클론 항체 (1 μg/ml) 코팅 후, biotinylated rat anti human IL-6, IL-8 단클론 항체 (0.1 μg/ml)를 처리했다. 0.05 % tween 20 이 함유된 PBS에 희석한 recombinant human IL-6, IL-8을 표준 용액으로 사용했다. 표준 곡선은 10 - 1000 pg/ml 범위에 있었다. % Inhibition = (a-b) × 100/a. 'a'는 진간식풍탕을 처리하지 않았을 때, 'b'는 진간식풍탕을 처리했을 때 사이토카인 분비량이다.

5. Western blot analysis 세포 추출물은 세정제 용해 방법으로 얻었다. 세포 (5 × 10⁶ cells)를 모은 후 PBS로 한번 세척하고 lysis buffer로 재현탁하였다. 검체를 용해시키기 위해 1시간 동안 4 °C에서 15분마다 수초간씩 vortex한 후, 4 °C에서 5분 동안 15000 g로 원심분리하여 상등액을 분석했다. 검체를 95 °C에서 5분동안 가열한 후, 얼음에서 잠시 냉각시켰다. 5분 동안 15000 g로 원심분리한 후에 50 μl의 aliquots을 15 %의 SDS-PAGE에 용해시켰다. 용해된 단백질은 25 mM Tris, pH 8.5, 0.2M glycerin, 20 % methanol에서 하룻밤 동안 25 V로 니트로셀룰로오스막에 전이시켰다. Blots은 10 %의 탈지우유를 함유한 1 X TBST로 적어도 2시간 동안 blocking 후, anti-COX-2 항체 (blocking 용액으로 1:200 희석)로 배양하였다. PBS-tween-20으로 3번 세척한 후에 blot은 30분 동안 제 2차 항체 (blocking 용액으로 1:1000 희석)로 배양하여 항체 특이 단백질을 enhanced chemiluminescence detection system에서 확인했다 (Amersham Corp., Newark, NJ, USA).

6. 통계 분석

각각의 자료는 같은 조건에서 독립된 실험을 수행하여

mean ± SEM으로 나타났다. Students t-test는 각 군간의 통계적 비교를 위해 사용하였으며, 결과는 P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 진간식풍탕의 astrocytes 생존율에 미치는 효과

맨 먼저 MTT assay로 진간식풍탕이 U373MG astrocytoma의 생존율에 미치는 효과를 관찰하였다. astrocytes를 진간식풍탕이 없는 상태에서 24시간 동안 IL-1β와 Aβ[25-35]로 자극한 바, 생존율이 대조군 (100.0 ± 1.3 %)과 비교하여 96.92 ± 3.5 %로 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 진간식풍탕 (1 - 0.01 mg/ml)을 처리했을 때는 세포 생존율에 거의 영향을 주지 않았다.(Fig. 1)

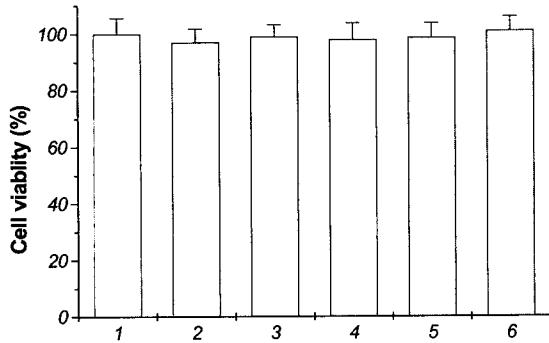


Fig. 1. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on cell viability in U373MG astrocytoma. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay for 24 h incubation after stimulation of IL-1β (10 ng/ml) plus Aβ[25-35] (30 μg/ml), in the absence or presence of ZGXFT (1 - 0.01 mg/ml). The percentage of viable cells was over 95%. Data represent mean ± SEM of six independent experiments. 1) Control, 2) IL-1β + Aβ[25-35] alone, 3) 1 mg/ml ZGXFT alone, 4) 1 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35], 5) 0.1 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35], 6) 0.01 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35].

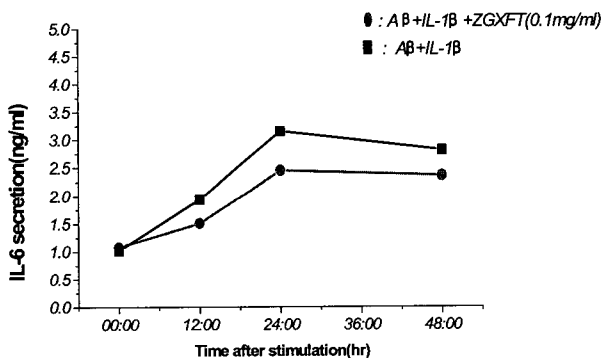


Fig. 2. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on IL-6 secretion in U373MG astrocytoma. ZGXFT (0.1 mg/ml) was treated before IL-1β (10 ng/ml) plus Aβ[25-35] (30 μg/ml) stimulations. Cell-free supernatants were tested at time courses for up to 48 h. The amount of IL-6 secreted by astrocytes was measured by ELISA. IL-6 secretion reached a peak 24 h incubation after stimulation. Data represent mean ± SEM of four independent experiments.

2. 진간식풍탕의 활성화된 astrocytes로부터 IL-6 분비 억제 효과
다음은 IL-1β와 Aβ[25-35] 자극에 의한 astrocytes로부터 IL-6 분비 최적 시간을 조사한 결과, IL-6 분비는 자극 후 24시간대에 최고치를 나타냈다. (Fig. 2) 시간대별 진간식풍탕 전처리에 의한 IL-6 분비 억제 효과를 분석한 결과, 진간식풍탕 (0.1 mg/ml)은 IL-1β와 Aβ[25-35]로 자극된 astrocytes에서 48시간에 이르기까지 IL-6의 분비를 억제함을 관찰했다.(Fig. 2)

3. 진간식풍탕의 활성화된 astrocytes로부터 IL-8 분비 억제 효과
이번에는 IL-1β와 Aβ[25-35]에 의해 자극된 astrocytes로부터 IL-8의 분비 최적 시간을 조사하였다. 자극 후 48시간대에 IL-8의 분비가 최고치를 보였다. (Fig. 3) 시간에 따른 진간식풍탕의 IL-8 분비 억제 효과를 알아보기 위해 IL-1β와 Aβ[25-35]로 자극하기 전에 진간식풍탕 (0.1 mg/ml)을 처리한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 진간식풍탕은 astrocytes에서 IL-8 분비가 IL-6에서와 마찬가지로 각 시간대에서 모두 억제됐다.

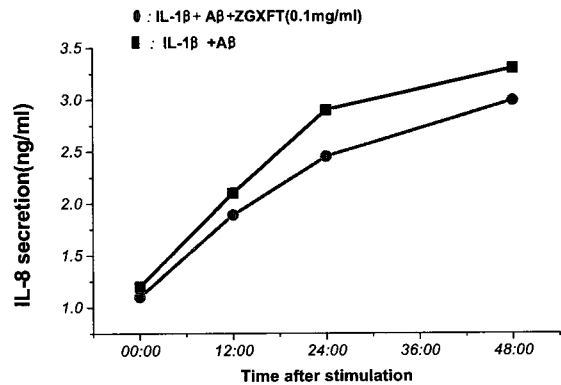


Fig. 3. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on IL-8 secretion in U373MG astrocytoma. ZGXFT (0.1 mg/ml) was treated before IL-1β (10 ng/ml) plus Aβ[25-35] (30 μg/ml) stimulations. Cell-free supernatants were tested at time courses for up to 48 h. The amount of IL-8 secreted by astrocytes was measured by ELISA. IL-8 secretion reached a peak 48 h incubation after stimulation. Data represent mean ± SEM of six independent experiments.

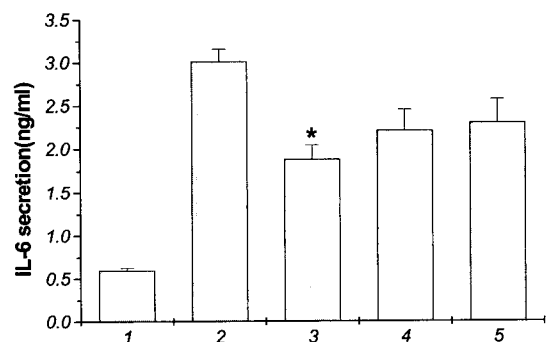


Fig. 4. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on IL-6 secretion in U373MG astrocytoma at various concentrations (1 - 0.01 mg/ml). ZGXFT was tested after 24 h of activation with IL-1β (10 ng/ml) plus Aβ[25-35] (30 μg/ml). Data represent mean ± SEM of six independent experiments. *P < 0.05; significantly different from the control value. 1) Control, 2) IL-1β + Aβ[25-35] alone, 3) 1 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35], 4) 0.1 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35], 5) 0.01 mg/ml ZGXFT plus IL-1β + Aβ[25-35].

4. 진간식풍탕의 활성화된 astrocytes로부터 농도 별 IL-6 분비 억제 효과

진간식풍탕 농도에 따른 IL-6 분비 억제 효과를 관찰하기 위해, IL-1 β 와 A β [25-35]로 astrocytes를 활성화시킨 24시간 후에 IL-6 분비량을 분석했다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 IL-6의 분비 억제제가 IL-1 β 와 A β [25-35]에 의해 증가됐는데, 1 - 0.01 mg/ml 농도의 진간식풍탕 전처리에 의해 농도 의존적으로 억제됐다. 특히 진간식풍탕 1 mg/ml 농도에서는 유의성 있는 억제 효과를 나타냈다.

5. 진간식풍탕의 활성화된 astrocytes로부터 농도 별 IL-8 분비 억제 효과

다음은 진간식풍탕 농도에 따른 IL-8 분비 억제 효과를 관찰하기 위해, IL-1 β 와 A β [25-35]로 astrocytes를 활성화시킨 24시간 후에 IL-8 분비량을 분석했다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 IL-8의 분비가 IL-1 β 와 A β [25-35]에 의해 증가됐는데, 1 - 0.01 mg/ml 농도의 진간식풍탕 전처리에 의해 농도 의존적으로 억제됐다. 하지만 진간식풍탕 모든 실험 농도에서 유의성있는 억제 효과는 나타나지 않았다.(Fig. 5)

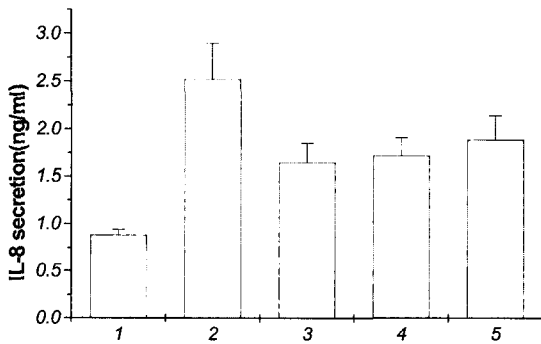


Fig. 5. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on IL-8 secretion in U373MG astrocytoma at various concentrations (1-0.01 mg/ml). ZGXFT was tested after 24 h of activation with IL-1 β (10 ng/ml) plus A β [25-35] (30 μ g/ml). Data represent mean \pm SEM of six independent experiments. 1) Control, 2) IL-1 β + A β [25-35] alone, 3) 1 mg/ml ZGXFT plus IL-1 β + A β [25-35], 4) 0.1 mg/ml ZGXFT plus IL-1 β + A β [25-35], 5) 0.01 mg/ml ZGXFT plus IL-1 + A β [25-35].

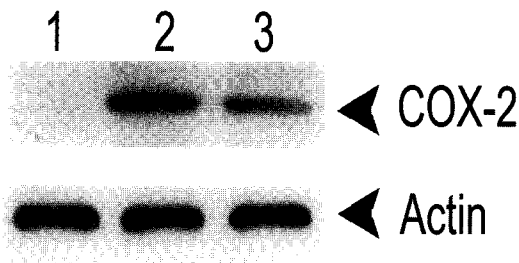


Fig. 6. Effect of ZhenganXifeng-tang (ZGXFT) on expression of COX-2 in U373MG astrocytoma. ZGXFT (1 mg/ml) was treated before IL-1 β (10 ng/ml) plus A β [25-35] (30 μ g/ml), 50 μ g of cell lysates was separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with antibody to COX-2. Lane 1: blank, lane 2: IL-1 β + A β [25-35], lane 3: IL-1 β + A β [25-35] plus 1 mg/ml ZGXFT.

6. 진간식풍탕의 astrocytes COX-2 발현에 미치는 효과

마지막으로 진간식풍탕에 의한 IL-1 β 와 A β [25-35]로 활성화된 astrocytes에서 COX-2 단백질 발현 억제효과를 실험하였다. IL-1 β 와 A β [25-35]에 의한 현저히 증가된 COX-2의 발현이 1 mg/ml의 진간식풍탕 전처리에 의해 현저히 억제됐다.(Fig. 6)

고 찰

진간식풍탕은 청대 이후로 간양상항에 의한 뇌졸중에 임상적으로 많이 사용 되어온 처방으로 그 적응증은 “頭目時常眩暈 腦中時作疼熱, 目脹耳鳴, 心中煩熱, 肢體漸却不利, 口眼漸形歪斜 昏不知人, 移時始醒, 或醒後不能復原, 精神短少, 或肢體萎廢, 或成偏枯, 其脈弦長有力”등을 들 수 있으며 그 처방 구성은 우슬 10 g, 대자석 10 g, 용골 5 g, 모려 5 g, 귀관 5 g, 백작약 5 g, 현삼 5 g, 천문동 5 g, 천련자 2 g, 맥아 2 g, 인진 2 g, 감초 1.5 g으로 되어 있다¹⁾. 본 연구에서는 이러한 진간식풍탕의 작용 기전을 규명하기 위하여 뇌졸중 및 기타 중추 신경계 질환의 중요한 병리 기전으로 인정되고 있는 사이토카인, 케모카인 및 효과기 분자에 대한 진간식풍탕의 효과를 살펴 보았다.

저자는 생체의 염증 실험 모델을 통하여 진간식풍탕이 인간 astrocytes의 활성화에 의한 염증성 사이토카인들의 분비와 COX-2의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 이런 결과 들은 진간식풍탕을 뇌경색 등에 의한 뇌 염증 질환에 유용하게 활용할 수 있음을 암시한다.

활성화된 신경교 세포 유래 전염증성 사이토카인들은 중추 신경계의 염증과 신경 병리학적 변화의 진행에 중요한 인자들이다. 케모카인은 염증 자극에 반응하여 국소적으로 발현하며 화학 주성 활성 등으로 계속되는 조직 반응을 증폭시킨다¹⁰⁾. A β peptide는 astrocytes에서 전염증성 사이토카인들과 케모카인의 분비를 유도한다⁶⁾. A β [25-35]에 반응하여 나타나는 IL-6와 IL-8의 분비는 IL-1 β 의 협조 자극에 의해 상승적인 효과를 나타내는 것으로 생각되는데, 진간식풍탕은 세포 독성없이 IL-6와 IL-8의 분비를 억제했다. 또한 신경교 세포에서 fragment A β [25-35]는 COX-2의 생성을 유도할 수 있는데, A β 주위의 astrocytes에서 생성되는 COX-2는 알짜하이머 질환에서 뇌손상과 신경 독성을 일으키는 주요 원인이 된다. 진간식풍탕은 IL-1 β 와 A β [25-35]로 자극된 세포에서 COX-2의 발현을 현저히 억제했다. IL-1 β 는 실험 쥐의 astrocytes에서 CCAAT/enhancer-binding protein B (C/EBP)와 C/EBP의 전사 인자의 발현을 유도한다²²⁾. A β [25-35]는 흰쥐 신경에서 전사 인자인 nuclear factor- κ B의 강력한 활성화제이다²³⁾. 향후 진간식풍탕에 의한 염증성 사이토카인들의 분비 및 COX-2의 발현 조절 기전 규명을 위한 더욱 상세한 연구가 필요하다.

결 론

astrocytes를 이용한 생체의 염증 실험 모델에서 진간식풍탕의 생물학적 효과를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

진간식풍탕 (1 - 0.01 mg/ml)은 본 실험에 사용된 U373MG astrocytoma에 대한 세포독성을 나타내지 않았고, 진간식풍탕 (0.1 mg/ml)은 IL-1 β 와 A β [25-35]에 의해 자극된 astrocytes로부터 48시간에 이르기까지 IL-6의 분비를 억제했으며, IL-1 β 와 A β [25-35]에 의해 자극된 astrocytes로부터 48시간에 이르기까지 IL-8의 분비를 억제했고, 진간식풍탕 (1 - 0.01 mg/ml)은 농도 의존적으로 astrocytes로부터 IL-1 β 와 A β [25-35] 유도성 IL-6의 분비를 억제했다. 특히 진간식풍탕 1 mg/ml 농도에서는 유의성있는 억제 효과를 나타냈고, astrocytes로부터 IL-1 β 와 A β [25-35] 유도성 IL-8의 분비를 억제했다. 그러나 진간식풍탕은 모든 실험 농도에서 유의성있는 억제 효과는 나타내지 않았다. 진간식풍탕 (1 mg/ml)은 IL-1 β 와 A β [25-35]로 활성화된 astrocytes에서 COX-2 단백질 발현을 현저히 억제했다.

결론적으로 본 연구에서는 진간식풍탕의 IL-1 β 와 A β [25-35]에 의해 자극된 astrocytes로부터 IL-6와 IL-8의 분비 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 관찰하여 미흡하나마 본 처방의 임상적 활용 근거를 제공하였다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. zhāng xī chún, yī xué zhōng zhōng sēn xī lù. shí jiā zhuāng shí, héběi science technology publishing company, China, 113-116, 1985.
2. Park, Kwang Su, Effect of jingansikpung-tang water Extract on LDH Activity of Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by GO. Korean Journal oriental physiology & Pathology 16(3), 563-566, 2002.
3. Kim, Hee Jun, Effect of jingansikpung-tang on blood pressure and serum Total cholesterol of rabbit. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine, 11(1), 109-120, 1990.
4. Jun-Chul Yoon, The Effects of Jingansikpung-tang, derived from Anal Therapy on CHT-induced brain edema and neurological disturbance symptom in Rats. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine, 23(1) 47-56, 2002.
5. L.L. Iversen, R.J. Mortishire-Smith, S.J. Pollack and M.S. Shearman, The toxicity in vitro of β -amyloid protein. Biochem. J. 311, 1-16, 1995.
6. R.E. Mark, J.G. Sheng and S.T. Griffin, Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. Hum. Pathol. 26, 816-823, 1995.
7. M. Aschner, Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. Toxicol. Lett. 102-103, 283-287, 1998.
8. G. Raivich, M. Bohatschek, C.U.A. Kloss, A. Werner, L.L. Jones and G.W. Kreutzberg, Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res. Rev. 30, 77-105, 1999.
9. J.Y. Um, K.S. Moon, K.M. Lee, J.M. Yun, K.H. Cho, B.S. Moon and H.M. Kim, Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction. Brain Res. Mol. Brain Res. 115, 50-54, 2003.
10. M. Hayashi, Y. Luo, J. Laning, R.M. Strieter and M.E. Dorf, Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other -chemokines in murine glial cells. J. Neuroimmunol. 60, 143-150, 1995.
11. R.M. Ransohoff, T.A. Hamilton, M. Tani, M.H. Stoler, H.E. Shick, J.A. Major, M.L. Estes, D.M. Thomas and V.K. Tuohy, Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. FASEB J. 7, 592-600, 1993.
12. E.T. Sutton, T. Thomas, M.W. Bryant, C.S. Landon, C.A. Newton and J.A. Rhodin, Amyloid- β peptide induced inflammatory reaction is mediated by the cytokines tumor necrosis factor and interleukin-1. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 31, 313-323, 1999.
13. E. Prata, P. Baron, L. Medaa, E. Scarpinia, D Galimbertia, G. Ardolino, A. Cataniab and G. Scarlato, The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with β -amyloid protein Neuroscience Letters. 283(3), 177-180, 2000.
14. K.T. Akama and L.J. Van Eldik, β -Amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β -and tumor necrosis factor- α (TNF- α)-dependent, and involves a TNF- α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. J. Biol. Chem. 275, 7918-7924, 2000.
15. V.L. Marcheselli and N.G. Bazan, Sustained induction of prostaglandin endoperoxide-2 by seizures in hippocampus. J. Biol. Chem. 271, 24794-24799, 1997.
16. L. Mingetti, D.T. Walsh, G. Levi and H. Perry, In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 58, 1184-1191, 1999.
17. A.M. Rohrenbeck, M. Bette, D.C. Hooper, F. Nyberg, L.E. Eiden, B. Dietzschold and E. Weihe, Upregulation of COX-2 and CGRP expression in resident cells of the Borna disease virus-infected brain is dependent upon inflammation. Neurobiol. Dis. 6, 15-34, 1999.
18. C.D. Breder, D. DeWitt and R.P. Kraig, Characterization of

- inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 355(2), 296-315, 1995.
19. W.E. Kaufmann, K.I. Andreasson, P.C. Isakson and P.F. Worley, Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins.* 54(3), 601-624, 1997.
20. G.M. Pasinetti and P.S. Aisen, Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience.* 87(2), 319-324, 1998.
21. K. Yasojima, C. Schwab, E.G. McGeer and P.L. McGeer, -2 Distribution of cyclooxy genase-1 and cyclooxy genasem RNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res.* 830(2), 226-236, 1999.
22. J.R. Cardinaux, I. Allaman and P.J. Magistretti, Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP and C/EBP in astrocytes. *Glia.* 29, 91-97, 2000.
23. B. Kaltschmidt, M. Uherek, B. Volk, P.A. Baeuerle and C. Kaltschmidt, Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by β -amyloid peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2642-2647, 1997.