



이학박사 학위논문

내독소로 유도된 패혈증 모델에서 실리마린의 치료 및 예방 효과

Therapeutic and Preventive Effect of Silymarin in

Endotoxin-induced Sepsis Model

울 산 대 학 교 대 학 원

- 의 학 과
- 박 윤 영

내독소로 유도된 패혈증 모델에서 실리마린의 치료 및 예방 효과

지 도 교 수 홍상 범

이 논문을 이학박사 학위 논문으로 제출함

2022 년 2 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

박 윤 영

박윤영의 이학박사 학위 논문을 인준함

심사위원	임	채	만	(인)
심사위원	0	재	철	(인)
심사위원	홍	상	범	(인)
심사위원	허	진	원	(인)
심사위원	박	태	선	(인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 2 월

국문 요약

연구목적

패혈증은 감염에 대한 숙주의 조절되지 않은 반응으로 인한 생명을 위협하는 장기부전으로 정의된다. 패혈증 치료의 상당한 발전에도 불구하고 중증패혈증과 패혈증 쇼크의 사망률은 각각 20~35%, 50%에 육박한다. 패혈증의 치료는 감염병소를 조기에 제거하고 적절한 항생제를 투여하는 것이나 중증패혈증의 사망률은 30% 이상으로 여전히 높다. 이러한 이유로 기존 치료 방법 외에 패혈증의 병태생리 중의 하나인 숙주의 염증 반응에 초점을 둔 약물 연구가 많이 이루어지고 있다.

실리마린은 식물 마리아엉겅퀴에서 추출한 물질로 플라보노이드의 한 종류이며 간 기능 개선제로 사용되고 있는데 이는 간질환의 염증 반응 물질의 생성을 억제하고 염증을 억제하는 것으로 알려져 있다. 실리마린의 이러한 항염증효과가 패혈증의 염증 반응에도 효과를 나타낼 수 있다는 가정을 하게 되었다.

본 연구에서는 내독소인 Lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 패혈증 모델에서 실리마린의 투여가 염증을 예방하고 치료 효과를 가지는지에 대하여 알아보았다. 실리마린의 투여가 염증 매개 물질의 활성과 조직학적 변화를 통하여 미치는 영향을 확인하고 임상치료제의 가능성에 대해 확인하고자 하였다. 대식세포와 동물 패혈증 모델에 다양한 농도의 실리마린을 전처치 또는 후처치하여 염증매개물질의 활성정도와 조직학적 변화를 살펴보았다.

연구재료 및 방법

1. 대식세포 실험

대식세포 J774A.1(2x10⁶cells/ml) 24 시간 배양한 후 Lipopolysaccharide(LPS, 200ng/ml) 투여 전과 후로 나누어 실험을 하고, 실리마린의 농도는 전처치와 후처치 모두 각각 10, 25, 50 μg/ml 세가지 용량을 실험하였다. 대조군은 실리마린 대신 세포배양액(DMEM)을 사용하였다.

그 후 24 시간 배양 한 후 배양액과 세포는 거두어 -80℃에 보관 하였다. 세포 배양액에서 Interleukin 1β(IL-1β), Interleukin 6(IL-6), Interleukin 10(IL-10), Cyclooxygenase 2(COX-2) 그리고 Prostaglandin E2(PGE2)의 농도를 효소결합면역흡착검사를 이용하여 효소면역분석으로 측정하였다. 세포에서 단백질을 분리하여 IL-1β, COX-2 를 Western blotting 방법으로 관찰하였다.

2. 동물 실험

7 주령의 수컷 쥐(㈜) 오리엔트)를 마취 후 LPS 5mg/kg 를 1 회 기관내 투여하여 패혈증 모델을 유도하였다. LPS 의 기관내 투여 전 실리마린 처치, 투여 후 처치의 두 가지 실험을 하였다. 실리마린의 농도는 100, 250 과 500mg/kg 세가지 용량으로 경구투여 하였다. 대조군은 LPS 대신 PBS 로, 실리마린 대신 실리마린을 녹인 용해제를 사용하였다. 48 시간 후에 쥐를 희생시킨 후 기관지에서 폐포 세척액을 회수하여 세포 수와 호중구 수를 산정하였다. 기관지폐포 세척액의 상층액에서 IL-1β, IL-6, IL-10, PGE2 그리고 Leukotriene B 4(LTB4)를 효소면역분석법으로 측정하였다. 쥐의 우측 폐는 -80°C에 보관, 좌측 폐는 10% formalin 용액에 고정한 후에 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색 후 조직학적인 폐손상을 평가하였다.

결과

1. 대식세포 실험

세포배양액에서 측정 한 IL-1β, IL-6, IL-10 그리고 PGE2의 값은 LPS 군에 비하여 실리마린을 투여한 전처치 실험과 후처치 실험에서 유의하게 감소하였다. 실리마린의

ii

투여 용량이 고용량 일수록 감소의 폭이 컸다. COX-2의 값은 전처치의 중간용량과 고용량에서 유의하게 감소하였다.

2. 동물 실험

동물의 기관지폐포 세척액 상층액에서 측정 한 IL-1β의 값은 LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 유의한 감소를 보였다. 기관지폐포 세척액 내의 전체 세포 수와 호중구 수는 LPS 군에 비하여 실리마린을 전처치한 실험과 후처치한 실험에서 유의한 감소를 보여주었다

조직학적 소견을 보면 혈관주위 콜라겐 침착 및 폐포 중격과 간질의 비후를 동반한 섬유화가 실리마린 투여한 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 LPS 만 투여한 군에 비하여 감소되었다.

결론

내독소인 LPS 를 처리한 대식세포와 동물의 패혈증 모델에 실리마린을 투여가 사이토카인을 유의하게 감소시킴으로 염증 유발 억제를 보이고, 기관지폐포 세척액 내 호중구 수를 감소시키며 조직학적 호전을 보임으로 폐손상이 호전됨을 보여주었다. 실리마린의 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 항염증 효과를 보여 패혈증의 예방과 치료제로써의 실리마린의 가능성을 보여 주었다.

중심단어: sepsis; lipopolysaccharide; silymarin; inflammation

iii

차례

국문요약i
표 차례 vi
그림 차례 vii
서론1
연구대상 및 방법5
결과14
고찰
결론
참고문헌 60
영문요약

표 차례

Table 1. Top Histological grading of acute lung injury	• 9
Table 2. Summary of silymarin of sepsis in mouse and cell models	50

그림 차례

Figure 1. Schematic Flow Chart of Experimental Design				
Figure 2. Cytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 level in cell medium supernatant at silymarin pre-				
treatment ······ 16				
Figure 3. COX-2 and PGE2 level in cell medium supernatant at silymarin pre-treatment				
Figure 4. Cytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 level in cell medium supernatant at silymarin post-				
treatment ······ 21				
Figure 5. COX-2 and PGE2 level in cell medium supernatant at silymarin post-treatment				
Figure 6. Analysis of IL-1 β pre and post-treatment with Silymarin in LPS-induced injury				
using Western blot analysis				
Figure 7. Analysis of COX-2 pre and post-treatment with Silymarin in LPS-induced				
injury using Western blot analysis 27				
Figure 8. Cytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 level in BAL fluid at silymarin pre-treatment29				
Figure 9. PGE2 and LTB4 level in BAL fluid at silymarin pre-treatment				
Figure 10. Total cells and the neutrophil in BAL fluid at silymarin pre-treatment				
Figure 11. Silymarin attenuates lung injury in LPS-induced sepsis at pre-treatment.				
hematoxylin-eosin staining				
Figure 12. Histologic scoring of lung injury in LPS-induced sepsis with silymarin pre-				
treatment ······· 38				

Figure 17. Histologic scoring of lung injury in LPS-induced sepsis with silymarin post-

서 론

미국의 중환자학회(Society of Critical Care Medicine)와 유럽의 중환자학회(European Society of Intensive Care Medicine)에서 발표한 지침서인 "Sepsis-3"¹ 에서 패혈증은 '감염에 의해서 조절되지 않는 숙주반응으로 발생되는 생명을 위협하는 장기부전'으로 정의하고 있다. 다양한 원인에 의한 감염으로 인해 유발된 숙주의 조절되지 않은 반응은 면역학적 반응인 전염증반응과 항염증반응의 불균형, 그리고 비면역학적인 반응으로 심혈관계, 신경계, 호르몬, 생에너지, 대사, 응고의 변화가 포함된다. 결국 여러 장기들에 심각한 기능장애를 유발할 수 있다.¹ 패혈증의 원인 균 중에서 가장 흔한 것은 그람 음성균(Gram negative bacteria)으로 중환자실 입원 환자 감염의 25~30%를 차지하며 감염 시 30~50%의 높은 치사율을 보이고 있다.

패혈증은 환자의 면역 상태와 관련이 깊은데 고령 환자와 각종 암, 폐쇄성 폐질환과 같은 고위험 만성질환 환자, 면역결핍 질환과 면역억제제를 투여하는 환자들에서 많이 나타난다² 패혈증에 의해 폐 손상이 진행될 경우 급성호흡곤란증후군(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)으로 나타나고 ³ 심혈관 손상이 진행되면 혈압이 떨어지고 심박동수가 증가하며 혈청 젖산염 수치 상승하게 된다.⁴

이러한 패혈증의 임상적 특징은 숙주의 염증반응조절실패 때문에 나타나는 것으로 알려져 있다. 감염은 장기간에 걸쳐 복잡하고 다양한 숙주의 반응을 유발 한다. 이러한 반응은 전염증(Pro-inflammatory)과 항염증(Anti-inflammatory) 메커니즘으로 나누며, 긍정적인 기대효과로 감염의 제거 및 조직 회복에 기여하지만 다른 한편으로는 장기 손상과 2 차 감염을 유발하는 양날의 검과 같은 것이다.⁵ 일반적으로 중증 패혈증에서 전염증 반응은 침입 병원체의 제거를 목적으로 작용하는 반면 부수적인 조직 손상을 일으킬 수 있으며, 항염증 반응은 국소 및 전신 조직 손상을 제한 할 목적으로 작용하는 반면 과도한 항염증반응으로 인한 면역억제는 부수적으로 이차감염을 증가시킬 수 있다.

면역체계는 전염증 반응의 해로운 영향을 완화시키는 작용을 한다. 집중 치료가 필요한 패혈증 초기 중증 환자에서 골수 세포에서 조직적합성항원 (Human Leukocyte Antigen -DR isotype, HLA-DR)의 발현이 저하 되어있는 것이 관찰되었다.⁶ 이 환자들은 항균 요법에도 불구하고 잠복성 바이러스 감염이 재 활성화 되기도 하고 지속적으로 다발성 감염 부위가 나타나기도 한다.^{7, 8} 여러 연구에서 패혈증 환자의 백혈구의 감소가 확인되었고, 비장과 폐에서 면역 억제 반응이 나타난 흔적을 관찰할 수 있었는데 억제 T 세포(Suppressor T cell) 수용체에 대한 기질 발현이 늘어나 있던 것을 그 증거로 볼 수 있다.⁶

패혈증의 치료는 환자의 병력을 조사하고 감염 의심 부위를 찾아 감염이 발생하게 된 환경적 요인과 함께 어떤 종류의 병원체에 의해 감염 되었는지를 알아내는 것으로 시작된다. 이 후 적절한 항생제를 투여함으로써 패혈증 환자의 사망률을 낮추는데 기여 할 수 있다.^{9, 10} 따라서 패혈증 환자의 초기 치료에 있어 정확한 진단과 조기 항생제 투여는 매우 중요하다.

스테로이드 호르몬은 염증성 사이토카인 및 호르몬들의 활성화와 상호작용에 관여하며 생체 항상성을 유지시켜주고 항염증 작용을 통하여 패혈증으로 유발된 생리적 변화를 조절하는데 중요한 역할을 한다.¹¹⁻¹³ 특히 중증질환 환자들은 스테로이드 호르몬이 부족할 수 있어 이러한 환자들에게 적절한 스테로이드 투여는 환자의 예후에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 패혈증 환자에게 과도한 염증 반응을 완화시키는 수단으로 코르티코스테로이드류(Corticosteroids) 가 많이 사용되고 있다.¹⁴ 하지만 스테로이드 사용에 대해 많은 논란이 있다. 최근에 시행 된 연구에 의하면 패혈증 쇼크 환자에게 투여된 스테로이드의 종류와 투여 방법에 상관없이 사망률의 개선에 유의한 차이가 없었다.¹⁵ 또한 스테로이드의 투여를 갑자기 중단한 경우 혈역학적, 면역학적 역효과가 나타나기도 했다.¹⁶ 따라서 스테로이드 사용은 감염 악화와 위장관 출혈 등 여러

부작용을 일으킬 수 있으므로 무분별한 사용을 자제하고 환자의 상태와 질환에 따라 선별하여 사용하는 것이 중요하다.¹⁷

이러한 이유로 많은 연구자들이 스테로이드를 대체하거나 더 많은 효과를 볼 수 있는 약제를 찾고 있다. 오랜 시간 패혈증의 병리 생리학적 효과를 직접 표적으로 삼는 약제들의 효과를 검증 한 여러 임상시험이 있으나 ¹⁸⁻²⁰ 아직까지 효과적인 약제를 찾지 못하고 있다.

패혈증은 치료에 효과적인 약제가 많지 않고 획기적인 약제 개발이 제한적인 상황에서 많은 연구자들은 기존 약제들 중 항염증에 근거한 약제를 연구하고 있다. 그 중 실리마린은 밀크 씨슬(Silybom marianum[L.] Gaerter)의 표준화 된 추출물로 플라보노이드의 한 종류이다. 오랜 시간 약초로 이용되어 왔으며, 약 30 년 전부터 유럽과 아시아에서 간 질환 치료를 위해 임상에서 사용되었다.²¹⁻²³

실리마린은 간세포에서 지질과산물 형성(Lipid peroxide formation)을 억제하는 강력한 항산화제이며 ²⁴, 간 쿠퍼세포(Kupffer cell)의 기능 변화에 영향을 미치는 항염증 성질을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.²⁵ Muriel 등의 연구 ²⁴에 의하면 실리마린은 항산화 특성을 통하여 약물 중독으로부터 간을 보호하는데 자유라디컬(Free radical)을 제거하는 역할과 관련 있다고 알려져 있다. 이러한 여러 연구를 통해 실리마린이 다양한 독성에 의해 유도된 간 질환 동물 모델에서 간 보호 기능을 보여왔으며, 간 조직의 재생을 도와 간 기능을 보호한다는 것이 입증되었다.

Jeong 등의 연구에서는 간독성 물질 인 Carbontetrachloride(CCL4)로 유도된 간경변 동물 모델에서 실리마린의 투여는 호중구세포(Neutrophil) 감소를 통해 염증을 낮추는 것이 확인되었고 ²⁶, Juma'a 등의 연구에서는 달걀 알부민(Egg albumin)으로 유발한 실험 동물의 발 부종 크기가 실리마린을 투여한 군에서 호전된 것을 확인하였다.²⁷ 이 연구

결과를 통해 실리마린의 항염증 효과가 간 뿐만 아니라 다른 장기에도 효과가 있다는 기대를 할 수 있다.

패혈증에서 실리마린 효과를 관찰한 연구들을 살펴보면, Kang 등의 연구에서는 Lipopolysaccharide(LPS, Salmonella typhosa)로 유도한 패혈증 동물 모델에서 실리마린을 전처치한 결과 생존률이 33% 증가 하였으며, 동물 실험과 세포 실험에서 Interleukin-1β(IL-1β)와 Cyclooxygenase 2(COX-2)에 의한 염증을 줄이는 효과가 있었다.²⁸ Zhu 등은 LPS 로 유도 한 동물의 급성호흡증후군 모델에 실리마린을 전처치한 결과 염증 반응을 차단하는데 효과를 보인다고 보고하였다.²⁹ 실리마린의 전처치에 대한 연구에 비해 후처치에 관한 연구는 부족한 편이지만 Zhao 등에 의한 연구에서 제초제 성분인 파라콰트(Paraquat)로 폐손상을 유도한 동물 모델에서 실리마린을 후처치 한 경우 손상 장기의 산화 스트레스(Oxidative stress)를 일부 완화시키는 것을 확인하였다. 이를 통해 실리마린이 항산화물질 역할을 하는 것은 확인할 수 있었지만 확실한 항염증의 경로를 밝힐 수는 없었다.³⁰

이와 같이 현재까지 보고 된 연구들에 의하면 실리마린이 염증을 감소시킨다는 결과를 보여주고 있으나 주로 발병 전의 전저치에 의한 예방 효과의 결과들만 보여주고 있으며 후처치에 의한 치료 효과에 관련된 보고는 많지 않다.

본 연구에서는 내독소를 이용하여 패혈증 모델을 유도한 대식세포(Macrophage)와 동물 패혈증 모델에 실리마린을 투여하여 투여 시점과 투여 용량에 따른 효과를 알아보고자 하였다. 실리마린의 투여 시점을 내독소인 LPS 투여를 기준으로 전처치와 후처치, 투여 용량은 저용량, 중간용량, 고용량까지 세가지 용량을 실험 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 대상과 실험 방법

가. 대식세포 실험

Mouse *Mus musculus*, macrophage 세포 J774A.1 를 10%의 FBS(Fetal Bovin Serum)와 1%의 antibiotics 가 포함 된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Welgene, Gyeongsan, Korea) 세포배양배지를 이용하여 37℃가 유지되는 CO₂ 인큐베이터(5% CO₂/ 95% humidified air) 안에서 평판 배양하였다.

대식세포 J774A.1 을 2x10⁶cells/ml 씩 세포배양접시(35mm)에 준비하고 24 시간 배양 후에 정착되지 않은 세포는 버리고 새로운 세포 배양액을 넣어 준 후 내독소인 LPS(Lipopolysaccharide, *Escherichia coli* 055:B5, sigma chemical co. st. Louis, USA) 200ng/ml 을 이용하여 세포에 자극을 주었고, 실리마린은 LPS 보다 1 시간 전(전처치)과 1 시간 후(후처치)로 나누어 주입하며, 용량은 10, 25, 50 µg/ml 세 용량으로 처치하였다. 대조군은 세포배양배지 (DMEM)로 실리마린을 대신하였다. 이 후 24 시간을 배양하고 배양액과 세포는 -80℃에 보관하였다. 같은 조건으로 세 번 반복 실험을 하였다.

나. 동물 실험

6 주령의 수컷 BALB/c 쥐(㈜) 오리엔트, 서울)를 사육실에서 1 주일간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 22±1℃, 상대습도 50±5%, 조명주기 12 시간으로 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 정상 대조군 (control; Ctrl), LPS 투여군 (Lipopolysaccharide induced acute lung injury; LPS), 실리마린 투여군으로 나누고 실리마린 투여는 LPS 투여 1 시간 전(전처치)과 1 시간 후(후처치)로 하였다. 실리마린의 투여 용량은 100, 250, 500mg/kg 이며 총 8 개 그룹으로 나누어 실험하였다. LPS (Sigma-Aldrich, MO, USA) 는 *E.coli*, Serotype 055:B5 에서 분리되었으며, 분말 형태의 LPS 를 생리식염수에 녹여서 2.5 mg/ml 의 stock solution 을 만든 후에 5 mg/kg 의 용량을 기관 내 투여하여 패혈증 모델을 만들었다. 실험 동물의 마취제로는 Zoletil 70 mg/kg (Virbac Korea, Seoul, Korea), Xylazine hydrochloride 9 mg/kg (Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였고 진통제로는 Ketorolac 1mg/kg(Samsungpharm, Gyeonggi, Korea)를 사용하였다.

마취한 쥐의 앞니를 고리에 걸고 입을 벌려 기관을 확보한 후 pipet 에 긴 loading tip 을 장착하여 LPS(5mg/kg)를 기관 내로 투여 하였다.

실리마린 전처치 실험은 LPS 를 투여하기 1 시간 전에 실리마린을 100(n=6), 250(n=6), 500mg/kg(n=8)의 용량으로 각각 경구 투여하였다. 실리마린은 가루형태로 0.9% sodium chloride 와 3% Ethanol 과 1%의 tween-80 그리고 6.6mM sodium hydroxid 로 구성된 용해제에 녹여서 사용하였고, 대조군에서 실리마린 대신 이 용해제를 투여하였다.

실리마린 후처치 실험은 LPS 를 투여하고 1 시간 후에 용해제에 녹인 실리마린을 100(n=6), 250(n=10), 500mg/kg(n=8)의 용량으로 각각 경구 투여 하였다.

대조군(Ctrl, n=5)은 LPS 대신 생리식염수로, 실리마린 대신 실리마린 용해제를 투여하였다. LPS 투여군 (LPS, n=10)은 LPS 를 투여하고 실리마린 대신 실리마린 용해제를 투여하였다.

2. 검체의 채취 및 처치

LPS 또는 생리식염수를 투여한 시간을 기준으로 48 시간 후 마취를 통하여 실험 동물을 희생시킨 후 기관지폐포 세척 및 조직적출 과정을 시행하였다.

1) 기관지폐포 세척액(Bronchoalveloar lavage fluid) 획득

실험동물의 목부위를 절개하여 기관을 노출시키고, 노출된 기관연골륜 사이를 가로로 절개한 뒤 기도 내로 정맥카테타 (22G Angiocath®)를 밀어 넣었다. 기관지폐포 세척액은 PBS 0.6cc 를 1 cc 주사기를 이용하여 주입하고 10 초 후 이를 주사기내로 일차 회수하였고 다시 주입하는 회수 과정을 총 3 회에 걸쳐 반복하였다. 획득한 기관지폐포 세척액은 -80°C에 보관하였다.

2) 조직 적출

페의 적출은 기관지폐포 세척술이 끝난 다음 마취가 되어있는 상태에서, 복강을 절개 하여 대동맥 및 하대정맥을 절단하여 충분히 실혈 시킨 후에 정중 흉골 절개술로 흉 곽을 절개하여 폐와 심장을 함께 적출하였다. 우측 폐는 단백질, 사이토카인 등 정량 분석을 위해 -80 °C 에 보관하였다. 좌측 폐는 폐조직을 얻기 위해 좌심방으로 20 cc 생리식염수를 관류하여 폐 내의 혈액을 제거하고 그 후 기관에 고정된 정맥카테타를 통해서 15 cmH2O 의 압력으로 10% paraformaldehyde 용액을 주입하여 폐를 팽창시킨 다음 10 %의 paraformaldehye 용액 내에서 24 시간 동안 고정하고 이후 심장 및 종격동 조직을 제거한 후에 파라핀에 포매 (Paraffin block)하였다. 모든 동물실험 과정은 아산생명과학연구원 동물실험실의 동물윤리위원회의 규정을

준수하여 시행하였다.

3. 측정 변수들

 대식세포 배양액과 동물의 기관지폐포 세척액 내 사이토카인 (Cytokine) 들의 측정 대식세포 실험 후 세포배양접시에서 획득한 각 군의 세포배양액과 동물실험에서 획득한 기관지폐포 세척액의 상층액에서 Interleukin 1β(IL-1β), Interleukin 6(IL-6), Interleukin 10(IL-10)을 측정하였다.

IL-1β, IL-6, IL-10 을 효소결합면역흡착검사 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) kit (R&D systems Inc., MN, USA)를 이용하여 회사에서 제공한 방법에 따라 효소면역분석(Enzyme immunoassay) 으로 측정하였다. Leukotriene B 4(LTB4) (Enzo, NY, USA), Prostaglandin E2(PGE2) (R&D systems Inc., MN, USA), Cyclooxygenase 2(COX-2) (R&D systems Inc., MN, USA) 역시 효소면역분석 방법을 따랐고 420nm 에서 측정하였으며 측정값은 두 번의 측정치의 평균값으로 하였다.

2) 동물의 기관지폐포 세척액 내의 총 세포 수 및 호중구 수의 측정

기관지폐포 세척액 내의 호중구의 수를 산정하기 위해 Everhart 의 방법을 변형하여 측정하였다. 기관지폐포 세척액 침전층 중에 적혈구를 제거한 후 0.1 ml 의 PBS 에 재부유 한 뒤 혈구산정기로 백혈구의 수를 산정하였다. 재부유액의 일부를 이용하여 500 x g 로 10 분간 원심분리 시킨 후 도말표본을 제작한 뒤 건조 후 Diff-Quick(Modified Wright Giemsa stain) 염색하여 광학현미경 400 배 시야에서 500 개의 세포 수를 세어 전체 세포 중 호중구가 차지하는 비율을 구하고 수를 산출하였다.

4. Western blot 분석

대식세포 실험을 마친 후 세포만 모아 3,000 rpm 에서 5 분간 원심 분리를 한 후 PBS 로 세포를 세척하였다. 세척 후 5x10⁶ 으로 세포 수를 맞춘 후 400 µℓ의 PRO-PREP[™] (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Gyeonggi, Korea) 넣고 거품이 나지 않도록 조심히 재현탁 시켰다. 얼음 위에서 또는 -20℃에서 20 분간 배양하여 세포 용해를 유도하였다. 4℃를 유지하며 13,000 rpm 에서 5 분간 원심 분리를 하고 상층액을 새 튜브에 옮겨 담았다. 단백질 농도는 Bio-rad Protein assay (Bradford, Bio-rad)를 이용하여 정량화하였다. 추출한 단백질을 sample buffer [50mM Tris-HCI (pH 6.8), 10 % glycerol,

2 % sodium dodesylsulfate (SDS), 1 % β-mercaptomethanol, 0,1 % bromophenol bule]와 혼합하여 5 분간 100℃에서 끓이고, 8~15 % Sodium Dodecyl Sulfatepolyacrylamide(SDS-polyacrylamide) gel 에서 전압 100 V 로 전기영동(Electrophoresis) 하였다. 전기영동 후 gel 에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membranes(Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로의 이동을 위해 immersion tank 형 transfer 를 이용 240 mA 로 1.5 시간 동안 전압을 걸어주었다. Blocking solution(5% skim milk or BSA solution)으로 실온에서 1 시간 반응시키고 Tween-20 이 들어가 있는 PBS-T 로 세 척하였다. 발현을 관찰하고자 하는 1 차 항체를 Blocking solution 에 1:300 에서 1:2000 으로 희석하여 4 ℃에서 overnight 하여 반응시키고, PBS-T buffer 로 3 회 세척하고, 2 차 항체(Blocking solution)를 1:5000 으로 희석하여 실온에서 1 시간 반응 시키고, PBS-T buffer 로 3 회 세척 후 ECL kit(Perkin Elmer)를 이용하여 membrane 을 감광시켜, x-ray film 을 이용하여 이미지를 얻었다. 사용된 일차 항체는 다음과 같다; β-Actin(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); COX-2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA), IL-1ß (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). 이차 항체는 Horseradish peroxidase 가 결합된 anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology)와 goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology)이었다.

5. 조직 절편 제작 및 염색

동물의 각 실험군에서 적출한 폐를 24 시간 이상 10% paraformaldehye 에 고정한 후 흐르는 물을 이용하여 세척하고, 70% 에탄올에 1 시간 동안 담근 다음 점차 농도를 증가시켜 수분을 제거하였다. 100% 에탄올 용액에서 수분을 모두 제거한 뒤, 자일렌(Xylene) 용액 농도를 점차 높여 처리하고, 자일렌에 담긴 조직을 파라핀에 포매하여 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 초박편제작기(Microtome; Leica RM2255)를

이용하여 5 µm 두께로 잘라서 슬라이드에 올린 후 슬라이드 드라이어를 이용하여 조직절편을 녹여 부착시켰다. 제작된 조직절편 슬라이드는 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거하고, 에탄올을 이용하여 가용성 상태의 조직으로 변환시키고 조직 염색을 하였다.

파라핀을 제거한 사용성 상태의 조직절편 슬라이드는 PBS 로 세척한 후 헤마톡실린(Hematoxylin)과 에오진(Eosin) 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)과 Masson's trichrome 염색 kit(Sigma-Aldrich)를 이용하여 구입한 회사에서 제공한 방법에 따라 조직염색을 시행하였다.

6. 형태 및 조직학적 관찰

폐손상 정도의 정량적 평가를 위해 실험조건을 알지 못하는 병리전문의가 한 동물 당 10 개의 부위를 무작위 선정하여 200 배 조건에서 평가하였다. 급성 폐손상 정도 는 5 개의 항목으로 평가하였고 각 항목 당 0-3 점으로 점수를 매겼다 (총 0-15 점). 5 개의 평가항목은 1) 중성구의 폐포 내 침윤, 2) 중성구의 간질 침윤, 3) 중성구의 혈관주변 침윤, 4) 폐울혈, 5) 폐포출혈 이었다.³¹

	0	1	2	3
Intra-alveolar infiltration of neutrophils	None	Scattered in alveolar space	Aggregated in $\leq 1/2$ of alveolar space	Aggregated in $\geq 1/2$ of alveolar space
Interstitial infiltration of neutrophils	None	Scattered around bronchiole	Compact infiltration around bronchiole	Infiltration around bronchiole with contiguous involvement of adjacent alveolar space
Perivenous infiltration of neutrophils	None	Scattered	Compact circumferential infiltration	Circumferential infiltration with contiguous involvement of adjacent alveolar space
Pulmonary congestion	None	\leq 1/3 of alveoli in the microscopic field	In between 1 and 3	$\geq 2/3$ of alveoli in the microscopic field
Alveolar hemorrhage	None	$\leq 1/3$ of alveolar space	In between 1 and 3	\geq 2/3 of alveolar space

Table 1. Histological grading of acute lung injury

총 15 점 중 폐 충혈(Congestion)과 치조의 출혈(Alveolar hemorrhage) 소견이 병변 정도를 비교하는데 혼란을 줄 수 있을 것으로 사료되어 이 부분을 제외한 총 9 점 만점으로 점수를 표기하였다. 폐섬유화 정도는 Masson Trichrome 염색 조직에서 정상 폐조직이 보이는 경우와 비교하여 폐포 중격의 두꺼워진 정도와 섬유화 병변이 있는 지 및 다발성 섬유와 병변에 실질구조의 전반적이 변형이 있는 지를 평가하였다.³²

7. 자료 처리 및 분석

모든 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 서로 다른 두 군 간의 평균값은 독립표본 t 검정으로, 정규분포를 따르지 않는 연속형 자료는 Mann-Whitney U 검정을 사 용하였으며, 범주형 자료는 chi-square test 를 사용하여 분석하였다. 모든 계산은 SPSS for Window 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하고, p 값이 0.05 미만 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

A. 대식세포 실험

(A) Pre-Treatment

(B) Post-treatment



B. 동물 실험

(1) Pre-Treatment



(2) Post-Treatment



Figure 1. Schematic Flow Chart of Experimental Design

- (A) Macrophage model (B) Animal model
- LPS, lipopolysaccharide

연구 결과

가. LPS 로 자극을 준 대식세포에 실리마린이 미치는 영향

1. LPS 로 자극을 준 대식세포에서 실리마린의 전처치 실험

(1) 세포 배양액 내 사이토카인 측정

(1) Interleukin 1 β (IL-1 β)

대식세포 실험 후 걷어 낸 세포 배양액 내 염증성 인자인 IL-1β 의 값은 Ctrl 군(0.0 ± 0.0 pg/ml)에 비해 LPS 군(114.4 ± 8.4 pg/ml)에서 증가하였다(p<0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(66.7 ± 3.9 pg/ml, p<0.05), 25 μg/ml 투여군(28.5 ± 4.5 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(3.6 ± 0.4 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량 의존적으로 감소하였다(Figure 2A).

② Interleukin 6 (IL-6)

세포배양액 내 염증성 인자와 항염증에 모두 관여하는 IL-6 의 값은 Ctrl 군(174.9 ± 1.8 pg/ml)에 비해 LPS 군(6050.4 ± 27.7 pg/ml)에서 증가하였다(p<0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 10 µg/ml 투여군(5744.8 ± 14.6 pg/ml, p<0.05), 25 µg/ml 투여군(4374.3 ± 342.7 pg/ml, p<0.05), 50 µg/ml 투여군(1785.0 ± 327.5 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량 의존적으로 감소하였다 (Figure 2B).

③ Interleukin 10 (IL-10)

세포배양액 내 항염증에 관여하는 IL-10 의 값은 Ctrl 군(56.8 ± 4.5 pg/ml)에 비해 LPS 군(425.6 ± 6.6 pg/ml)에서 증가하였다(p<0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 10 µg/ml 투여군(145.4 ± 2.5 pg/ml, p<0.05), 25 µg/ml 투여군(96.6 ± 7.7 pg/ml, p<0.05), 50 µg/ml 투여군(42.3 ± 4.0 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량 의존적으로 감소하였다(Figure 2C).





(A) IL-1 β level in pre-treatment with Silymarin (B) IL-6 level in pre-treatment with Silymarin (C) IL-10 level in pre-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, IL-1 β , IL-6 and IL-10 were significantly decreased in the pre-treatment with silymarin. There was a dose-dependent decrease between silymarin doses.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 10, silymarin 10 μ g/ml; 25, 25 μ g/ml; 50, 50 μ g/ml; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin; \dagger for p<0.05 between silymarin treatment group

(2) 세포 배양액 내 IL-1β 관련 인자 측정

① Cyclooxygenase 2 (COX-2)

COX-2 의 세포배양액 내의 값은 Ctrl 군(93.7 ± 8.6 pg/ml)에 비해 LPS 군(192.1 ± 16.3 pg/ml)에서 증가하였다(p=0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(150.5 ± 11.3 pg/ml, p=0.66)은 차이를 보이지 않았으나, 25 μg/ml 투여군과(63.9 ± 1.1 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(54.1 ± 4.4 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다(Figure 3A).

② Protaglandin E2 (PGE2)

급성 염증에서의 매개체 역할과 면역 반응의 조절자로 중요한 역할을 하는 PGE2 의 세포배양액 내의 값은 Ctrl 군(213.6 ± 22.7 pg/ml)에 비해 LPS 군(20074.3 ± 2067.1 pg/ml)에서 증가하였다(p=0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(4159.2 ± 367.2 pg/ml, p<0.05), 25 μg/ml 투여군(289.4 ± 28.5 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(256.9 ± 6.0 pg/ml, p<0.05)로 유의하게 감소하였다. 투여 용량 간 비교 시 10 μg/ml 투여군에 비해 25 μg/ml 투여군과 50 μg/ml 투여군에서 유의하게 감소하였다(Figure 3B).





(A) COX-2 level in pre-treatment with Silymarin (B) PGE2 level in pre-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, COX-2 and PGE2 were significantly decreased in the pre-treatment with silymarin. There was a dose-dependent decrease between silymarin doses.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 10, silymarin 10 μ g/ml; 25, 25 μ g/ml; 50, 50 μ g/ml; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin; \dagger for p<0.05 between silymarin treatment group

2. LPS 로 자극을 준 대식세포에서 실리마린의 후처치 실험

(1) 세포 배양액 내 사이토카인 측정

(1) Interleukin 1 β (IL-1 β)

세포 배양액 내 IL-1β 의 값은 LPS 군(114.4 ± 8.4 pg/ml)에 비하여 후처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(26.6 ± 4.9 pg/ml, p<0.05), 25 μg/ml 투여군(1.1 ± 0.8 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(0.0 ± 0.0 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량에 의존적으로 감소하였다(Figure 4A).

② Interleukin 6 (IL-6)

세포 배양액 내 IL-6 의 값은 LPS 군(6050.4 ± 27.7 pg/ml)에 비하여 후처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(5399.8 ± 36.5 pg/ml, p<0.05), 25 μg/ml 투여군(3673.4 ± 332.9 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(1530.2 ± 112.9 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량에 의존적으로 감소하였다(Figure 4B).

③ Interleukin 10 (IL-10)

세포 배양액 내 IL-10 의 값은 LPS 군(425.6 ± 6.6 pg/ml)에 비하여 후처치 실험에서 10 μg/ml 투여군(172.3 ± 8.5 pg/ml, p<0.05), 25 μg/ml 투여군(141.3 ± 2.9 pg/ml, p<0.05), 50 μg/ml 투여군(79.9 ± 9.0 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 투여 용량을 증량 시 용량에 의존적으로 감소하였다(Figure 4C).



Figure 4. Cytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 level in cell medium supernatant at silymarin post-treatment

(A) IL-1 β level in post-treatment with Silymarin (B) IL-6 level in post-treatment with Silymarin (C) IL-10 level in post-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, IL-1 β , IL-6 and IL-10 were significantly decreased in the post-treatment with silymarin. There was a dose-dependent decrease between silymarin doses.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 10, silymarin 10 μ g/ml; 25, 25 μ g/ml; 50, 50 μ g/ml; Silymarin post, silymarin post-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin; \dagger for p<0.05 between silymarin treatment group

(2) 세포 배양액 내 IL-1β 관련 인자 측정

① Cyclooxygenase 2 (COX-2)

세포 배양액 내 COX-2 의 값은 LPS 군(192.1 ± 16.3 pg/ml)에 비하여 후처치 실험에서 10 µg/ml 투여군(124.6 ± 0.8 pg/ml, p=0.17), 25 µg/ml 투여군(150.6 ± 5.1 pg/ml, p=0.63), 50 µg/ml 투여군(146.0 ± 6.7 pg/ml, p=0.52)에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 5A).

② Protaglandin E2 (PGE2)

세포 배양액 내 PGE2 의 값은 LPS 군(20074.3 ± 2067.1 pg/ml)에 비하여 후처치 실험에서 10 µg/ml 투여군(843.6 ± 89.6 pg/ml, p<0.05), 25 µg/ml 투여군(214.7 ± 65.7 pg/ml, p<0.05), 50 µg/ml 투여군(133.7 ± 10.3 pg/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 로 저용량에서 큰 감소를 보여주었다. 투여 용량을 증량 시 용량에 의존적으로 감소하였다(Figure 5B).



Figure 5. COX-2 and PGE2 level in cell medium supernatant at silymarin posttreatment

(A) COX-2 level in post-treatment with Silymarin (B) PGE2 level in post-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, PGE2 was significantly decreased in the post-treatment with silymarin, and there was a dose-dependent decrease between silymarin doses.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 10, silymarin 10 μ g/ml; 25, 25 μ g/ml; 50, 50 μ g/ml; Silymarin post, silymarin post-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin; \dagger for p<0.05 between silymarin treatment group

3. 실리마린에 의한 대식세포 내 단백질 발현 변화

대식세포에서 단백질을 분리 한 후 단백질 항체 검출 방법 (Western blot, Immunoblot) 방법을 이용하여 관찰 하였다.

전염증 반응에 의하여 활성화 된 IL-1β 를 대식세포의 단백질 발현 변화를 보면 LPS 군에 비하여 실리마린을 투여한 군이 유의하게 발현이 감소 되었으나, Ctrl 군과 실리마린 투여군 사이에 큰 차이는 없었다. 실리마린의 전처치 실험 보다 후처치 실험이 더 감소하였으며 실리마린의 투여 용량이 커질수록 발현이 감소하였다(Figure 6).

사이토카인 IL-1β 및 다른 사이토카인에 의해 유도 되는 것으로 알려 진 COX-2 의 발현은 Ctrl 군에 비하여 LPS 로 자극을 준 군이 큰 차이로 발현 되었다. 그러나 LPS 군에 비하여 실리마린을 투여한 군의 발현은 감소하였으나 유의미한 차이는 아니었다. 실리마린의 전처치 실험에서 투여 용량에 의존적으로 감소하였다(Figure 7).


Figure 6. Analysis of IL-1 β pre and post-treatment with Silymarin in LPS-induced injury using Western blot analysis

Protein are extracted from cells and quantified. The LPS group expressed IL-1 β (1:1000), and the silymarine treatment decreased with concentration. β -actin(1:5000). In the control group, silymarin has not effect.

Ctrl, DMEM only; Ctrl 25, DMEM+silymarin 25 µg/ml; Ctrl 50, DMEM+silymarin 50 µg/ml; LPS, lipopolysaccharide only; pre, silymarin pre-treatment; post, silymarin post-treatment.

* relative intensity is target protein/β-actin



Figure 7. Analysis of COX-2 pre and post-treatment with Silymarin in LPS-induced injury using Western blot analysis

Protein are extracted from cells and quantified. The LPS group expressed COX-2(1:1000), and the silymarine treatment decreased with concentration. β -actin(1:5000).

Ctrl, DMEM only; LPS, lipopolysaccharide only; post, silymarin post-treatment; 10, silymarin 10μ g/ml; 25, silymarin 25μ g/ml; 50, silymarin 50μ g/ml; pre, silymarin pre-treatment

* relative intensity is target protein/ β -actin

나. LPS 로 유도 된 패혈증 동물 모델에서 실리마린이 미치는 영향

1. 패혈증 동물모델에서 실리마린의 전처치 실험

(1) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 사이토카인 측정

(1) Interleukin 1 β (IL-1 β)

동물의 기관지폐포 세척액 내 IL-1β 의 값은 Ctrl 군(0.0 ± 0.0 pg/ml)에 비해 LPS 군(202.9 ± 111.6 pg/ml)에서 증가하였다 (p<0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 100mg/kg 투여군(54.2 ± 15.3 pg/ml, p<0.05), 250mg/kg 투여군(65.6 ± 36.1 pg/ml, p<0.05), 500mg/kg 투여군(39.6 ± 23.9 pg/ml, p<0.05)로 유의하게 감소하였다. 투여 용량 증량 시 용량 간의 차이는 보이지 않았다(Figure 8A).

② Interleukin 6 (IL-6)

동물의 기관지폐포 세척액 내 염증성 인자와 항염증에 모두 관여하는 IL-6 의 값은 Ctrl 군(0.0 ± 0.0 pg/ml)에 비해 LPS 군(512.7 ± 294.4 pg/ml)에서 증가하였다 (p<0.05). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 100mg/kg 투여군 (452.4 ± 33.8 pg/ml, p=0.99), 250mg/kg 투여군 (329.3 ± 44.3 pg/ml, p=0.26), 500mg/kg 투여군 (424.5 ± 69.9 pg/ml, p=0.83)로 통계학적으로 유의하지 않았다(Figure 8B).

③ Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 의 값은 Ctrl 군 (3.9 ± 2.0 pg/ml), LPS 군 (6.3 ± 2.1 pg/ml)으로 나왔다 (p=0.1). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 100mg/kg 투여군(14.2 ± 1.4 pg/ml, p<0.05), 250mg/kg 투여군(13.0 ± 3.6 pg/ml, p<0.05), 500mg/kg 투여군(17.4 ± 2.2 pg/ml, p<0.05)에서 증가하였다(Figure 8C).





(A) IL-1 β level in pre-treatment with Silymarin (B) IL-6 level in pre-treatment with Silymarin (C) IL-10 level in pre-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, IL-1 β was significantly decreased in the pre-treatment with silymarin, and IL-6 decreased, but it was not significant. IL-10 was increased.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500,

500mg/kg; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin treatment

(2) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 IL-1β 관련 인자 Protaglandin E2 (PGE2) 측정

동물의 기관지폐포 세척액 내 PGE2 값은 Ctrl 군(1849.3 ± 414.3 pg/ml)에 비해 LPS 군(2454.2 ± 182.9 pg/ml)에서 증가하였으나 유의한 차이를 보이지는 못하였다(p=0.8). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 100mg/kg 투여군(7149.9 ± 3201.5 pg/ml, p=0.19)은 차이가 없었으나, 250mg/kg 투여군(6955.1 ± 2930.1 pg/ml, p=0.02), 500mg/kg 투여군(8273.1 ± 4219.2 pg/ml, p=0.02)에서 유의하게 증가하였다(Figure 9A).

(3) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 염증성 질환 관련 인자 Leukotriene B4 (LTB4) 측정

동물의 기관지폐포 세척액 내 LTB4 값은 Ctrl 군(13.5 ± 6.7 pg/ml)에 비하여 LPS 군 (35.0 ± 23.3 pg/ml)에서 증가하였으나 유의한 차이는 없었다(p=0.41). LPS 군에 비하여 실리마린 전처치 실험에서 100mg/kg 투여군(11.5 ± 3.7 pg/ml, p=0.69), 250mg/kg 투여군(15.3 ± 6.1 pg/ml, p=0.84), 500mg/kg 투여군(13.6 ± 5.1 pg/ml, p=0.69)로 감소의 경향은 있었으나 통계학적으로 유의하지 않았다(Figure 9B).



Figure 9. PGE2 and LTB4 level in BAL fluid at silymarin pre-treatment

(A) PGE2 level in pre-treatment with Silymarin (B) LTB4 level in pre-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, PGE2 increased and LTB4 decreased in the pre-treatment with silymarin, but none of them were significant.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500, 500mg/kg; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

(4) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 세포 수 및 호중구 수 측정

폐조직의 호중구 침윤정도와 폐손상 정도는 상응하는 관계를 가지며 호중구의 폐침윤을 예방하거나 줄임으로써 급성 폐손상을 경감시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서도 LPS 로 유도된 급성 폐손상 동물 모델에 실리마린의 100, 250, 500 mg/kg 를 LPS 투여 전 전처치한 후에 기관지폐포 세척액 내의 염증 소견을 확인하기 위해 총 세포 수 및 호중구 소를 조사하였다. Ctrl 군(10.8 ± 6.6 x 10⁴/ml)에 비하여 LPS 군(224.9 ± 62.6 x 10⁴/ml)에서 총 세포 수가 의미 있게 높았다(P<0.05). 실리마린 전처치 실험에서 LPS 군에 비하여 100mg/kg 투여군(158.4 ± 15.8 x 10⁴/ml, p<0.05), 250mg/kg 투여군(133.1 ± 12.2 x 10⁴/ml, p<0.05), 500mg/kg 투여군(127.6 ± 34.3 x 10⁴/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 그러나 실리마린의 투여 용량간 차이는 보이지 않았다(Figure 10A).

호중구의 수 (Polymorphonuclear leukocyte)는 Ctrl 군(0.1 ± 0.1 x 10⁴/ml) 보다 LPS 군(166.4 ± 47.4 x 10⁴/ml)에서 유의하게 증가하였다(p<0.05). 실리마린 전처치 실험에서 LPS 군에 비하여 100mg/kg 투여군 (108.2 ± 12.4 x 10⁴/ml, p<0.05), 250mg/kg 투여군 (90.9 ± 11.8 x 10⁴/ml, p<0.05), 500mg/kg 투여군 (75.6 ± 21.9 x 10⁴/ml, p<0.05)에서 모두 유의한 감소를 보였고, 실리마린의 투여 용량을 증량할수록 감소의 폭이 컸다(Figure 10B).





(A) Total cells (x10⁴/ml) count in pre-treatment with Silymarin **(B)** Neutrophil(x10⁴/ml) count in pre-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, total cells and neutrophil count were significantly decreased in the pre-treatment with silymarin.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500, 500mg/kg; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin treatment

(5) 패혈증 동물모델에서 폐 형태 및 조직학적 관찰

① 폐 조직 관찰

정상대조군의 폐 조직은 폐포 중격 (Alveolar septa), 폐포강 (Alveolar lumen) 그리고 모세혈관 등 모두 정상적인 구조를 가지고 있었고 폐포강으로 삼출된 물질이나 폐포 내 부종 등의 소견도 관찰되지 않았다(Figure 11A). LPS 군은 다형 백혈구 (호중구)를 위주로 하는 심한 염증세포의 폐포강 내 유주 및 간질 내 침윤이 현저히 많았으며 주로 림프구로 형성된 혈관주위의 세포 침윤 (Perivascular cuffing)과 폐포 중격의 부종 등의 소견이 뚜렷하였다. 또한 폐포강 내 출혈이 관찰되었다(Figure 11B). 실리마린 전처치 실험에서 저용량에서 고용량으로 갈수록 용량에 의존적으로 폐포강이 비교적 잘 유지 되었으며 폐포강 내 염증 세포의 침윤 및 혈관 주위 부종이 감소하였으며 폐포강 내 출혈이나 부종은 거의 관찰되지 않았다(Figure 11C, D, E).

② 폐손상 정도 평가

폐손상 정도 평가 점수(Lung injury scores) 에서 LPS 군(6.8 ± 1.5)은 Ctrl 군(0.0 ± 0.0)에 비하여 월등히 높은 점수를 나타내며(p<0.05) LPS 에 의한 폐의 손상도를 보였다. 실리마린 전저치 실험에서 LPS 군에 비하여 100mg/kg 투여군 (4.3 ± 0.0, p<0.05), 250mg/kg 투여군(4.8 ± 0.9, p<0.05), 500mg/kg 투여군(4.8 ± 0.4, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. 그러나 실리마린의 투여 용량에 의존적이지 않았다(Figure 12).



Figure 11. Silymarin attenuates lung injury in LPS-induced sepsis at pre-treatment. hematoxylin-eosin staining

(A) Control (B) LPS, lipopolysaccharide only induced sepsis (C) Pre-treatment in LPS induced sepsis model with silymarin 100mg/kg on the LPS-induced sepsis (D) Pre-treatment with silymarin 250mg/kg on the LPS-induced sepsis (E) Pre-treatment with silymarin 500mg/kg on the LPS-induced sepsis

In control the normal pulmonary architectures such as alveolar septa, alveolar lumen and capillary were well preserved. The infiltration of inflammatory cells was not observed. In LPS group the infiltration of inflammatory cell was observed in alveolar space and interstitium. Mild thickening in alveolar septa and interstitium was suspected. (magnification, x100)



Figure 12. Histologic scoring of lung injury in LPS-induced sepsis with silymarin pre-

treatment

Compared with the LPS group, inflammatory score was significantly decreased in the pre-treatment with silymarin.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500,

500mg/kg; Silymarin pre, silymarin pre-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin treatment

2. 패혈증 동물모델에서 실리마린의 후처치 실험

(1) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 사이토카인 측정

(1) Interleukin 1 β (IL-1 β)

동물의 기관지폐포 세척액 내 IL-1β 의 값은 LPS 군(202.9 ± 111.6 pg/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험에서 100mg/kg 투여군(182.5 ± 24.2 pg/ml, p=0.59), 250mg/kg 투여군(171.5 ± 23.0 pg/ml, p=0.48), 500mg/kg 투여군(145.4 ± 18.8 pg/ml, p=0.36)에서 유의한 차이는 보이지 않았다. 투여 용량 간 비교에서 250 mg/kg 에 비해 500 mg/kg 에서 유의하게 감소하였다 (p<0.05)(Figure 13A).

② Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 의 값은 LPS 군 (512.7 ± 294.4 pg/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험에서 100mg/kg 투여군(509.7 ± 68.9 pg/ml, p=0.68), 250mg/kg 투여군(455.6 ± 70.6 pg/ml, p=0.97), 500mg/kg 투여군(389.2 ± 51.3 pg/ml, p=0.60)에서 유의한 차이는 보이지 않았다. 투여 용량 간 비교에서 250 mg/kg 에 비해 500 mg/kg 에서 유의하게 감소하였다 (p<0.05)(Figure 13B).

③ Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 의 값은 LPS 군 (6.3 ± 2.1 pg/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험에서 100mg/kg 투여군(6.6 ± 1.3 pg/ml, p=0.66), 250mg/kg 투여군(6.0 ± 1.7 pg/ml, p=0.75), 500mg/kg 투여군(7.4 ± 1.9 pg/ml, p=0.28)에서 유의한 차이는 보이지 않았다(Figure 13C).





(A) IL-1 β level in post-treatment with Silymarin (B) IL-6 level in post-treatment with Silymarin (C) IL-10 level in post-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, IL-1 β was significantly decreased in the post-treatment with silymarin, and IL-6 decreased, but it was not significant. was a dose-dependent decrease between silymarin doses. IL-10 was increased.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500, 500mg/kg; Silymarin post, silymarin post-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; \dagger for p<0.05 between silymarin treatment group

(2) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 IL-1β 관련 인자 Protaglandin E2 (PGE2) 측정

PGE2 값은 LPS 군(2454.2 ± 182.9 pg/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험에서 100mg/kg 투여군(2054.4 ± 384.2 pg/ml, p=0.41), 250mg/kg 투여군(2694.7 ± 741.9 pg/ml, p=0.91), 500mg/kg 투여군(3203.9 ± 375.2 pg/ml, p=0.34)에서 통계학적으로 유의하지 않았다(Figure 14A).

(3) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 염증성 질환 관련 인자 Leukotriene B4 (LTB4) 측정

LTB4 값은 LPS 군 (35.0 ± 23.3 pg/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험에서 100mg/kg 투여군(8.4 ± 1.4 pg/ml, p=0.06), 250mg/kg 투여군(10.1 ± 1.6 pg/ml, p=0.42), 500mg/kg 투여군(9.3 ± 4.4 pg/ml, p=0.31)에서 감소하는 경향은 보였으나 유의하지 않았다(Figure 14B).



Figure 14. PGE2 and LTB4 level in BAL fluid at silymarin post-treatment

(A) PGE2 level in post-treatment with Silymarin (B) LTB4 level in post-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, PGE2 increased and LTB4 decreased in the post-treatment with silymarin, but none of them were significant.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500, 500mg/kg; Silymarin post, silymarin post-treatment

(4) 패혈증 동물모델에서 기관지폐포 세척액 내 세포 수 및 호중구 수 측정

후처치 실험에서 기관지폐포 세척액 내 총 세포 수는 LPS 군(224.9 ± 62.6 x 10⁴/ml)에 비하여 100mg/kg 투여군(201.8 ± 28.6 x 10⁴/ml, p=0.51)이었고, 250mg/kg 투여군(166.5 ± 37.4 x 10⁴/ml, p<0.05)과 500mg/kg 투여군(140.1 ± 19.4 x 10⁴/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다 (Figure 15A).

호중구의 수는 LPS 군(166.4 ± 47.4 x 10⁴/ml)에 비하여 실리마린 후처치 실험 100mg/kg 투여군(125.0 ± 20.6 x 10⁴/ml, p=0.1)이었고, 250mg/kg 투여군(107.9 ± 20.5 x 10⁴/ml, p<0.05), 500mg/kg 투여군(84.9 ± 12.6 x 10⁴/ml, p<0.05)에서 유의하게 감소되었다 (Figure 15B).



Figure 15. Total cells and the neutrophil in BAL fluid at silymarin post-treatment

(A) Total cells (x10⁴/ml) count in post-treatment with Silymarin **(B)** Neutrophil(x10⁴/ml) count in post-treatment with Silymarin

Compared with the LPS group, total cells and neutrophil count were significantly decreased in the post-treatment with silymarin. LPS, lipopolysaccharide only induced acute lung injury.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500, 500mg/kg; Silymarin post, silymarin post-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin treatment

(5) 패혈증 동물모델에서 폐 형태 및 조직학적 관찰

① 폐 조직 관찰

전처치 실험과 같이 정상대조군에서는 폐 조직이 폐포 중격 (Alveolar septa), 폐포강 (Alveolar lumen) 그리고 모세혈관 등 모두 정상적인 구조를 가지고 있었고(Figure 16A), LPS 군에서는 심한 염증세포의 폐포강 내 유주 및 간질 내 침윤이 보이고, 혈관주위의 세포 침윤 (Perivascular cuffing)과 폐포 중격의 부종 등의 소견이 뚜렷하였다(Figure 16B). LPS 군에 비교하여 LPS 를 주입한 후 실리마린을 투여 한 후처치 실험에서 폐포강 내 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 섬유모세포증식은 뚜렷하지 않다(Figure 16C, D, E).

② 폐손상 정도 평가

후처치 실험에서 LPS 군(6.8 ± 1.5)에 비하여 100mg/kg 투여군(3.6 ± 0.4, p<0.05), 250mg/kg 투여군(3.4 ± 0.5, p<0.05), 500mg/kg 투여군(4.3 ± 0.9, p<0.05)에서 유의하게 감소하였다(Figure 17).



Figure 16. Silymarin attenuates lung injury in LPS-induced sepsis at post-treatment. hematoxylin-eosin staining

(A) Control (B) LPS, lipopolysaccharide only induced sepsis (C) Post-treatment with silymarin 100mg/kg on the LPS-induced sepsis (D) Post-treatment with silymarin 250mg/kg on the LPS-induced sepsis (E) Post-treatment 500mg/kg on the LPS-induced sepsis

In control, the normal pulmonary architectures such as alveolar septa, alveolar lumen and capillary were well preserved. The infiltration of inflammatory cells was not observed. In LPS group, the infiltration of inflammatory cell was observed in alveolar space and interstitium. In the group silymarin post-treatment, infiltration of inflammatory cells in the alveolar was observed, but fibroblast proliferation was not evident. (magnification, x100)



Figure 17. Histologic scoring of lung injury in LPS-induced sepsis with silymarin post-tratment

Compared with the LPS group, inflammatory score was significantly decreased in the post-treatment with silymarin.

Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide only; 100, silymarin 100mg/kg; 250, 250mg/kg; 500,

500mg/kg; Silymarin post, silymarin post-treatment

Significance was defined as * for p < 0.05 between Ctrl vs LPS; ** for p<0.05 between LPS vs silymarin treatment

Injury model	Silymarin dose	Silymarin delivery	Major finding	Reference
Mouse Intraperitoneal LPS(<i>Salmonella</i> <i>typhosa)</i>	50mg/kg	Orally 2h and 0h before injury	↓ Pro-inflammatory cytokine (IL-1β) ↓ PGE2 ↑ Survival	Biochemical Pharmacology 67 (2004) 175–181 ²⁸
Rat Intraperitoneal Paraquat(PQ)	200mg/kg	Intraperitoneal 3 consecutive days after injury	↓ Total cell, MPO, HYP, total protein ↓ Lung W/D ration, NO, iNOS ↓ MDA ↑ SOD, CAT, GSH-Px ↓ Pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6)) ↓ Anti-inflammatory cytokine (TGF-β1)	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2015) 42, 988–998 ³⁰
Rat Intratracheal LPS	50, 100, 200mg/kg	Intraperitoneal 5 consecutive days before injury	 (High dose; 100, 200mg/kg) ↓ Lung W/D ratio, total protein, P(A-a)O₂, PaO₂/FiO² ratio ↓ Histological score ↓ total cells, Lymphocytes, Macrophages, Neutrophils ↓ Pro-inflammatory cytokines(IFN-γ, IL-6, TNF-α) ↑ Anti-inflammatory cytokine (IL-10) ↓ p-JNK, p-p38, p-ERK 	Inflammopharmacol (2018) 26:747–754 ²⁹
Rat CLP	50mg/kg Or NAC(150mg/kg)	Orally 10days before CLP	† Survival ↓ MDA † GSH ↓ MPO, luminol ↓ lucigenin - Thromboplastic	Journal of Surgical Research (2008) 145, 214-222 ⁶⁶
Mouse macrophage cell LPS(<i>Salmonella</i> <i>typhosa)</i>	6.25, 12.5, 25, 50 μg/mL	24h before LPS	↓ Pro-inflammatory cytokine (IL-1β) ↓ PGE2 ↓ COX-2, NF-κB/Rel	Biochemical Pharmacology 67 (2004) 175–181 ²⁸
Human adenocarcinoma cell Paraquat(PQ)	50 μg/mL	treated 3h and then with 200µ mol/L PQ	↑ Protein expression (Nrf2, HO-1, NAD(P)H)	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2015) 42, 988–998 ³⁰

Table 2. Summary of silymarin of sepsis in mouse and cell models

고 찰

본 실험에서는 LPS로 유도 된 대식세포와 동물의 패혈증 모델에서 실리마린의 투여가 미치는 영향을 알아보기 위해 염증관련 인자와 조직학적 변화를 확인하였다. 기존 연구 들이 실리마린의 패혈증 염증 감소 효과를 입증하였지만 주로 전저치에 의한 예방 효과 를 보고하였기에 이번 실험에서는 실리마린의 예방 효과뿐만 아니라 후처치를 통한 치료 효과를 관찰하고 투여 용량에 따른 효과 차이를 조사하였다.

내독소인 LPS로 패혈증을 유도 한 대식세포에 실리마린을 투여 한 결과 염증 지표 들인 IL-1β와 IL-6, IL-10, PGE2 수치가 LPS만 투여한 군에 비해 전처치와 후처치 모두에 서 유의하게 감소하였다. 동물 실험 결과에서도 IL-1β가 전처치와 후처치 모두에서 감소 하였고 이에 IL-1β와 가장 관련이 있음을 알 수 있었다. 대식세포 실험에서는 투여 용량 에 따라 염증 지표 수치 감소 정도에 유의미한 차이가 있었으나 동물 실험에서는 투여 용량과 관계에 차이가 없었다.

LPS 투여 48시간 후 관찰 한 쥐의 기관지폐포 세척액에서 실리마린을 투여한 군이 LPS만 투여한 군에 비하여 호중구를 유의하게 낮추었고 조직학적 폐손상 평가에서도 전 처치 실험과 후처치 실험 모두에서 폐포와 간질 내 호중구 침윤 및 폐포강 내 부종과 출 혈이 감소되는 호전의 소견을 보여주었다.

대식세포와 쥐 모델에서 실리마린의 투여 효과

실리마린을 투여한 대식세포의 세포배양액과 쥐의 기관지폐포 세척액에서 사이토카 인 등 염증관련 인자들을 분석하였다.

사이토카인은 내독소로 유도 된 패혈증에서 염증 관련 신호 분자로서 염증 반응이 시작되면 이를 증폭시키고 지속하는데 중요한 역할을 한다. 특히 전염증성 사이토카인인

IL-1β은 폐손상의 초기에 나타나 다양한 세포들로부터 케모카인(Chemokine)과 면역조절 물질을 분비하게 하여 염증 반응을 더욱 가중 시키는 것으로 알려져 있다.^{33, 34} IL-6는 처 음에는 B세포 성장인자로 밝혀졌었던 물질로, 염증 물질에 의하여 활성화 된 대식세포에 서 생성되고 간에서는 급성 염증을 유발하기도 하여, 염증 반응과 항염증 반응을 모두 지니고 있는 것으로 보고되었다.³⁵ 본 실험에서 실리마린이 염증 감소에 관련 된 효과를 관찰하는데 사이토카인과의 연관성을 고려하여 IL-1β와 IL-6를 측정하였다. 실험 대상인 대식세포의 세포배양액과 쥐의 기관지폐포 세척액에서 측정 한 사이토카인 IL-1β와 IL-6 의 측정 값은 LPS만 투여한 군에 비하여 실리마린을 함께 투여한 군이 유의하게 감소하 는 것을 보여주었다. 기존의 연구와 마찬가지로 이번 연구에서도 패혈증 모델에서 IL-1β 와 IL-6의 사이토카인이 감소하는 결과값이 나왔으며 이는 실리마린이 항염증 효과가 있 음을 증명하였다.²⁸⁻³⁰ 전처치 실험과 후처치 실험 모두 감소하였고 이것으로 예방 효과와 치료효과를 관찰 할 수 있었다.

반면 면역 조절 및 염증에 여러 가지 다발성 효과를 가지고 있는 IL-10은 기존 동물 연구 결과에 따르면 염증 효과를 상쇄하는 것으로 알려져 있다.³⁶ 본 실험에서 대식세포 에 LPS만 투여한 군에 비하여 실리마린을 함께 투여한 군의 IL-10 수치가 감소 하는 반 면 실리마린을 쥐에 투여하고 쥐의 기관지폐포 세척액에서 측정 한 IL-10 수치는 증가하 는 것을 보여주었다. 쥐 모델에서의 IL-10의 결과값은 기존에 Zhu등의 쥐 모델을 대상으 로 한 연구의 결과³⁷와 같다. 쥐의 폐 라는 국소적인 환경이지만 IL-10 값이 높을수록 항 염증 능력이 증가 함을 시사 하고³⁷ 이것은 실리마린이 염증 치료 과정에서 IL-10보다 상 위 레벨에 영향을 주어 항염증 능력을 향상 시키는 것으로 생각된다. 그러나 대식세포에 실리마린을 투여 한 실험 결과에서는 IL-10의 분석 값이 LPS만 투여한 군에 비하여 감소 함을 보였고 이는 이전 실험 결과가 없어서 비교가 불가능하였다. 세포실험과 동물실험 에서의 실리마린이 염증 조절에 영향을 미치는 부분이 다를 수 있거나 동물의 폐 손상

정도에 따라 IL-10을 작동 시키지 못 한 것 있어 이는 추후 추가 실험이 필요하다 생각 된다.

이와 함께 실리마린의 항염증 효과를 확인하기 위하여 PGE2의 생성을 살펴보았다. PGE2는 염증과 패혈증에 관여하는 주요 매개체로 발열과 통증 조절에 중요한 역할을 한 다고 알려져 있다. PGE2의 증가는 IL-1B에 의해 유발되는 염증의 통증과 관련이 있으며 IL-1B는 주로 PGE2의 합성을 증가시킴으로써 통증의 역치를 낮추는 것으로 보고되고 있 다.³⁸ 또한 PGE2는 패혈증의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.^{39, 40} PGE2수용 체 길항제 치료는 화상으로 인한 패혈증에서 완화 효과를 보였으며⁴¹, Shoup 등의 연구 에 따르면 COX-2 억제제(COX-2 inhibitor)가 화상 감염 후 생존율을 향상 시키고 PGE2의 생산을 억제함으로써 패혈증을 호전 시킬 수 있음을 시사하였다.41 그리고 Kang 등의 연 구에 의하면 대식세포에 직접 실리마린 처리를 한 경우와 동물에 실리마린 처치를 한 후 분리 해 낸 복막의 대식세포 모두에서 PGE2의 감소를 확인하였다. 이는 LPS로 자극을 준 대식세포에서 PGE2 생산 및 COX-2 발현에 실리마린이 억제 효과를 보이는 것이라고 보고하였다.²⁸ 본 실험에서도 대식세포에 LPS로 자극을 준 후 실리마린을 처리하였을 때 는 PGE2가 큰 폭으로 감소하는 것을 보여주었다. 그러나 이전 연구에서 볼 수 없었던 쥐 실험에서는 LPS만 투여한 군에 비하여 실리마린을 함께 투여한 군의 PGE2 값이 전처 치와 후처치 모두에서 LPS군과 차이를 보이지 않았다. 이것은 사이토카인 IL-10과 같이 실리마린을 투여 하였을 때 LPS만 투여한 군에 비하여 대식세포 실험에서는 감소하고 쥐 실험에서는 감소하지 않은 값을 보여주었다. PGE2의 역할을 다시 살펴보면 염증 반응 의 매개체로서 뿐만 아니라, IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 생성을 촉진하는 면역 반응 조절자로서의 역할을 찾아 볼 수 있다.42 PGE2는 가지 세포(Dendritic cells)에 대하여 세포의 성숙도와 세포가 활성화 되는 외부 조건에 따라 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.43-45 따라서 앞서 IL-10이 폐 손상 정도에 의하여 작동하지 않아 PGE2 발현

에도 영향을 준 것으로 볼 수 있다. PGE2와 COX의 관계를 살펴보면 COX-1의 발현이나 활성을 억제시킨 경우 double negative thymocyte(DN)가 double positive thymocyte(DP) 로 분화되는 것이 억제되었고, COX-2의 발현이 억제 된 경우에는 DN의 미성숙과 single positive thymocyte의 수가 감소 되어, thymocyte의 각 분화 단계에서 서로 다른 COX의 효소가 PGE2에 관여 되고 있음을 제시하고 있다.⁴⁶ 따라서 염증성 질환에서 매개체 역할 외에도 면역 반응의 조절자 역할도 하는 것으로 알려 진 PGE2 작용이 선택적으로 조절 되는 것에 대한 연구가 앞으로 더 이루어져야 할 것으로 생각 된다.

실리마린의 항염증 효과를 보기 위하여 조사한 PGE2와 COX-2는 염증, 통증, 고열을유 발하는 프로스타글란딘(Prostaglandine)의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁴⁷ 실리마 린을 투여한 군에서 IL-1β의 생성을 감소시키면 줄어 든 양 만큼 IL-1β가 수용체에 결합 하는 수가 줄어들고 그로 인하여 COX-2의 발현이 줄어들게 되면 치료 효과에 영향을 준 다고 볼 수 있다.⁴⁸ 기존의 연구에서²⁸ 실리마린의 전처치에서 COX-2의 감소를 보여준 것에 더하여 본 실험에서는 LPS로 자극을 준 대식세포에서 실리마린 전처치 실험과 와 후처치 실험 모두에서 LPS만 처리한 군에 비하여 COX-2가 감소함을 보였으며, 다만 후 처치에 비하여 전처치에서 감소의 폭이 큰 경향을 보여주었다.

결국 사이토카인 IL-1β, IL-6와 함께 염증 지수로 간주되고 있는 COX-2까지 LPS만 투 여한 군에 비하여 실리마린을 함께 투여군에서 감소함을 보임으로 항 염증 작용을 나 타내는 것을 시사하고, 실리마린의 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 감소함을 보 임으로 예방 효과와 함께 치료 효과를 제시 할 수 있다.

실리마린의 호중구 이동에 대한 효과

실리마린의 항염증 효과를 또다른 경로에서 확인하기 위하여 LPS으로 유도 된 패혈 증 쥐 모델에서 염증에 반응하여 호중구를 이동시키는 LTB4를 측정하였다. 우선 호중구

는 상주 세포에 의해 생성되는 케모마인 및 사이토카인과 같은 염증 신호에 반응하여 염 증 부위로 빠르게 이동 한다.⁴⁹ 이전 연구들에 의하면 LTB4가 BLT1 수용체 활성화를 통 하여 호중구의 동원을 자극하는 필수 화학주성작용제 (Essential chemotactic agent)로 작 용하는 것이라고 보고되었다.^{50, 51} 따라서 LTB4 생산에 대한 실리마린의 항염증 효과에 의 한 화학주성작용 억제는 호중구 모집에 직접적인 영향을 미칠 수 있고, LPS로 유도 된 염증에 의한 사이토카인은 직접 접착 분자의 발현을 자극하여 호중구 모집에 영향을 준 다.⁵²⁻⁵⁴ 즉 활성화 된 대식세포는 염증 초기 단계에서 매개체 생산의 가장 중요한 원천 중 하나라고 할 수 있다.⁵⁵ 본 실험에서 LPS로 유도 된 패혈증 쥐 모델에서 실리마린를 전처치와 후처치를 한 경우 동물의 기관지폐포 세척액에서 측정 한 LTB4의 값이 모두 유의하게 감소하였다. 이는 실리마린이 호중구 동원 및 사이토카인 생산을 억제시키고 이로 인하여 대식세포의 활성화를 감소 시킨다는 것을 관찰 할 수 있었으며, 투여 시점 인 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 효과를 나타냄으로 예방 효과와 치료 효과를 보 이는 것이라 생각된다.

실리마린을 투여 한 기관지폐포 세척액 분석 및 병리학적 변화 효과

조직학적 변화를 통하여 패혈증 모델에서 실리마린의 투여가 미치는 영향을 알아보 았다. LPS 를 투여한 후 48시간 째에 얻은 조직에서 실리마린 전처치 실험과 후처치 실 험 모두에서 중성구 침윤이 LPS만 투여한 군에 비하여 감소되는 경향을 보여주었다. 폐 손상 정도 점수(Lung injury scores)의 비교에서는 실리마린의 전처치 실험과 후처치 실험 모두 LPS만 투여한 군에 비하여 유의하게 폐손상 점수가 낮았다.

염증성 질환은 다양한 측면에서 다르지만 일부 증거에서 대식세포와 호중구가 많은 염증성 질환의 경우 시작점과 악화 단계에는 일관된 모습들을 보인다.⁵⁶ 이 중 호중구에 의한 급성 폐손상 발생기전이 급성 폐손상 병인론에서 중요하며 LPS는 폐 내에 호중구

의 침윤을 증가시키고 혈관내의 호중구가 폐포 쪽으로 이동하여 제 1, 2 폐포 세포의 손 상을 가져오며 동시에 혈관내피세포의 손상을 가져와 상피장벽 및 혈관장벽을 파괴하여 부종액의 폐포유입(Alveolar flooding) 을 유발한다고 한다.^{57, 58} 본 실험의 결과에서도 LPS 만 투여 한 군에 비하여 실리마린을 투여한 군의 폐조직에서 중성구 침윤 및 폐부종이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 또한 실리마린을 투여한 군의 기관지폐포 세척액 속의 호 중구 수가 LPS만 투여한 군에 비하여 유의하게 낮아지는 호전을 보였다. 패혈증 쥐 모델 에서 실리마린 전처치가 후처치 보다 기관지폐포 세척액 내의 총 세포 수에서 좀 더 큰 감소 폭을 보여주었다. Yang 등의 연구에 의하면 호중구가 대식세포가 염증에 대응하는 데 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다.⁵⁹ 지금까지 알려진 연구들에 의하면 칼슘 의존 적 신호 전달은 대식세포 활성화를 강화하고⁶⁰ 이러한 세포에서 염증성 사이토카인의 생 산에 자극을 준다는 것이다.⁶¹ 따라서 대식세포를 포함한 면역 세포에서 칼슘 유입 및 관 련 신호전달 경로를 조절 하는 데 있어 실리마린의 역할을 다루는 추가 연구가 메커니즘 을 특성화 하는데 기여할 것이라 생각된다.

실리마린의 투여 용량에 따른 효과

실리마린의 투여 용량에 따라 비교해보면 대식세포 실험에서 실리마린의 투여 용량 은 10, 25, 50µg/ml로 나누었고 이는 기존의 연구²⁸에서 행해진 용량을 고용량으로 하고 그보다 낮은 용량을 추가하였다. 대식세포의 배양액에서 측정한 사이토카인 IL-1β, IL-6, IL-10의 결과 값은 투여 된 실리마린의 용량에 의존적으로 감소 함을 보여주었다. 실리마 린의 투여 용량에 의존적인 결과는 투여 시점인 전처치와 후처치 모두에서 보여주었다. 그러나 COX-2에서는 전처치의 중간 용량부터 유의하게 감소하였으며 저용량은 거의 감 소하지 않아, 실리마린의 저용량 투여는 COX-2의 감소에 영향을 주지 못한다고 생각되 었다. 실리마린의 투여 용량은 쥐 실험에서도 나누었는데, 기존의 연구 중 가장 고용량을 투여 한 연구²⁷에서의 값을 역시 고용량으로 정하고 그 보다 저용량을 정하여 세 용량

인 100, 250, 500mg/kg로 나누었다. 실리마린의 투여 용량에 따른 용량 의존도는 세포 실험에 비하여 쥐 실험에서는 용량에 의존적으로 유의한 감소 또는 증가를 보이지는 않 았으나 경향을 보였다. 실리마린의 투여 시점에 따라 나눈 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 용량에 의존적이지 않았다. 이는 동물의 위장관에서 실리마린의 흡수가 용량비 례적으로 이루어지지 않았을 가능성이 있기 때문이라 사료된다. 따라서 추후 동물 실험 에서 실리마린의 흡수 시간과 흡수력에 대한 보강 실험이 필요하다 생각된다.

패혈증에 대한 이해가 증가하게 되면서 특정 사이토카인, 응고인자, 성장인자와 같이 치료약제의 표적이나 잠재적인 생물할적 치료제들이 많이 시도되고⁶² 있으나, 효과적인 치료제를 찾기 어려운 이유는 패혈증의 다양한 위험인자와 이에 따른 병태생리가 다를 가능성이 높고⁶³⁻⁶⁵, 발현되는 표적들의 시기와 역할이 다양하기 때문이다. 따라서 다양한 기능으로 패혈증에 효과를 보이거나 상태 호전에 중요한 역할을 하는 인자에 작용하는 약제가 있다면 패혈증의 치료제로 사용 될 가능성이 높다고 할 수 있다. 본 실험의 결과 기존의 실리마린 연구들에 더하여 염증 유도 지표들을 낮추고 항염증 관련 지표는 증가 함을 보임으로 경구 투여가 가능 한 패혈증의 치료제로써의 가능성을 보여준다.

실리마린은 이미 오랜 기간 간 질환 치료제로 임상에서 사용되고 있다.^{22, 23} 이는 실 리마린이 항산화제로의 역할과 항염증 성질을 갖고 있다고 알려져 있기 때문이다.^{24, 25} 그 리하여 현재는 항염증 효과를 활용하여 패혈증의 치료 개선에 도움을 줄 것이라 기대하 며 가능성을 제시하는 연구들이 시행되고 있다. 그러나 아직 실리마린의 작용기전이 명 확하게 밝혀지지 않았기 때문에 더 많은 연구가 필요한 상황이다. 본 연구에서는 실리마 린을 대식세포와 동물에 투여하였고, 투여 시점을 전처치와 후처치로 하였다. 그리고 투 여 용량에 따른 항염증 효과의 크기를 관찰하였다. 이에 세포와 동물 모두에서 LPS군과 비교하여 전염증성 사이토카인 IL-1β와 IL-6의 측정 값이 감소하여 패혈증 고위험 환자에 예방과 패혈증 치료에 모두 효과를 기대 할 수 있게 되었다. 그러나 항염증성 지수를 측

정한 IL-10과 PGE2 값에서는 세포에서는 LPS군에 비하여 감소하였으나 동물 실험에서는 큰 차이를 보이지 않음으로 여러 면역세포들이 작용하는 In vivo 환경에서의 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 내독소로 유도 된 대식세포와 동물의 패혈증 모델에서 실리마린 투여가 염증 유발에 관여하는 사이토카인을 유의하게 감소시킴으로 염증 유발을 억제하고, 동물 모델에서 기관지폐포 세척액 내 호중구를 유의하게 감소시키고 조직학적 폐손 상 평가에서는 폐포강 및 간질 내 호중구의 침윤과 혈관 주위의 부종이 감소하는 호 전된 소견을 보여 주었다. 본 연구 결과로 실리마린이 항염증 효과를 보이며 이를 통하여 패혈증의 급성 폐 손상을 약화시키고 폐 조직 보호에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다. 이는 전처치 실험과 후처치 실험 모두에서 보이는 결과로 예방 효과와 치 료 효과를 기대 할 수 있게 되었다.

참고 문헌

- 1 M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour et al., The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), JAMA. 2016 Feb 23;315(8): 801–10. doi: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
- 2 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7):1303-10. doi: 10.1097/00003246-200107000-00002. PMID: 11445675
- 3 Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA 2012 Jun 20;307(23):2526-33. doi: 10.1001/jama.2012.5669. PMID:22797452
- 4 R Phillip Dellinger, Mitchell M Levy, Andrew Rhodes, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. 2013 Feb;41(2):580-637. doi: 10.1097/CCM.0b013e31827e83af. PMID: 23353941
- 5 Tom van der Poll, Steven M Opal. Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis. 2008 Jan;8(1):32-43. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70265-7. PMID: 18063412
- 6 Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA. 2011 Dec; 21;306(23):2594-605. doi: 10.1001/jama.2011.1829. PMID: 22187279
- 7 Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. JAMA. 2008 Jul; 23;300(4):413-22. doi: 10.1001/jama.300.4.413. PMID: 18647984
- 8 Christian Torgersen, Patrizia Moser, Günter Luckner, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. Anesth

Analg. 2009 Jun;108(6):1841-7. doi: 10.1213/ane.0b013e318195e11d. PMID: 19448210

- 9 Mical Paul, Vered Shani, Eli Muchtar, Galia Kariv, Eyal Robenshtok, Leonard Leibovici. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Nov;54(11):4851-63. doi: 10.1128/AAC.00627-10. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20733044
- 10 Anand Kumar, Daniel Roberts, Kenneth E Wood, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med. 2006 Jun;34(6):1589-96. doi: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9. PMID: 16625125
- 11 Constantine Tsigos, George P Chrousos. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res. 2002 Oct;53(4):865-71. doi: 10.1016/s0022-3999(02)00429-4. PMID: 12377295
- 12 S R El Azab, P M J Rosseel, J J de Lange, et al. Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery. Br J Anaesth. 2002 Apr;88(4):496-501. doi: 10.1093/bja/88.4.496. PMID: 12066724
- 13 Hélène Gonzalez, Olivier Nardi, Djillali Annane. Relative adrenal failure in the ICU: an identifiable problem requiring treatment. Crit Care Clin. 2006 Jan;22(1):105-18, vii. doi: 10.1016/j.ccc.2005.09.001. PMID: 16399022
- Mark S Cooper, Paul M Stewart. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients.
 N Engl J Med. 2003 Feb; 20;348(8):727-34. doi: 10.1056/NEJMra020529. PMID: 12594318
- 15 Gibbison B, López-López JA, Higgins JP, Miller T, Angelini GD, Lightman SL, Annane D. Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network metaanalysis. Crit Care. 2017 Mar; 28;21(1):78. doi: 10.1186/s13054-017-1659-4. PMID: 28351429
- 16 Didier Keh, Thomas Boehnke, Steffen Weber-Cartens, et al. Immunologic and
hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a doubleblind, randomized, placebo-controlled, crossover study. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Feb; 15;167(4):512-20. doi: 10.1164/rccm.200205-446OC. Epub 2002 Nov 8. PMID: 12426230

- 17 Sangkil Lee, Jeong-Am Ryu, Corticosteroid Treatment in Critically Ill Patients. J Neurocrit Care. 2017; 10(2): 86-91. doi: 10.18700/jnc.170030
- 18 E J Ziegler, C J Fisher Jr, C L Sprung, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. N Engl J Med. 1991 Feb; 14;324(7):429-36. doi: 10.1056/NEJM199102143240701. PMID: 1988827
- 19 Steven M Opal, Pierre-Francois Laterre, Bruno Francois, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. JAMA. 2013 Mar; 20;309(11):1154-62. doi: 10.1001/jama.2013.2194. PMID: 23512062
- 20 G R Bernard, J L Vincent, P F Laterre, S P LaRosa, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med. 2001 Mar; 8;344(10):699-709. doi: 10.1056/NEJM200103083441001. PMID: 11236773
- A Valenzuela, A Garrido. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol Res. 1994;27(2):105-12. PMID: 8640239
- Francine Rainone. Milk thistle. Am Fam Physician. 2005 Oct; 1;72(7):1285-8. PMID:
 16225032
- 23 W H Down, L F Chasseaud, R K Grundy. Effect of silvbin on the hepatic microsomal drug metabolizing enzyme system in the rat. Arzneimittelforschung. 1974 Dec;24(12):1986-8. PMID: 4218108
- 24 P Muriel, T Garciapiña, V Perez-Alvarez, M Mourelle. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. J Appl Toxicol. 1992

Dec;12(6):439-42. doi: 10.1002/jat.2550120613. PMID: 1360480

- 25 C Dehmlow, J Erhard, H de Groot. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. Hepatology. 1996 Apr;23(4):749-54. doi: 10.1053/jhep.1996.v23.pm0008666328. PMID: 8666328
- 26 Da-Hee Jeong, Gi-Ppeum Lee, Won-Il Jeong, et al. Alterations of mast cells and TGF-β1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis. World J Gastroenterol. 2005 Feb; 28;11(8):1141-8. doi: 10.3748/wjg.v11.i8.1141. PMID: 15754394
- 27 Kasim M. Juma'a, Saad A. Hussain,1, Intesar T. Numan and Assad H. Siqar. Dosedependent Anti-inflammatory Effect of Silymarin in Experimental Animal Model of Acute Inflammation. Iraqi J Pharm Sci. 2009; Vol.18 (Suppl.). doi: 10.31351/vol18issSuppl.pp14-18
- 28 Jong Soon Kang, Young Jin Jeon, Song-Kyu Park, Kyu-Hwan Yang, Hwan Mook Kim. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1b and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. Biochemical Pharmacology. 2004 Jan; 67;175–181. doi: 10.1016/j.bcp.2003.08.032
- 29 Zhongming Zhu, Gengyun Sun. Silymarin mitigates lung impairments in a rat model of acute respiratory distress syndrome. Inflammopharmacology. 2018 Jun;26(3):747-754. doi: 10.1007/s10787-017-0407-3. PMID: 29098546
- 30 Feng Zhao, Danyang Shi, Tiegang Li, Lizhuo Li, Min Zhao. Silymarin attenuates paraquat-induced lung injury via Nrf2-mediated pathway in vivo and in vitro. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2015 Sep;42(9):988-998. doi: 10.1111/1440-1681.12448. PMID: 26173462
- 31 Hong SB, Koh Y, Lee IC, et al. Induced hypothermia as a new approach to lung rest for the acutely injured lung. Crit Care Med. 2005 Sep;33(9):2049-55. doi: 10.1097/01.ccm.0000178186.37167.53. PMID: 16148479
- 32 Amber L Degryse, Harikrishna Tanjore, Xiaochuan C Xu, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Oct;299(4):L442-52. doi: 10.1152/ajplung.00026.2010. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20562227

- 33 Schütte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H, et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. Eur Respir J. 1996 Sep;9(9):1858-67. doi: 10.1183/09031936.96.09091858. PMID: 8880103
- 34 P M Suter, S Suter, E Girardin, P Roux-Lombard, G E Grau, J M Dayer. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. Am Rev Respir Dis. 1992 May;145(5):1016-22. doi: 10.1164/ajrccm/145.5.1016. PMID: 1586041
- S A Jones, S Horiuchi, N Topley, N Yamamoto, G M Fuller. The soluble interleukin
 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. FASEB J. 2001
 Jan;15(1):43-58. doi: 10.1096/fj.99-1003rev. PMID: 11149892
- 36 Michele A Grimbaldeston, Susumu Nakae, Janet Kalesnikoff, Mindy Tsai, Stephen J Galli. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. Nat Immunol. 2007 Oct;8(10):1095-104. doi: 10.1038/ni1503. PMID: 17767162
- 37 Zhongming Zhu, Gengyun Sun. Silymarin mitigates lung impairments in a rat model of acute respiratory distress syndrome. Inflammopharmacology. 2018 Jun;26(3):747-754. doi: 10.1007/s10787-017-0407-3. PMID: 29098546
- 38 A Schweizer, U Feige, A Fontana, K Müller, C A Dinarello. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. Agents Actions. 1988 Dec;25(3-4):246-51. doi: 10.1007/BF01965025. PMID: 3265268
- C L Miller-Graziano, M Fink, J Y Wu, G Szabo, K Kodys. Mechanisms of altered monocyte prostaglandin E2 production in severely injured patients. Arch Surg. 1988 Mar;123(3):293-9. doi: 10.1001/archsurg.1988.01400270027003. PMID: 2963603

- 40 R Fukushima, J W Alexander, J Z Wu, J X Mao, K Szczur, A M Stephens, J D Ogle, C K Ogle. Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. Circ Shock. 1994 Mar;42(3):154-62. PMID: 8025981
- 41 S Santangelo, M Shoup, R L Gamelli, R Shankar. Prostaglandin E2 receptor antagonist (SC-19220) treatment restores the balance to bone marrow myelopoiesis after burn sepsis. J Trauma. 2000 May;48(5):826-30; discussion 830-1. doi: 10.1097/00005373-200005000-00005. PMID: 10823525
- 42 Sarah G Harris, Josue Padilla, Laura Koumas, Denise Ray, Richard P Phipps.
 Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002 Mar;23(3):14450. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02154-8. PMID: 11864843
- 43 P Kaliński, C M Hilkens, A Snijders, F G Snijdewint, M L Kapsenberg. IL-12deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naïve T helper cells. J Immunol. 1997 Jul 1;159(1):28-35. PMID: 9200435
- 44 P Kaliński, C M Hilkens, A Snijders, F G Snijdewint, M L Kapsenberg. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. Adv Exp Med Biol. 1997;417:363-7. doi: 10.1007/978-1-4757-9966-8_59. PMID: 9286387
- 45 Etsushi Kuroda, Uki Yamashita. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2dominant BALB/c mice. J Immunol. 2003 Jan 15;170(2):757-64. doi: 10.4049/jimmunol.170.2.757. PMID: 12517938
- 46 E J Goetzl, S An, L Zeng. Specific suppression by prostaglandin E2 of activationinduced apoptosis of human CD4+CD8+ T lymphoblasts. J Immunol. 1995 Feb 1;154(3):1041-7. PMID: 7822781
- 47 Kim Newton, Vishva M Dixit. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Mar 1;4(3). doi:

10.1101/cshperspect.a006049. PMID: 22296764

- 48 Hung-Jen Wang, Pradeep Tyagi, Yu-Ming Chen, Michael B Chancellor, Yao-Chi Chuang. Low Energy Shock Wave Therapy Inhibits Inflammatory Molecules and Suppresses Prostatic Pain and Hypersensitivity in a Capsaicin Induced Prostatitis Model in Rats. Int J Mol Sci. 2019 Sep 26;20(19):4777. doi: 10.3390/ijms20194777. PMID: 31561455
- 49 Niels Borregaard. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010 Nov 24;33(5):657-70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011. PMID: 21094463
- 50 J Palmblad, C L Malmsten, A M Udén, O Rådmark, L Engstedt, B Samuelsson. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. Blood. 1981 Sep;58(3):658-61. PMID: 6266432
- 51 Philippe V Afonso, Mirkka Janka-Junttila, Young Jong Lee, et al. LTB4 is a signalrelay molecule during neutrophil chemotaxis. Dev Cell. 2012 May 15;22(5):1079-91. doi: 10.1016/j.devcel.2012.02.003. PMID: 22542839
- 52 J Doukas, J S Pober. IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. J Immunol. 1990 Sep 15;145(6):1727-33. PMID: 1697308
- 53 A Marfaing-Koka, O Devergne, G Gorgone, A Portier, T J Schall, P Galanaud, D Emilie. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. J Immunol. 1995 Feb 15;154(4):1870-8. PMID: 7530744
- 54 Peter Libby. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. Nutr Rev. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S140-6. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x. PMID: 18240538
- 55 Nagatoshi Fujiwara, Kazuo Kobayashi. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005 Jun;4(3):281-6. doi: 10.2174/1568010054022024.
 PMID: 16101534

- 56 Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol.2005 Jan;17(1):1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186. PMID: 15585605
- 57 W L Lee, G P Downey. Neutrophil activation and acute lung injury. Curr Opin Crit Care. 2001 Feb;7(1):1-7. doi: 10.1097/00075198-200102000-00001. PMID: 11373504
- H P van Helden, W C Kuijpers, D Steenvoorden, C Go, P L Bruijnzeel, M van Eijk,
 H P Haagsman. Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat: a comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome.
 Exp Lung Res. Jul-Aug 1997;23(4):297-316. doi: 10.3109/01902149709039228.
 PMID: 9202956
- 59 Wenting Yang, Yuandong Tao, Yan Wu, et al. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. Nat Commun. 2019 Mar 6;10(1):1076. doi: 10.1038/s41467-019-09046-8. PMID: 30842418
- 60 Sara Zumerle, Bianca Calì, Fabio Munari, et al. Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. Cell Rep. 2019 Apr 2;27(1):1-10.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.011. PMID: 30943393
- 61 Bimal N Desai, Norbert Leitinger. Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. Front. Front Immunol. 2014 Nov 27;5:580. doi: 10.3389/fimmu.2014.00580. PMID: 25505897
- 62 Andrew James Boyle, James Joseph McNamee, Daniel Francis McAuley. Biological therapies in the acute respiratory distress syndrome. Expert Opin Biol Ther. 2014 Jul;14(7):969-81. doi: 10.1517/14712598.2014.905536. PMID: 24702248
- 63 Chau-Chyun Sheu, Michelle N Gong, Rihong Zhai, et al. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-sepsis-related ARDS. Chest. 2010 Sep;138(3):559-67. doi: 10.1378/chest.09-2933. PMID: 20507948
- 64 Calfee CS, Eisner MD, Ware LB, Thompson BT, Parsons PE, Wheeler AP, et al. Trauma-associated lung injury differes clinically and biologically from acute

lung injury due to other clinical disorders. Crit Care Med. 2007 Oct;35(10):2243-50. doi: 10.1097/01.ccm.0000280434.33451.87. PMID: 17944012

- 65 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med. 2005 Oct 20;353(16):1685-93. doi: 10.1056/NEJMoa050333 PMID: 16236739
- 66 Hale Z Toklu, Tugba Tunali Akbay, Ayliz Velioglu-Ogunc, et al. Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. J Surg Res. 2008 Apr;145(2):214-22. doi: 10.1016/j.jss.2007.03.072. PMID: 17950327

Abstract

Background

Sepsis is an infection caused by various strains, which causes an inflammatory response and induces the malfunction of multiple organ of the body. Sepsis should be treated with a focus on the cause of the infection and subsequent inflammation. Therefore, many studies on anti-inflammatory drugs are being conducted. Among them, silymarin used as a liver function improving agent inhibits the production of substances that cause inflammatory reaction and inhibits the fibrosis reaction that occurs in cirrhosis of the liver. It is thought that silymarin may have an effect on inflammation of sepsis. The purpose of this study is to investigate whether silymarin has an anti-inflammatory role and influences fibrosis in a lipopolysaccharide(LPS)-induced sepsis model under multiple conditions.

Methods

1. Macrophage Experiment

Culturing J774A.1 cells were stimulated with LPS. Based on the time of LPS administration, they were divided into pre-treatment and post-treatment, and the dose of silymarin was into 10, 25 and 50μ g/ml. For the control group, culture medium was used instead of LPS and silymarin. After culturing for 24hours, the culture medium was collected and the inflammation-related factors Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), Prostaglandin E2 (PGE2) and Cyclooxygenase 2(COX-2) were measured by enzyme linked immunosorbent assay. Western blot analysis was performed for IL-1 β , COX-2 by separating cell proteins.

2. Animal Experiment

A sepsis model was induced by instilling 5 mg/kg of LPS intratracheally in male, 7week–old, BALB/c mice. Control mice received normal saline (NS). Silymarin was given before and after LPS administration. The administered dose of silymarin was divided into 100, 250 and 500mg/kg. Two days later, mice were sacrificed and bronchoalveolar lavages (BAL) and lung tissues were acquired. Histopathologic examination was done using hematoxylin-eosin and Masson trichrome staining. The count total cells and polymorphonuclear (PMN) leukocytes were measured using BAL fluid. IL-1 β , IL-6, IL-10, PGE2 and Leukotriene B 4(LTB4) were measured by enzyme linked immunosorbent assay.

Results

In the macrophage experiment, the cytokines decreased in the pre-treatment administered with silymarin compared with the LPS group, and the extent of the decrease was proportional to the administered does (pre-treatment; IL-1 β measurements; LPS, 114.4 ± 8.4 pg/ml vs silymarin 10µg/ml, 66.7 ± 3.9 pg/ml, 25µg/ml, 28.5 ± 4.5 pg/ml, 50µg/ml, 3.6 ± 0.4 pg/ml). The cytokines in post-treatment also decreased compared to the LPS group and the extent of decrease was also proportional to the dose (post-treatment; IL-1 β measurements; LPS, 114.4 ± 8.4 pg/ml vs silymarin 10µg/ml, 66.7 ± 0.4 pg/ml, 25µg/ml, 26.6 ± 4.9 pg/ml, 25µg/ml, 1.1 ± 0.8 pg/ml, 50µg/ml, 0.0 ± 0.0 pg/ml).

In animal experiments, the cytokine value was decreased in the group administered with silymarin compared to the group administered with LPS group. (pre-treatment; IL-1 β measurements; LPS, 202.9 ± 111.6 pg/ml vs silymarin 100mg/ml, 54.2 ± 15.3 pg/ml,

250mg/ml, 65.6 \pm 36.1 pg/ml, 500mg/ml, 39.6 \pm 23.9 pg/ml, post-treatment; IL-1 β measurements; LPS, 202.9 \pm 111.6 pg/ml vs silymarin 100mg/ml, 182.5 \pm 24.2 pg/ml, 250mg/ml, 171.6 \pm 23.0 pg/ml, 500mg/ml, 145.4 \pm 18.8 pg/ml,). However, the decrease was not depending on the dose of silymarin administered. the examination of the lung tissue showed that neutrophil infiltration in the alveolar cavity was decreased in the group administered with silymarin, and interstitial and alveolar hemorrhage or congestion were less pronounced compared to the group administered with LPS group. Administration of silymarin suppressed inflammation in sepsis and attenuated the alveolar septal thickening and interstitial fibrosis.

Conclusion

Administration of silymarin in LPS-induced sepsis models suppresses inflammation and attenuates pathologic change of lung parenchyma and neutrophil infiltration, suggesting a certain role in sepsis. In addition, we compared and therapeutic effect as well as the preventive effect of silymarin by comparing the pre-treatment and post treatment. Clinical application would be possible in the future after further studies addressing some issues raised in our study such as gastrointestinal absorption of silymarin and contradictory change of some cytokines.

Keywords: ; sepsis; lipopolysaccharide; silymarin; inflammation