

간 보호제 및 담즙산류들이 마크로파지 세포주에서 TNF- α 분비에 미치는 효과

조재열[#] · 박지수 · 유은숙 · 백경업 · 박명환

(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received October 2, 1997)

Effect of Hepatoprotective Agents and Bile acids on TNF- α Production in Macrophage Cell Lines

Jae Youl Cho[#], Jisoo Park, Eun Sook Yoo,
Kyong Up Baik and Myung Hwan Park

R & D Center, Daewoong Pharm. Co., Ltd. 223-23, Sangdaewon-Dong,
Joongwon-Gu, Sungnam, Kyunggi-Do, Korea, 462-120

Abstract—The effect of hepatoprotective agents and bile acids on tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in murine and human macrophage cell line (RAW264.7 and U937) was investigated. The hepatoprotective agents including silymarin and its major component, silybin, significantly inhibited TNF- α production in a concentration dependent manner (IC_{50} of silybin=67.7 μ g/ml (140.3 μ M)). In differentiated U937 cells, especially, silybin showed more effective inhibitory activity (IC_{50} =35.1 μ g/ml (72.7 M)). These results suggest that silymarin and silybin may inhibit TNF- α production in the process of hepatic diseases in human. However, biphenyldimethyl dicarboxylate (DDB) was not effective. In the case of bile acids, chenodeoxycholic acid (CDCA) showed a concentration dependent inhibitory effect on TNF- α production (IC_{50} of CDCA=71.5 μ g/ml (182.1 μ M)). In contrast, glycine or taurine conjugated form (G-CDCA or T-CDCA) restored to the control level or significantly increased TNF- α production. And also ursodeoxycholic acid (UDCA) and its conjugated forms (G-UDCA and T-UDCA) showed a variety of patterns on TNF- α production by changes of functional groups and concentration. These results also indicate that bile acids may regulate TNF- α production in normal hepatic function or disease conditions.

Keywords □ TNF- α , silymarin, silybin, biphenyldimethyl dicarboxylate, ursodeoxycholic acid, cheno-deoxycholic acid.

여러 간장질환과 TNF- α 와의 관계는 매우 밀접한 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이와같은 사실은 그람 음성균으로부터 생성된 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 내독소(endotoxin)와 D-galactosamine(D-GalN) 및 CCl₄와 같은 실험적 간장해 유발물질에 의한 여러 간염모델에서 증명되고 있다.^{3~8)} 특히 endotoxin-mediated liver injury는 TNF- α 에 의해 매개되는 가장 대표적인 간장질환의 예인데, 이들 질환의 발생은 감염균으로 부

터 방출된 LPS에 의해 간 macrophage인 kupffer cell이 자극을 받음으로써 분비되는 TNF- α 에 의해 주로 매개되는 것으로 보고되는데,¹⁾ 이때 분비된 TNF- α 는 혈액내 polymorphonuclear leukocyte(PML)을 자극하여 adhesion molecules의 생성을 촉진하고 간 조직내로 이동하게 한다.^{9,10)} 이때 PML은 coagulation system과 활성산소(reactive oxygen)을 생성하여 간세포의 파괴를 유도하고, 결국 간장해에 이르게 한다.^{1,11,12)} 또한 이와같은 과정에 의해 심하게 간세포가 파괴될 경우, endotoxin-mediated liver injury는 계속해서 생성되는 LPS를 중화시키지 못하고,¹³⁾ septic

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

shock과 같은 치사율이 높은 질환으로 전환되어 생명을 잃게 하는 것으로 알려져 있다.^{3, 14-16}

간손상에 있어서 TNF- α 의 병리적 중요성은 TNF- α 에 대한 단세포 항체(monoclonal antibody)를 주입하거나 TNF- α 를 저해하는 약물들을 처리할 경우 이들 질환의 높은 사망율을 저하시키는 것으로 증명되고 있다.^{6, 14}

또한 이외에도 D-GalN이나 CCl₄ 주입에 따른 실험적 간장해에서도 TNF- α 뿐만 아니라 interleukin(IL)-1, 2, 및 6 등의 분비가 유도되는 것으로 보고되었으며,⁷ 알콜성 간염이나 바이러스성 간염에서도 TNF- α 의 관련성은 매우 높게 시사되고 있다.^{2, 17}

Cholestasis 과정에서도 간조직내 kupffer cell의 활성이나 세포매개성 면역(cell-mediated immunity)의 손상이 유도되는데 이때 kupffer cell에 의한 사이토카인 분비상태도 균형이 깨지는 것으로 보고되고 있다.¹

따라서 이를 배경으로 본 연구에서는 현재 간질환 치료를 위해 임상에서 사용되고 있는 biphenyl dimethyl dicarboxylate(DDB)나 silymarin 등과 같은 hepatoprotective agent(간보호제)들이 TNF- α 분비에 미치는 영향을 조사하여 이들의 기존 역할인 radical scavenger외에 TNF- α 분비억제 작용이 있는지를 조사해 보고자하였다. 또한 현재 담석용해 역할이 보고되어 임상에서 처방되고 있는 주요 담즙산인 ursodeoxycholic acid(UDCA)와 chenodeoxycholic acid(CDCA) 그리고 이들의 담즙내 분비형인 tauroine(T)과 glycine(G)포합체(G-UDCA, T-UDCA, G-CDCA 및 T-CDCA)들이 TNF- α 생성에 미치는 영향을 검토하여 담즙산의 TNF- α 생성에 관한 조절작용 가능성을 함께 고찰해 보았다.

실험 방법

시약 및 재료 - Ursodeoxycholic acid(UDCA), tauroursodeoxycholic acid(TUDCA), glycourso-deoxycholic acid(GUDCA), chenodeoxycholic acid(CDCA), taurochenodeoxycholic acid(TCDCA), glycochenodeoxycholic acid(GCDCA), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), pentoxifylline(PTX), MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 및 LPS(*E. coli* 0111 : B4)는 Sigma(USA)로부터 구매하여 사용하였으며 *Cardus*

*mariarus extract*인 silymarin은 Indena(France)에서 구입하였다. Silymarin의 주 성분인 silybin은 Roth(Germany)사 제품을 사용하였다. Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 ATCC(USA)로부터 구입하여 실험하였다. 또한 세포배양시 사용된 RPMI1640 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(USA)로부터 구입하였다. 그외 사용된 모든시약은 특급이상 및 Sigma제품을 이용하였다. 초자의 경우 24 well plate는 Falcon사(USA) 제품을, TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 Amersham Life Science Co(Arlington Heights, U.K.)사로부터 구입하여 정량에 이용하였으며 ELISA reader로는 Spectramax 250 microplate reader(Molecular Devices, U.S.A.)를 사용하였다.

약물 처리 - 시험약물 및 추출물은 propylene glycol(PPG) 89.1%, EtOH 10% 및 DMSO 0.1% 비율로 조제된 vehicle을 100%로 하여 녹인 후 다시 배지를 이용하여 각각의 농도로 희석하였다. 또한 약물처리시 각 well당 vehicle의 농도는 RAW264.7 세포의 TNF- α 생성 분비에 영향을 미치지 않는 농도인 0.1% 이하로 하였다.

In vitro TNF- α 생성 및 정량 - Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI1640 배지를 이용해서 1×10^6 cells/ml로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 μ l와 450 μ l의 LPS(최종농도 1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 4.5 시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하여 상층액을 얻고 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다.

Human macrophage cell line(U937 세포)을 이용한 TNF- α 의 생성은 다음의 방법으로 실시하였다. U937 세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI1640 배지로 1×10^6 cells/ml의 농도로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고 20 ng/ml의 PMA와 함께 24시간 동안 5% CO₂ 및 37°C에서 배양하여 분화를 유도하였다. 다시 새로운 RPMI1640 배지로 교환 후, 분화되어 바닥에 부착된 세포들을 40시간 정도 더 배양하였다. 최

총농도 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS와 다양한 농도(10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 silybin을 동시에 처리하여 6시간정도 방치하였다. 이후 원심분리하여 상층액을 얻고 human TNF- α 정량시까지 -20°C 이하에서 보관하였다.

TNF- α 의 정량은 mouse 및 human TNF- α ELISA kit를 이용하여 정량하였다. TNF- α 의 정량한계는 5 pg/ ml 이하였으며 standard TNF- α 에 대한 표준 곡선의 r^2 값은 두 방법이 0.99 이상이었다.

MTT assay에 의한 세포독성 평가 – TNF- α 억제효과를 보인 단일화합물 silybin이 세포독성을 나타내는지 확인하기 위해 RAW264.7 및 U937 세포를 이용하여 검정하였다. RAW264.7 및 U937 세포를 $1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 로 96 well plate에 접종하고, 5% CO_2 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 silybin과 담즙산을 여러 농도로 회석하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 MTT 용액(5 mg/ml) 20 μl 를 첨가하고 다시 4시간 동안 동일 조건에서 배양하였다. 빌색은 30% SDS용액을 첨가하여 유도하였으며 흡광도는 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

통계처리 – 각 data는 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였으며 p 값이 0.05이상일 때 유의성 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

TNF- α 생성에 미치는 hepatoprotective agents의 영향

대표적인 hepatoprotective agent인 silymarin과 그 주성분인 silybin의 TNF- α 생성 억제에 대한 본 실험 결과를 보면, Fig. 1(A)에서 나타냈듯이 RAW264.7 세포의 경우 25, 50, 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 silymarin은 21.0%, 40.2% 및 59.1%로, silymarin의 주성분인 silybin은 28.9%, 35.5% 및 71.2%로 각각 유의성 있는 억제 효과를 보여 주었으며, silybin의 IC_{50} 는 140.3 μM 이었다. 또한 단일성분인 silybin에 대한 human cell에서의 작용 역시 Fig. 2(A)에서 볼 수 있듯이 용량 의존적인 억제 효과를 보였으며 특히 IC_{50} 는 RAW264.7 세포의 결과보다 두 배 정도 낮은 72.2 μM 이었다. 이것은 TNF- α 생성에 있어서, 조직내 macrophage들이 혈액내 monocyte나 여러 macrophage cell line들과 유사한 양상을 나타낸다는 보고로 볼 때,^{18, 19)} silybin이 사람의 간조직내에서도 간 macrophage인 kupffer cell의 TNF- α 생성에 대한 억제 작용 가능성도 시사한다고 하

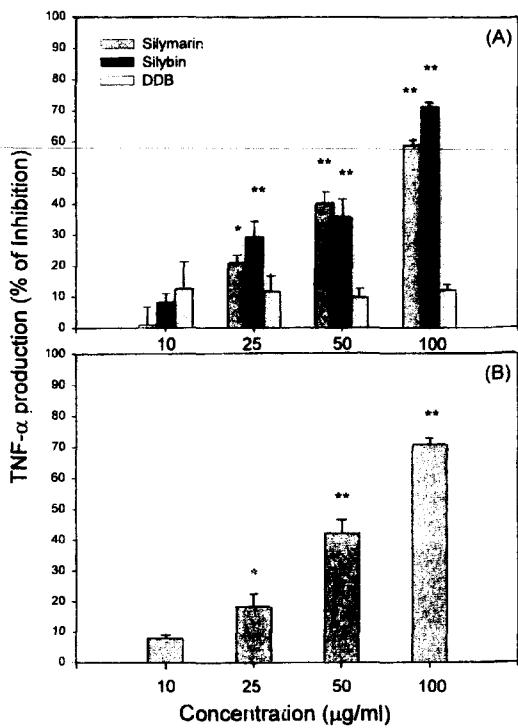


Fig. 1 – Effect of hepatoprotective agents (silymarin, silybin and biphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB)) (A) and nonselective phosphodiesterase (PDE) inhibitor (pentoxifylline) (B) on TNF- α production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells ($1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of testing compounds. Supernatants were collected after 6 hrs and assayed by ELISA.

Data represent mean \pm SEM of 3 observations.

* $p<0.05$ compared to control.

** $p<0.01$ compared to control.

겠다. 그러나 구체적인 고찰은 직접 kupffer cell을 대상으로 한 실험이 진행된 후 가능할 것으로 사료된다.

MTT assay를 통해 silybin이 U937 세포의 생존율에 미치는 정도를 확인하여 Fig. 2(B)에 나타냈다. 결과에서처럼 24시간에서 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 유의성 있는 세포 생존율 억제효과를 나타냈으나 그 이하 농도에서는 오히려 유의적인 증가현상을 나타냈다. 따라서 이와같은 결과는 silybin의 TNF- α 억제 작용은 세포독성에서 기인된 것이 아니라는 것을 시사한다.

Silybin의 TNF- α 생성 억제능은 대조약물인 cAMP PDE 저해제이면서 TNF- α 생성 억제효과가 보고된 pentoxifylline(244.6 μM)보다 다소 우수한 것으로 나타났다(Table I).

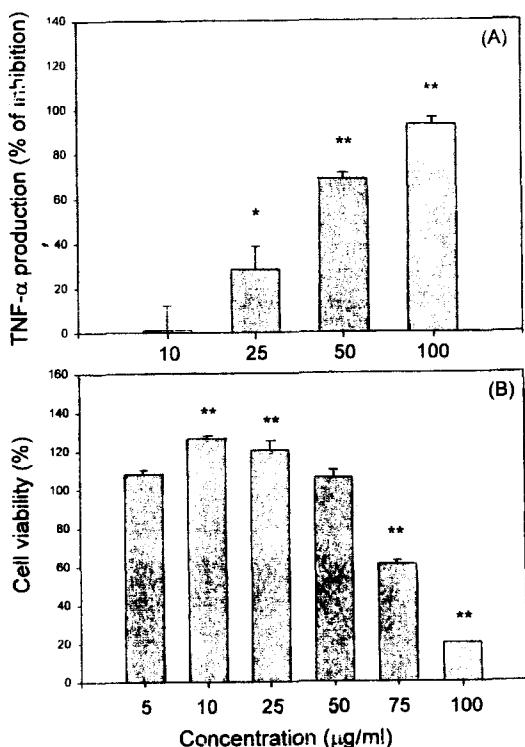


Fig. 2 — Effect of silybin on TNF- α production (A) and cell viability (B) in differentiated U937 cells. Differentiated U937 cells ($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) were stimulated with LPS of $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ in the presence of silybin. Supernatants were collected after 6 hrs and assayed by ELISA. In viability test, U937 cells ($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) were incubated with various concentrations of silybin for 24 hrs. And then, cells were treated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) for 4 hrs.

Data represent mean \pm SEM of 3 observations.

* $p < 0.05$ compared to control.

** $p < 0.01$ compared to control.

LPS 자극에 의해 생성된 TNF- α 는 cAMP 및 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 약물(adenylate cyclase activator인 forskolin 및 PGE₂, cAMP PDE 저해제인 pentoxifylline, theophylline 및 rolipram 및 세포내 cAMP인 dibutyryl cAMP와 유도체)들에 의해 생성이 억제되는 것으로 밝혀졌는데,²⁰⁾ Koch(1985) 등도 silybin이 강력한 cAMP PDE 억제 작용을 나타낸다고 보고하였다.²¹⁾ 따라서 silybin의 TNF- α 억제는 세포 내에서의 cAMP 증가에서 기인될 것으로 사료된다. 한편 Magliulo 등 (1990)은 *in vivo* 실험을 통해 silybin이 regenerating rat liver의 kupffer cell 분열을 자극하는

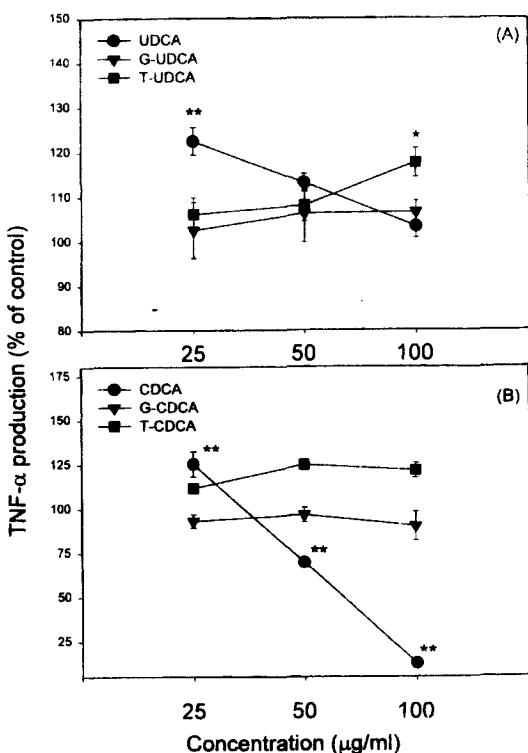


Fig. 3 — Effect of UDCA and its conjugated forms (G-UDCA and T-UDCA) (A), and CDCA and its conjugated forms (G-CDCA and T-CDCA) (B) on TNF- α production in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells ($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) were stimulated with LPS of $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ in the presence of various compounds. Supernatants were collected after 6 hrs and assayed by ELISA.

Data represent mean \pm SEM of 3 observations.

* $p < 0.05$ compared to control.

** $p < 0.01$ compared to control.

것으로 보고하였다.²²⁾ 따라서 silymarin 및 silybin은 radical scavenger 역할에서 기인된 lipid peroxidation 억제,²³⁾ lipoxygenase²⁴⁾ 및 cAMP PDE 억제,²¹⁾ TNF- α 생성 억제 및 kupffer cell의 분열 촉진²¹⁾ 등의 다양한 약리 작용을 바탕으로 종합적인 간질환 치료효과를 나타내는 것으로 판단된다.

DDB는 한방 생약제인 북오미자(*Schizandrae chinensis*)의 열매에서 분리된 활성 성분인 Schizandrin C의 합성동속체의 하나로서 여러 실험적 간질환시 증가된 SGPT치를 저하시키고 임상적으로도 만성간염과 간경변 환자의 상승된 SGPT치, 혈청 bilirubin 및 transpeptidase치를 감소시켰으며, 간경변에 의한 여러 증상도 일부는 호전시키는 것으로 보고되고 있다.²⁵⁾ 그러

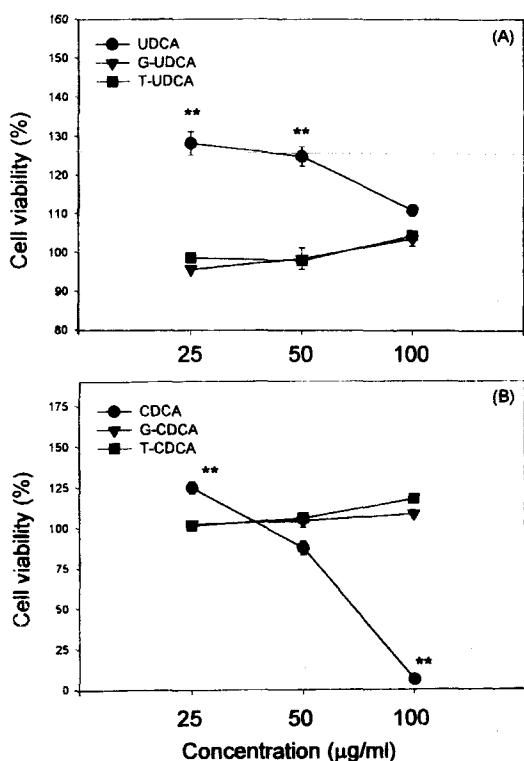


Fig. 4 — Effect of UDCA and its conjugated forms (G-UDCA and T-UDCA) (A), and CDCA and its conjugated forms (G-CDCA and T-CDCA) (B) on cell viability from RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with various concentrations of bile acids for 24 hrs. And then, cells were treated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) for 4 hrs.

Data represent mean \pm SEM of 4 observations.
**p<0.01 compared to control.

나 silymarin 및 silybin의 작용과 달리, DDB는 Fig. 1(A)에서 처럼 전 농도에서 유의성 있는 억제 작용을 나타내지 않았다. 따라서 DDB는 체내에서 TNF- α 억제작용이 없을 것으로 판단된다.

TNF- α 생성에 미치는 담즙산의 영향

생체내 여러 담즙산중 다양한 생리작용이 연구되고 있는 UDCA 및 CDCA가 TNF- α 분비에 미치는 영향을 조사해 보았다. Fig. 3에서 처럼 UDCA와 CDCA는 free form과 glycine 및 taurine이 포함됨으로써, TNF- α 생성에 다양한 형태의 영향을 미치고 있는 것으로 확인되었다.

CDCA의 경우 50 및 100 μ g/ml에서 유의성 있는 억

Table I — The molar concentrations of silybin, cheno-deoxycholic acid (CDCA) and pentoxifylline producing 50% inhibition (IC_{50}) of TNF- α production in RAW264.7 cells and differentiated U937 cells stimulated by LPS (1 μ g/ml) for 6 hrs

Compound	IC_{50} value,	
	μ g/ml	μ M
Murine cell line (RAW264.7)		
Silybin	67.7	140.3
CDCA	71.5	182.1
Pentoxifylline	68.1	244.6
Human cell line (U937)		
Silybin	35.1	72.7

RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) and differentiated U937 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated with LPS (1 μ g/ml) with various concentration of testing compounds. Supernatants were collected after 6 hrs and assayed by ELISA.

Data represent mean of 3 observations.

제 작용을 나타냈으며, IC_{50} 는 71.5 μ g/ml(182.1 μ M) 이었다(Table I). 이와같은 억제 작용은 Calmus 등 (1992)의 보고²⁶⁾와도 유사하였다. 또한 Calmus 등 (1992)은 CDCA가 250 μ M에서도 10% 이하의 낮은 세포독성을 나타낸다고 보고하였으며,²⁶⁾ 본 연구에서도 100 μ g/ml의 고농도에서만 유의적인 억제 현상을 나타냈다. 그러나 특이할만한 것은 CDCA의 TNF- α 억제 작용은 glycine 및 taurine이 포함되면서 소실되어 LPS 단독 투여군(대조군) 수준으로 TNF- α 분비양이 회복되거나 T-CDCA에서는 오히려 25% 정도 유의적인 TNF- α 생성 증가작용을 나타냈다. 이와 같은 회복 효과는 이들 포함체들의 세포 생존율에 미치는 영향 (Fig. 4)에서도 보여주듯이, 직접적인 세포내 신호전달 과정의 억제 보다는 세포분열 촉진 등에 의한 관련성이 더 클 것으로 판단된다. 이와같은 현상은 UDCA에서도 확인할 수 있었는데, UDCA는 저농도(25 μ g/ml)에서 23% 정도로 유의적인 TNF- α 증가작용을 나타냈으며, T-UDCA의 경우에도 농도가 증가됨에 따라 통계적으로 유의성 있는 상승작용을 유도하여 100 μ g/ml 농도에서는 18% 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 담즙산의 포함유무 및 농도변화가 macrophage의 분열 촉진 혹은 억제와 이에따른 TNF- α 의 생성에 있어서 매우 다양한 형태로 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사하며, kupffer cell이 LPS의 자극에 대해 macrophage와 유사한 반응을 나타내는 것으로

볼 때¹⁸⁾ kupffer cell에서도 동일한 결과를 나타낼 것으로 판단된다. 따라서 본 결과는 간의 정상상태 혹은 질환과 관련되어 생체는 다른 조절방법과 더불어, 담즙산의 조성이나 각 담즙산의 농도 변화를 통한 관련 세포들의 분열을 조절하거나 이들로부터의 cytokine의 분비를 제어할 수 있다는 가능성을 제시한다고 하겠다. 또한 이와같은 가능성은 Calmus 등(1992)이 보고한 CDCA와 UDCA의 interleukin-1 및 6의 분비억제 작용²⁶⁾과 여러 암세포들에 대한 담즙산의 apoptosis 유도 작용 등의 보고들에 의해서도 제시되었다.^{27), 28)}

한편 조 등(1996)은 흰쥐에서 담석용해제이면서 이 탐색인 UDCA의 연용 투여에 의한 담즙산 조성비 및 포함비율에 대한 변화를 보고한 바 있다.²⁹⁾ 이것은 담즙산 복용을 통해, 체내 담즙산의 농도나 포함비의 변화를 유도하여 그에 따라 각 담즙산의 다양한 생리작용 조절이 가능하다는 것을 시사한다고 하겠다.

이후 연구로는 silybin이나 담즙산들이 kupffer cell에 미치는 TNF- α 억제효과와 다른 활성작용 등에 관한 구체적인 연구가 추가되어야 하겠다.

결 론

결론적으로, hepatoprotective agent인 silymarin 및 silybin은 murine 및 human macrophage cell line인 RAW264.7 세포와 U937 세포로부터 LPS자극에 의해 유도된 TNF- α 의 생성을 유의적으로 억제하였으며, silybin의 경우 IC₅₀는 각각 RAW264.7 세포에서 140.3 μ M과, U937 세포에서 72.7 μ M이었다. 그러나 DDB에서는 억제 작용을 관찰할 수 없었다. 또한 담즙산의 경우, RAW264.7 세포로부터 분비되는 TNF- α 에 대한 CDCA의 유의적인 억제 작용(IC₅₀=72.7 μ M)은 포함체(G-CDCA 및 T-CDCA)로 전환되면서 억제 작용이 상실되었으며, 오히려 T-CDCA에서는 25% 정도로 증가작용을 나타냈다. 또한 이와같은 결과는 이들의 세포독성 결과와도 일치되었다. UDCA역시 유리형(free form)과 G-UDCA 및 T-UDCA가 서로 다른 양상으로 TNF- α 생성에 관련되는 것으로 나타났다.

문 헌

- Hewett, J. A. and Roth, R. A. : Hepatic and extrahepatic pathology of bacterial lipopolysac-

charides. *Pharmacol. Rev.* **45**, 381 (1993).

- Sekut, L. and Connolly, K. M. : Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. *Drug News Perspect.* **9**, 261 (1996).
- Reudenberg, M. A., Galanos, C. : Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-Galactosamine-treated mice. *Infect. Immun.* **59**, 2110 (1991).
- Tiegs, G., Wolter, M. and Wendel, A. : Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 627 (1989).
- Nagakawa, J., Hishinuma, I., Hirota, K., Miyamoto, K., Yamanaka, T., Yamatsu, I. and Katayama, K. : Protective effects of E3330, a novel quinone derivative, on galactosamine/tumor necrosis factor- α -induced hepatitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **229**, 63 (1992).
- Bamkey, P. E. and Cerra, F. B. : Hepatic dysfunction in shock and organ failure. In *pathophysiology of shock, sepsis and organ failure*, edited by Schlag, G. and Redl, H., Spring-Verlag, Berlin, pp. 948-960 (1993).
- Roy, A., Soni, G. R., Kolhapure, R. M., Banerjee, K. and Patki, P. S. : Induction of tumor necrosis factor alpha in experimental animals treated with hepatotoxicants. *Indian J. Exp. Biol.* **30**, 696 (1992).
- Hishinuma, I., Nakagawa, J., Hirota, K., Miyamoto k., Tsukidate, K., Yamanaka, T., katayama, K. and Yamatsu, I. : Involvement of tumor necrosis factor- α in development of hepatic injury in galactosamine-sensitized mice. *Hepatology* **12**, 1187 (1990).
- Vadas, M. A. and Gamble, J. R. : Regulation of the adhesion of neutrophils to endothelium. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1683 (1990).
- Salyer, J. L., Bohnsack, J. F., Knape, W. A., Shigeoka, A. O., Ashwood, E. R. and Hill, H. R. : Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha alteration of PMN adhesion and migration. *Am. J. Pathol.* **136**, 831 (1990).
- Bautista, A. P., Schuler, A., Spolarics, Z. and Spitzer, J. J. : Tumor necrosis factor-alpha stimu-

- lates superoxide generation by perfused rat liver and kupffer cells. *Am. J. Physiol.* **261**, G891 (1991).
- 12) Hewett, J. A. and Roth, R. A. : The coagulation system, but not circulating fibrinogen, contributes to liver injury from gram-negative bacterial endotoxin (LPS). *Toxicologist* **12**, 65 (1992).
 - 13) Yamaguchi, Y., Yamaguchi, K., Babb, J. L. and Gans, H. : *In vivo* quantitation of the rat liver's ability to eliminate endotoxin from portal vein blood. *J. Reticuloendothel. Soc.* **32**, 409 (1982).
 - 14) Stone, R. : Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* **264**, 365 (1994).
 - 15) Zentella, A., Manogue, K. and Cerami, A. : The role of cachectin/TNF-alpha and other cytokines in sepsis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **367**, 9 (1991).
 - 16) Beutler, P. B. : *Tumor necrosis factors*: The molecules and their emerging role in medicine. Raven press, New York (1992).
 - 17) Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C. J., Logan, G., Allen, J. I. : Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* **13**, 267 (1991).
 - 18) Peters, T., Karck, U. and Decker, K. : Interdependence of tumor necrosis factor, prostaglandin E₂ and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat kupffer cells. *Eur. J. Biochem.* **191**, 583 (1990).
 - 19) Galve-Roperh, I., Malpartida, J. M., Haro, A., Brachet, P. and Diaz-Laviada, I. : Regulation of nerve growth factor secretion and mRNA expression by bacterial lipopolysaccharide in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **49**, 569 (1997).
 - 20) Taffet, S. M., Singhel, K. J., Overholtzer, J. F. and Shurtleff, S. S. : Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cellular Immunol.* **120**, 291 (1989).
 - 21) Koch, H. P., Bachner, J. and Loffler, E. : Silymarin: Potent inhibitor of cyclic AMP phos-
 - phodiesterase. *Meth. Find. Expl. Clin. Pharmacol.* **7**, 409 (1985).
 - 22) Magliulo, E., Scevola, D. and Carosi, G. P. : Investigation on the actions of silybin on regenerating rat liver: Effects on Kupffer's cells. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **29**, 1024 (1979).
 - 23) Bildoli, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N. : Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 2405 (1977).
 - 24) Lastra, C. A. D. L., Martin, M. J. and Marhuenda, E. : Gastric anti-ulcer activity of silymarin, a lipoxygenase inhibitor, in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 929 (1992).
 - 25) Shin, I. C. and Koh, H. C. : Effects of biphenyldimethyl dicarboxylate (DDB) on the lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging enzyme activities in mercuric chloride-induced hepatotoxic rats. *J. App. Pharmacol.* **3**, 223 (1995).
 - 26) Calmus, Y., Guechot, J., Podevin, P., Bonnefis, M. T., Giboudeau, J. and Poupon, R. : Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology* **16**, 719 (1992).
 - 27) Baek, J. H., Kang, C. M., Chung, H. Y., Park, M. H. and Kim, K. W. : Increased expression of c-jun in the bile acid-induced apoptosis in mouse F9 teratocarcinoma stem cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 68 (1996).
 - 28) Baek, J. H., Kim, J. A., Kang, C. M., Lee, Y. S. and Kim, K. W. : Induction of apoptosis by bile acids in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **1**, 107 (1997).
 - 29) Cho, J. Y., Yeon, J. D., Nam, K. H., Kim, J. Y., Yoo, E. S., Yu, Y. H. and Park, M. H. : Compositional change of hepatic bile acid by multiple administration of DWP305, a combined preparation containing ursodeoxycholic acid and silymarin, in rats. *Yakhak Hoeji* **40**, 311 (1995).