

건강 열수추출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향

이영선¹ · 이금홍 · 김상찬² · 권영규³ · 신상우*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 성덕대학 전통건강자원개발과, 2: 대구한의대학교 한의과대학 방제학교실, 3: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실

Immunomodulatory Effects of Aqueous-extracted *Zingiberis rhizoma* on Methotrexate Induced Immune Suppression in Mouse Spleen Cell

Young Sun Lee¹, Geum Hong Lee, Sang Chan Kim², Young Kyu Kwon³, Sang Woo Shin*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
1: Department of Traditional Health Resource Development, College of Sung Duk,
2: Department of Prescription, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
3: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Zingiberis rhizoma(ZB) has been used to treat a various condition and disease in traditional oriental medicine. The present study was conducted to evaluate the immunomodulatory effect of aqueous-extracted ZB(ZBE) on methotrexate (MTX)-induced immune suppression in mouse spleen cells. In spleen cell proliferation assay, ZBE enhanced mitogenic activity in mouse spleen cells. In RT-PCR, ZBE induced IL-2, IFN γ and IL-6 cytokine gene expression in mouse spleen cells. In spite of MTX treatment, IL-2, IFN γ and IL-6 gene expressions sustained in MTX treated spleen cells. CD45R/B220, pan B marker was slightly increased in ZBE treated mouse spleen cells. IL-6, B cell tropical cytokine, production was induced by ZBE-treated mouse spleen cells and IL-6 production was sustained on MTX-ZBE co-cultured cells. ZBE administration enhanced survival of S-180 bearing mouse. These data indicate that ZBE has a protective effect of immune suppression caused by MTX, and ZBE may be enhance cellular and humoral function by regulate cytokine gene expression as well as the mitogenic effect on spleen cells.

Key words : *Zingiberis rhizoma*(ZB), immunomodulatory effects, mouse, methotrexate(MTX), IL-6, CD45R/B220+

서 론

최근 생체 면역을 조절 할 수 있는 생물반응조절물질(biological response modifier; BRM)에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 항암제와 같은 의약품의 부작용에 의한 생체면역변화를 조절하여 항암성을 유지시키거나 변화를 감소시킬 수 있는 BRM에 관한 관심이 증대되어 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다¹⁻⁵⁾.

Methotrexate(MTX)는 암의 성장을 억제하는 세포독성물질(細胞毒性物質)로 각종 암의 치료에 광범위하게 사용된다. MTX는 비타민인 엽산(葉酸)의 대사길항제(代謝拮抗劑)로 핵산의 합

성을 억제해 세포재생 및 증식을 막으며, 면역억제제로서 생체에 투여하면 DNA합성을 저해하고 세포독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소현상을 초래하는 것으로 알려져 있다^{1,6-8)}.

이러한 면역억제제에 의한 부작용 및 면역독성은 항암치료에 많은 장애를 초래 할 수 있으므로 이러한 항암제의 정상세포에서의 부작용과 면역독성을 최소화 할 수 있는 면역조절제 발굴의 필요성이 요구되고 있다.

건강(*Zingiberis rhizoma*)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하며 생강의 근경을 건조한 것이다. 생강은 특유의 매운맛과 향기로 오랫동안 전 세계적으로 향신료로 사용되고 있으며, 특히 많은 아시아국가에서는 겨울철 몸을 따뜻하게 하기위해 생강뿌리를 음식에 사용하고 있다. 한의학에서 건강은 식욕증진, 소화촉진 및 복통, 설사의 치료 및 살균의 효능이 있는 것으로 알려져 있

* 교신저자 : 신상우, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : swshin@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2250

· 접수 : 2006/05/24 · 수정 : 2006/07/10 · 채택 : 2006/08/07

다. 건강의 주요성분은 gingerol, zingerone, shogaol 과 parado 등이 알려져 있으며 최근 이들 성분의 항산화, 항암 및 면역증진 효과가 보고 되고 있다^{9,18)}. 생강의 주요 성분 중 하나인 gingerol 이 HL-60세포의 apoptosis에 관여함이 보고 되었으며, 류등¹⁹⁾ 은 생강 추출물이 마우스 비장세포 증식능과 복강대식세포에 의한 사이토카인 분비를 상승시킴으로서 면역기관의 주요기능을 증진시킬 수 있음을 보고하였다. 그러나 이러한 면역조절기능이 암 성장을 억제하기 위하여 광범위하게 사용되고 있는 MTX에 의해 유도된 면역억제를 조절 할 수 있는 능력이 있는지에 관해서는 아직 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 건강의 열수추출액을 이용하여 정상 마우스와 MTX 처리에 의한 면역작용의 변화에 미치는 영향을 살펴보기위해 in vitro 및 in vivo 실험을 통하여 건강열수추출액 단독 또는 MTX를 병용 처리하여 비장세포 증식능, 사이토카인 발현능, 세포표현형 변화 및 S-180 복수암에 의한 마우스 생존율을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 검액 준비

건강의 열수추출액(ZBE)은 건강 14.6 kg을 정제수 7.5 L를 가하여 약탕기에서 2시간 30분 가열하여 추출한 후 다시 5L의 정제수를 가하여 2시간 30분 가열하여 추출하였다. 이를 여과 후 진공감압 농축하였다. 농축된 건강 추출액을 동결건조 하여 얻은 건강열수 추출물의 수득율은 6.7%였으며 실험에 사용할 때까지 냉동보관 하였다.

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 50±5%를 유지하였다.

3. 비장세포 분리 및 비장세포 증식능 실험

에테르 마취 후 심장에서 혈액을 채취 후 70% 알코올로 분무한 후 무균적으로 비장을 적출 하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장세포로 만든 후 4℃ HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A) 용액으로 2회 세척하였다. ACK lysis 용액을 가하여 적혈구를 완전히 용혈시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) 배지로 2회 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4% trypan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 생세포 수를 측정하여 사용하였다.

마우스 비장세포를 5×10⁵/100μl 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100μl가 되게 조정하

여 37℃, 5% CO² 배양기에 넣어 24시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96@ AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다.

4. RNA 분리 및 RT-PCR

RNA 분리는 TRIzol를 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 2회 세척 후 TRIzol 900μl를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100μl를 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4℃, 12,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5×RT buffer 2μl, 10mM dATP 0.25μl, 10mM dGTP 0.25μl, 10mM dTTP 0.25μl, 10mM dCTP 0.25μl, MMLV reverse transcriptase (200U/μl) 0.25μl, RNase inhibitor (28U/μl) 0.25μl, 50μM oligo dT primer 0.5μl, DEPC-DW 4μl를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (AB GeneAmp® PCR System 2700)에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10×PCR buffer 3μl, 25mM MgCl₂ 1.8μl, 10mM dATP 0.3μl, 10mM dGTP 0.3μl, 10mM dTTP 0.3μl, 10mM dCTP 0.3μl, 50μM sense 및 antisense primer 0.25μl, Taq polymerase (5U/μl, Promega) 0.25μl를 혼합하고, 여기에 DW를 넣어 최종 용량이 20μl되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 2.5μl를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94℃에 3분간 1cycle 반응 후, 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초간 35cycles 반응시켰으며, 72℃에서 10min extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아 (충북 청원, 한국) 사에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 1과 같다

Table 1. Primer sequences used for detection of cytokine and inflammatory related gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-2	5'-GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' 5'-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IL-6	5'-CTC GTG ACA ACC ACG GGC TTC CCT A-3' 5'-ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T-3'
IFN γ	5'-CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3' 5'-GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'

5. Flow cytometry analysis

각 실험군의 비장세포의 B 세포 표현형을 조사하기 위하여

건강 열수추출액 단독 및 MTX 병용 처리하여 마우스 비장세포를 48시간 배양한 후 배양된 비장세포에 phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220+mAb(BD Pharmingen) 제조회사의 설명에 따라 염색한 후 FACScan을 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

6. S-180 복수암 유발 마우스의 생존율

건강추출액의 면역증강 효과를 조사하기위해 마우스의 실험군을 건강 추출액(2mg/kg p.o) 투여군 과 PBS 투여군의 2군으로 나누어 각 군당 8마리씩 배치하였다. S-180종양세포를 복강투여하기 전 3주간 한약추출액을 경구투여한 후 S-180종양세포를 1×10⁶개/100 μl의 농도로 조정하여 복강에 투여 하였다. 종양세포 투여 후 건강 추출액 경구 투여군에는 이들 추출액을 음용수에 3%되게 희석하여 제공하였으며, 생리식염수 투여군에는 음용수를 제공하면서 복수암 진행에 따른 사망률을 관찰하였다.

7. 통계 처리법

모든 실험결과는 means±S.D.로 나타내었고, 각 실험군간의 측정치에 대한 자료분석은 각 군간 ANOVA와 Duncan's test에 의해 검정하였다.

결 과

1. 건강 열수추출액이 비장세포 증식능에 미치는 영향

건강열수추출액이 면역계에 미치는 영향을 조사하기위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰 하였다. 분리된 마우스 비장세포에 건강추출액을 다양한 농도(10, 100, 1000μg/ml)로 처리한 결과 세포증식능이 각각 0.56±0.01, 0.57± 0.01, 0.53±0.01로 LPS 처리군 0.76±0.03 보다는 낮았으나, 대조군 0.46± 0.01에 비해 건강추출액의 처리 시 비장세포 증식능이 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가가 관찰 되었다(Fig. 1).

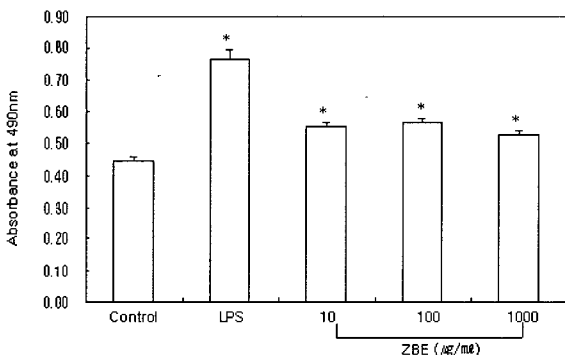


Fig. 1. Dose response of ZBE on the proliferation of mouse splenocytes. Mouse spleen cells(2×10⁶cells/ml) were cultured with several concentration(0,10,100μg/well) of ZBE for 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as mean ± S.D in triplicate cultures. * Significantly enganced, p<0.05 compared with control

2. MTX 처리 마우스 비장세포에서 IL-2, IFN γ , IL-6유전자 발현 및 단백질 생성에 미치는 영향

건강열수추출액의 세포성 면역과 체액성면역반응의 작용에 미치는 효과를 살펴보기위하여, 마우스비장세포에서 T세포와 B 세포 반응에 영향을 미치는 사이토카인인 IL-2, IFN γ 및 IL-6 유전자 발현에 미치는 영향을 조사 하였다. 건강 추출액 처리에 의해 마우스 비장세포에서 IL-2, IFN γ 및 IL-6유전자 발현이 유도 되었으며, 이러한 사이토카인의 유전자 발현은 MTX처리에도 불구하고 발현이 유지되었다(Fig. 2). 이들 사이토카인 유전자의 발현이 단백질 발현에 미치는 영향을 ELISA로 측정 한 결과 IL-6 단백질 생성이 MTX처리에도 불구하고 유지됨이 관찰 되었다 (Fig. 3).

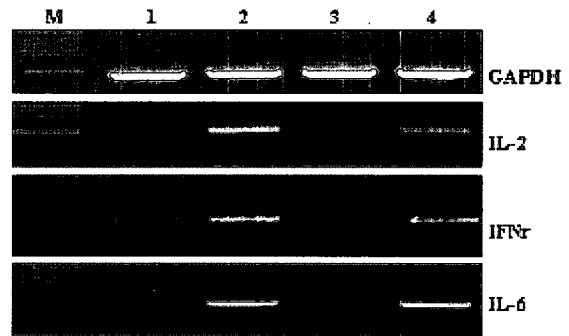


Fig. 2. Effect of ZBE expression of cytokine mRNA in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells(5×10⁶/ml) were incubated with MTX only or with ZBE for 24hrs. After stimulation, total RNA was isolated from cultured cells using TRIzol and RT-PCR performed. GAPDH was used control genes. M:100bps size marker, 1. control; 2. ZBE(100μg/ml); 3. MTX(1600μg/ml); 4. MTX+ZBE

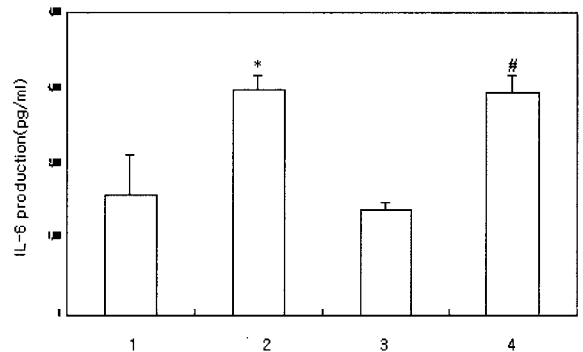


Fig. 3. Effect of ZBE on the production of IL-6 in mouse spleen cells. Mouse spleen cells (5×10⁶/ml) were incubated with MTX only or with ZBE for 24hrs. After stimulation, culture supernatant were collected. The production of IL-6 detected using IL-6 ELISA Kit. 1. control; 2. ZBE(1000μg/ml); 3. MTX(1600μg/ml); 4. MTX(1600μg/ml)+ZBE(1000μg/ml). * Sogmofocamtu emganced. p<0.05 compared with control, # Significantly enhanced, P<0.05 compared with MTX

3. 건강 열수추출액 경구 투여에 의한 MTX처리 마우스 비장세포에서 세포표현형의 변화

건강열수추출액을 2주간 경구투여한 후 MTX를 경구투여하고 다시 2주간 건강추출액을 경구투여한 후 마우스 비장세포를 적출하여 B세포 표현형의 변화를 FACs를 이용하여 관찰 한 결과, 건강 단독 투여군에서 CD45R/B220+발현이 대조군에 비해 증가됨이 관찰 되었다. MTX 처리군에서 CD45R/B220+발현이

대조군에 비해 억제됨이 관찰 되었으며 건강추출액과 MTX 병용 투여군에서는 MTX 단독 투여군에 비해 CD45R/B220+발현의 증가가 관찰 되었으나 통계적 유의성은 관찰 할 수 없었다(Fig. 4).

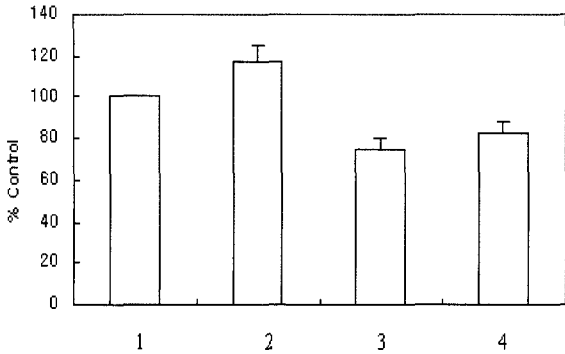


Fig. 4. Effect of ZBE administration on splenic levels of CD45R/B220⁺ cells in MTX-treated mouse. Splenocytes(2×10⁶cells/ml) were washed with PBS containing 0.1% BSA before analysis. To assess the cells were incubated with PE-labeled anti-mouse CD45R/B220+ antibody. Flow cytometric analysis was performed was FACScon cytometer. The results are presented as the percentage of values from the control mice. 1. control; 2. ZBE(1000µg/ml); 3.MTX(1600µg/ml); 4. MTX(1600µg/ml)+ZBE(1000µg/ml)

4. S-180 복수암 유발 마우스에서 건강 추출액 경구투여에 의한 생존율 변화

건강열수추출액이 S-180 복수암 유발 마우스의 생존에 미치는 영향을 관찰 한 결과 건강 추출액 경구 투여군이 대조군인 생리식염수투여군에서 비해 생존일수가 연장됨이 관찰되었다 (Table 2).

Table 2. Survival time by ZBE administration in S-180 bearing mouse

Day	No. of surviving mice/group									
	0	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Control (saline)	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8
ZBE (2mg/kg)	8/8	1/8	8/8	8/8	8/8	5/8	3/8	3/8	3/8	0/8

고찰

새로운 면역조절제의 탐색은 지난 수년간 많은 천연물을 대상으로 계속되어오고 있다. 전통적으로 한의학에서 사용되는 많은 약재들은 숙주방어체계를 강하게 하는 자양, 강장의 효과가 있음이 보고를 통해 증명되고 있다^{4,6)}. 건강은 생강의 뿌리를 건조한 것으로 한의학에서는 전통적으로 온중축한(溫中蘊寒), 회양통맥(回陽通脈), 치심복냉통(治心腹冷痛)에 효능이 있어 토사(吐瀉), 지냉맥미(肢冷脈微), 한음천해(寒飲喘咳), 풍한습비(風寒濕痺), 양허토혈(陽虛吐血), 하혈(下血)에 사용되었으며 건위제, 구토, 복통, 요통, 설사 등의 치료 및 살균제, 식욕증진과 소화 촉진에 사용되었다²⁰⁾. 최근 건강의 항산화, 항균, 고지혈 예방 및 항암효과에 관한 보고들이 있다. 건강의 주요성분은 gingerol, zingerone, shogaol 과 paradol로 알려져 있으며, 이들 성분에만

한 항산화 항암효과에 관한 연구가 보고 되었다^{9,13)}. 또한 건강이 인체말초혈액단핵구에서 사이토카인의 발현을 유도함이 보고 되었다^{10,18)}. 그러나 보고 된 연구 중 면역억제제로 항암제로 주로 광범히 하게 사용되고 있는 MTX에 의한 면역조절능의 변화에 관한 보고가 전무한 실정으로 이번 연구에서 건강의 열수 추출액의 마우스 비장세포를 이용한 in vitro 실험과 건강추출액의 마우스 경구투여를 통한 in vivo 실험을 통하여 조사 하였다.

임파구 증식능은 면역지표의 하나로 여러 자극에 의해 초래된 새로운 DNA 합성과 더불어 세포 분열의 결과로 나타나는 하나의 과정이라 할 수 있다¹⁹⁾. 건강추출액의 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰한 결과, 건강열수추출액 처리 시 비장세포 증식능을 촉진하여 면역반응을 증가 시킬 수 있는 mitogen으로써의 작용능력이 있는 물질이라 생각한다.

MTX는 Aminopterin의 유도체로 DNA 합성 억제제를 통한 면역억제제의 하나로 항암치료등에 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 MTX 사용에 따른 정상 면역계의 이상은 간경변증이나 중추신경계의 손상, 혈뇨증 및 태아에게 태반을 통하여 다발성 골격기형을 유발하는 것으로 알려져 있다^{1,6-8)}. 면역반응은 여러 면역세포의 상호작용과 관련이 있으며 이러한 면역세포는 사이토카인에 의해 조절됨으로 이러한 조절자의 생산과 분비의 조절은 면역반응에 매우 중요하고 생각된다. 따라서 MTX치리에 의한 면역반응의 변화를 사이토카인 발현의 변화를 통하여 살펴보는 것은 면역반응 조절능의 하나의 지표가 될 수 있다고 생각된다.

사이토카인은 세포활성 물질로 림프구의 활성화, 성장 및 분화 조절 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이중 IL-2는 T 림프구 증식인자로 알려져 있으며 INFr는 대식세포 활성화, T 및 B 림프구의 분화증진에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 IL-6은 B 림프구의 증식 및 분화증진의 기능이 있는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 건강 추출액의 MTX 처리에 의한 T세포와 B 세포작용에 미치는 효과를 관찰하기 위한 in vitro 실험으로 마우스 비장세포에 건강 추출액을 처리하여 T세포 분화증식에 관여하는 사이토카인인 IL-2와 INFr 사이토카인 유전자 발현과 B 세포 분화증식에 관여하는 사이토카인인 IL-6 유전자 발현을 관찰한 결과 이들 사이토카인의 발현이 건강 추출액의 처리에 의해 유도됨이 확인 되었다. 또한 이들 사이토카인의 유전자 발현은 MTX 처리군에서도 유지됨이 관찰 되었으며 이들 사이토카인 중 IL-6 단백질 생성이 MTX 처리에도 불구하고 유지됨이 관찰 되었다.

류등¹⁹⁾은 생강추출물이 마우스 복강대식세포에 IL-1β, IL-6 및 TNFα와 같은 사이토카인의 분비를 상승 시킬 수 있음을 보고 하였으며, 본 연구진은 황기추출액이 마우스 비장세포와 RAW 264.7대식세포에서 다양한 사이토카인 발현을 조절 하여 면역반응을 조절 할 수 있음을 보고하였다. 또한 황기추출액의 MTX치리에 의한 연증관련 사이토카인의 발현 및 RAW마우스 대식세포에서 MTX치리에 의한 다양한 연구를 통해 황기 추출액이 MTX의 처리에 의한 면역억제시 면역조절능이 있음을 보고하였다^{22,23)}.

건강열수추출액의 MTX 처리를 처리하여 의한 T세포와 B 세포작용에 미치는 효과를 관찰하기 위한 in vitro 실험으로 건강 열수추출액을 마우스에 경구투여한 후 MTX를 처리하여 T 및

B 세포표현형의 변화를 관찰 하였다. 건강열수추출액 단독 투여군에서 CD45R/B220+발현이 대조군에 비해 증가됨이 관찰 되었으며 건강열수추출액과 MTX 병용 투여군에서 MTX 단독 투여군에 비해 CD45R/B220+발현의 증가 경향이 관찰 되었다. 이러한 결과는 건강 열수추출액이 B세포 증식을 촉진하여 MTX에 의한 면역억제를 조절 하는데 기여하는 결과로 생각된다. 이러한 결과를 종합해보면 건강 추출액이 생체의 면역반응을 조절함과 동시에 MTX에 의해 억제된 면역세포의 기능을 향상 시키는 작용이 있음을 나타내 주는 결과라 하겠다.

건강 열수추출액의 면역조절 효과를 조사하기위해 건강 열수추출액을 마우스에 경구 투여한 후 S-180 복수암를 복강 주입하여 마우스 생존율을 조사한 결과, 건강 추출액 경구 투여군이 대조군인 생리식염수투여군에서에 비해 생존일수가 연장됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 건강 열수추출액이 복수암 유발 마우스에 복수암 진행을 연장시킬 수 있는 효과를 가지고 있음을 타내는 결과라 생각된다.

이러한 결과를 종합해보면 건강 열수추출액이 세포증식능, 사이토카인 유도능, 면역억제제 MTX 처리에 의한 조절능, S-180 복수암 세포의 진행억제를 통하여 생체 면역반응조절효과를 보여줌으로 중요한 면역조절제로의 효능을 가진다고 추정된다.

결 론

건강열수추출액이 MTX에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여 in vitro 및 in vivo 실험을 통하여 건강열수추출액 단독 및 MTX를 병용 처리하여 비장세포 증식능, 사이토카인 발현능, 세포표현형 변화, S-180 복수암 세포 주입에 의한 생존율을 관찰하였다. 건강 열수추출액은 비장세포 증식, IL-2, INF γ 및 IL-6 유전자 발현을 유도 하였다. 이들 사이토카인의 유전자 발현은 MTX 처리군에서도 유지되었으며 이중 IL-6의 단백질 생성은 MTX 처리에도 불구하고 유지되었다. 건강 열수추출액과 MTX 병용 투여군에서 MTX 단독 투여군에 비해 CD45R/B220+발현의 증가 경향이 관찰 되었으며, S-180 복수암를 복강 주입하였을 때 건강 추출액 경구 투여군이 대조군인 생리식염수투여군에서에 비해 생존일수가 연장되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 건강 열수추출액은 마우스 비장세포에서 세포증식능과 사이토카인 유도능이 있으며 특히 MTX에 의해 유도된 면역억제를 조절 할 수 있는 면역조절제로 제공 될 수 있음을 나타낸다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발산업의 지원 (02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Artym, J., Zimecki, M., Kruzel, M.L. Effect of lactoferrin on

the methotrexate-induced suppression of the cellular and humoral immune response in mice. *Anticancer Res* 24(6):3831-3836, 2004.

2. Artym, J., Zimecki, M., Paprocka, M., Kruzel, M.L. Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromise mice. *Immunol Lett* 9, 89(1):9-15, 2003.

3. Mitsugi, K., Nakamura, T., Kashiwabara, N., Ariyama, H., Tanaka, R., Baba, E., Nakamura, M., Harada, M., Nakano, B. Protection against methotrexate toxicity by a soybean protein- and omega-3 fatty acid-containing diet: comparative study with a casein-containing diet. *Oncol Rep* 12(1):41-45, 2004.

4. 표명윤, 현수미, 양기숙. 상항버섯 추출물이 정상 마우스와 Cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. *한국의용약물학회* 9(3):194-200, 2001.

5. 김진, 류혜숙, 신정희, 김현숙. 어삼초 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향. *한국식품영양과학회* 34(2):167-175, 2005.

6. 박진웅, 고희균, 김창환. 농도차에 따른 황기수침이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. *대한침구학회* 11(1):67-81, 1994.

7. Bogyo, D., Ehrke, M.J., Mihich, E. Reversal by citrovorum factor of methotrexate-induced suppression of cell-mediated and humoral immune response in mouse model systems. *Biochem Pharmacol* 1;31(7):1387-1392, 1982.

8. Kroger, H., Hauschild, A., Ohde, M., Bache, K., Voigt, W.P., Thefeldt, W., Kruger, D. Nicotinamide and methionine reduce the liver toxic effect of methotrexate. *Gen Pharmacol* 33(2):203-206, 1999.

9. 백숙은, 이상규. Crude Gingerol의 항산화 효과-1. 생강 Gingerol의 열안정성 및 대두유에 대한 농도에 따른 항산화 효과. *한국조리과학회* 9(1):33-36, 1993.

10. 최영진, 백숙은. 생강추출물(Crude Gingerol)의 항산화 효과.

11. 이진영, 안명수. 생강추출물의 열처리에 따른 항산화성 변화. *한국조리과학회* 10(1):63-64, 1994.

12. 조길석. LC/MS에 의한 원료생강 및 생강 페이스트 중의 Gingerol 화합물 분석. *한국식품영양과학회* 29(5):747-751, 2000.

13. 양원경, 정춘식, 정기화, 김재완, 이은방. 생강추출물의 항위염, 항궤양 작용. *약학회지* 36(2):173-179, 1992.

14. 김송전. 생강의 성분이 흰쥐의 혈청성분에 미치는 영향. *한국식품영양학회* 12:127-140, 1995.

15. Kwang-Kyun Park, Kyung-Soo Chun, Jong-Min Lee, Sang-Sup Lee, Young-Joon Surh. Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer letters* 129:139-144, 1998.

16. Eunyong Lee, Young-Joon Surh. Induction of apoptosis in

- HL-60 cells by pungent vanilloids,[6]-gingerol and [6]-paradol. *Cancer letters* 134:163-168, 1998.
17. Katsunari Ippoushi, Keiko Azuma, Hidekazu Ito, Hideki Horie, Hisao Higashio. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Science* 73:3427-3437, 2003.
 18. Wang, C.C., Chen, L.G., Lee, L.T., Yang, L.L. Effects of 6-gingerol, and antioxidant from ginger on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *In Vivo* 17(6):641-645, 2003.
 19. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. *한국영양학회지* 37(1):23-30, 2004.
 20. 김호경, 김영아, 황성원, 고병섭. 수치에 따른 건강증의 6-Gingerol 함량 분석. *생약학회지*, 33(4):291-295, 2002.
 21. 면역학, 서울대학교 의과대학, 대한민국, 서울대학교 의과대학 출판부, pp 121-134, 1997.
 22. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Seong Il Suh, Sang Woo Shin, Chae Ha Yang, Tae Won Jeon, Eun Sil Lee, Kwang Joong Kim, Seong Ho Kim, Wang Keun Yoo, Hyo Jung Kim. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *Journal of Ethnopharmacology* 84:193-198, 2003.
 23. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Tae Won Jeon, Wang Keun Yoo, Seong Ho Kim, Hyo Jung Kim: Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 100:289-294, 2005.