건강 열수추출액이 Cyclophosphamide에 의해 유도된 면역억제조절에 미치는 영향

이영선[1] · 이금홍 · 권영규[2] · 박종현 · 신상우*

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

Immunomodulatory Effect of Aqueous Extracted *Zingiberis* Rhizoma on Cyclophosphamide - Induced Immune Suppression

Young Sun Lee[1], Geum Hong Lee, Young Kyu Kwon[2], Jong Hyun Park, Sang Woo Shin*

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

Zingiberis rhizoma(ZB) has been used to treat a various condition and disease in many traditional preparation. The present study was conducted to investigate the immunomodulatory effect on cyclophosphamide(CY)-induced immunotoxicity of aqueous-extracted ZB(ZBE) using *in vitro* and *in vivo* experiment. *In vitro* experiment, the mouse spleen cells proliferation and nitric oxide(NO) production in RAW 264.7 mouse macrophage cells were investigated. ZBE enhanced mitogenic activity in mouse spleen cells. The suppression of CY-induced mouse speen cell proliferation was significantly restored by ZBE treatment. ZBE inhibited NO production, iNOS mRNA and protein levels in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *In vivo* experiment, ZBE was orally administrated(single dose of 150mg/kg for 14 days) and CY i.p(150mg/kg) injected to SD rats. In CY alone injected group, body weights and spleen weights, and a various hematological parameters were reduced when compared with control group, whereas those values were increased by concomitant treatment of CY and ZBE when compared with CY alone injected group. These results indicated that ZBE can modulate CY-induced immune suppression through immune cell proliferation, the regulation of NO production and the inhibition of CY-induced immunotoxicity.

Key words : *Zingiberis* rhizoma(ZB), immunomodulatory effect, cyclophosphamide, NO, iNOS

서 론

면역이란 외부의 침입을 효율적으로 막기 위한 생체반응을 유도하여 생체의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 작용으로 볼 수 있다[1]. 최근 항암치료에 사용되는 여러 의약품에 의해 유발되는 생체면역 기능의 변화를 경감 시킬 수 있는 생리활성물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다[2-11].

Cyclophosphamide(CY)는 항암제나 면역억제제로 가장 일반적으로 사용되는 알킬화제 약물중 하나로 만성, 급성 백혈병, 류마티스 관절염, 림프종, 다발성 골수종과 골수 이식을 위한 전처리를 위해 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 CY는 비선택적 독성으로 정상세포에도 독성을 나타내며 골수부전을 일으켜 혈소판 감소증 과 더불어 빈혈증상을 악화 시키고 이러한 빈혈 증상은 신체 발육부진 면역기능 저하 등의 생리적 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 비선택적 독성을 가진 면역억제제의 부작용이나 독성을 경감 시킬 수 있는 물질 개발의 중요성이 대두되면서 최근 이에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[5-11].

건강(*Zingiberis* rhizoma)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하며 생강의 뿌리를 건조한 것으로 한의학에서는 溫中逐寒, 回陽通脈, 治心腹冷痛에 효능이 있어 吐瀉, 肢冷脈微, 寒飮喘咳, 風寒濕痺, 陽虛吐血, 下血에 상용되고 있으며, 건위제, 구토, 복통, 요통, 설

* 교신저자 : 신상우, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : swshin@swshin.com, · Tel : 053-770-2250
· 접수 : 2007/01/15 · 채택 : 2007/03/14

사 등의 치료 및 살균제, 식욕증진 및 소화 촉진에 사용되었다[12-15]. 최근 건강의 항산화, 항균, 고지혈 예방 및 항암효과 등이 보고되고 있으며, 건강의 주요성분으로 알려진 gingerol, zingerone, shogaol 과 paradol등의 성분에 관한 항산화 및 항암효과에 관한 연구가 보고 되었다[12-18]. 최근 본 연구팀은 건강추출액(ZBE)이 면역억제제 중의 하나인 Methotrexate에 의해 유도된 면역억제를 조절 할 수 있음을 보고하였다[4]. 그러나 건강추출액의 연구결과 중 면역억제제로 항암제로 광범위하게 사용되고 있는 CY에 의해 초래되는 면역독성의 조절능에 관한 연구 보고가 전무한 실정으로 본 연구에서는 건강추출액을 이용하여 정상마우스와 CY 처리에 의한 건강추출액의 면역작용 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 건강추출액 단독 또는 CY 병용 처리하여 면역장기 무게 변화, 혈액학적변화, 비장세포증식능, 항산화 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 랫드를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 랫드에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주 이상 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2 ℃, 습도는 50±5 %를 유지하였다.

2. 검액 준비

ZBE는 건강 14.6 kg을 정제수 7.5 L를 가하여 약탕기에서 2시간 30분 가열하여 추출한 후 다시 5 L의 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.

3. 실험군 및 검액투여

생리식염수 경구투여군(Control), 건강추출물 경구투여군(ZBE), 생리식염수 경구투여군-CY 복강 투여군(CY), 건강추출액 투여군-CY 복강투여군(ZBE+CY)으로 나누고 각 그룹은 7마리로 하였다. 건강추출액과 생리식염수를 경구로 3주간 투여 한 후 CY 복강 투여군에는 CY를 150 mg/B.W를 1회 주사한 후 7일째 랫드를 희생하여 체중의 변화, 간, 비장, 콩팥의 무게변화 및 혈액을 채취하였다. 모든 실험동물에 사료와 물은 무제한으로 공급하며 실험에 사용하였다.

4. 혈액채취 및 분석

모든 실험군의 랫드를 CY 복강주사 7일 후 절식하여 혈액을 채취하였다. 랫드를 엔토발(Hanlim Pharm. CO., LTD, Korea)로 마취 후 복강대동맥으로부터 혈액을 채취해 EDTA가 처리된 튜브에 넣어 기기로 잘 섞어 준 후 백혈구(white blood cell, WBC), 적혈구(red blood cell, RBC), 혈색소(hemoglobin, Hgb), 적혈구 용적(hematocrit, Hct)를 SYSMEX XE-2100D(Japan) 기기를 사용하여 측정하였다.

5. 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 용혈 시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) 배지로 2회 세척한 후 10 % FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4 % tryphan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 생세포 수를 측정하여 사용하였다. 마우스 비장세포를 5×10^5/100 ㎕ 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100 ㎕가 되게 조정하여 37 ℃, 5 % CO_2 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 90 0㎕를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100 ㎕를 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 2 ㎕, 10 mM dATP 0.25 ㎕, 10 mM dGTP 0.25㎕, 10mM dTTP 0.25 ㎕, 10mM dCTP 0.25 ㎕, MMLV reverse transcriptase (200 U/㎕) 0.25㎕, RNase inhibitor (28 U/㎕) 0.25 ㎕, 50 μM oligo dT primer 0.5 ㎕, DEPC-DW 4 ㎕를 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 3 ㎕, 25 mM $MgCl_2$ 1.8 ㎕, 10 mM dATP 0.3 ㎕, 10 mM dGTP 0.3 ㎕, 10 mM dTTP 0.3 ㎕, 10 mM dCTP 0.3 ㎕, 50 mM sense 및 antisense primer 0.25 ㎕, Taq polymerase (5 U/㎕, Promega) 0.25 ㎕를 혼합하고, 여기에 DW를 넣어 최종 용량이 20 ㎕되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 2.5 ㎕를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94 ℃에 3분간 1cycle 반응 후, 94 ℃ 45초, 57 ℃ 45초, 72 ℃ 45초간 35 cycles 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'
iNOS	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

6. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 Nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess시약 (1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid + 1 % a-naphthylamide in H_2O) 100 ㎕를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO_2^- 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

7. Western blotting

RAW 264.7세포를 PBS로 3회 세척 후 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 10 ㎍/㎖ leupeptin, 2 mM PMSF, 2 ㎍/㎖ aprotinin 10 ㎍/㎖ Na_3VO_4, 10 ㎍/㎖ $Na_5P_2O_7$)로 균질화하고 세포 추출물을 얻어, SDS가 함유된 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동 후 nitrocellulose filter에 90 V에서 1 시간 동안 transfer하고, 3 % non-fat milk를 함유한 TBS로 blocking한 후 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG-HRP로 반응 후 0.05 % tween 20이 함유된 TBS로 세척한 후 ECL detection kit를 이용하여 X-ray film에 감광시켰다.

8. 통계 처리법

모든 실험결과는 means±S.D.로 나타내었고, 각 실험군간의 측정치에 대한 자료분석은 각 군간 ANOVA와 Duncan's test에 의해 검정하였다. $p<0.05$일때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 비장세포 증식능에 미치는 영향

ZBE의 비장세포 증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 마우스 비장 세포를 분리한 후 ZBE을 다양한 농도(100, 500, 1000, 1500, 2000㎍/㎖)로 처리 하여 비장세포 증식능을 살펴보았다. ZBE에 의한 비장세포증식능은 대조군에서 0.75±0.02이었으며 ZBE의 처리 농도에 따라 각각 0.93±0.01, 0.92±0.02, 0.97±0.01, 1.04±0.02, 1.14±0.03 로 ZBE의 처리 시 비장세포 증식능이 처리군 모두에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰 되었다(Fig. 1).

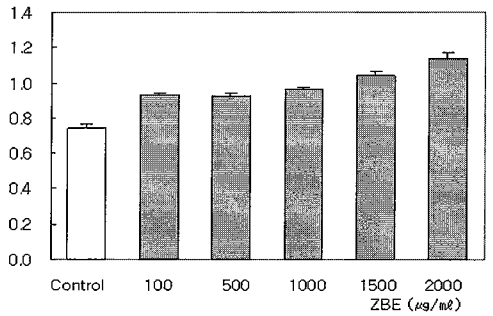

Fig. 1. Dose response of ZBE on the proliferation of mouse splenocytes. Mouse spleen cells(5×10^6cells/㎖) were cultured with several concentration(0, 100, 500, 1000, 1500, 2000 ㎍/well) of ZBE for 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as mean±S.D in triplicate cultures. * Significantly enhanced, $P<0.05$ compared with control

2. CY처리에 의한 비장세포 증식능

ZBE의 CY 처리에 의한 면역억제 보호효과를 관찰하기위해 CY처리에 의한 비장세포 증식능의 변화를 관찰하였다. CY 처리가 비장세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 비장세포에 CY를 1600 ㎍/㎖ 처리 시 비장세포증식능이 약 50 % 감소하였다 (data has not shown). CY(1600 ㎍/㎖)의 농도에 ZBE농도별(100, 500, 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖)로 처리하였을 때 CY 단독 처리군(0.46±0.03)에 비해 ZBE 처리 농도 의존적(0.72±0.01, 0.75±0.02, 0.80±0.01, 0.88±0.02, 0.93±0.04)으로 비장 세포 증식능의 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 2).

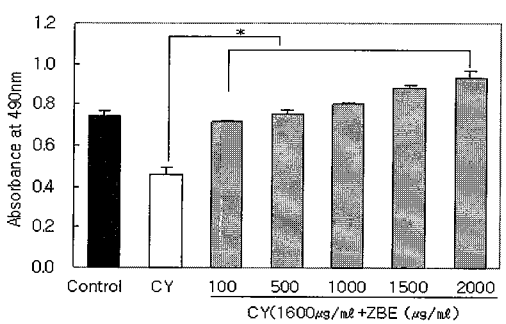

Fig. 2. Effect of ZBE on the proliferation of mouse spleen cells with or without cyclophosphamide *in vitro*. Mouse spleen cells(5×10^6cells/㎖) were cultured with several concentration(0, 100, 500, 1000, 1500, 2000㎍/well) of ZBE with or without CY for 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as mean±S.D in triplicate cultures. * Significantly enhanced, $P<0.05$ compared with CY.

3. NO 생성에 미치는 영향

ZBE의 대식세포 면역활성 유도능을 살펴보기 위해 NO 생성조절에 미치는 영향을 살펴본 결과, RAW 264.7 대식세포주에 LPS 처리에 의해 과다하게 유도된 NO의 생성이 ZBE 처리에 의해 농도 의존적으로 NO생성이 억제됨이 관찰되었다(Fig. 3).

NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현 및 단백질 발현의 관련성을 조사한 결과, LPS 자극에 의해 iNOS 유전자 발현 및 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, LPS와 ZBE을 동시에 처리 시 ZBE 농도 의존적으로 iNOS 유전자 발현 및 단

백질 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4, 5).

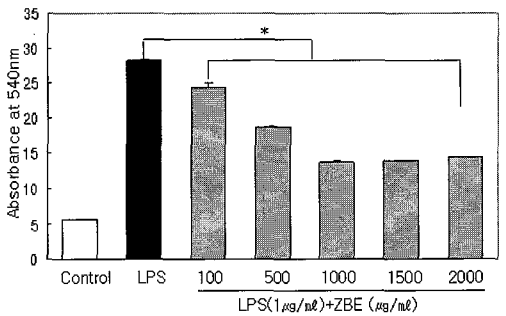

Fig. 3. Effect of ZBE on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without lipopolysaccharide (LPS; 1 ㎍/ml) for 24hr in the presence or absence of ZBE at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are the means±SD of three independent experiments. *significantly different from samples treated with LPS alone, (ANOVA, P<0.05).

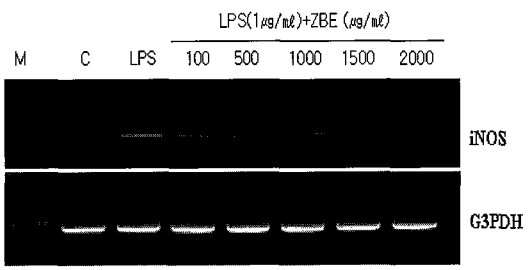

Fig. 4. Inhibitory effect of ZBE on iNOS mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1㎍/ml LPS in the presence or absence of various concentration of ZBE for 24h. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes.

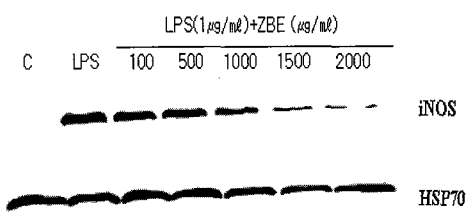

Fig. 5. Effects of ZBE on the expression of iNOS protein in LPS stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1㎍/ml LPS in the presence or absence of various concentration of ZB extract for 24h. The protein extracts were prepared, and then the samples analyzed for iNOS expression by Western blotting as described in the method. HSP70 was used as control protein.

4. 체중 및 장기 무게량의 변화

ZBE의 경구 투여에 의한 체중의 변화는 정상군 50.2±3.70에 비해 CY 단독 투여군에서 15.2±3.27로 유의한 감소가 관찰되었으며, ZBE의 투여 후 CY 처리군은 48.2±1.30으로 CY 단독 처리군에 비해 유의한 증가가 관찰 되었다. 각종 장기의 무게 변화를 살펴본 결과 CY 단독 처리군에서 비장의 무게 변화는 0.39±0.04로 정상군 0.69±0.08에 비해 유의한 감소가 관찰되었으나, ZBE을 경구투여 후 CY 처리군에서 비장 무게변화는 0.51±0.12로 CY단독 처리군에 비해 증가가 관찰되었다(Table 2).

Table 2. The body and organ weight in mice administrated ZBE and/or cyclophosphamide

Exp. Group (mg/kg)	Body	Spleen	Liver	Kidney
Control	50.2±3.70#	0.69±0.08#	2.62±0.09	10.07±0.38
ZBE	48.2±1.30#	0.77±0.01#	2.87±0.17*#	11.11±0.55
CY	15.2±3.27*	0.39±0.04*	2.47±0.03	10.38±1.09
CY+ZBE	43.0±12.9#	0.51±0.12*	2.62±0.05	10.80±0.55

ZBE was orally administrated once a day for 21 days in mice. Cyclophosphamide(CY) was i.p injected with dose 150 mg/kg. Mice were sacrified on day 7 following injection of CY. Results are the mean±S.D. of 5 mice. *Significant difference from control($p<0.05$), #Significant difference from CY($p<0.05$)

5. 혈액학적 parameter에 미치는 영향

ZBE의 경구 투여에 의한 혈액학적 parameter의 변화를 관찰한 결과, 정상군의 WBC의 수치는 8.61±0.66으로 CY 단독 처리한 군 0.43±0.22에 비해 유의한 감소가 관찰되었다. ZBE을 경구 투여 후 CY 처리군에서는 WBC 수치가 0.7±0.20으로 CY 단독 처리한 군에 비해 증가가 관찰되었다. RBC의 수치도 정상군 8.81±0.18에 비해 CY 단독 처리 군에서는 6.58±0.91로 유의한 감소가 관찰되었으며, ZBE 경구투여 후 CY를 처리한 군에서는 RBC 수치가 7.35±0.39로 CY 단독 처리군에 비해 증가가 관찰 되었다($P<0.05$). HGB와 HCT 수치는 17.1±0.45와 56.5±1.04 에 비해 CY 단독 처리한 군 12.7±1.88와 40.9±6.46으로 유의한 감소가 관찰되었다. ZBE 경구투여 후 CY처리 군에서는 HGB와 HCT 수치가 13.9±0.70 과 47.8±2.75로 CY단독 처리군에 비해 증가됨이 관찰 되었다. PLT 수치의 변화 역시 CY 처리군 192.4±80.4은 정상군 743.6±123.6으로 유의한 감소가 관찰 되었으며, CY 처리에 의한 감소는 ZBE을 경구 투여한 경우 618.8±156.3으로 CY 단독에 비해 증가됨이 관찰 되었다(Table 3).

Table 3. The variation in hematological parameter of mice administrated ZBE and/or cyclophosphamide

Hematological parameter	Control	ZBE	CY	CY+ZBE
WBC	8.61±0.66#	7.13±0.73#*	0.43±0.22*	0.7±0.20*
RBC	8.81±0.18#	8.43±0.29#	6.58±0.91*	7.35±0.39*
HGB	17.1±0.45#	17.3±1.15#	12.7±1.88*	13.9±0.70*
HCT	56.5±1.04#	56.0±2.76#	40.9±6.46*	47.8±2.95*
PLT	778.2±123.6#	652.4±94.8#	192.4±80.0*	618.8±156.3*#

ZBE was orally administrated once a day for 21 days in mice. Cyclophosphamide(CY) was i.p injected with dose 150 mg/kg. Mice were sacrified on day 7 following injection of CY. Results are the mean±S.D. of 5 mice. WBC (white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(haemoglobin), HCT(hematocrit), PLT(platelet). *Significant difference from control($p<0.05$), #Significant difference from CY($p<0.05$)

고 찰

免疫反應은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 이러한 반응의 적절한 조절은 疾病의 예방과 더불어 치료에 있어서도 중요하다. 최근 기존 알려진 면역조절제의 독성에 따른 낮은 활용도로 인하여 기존 면역조절제의 독성을 감소시키거나 조절 할 수 있는 재료 및 성분을 천연물에서 찾고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다[2-11].

乾薑은 생강의 뿌리를 건조한 것으로 향미료나 약용으로 사용되어오고 있으며, 한의학에서 乾薑은 약성이 맵고 따뜻하여 진토제, 구토제, 건위제, 복통 및 소화 불량에 상용되고 있다[14]. 乾

薑에 관한 연구보고는 생강 추출물이 위염, 위궤양에 효과적임이 보고 되었고, 생강의 매운맛 성분인 gingerol의 항산화, 항염증, 항암효과등이 보고 되었다[12-17]. 또한 최근 류 등[18]의 보고에 의하면 생강 추출물이 마우스 면역세포를 활성화하여 면역기능을 항진 시킬 수 있다고 보고되었다. 이러한 생강에 관한 연구를 바탕으로 생강의 根莖을 말려 주로 한방처방에 사용되는 건강의 면역조절 등에 관한 효능과 기전을 연구함으로써 면역기능의 항진과 조절에 건강 사용의 과학적 근거를 제공하고자 하였다. 본 연구에서 ZBE의 면역조절 효과를 살펴보기 위하여 비장세포 증식능 및 항산화효과와 랫드를 이용한 CY의 투여에 의한 면역억제 시 ZBE이 생체면역반응과 관련된 면역 장기의 무게 변화에 어떠한 영향을 미치는 지에 관하여 조사하였다.

임파구 증식능은 각종 항원이나 mitogen, cytokine 등 여러 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA합성과 더불어 세포분열의 결과로 새로운 면역조절제를 탐색하는 방법으로 광범위하게 사용되어지고 있다[3,4,18]. 본 연구에서 ZBE이 비장세포 증식에 미치는 효과를 조사해본 결과 *in vitro* 실험에서 비장세포의 증식능이 ZBE에 대하여 농도 의존적으로 증가되었다. 이는 ZBE이 직접 mitogen으로 작용될 수 있는 있음을 간접적으로 보여주는 결과라 할 수 있다. CY처리에 의해 억제된 비장세포증식능은 ZBE을 동시에 처리하였을 경우 비장세포증식능의 억제가 농도 의존 적으로 증가됨이 관찰 되었는데 이는 화학요법제의 처리에 의한 부작용 중의 하나인 면역세포에 대한 독성을 감소시킬 수 있는 결과로 생각된다.

NO는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로 저 농도에서 신경전달 물질 등과 같은 작용을 하나 NO가 과도하게 생성 시 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다[19,20]. 대식세포에서 NO는 여러 가지 요인에 의해 조절되는데 최근 여러 보고에 다르면 활성화된 대식세포의 NO조절이 iNOS 유전자 발현에 의한 것으로 보고 되고 있으며, 최근 많은 연구에서 iNOS 유전자의 조절을 통한 NO 생성 조절제를 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[21,22]. 본 연구팀은 향부자 추출물, 당귀작약산등이 LPS 자극에 의해 유도된 NO 생성을 감소시켰으며 이러한 NO 생성감소가 iNOS유전자 발현 감소에 의한 결과임을 보고하였다[23,24]. 본 연구에서는 ZBE의 RAW 264.7세포주에서 NO 생성, iNOS 유전자 발현 및 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, LPS에 의해 과도하게 증가된 NO 생성, iNOS 유전자 발현 및 단백질 발현이 ZBE의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. 이러한 결과는 ZBE의 NO 생성 조절에 iNOS 유전자 발현 및 단백질이 관여하고 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

면역계의 이상을 간접적으로 확인하기 위한 지표 중 하나인 체중 및 면역 장기의 무게 변화는 여러 면역반응조절제의 탐색을 위한 방법으로 사용되고 있으며, 특히 화학요법제로 인한 체중감소는 식욕부진과 함께 영양상태도 악화시키는 것으로 보고되고 있다[10,25]. 따라서 화학요법제 사용 시 초래되는 체중 및 장기무게 변화는 면역조절제의 탐색을 위한 실험적 방법으로 사용되고 있다. 본 연구 결과 ZBE의 투여 후 CY 처리군은 CY 단독처리군에 비해 체중 및 비장의 무게감소가 적게 관찰되었다. 이는 ZBE의 투여가 CY투여에 의해 유도된 체중의 감소 및 비장의 무게 감소를 줄일 수 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다. ZBE의 경구 투여에 의한 혈액학적 parameter의 변화는 CY 단독 처리한 군에 비해 ZBE을 경구 투여 한 후 CY 처리한 경우 WBC, RBC, HGB, HCT 및 PLT 수치의 변화를 감소시켰다. 이는 ZBE가 CY처리에 의해 유도된 혈액학적 변화를 감소시켜 조혈작용의 기능 항진에 영향을 주어 체중 및 면역장기의 무게 변화를 감소시키는 긍정적 영향을 미친 결과로 생각된다.

이상의 연구 결과로 볼 때 ZBE는 임파구세포와 대식세포의 활성화를 통해 면역반응을 유도 할 수 있으며, 특히 in vivo 실험의 결과 CY투여에 의한 랫드 체중, 비장 무게변화 및 혈액학적 변화를 감소하여 CY에 의해 초래된 독성효과를 억제 시킬 수 있음을 나타내었다.

결 론

ZBE의 정상마우스와 CY 처리에 의한 면역작용의 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 ZBE 단독 또는 CY 병용 처리하여 비장세포증식능, 항산화 효과, 면역장기 무게 변화, 혈액학적변화를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

ZBE이 비장세포 증식능에 미치는 영향 결과, 비장세포 증식능이 ZBE 처리 농도 의존적으로 유의한 증가가 관찰 되었으며, CY 처리에 의해 감소된 비장세포 증식능이 ZBE을 동시에 처리 시 ZBE 농도 의존적으로 비장 세포 증식능의 증가가 관찰되었다. ZBE은 LPS 자극에 의해 대식세포에서 과다하게 생성된 NO의 양을 감소시킬 수 있음이 관찰되었으며, 이러한 NO 생성 억제 기작에 iNOS mRNA 유전자 발현 및 단백질 발현이 관련되어 있음이 관찰되었다. ZBE의 경구 투여에 의한 체중 및 비장의 무게의 변화는 CY 단독 투여군 비해 ZBE를 경구 투여한 후 CY 처리군 에서 유의한 증가가 관찰 되었다. ZBE의 경구 투여에 의한 혈액학적 parameter의 변화를 관찰한 결과, WBC, RBC, HGB, HCT 및 PLT 수치의 변화는 CY 단독 투여군 비해 ZBE의 경구투여 후 CY 처리군 에서 증가가 관찰 되었다.

본 연구 결과 ZBE은 CY 투여에 의한 랫드 체중과 비장의 무게변화를 감소시켰으며, CY 처리에 의한 혈액학적 변화를 감소시켰다. In vitro실험에서 ZBE은 비장세포 증식능을 농도 의존적으로 증가 시켰으며, CY 에 의해 초래된 비장세포 증식의 감소를 억제 시켰다. 이상의 결과로 볼 때 ZBE은 CY에 의해 초래된 독성효과를 감소시킬 수 있으며, 비장세포와 대식세포의 면역기능을 항진시켜 질병의 예방과 치료에 면역조절제로 특히 화학요법제에 의해 초래되는 면역독성을 억제 시킬 수 있는 조절제로서 개발 가능성을 제시해 줄 수 있다고 생각된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 면역학, 서울대학교 의과대학 출판부, 대한민국, 서울대학교 의과대학, pp 121-134, 1997.
2. 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):3831-3886, 2004.
3. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Suh, S.I., Shin, S.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Lee, E.S., Kim, K.J., Kim, S.H., Yoo, W.K., Kim, H.J. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J. Ethno 84: 193-198, 2003.
4. 이영선, 권영규, 이금홍, 신상우. 건강열수출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 2006.
5. Senthikumar, S., Devaki, T., Manohar, B.M., Babu, M.S. Effect of squalene on cyclophophamide-induced toxicity. Clin Chim Acta 364: 335-342, 2005.
6. Artym, J., Zimecki, M., Paprocka, M., Kruzel, M.L. Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice. Immunology Letters 89: 9-15, 2003.
7. Artym, J., Zimecki, M., Kruzel, M. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. Med Sci Monit 10(3):BR84-89, 2004.
8. 표명윤, 현수미, 양기숙. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 양향. 응용약물학회지 9: 194-200, 2001.
9. 강순아, 장기효, 이지은, 안덕균, 박성규. 한국 중국 일본 당귀가 cyclophosphamide로 유발된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향의 차이. 한국식품과학회지 35(6):1204-1208, 2003.
10. 한진아, 장기효, 강순아, 조여원. Cyclophosphamide로 유도된 빈혈흰쥐에서 참당귀 열수추출물이 혈액학적 빈혈지표에 미치는 영향. 한국영양학회지 36(10):1013-1021, 2003.
11. 마진열, 하창수, 성현제, 지옥표. Cyclophosphamide로 Rat에 유도된 악성빈혈에 대한 숙지황의 증수에 따른 치료효능에 관한 연구. 생약학회지 32(3):325-334, 2005.
12. 백숙은, 우상규. Crude Gingerol의 항산화 효과-1 생강 Gingerol의 열안정성 및 대두유에 대한 농도에 따른 항산화 효과. 한국조리과학회, 9(1):33-36, 1993.
13. 이진영, 안명수. 생강추출물의 열처리에 따른 항산화성 변화. 한국조리과학회, 10(1):63-64, 1994.
14. 양원경, 정춘식, 정기화, 김재완, 이은방. 생강추출물의 항위염, 항궤양 작용. 약학회지 36(2):173-179, 1992.
15. 김송전. 생강의 성분이 흰쥐의 혈청성분에 미치는 영향. 한국식품양양학회, 12: 127-140, 1995.
16. Park, K.K., Chun, K.S., Lee, J.M., Lee, S.S., Surh, Y.J. 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. Lee, E.Y., Surh, Y.J. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids,[6]-gingerol and [6]-paradol. Cancer letters 134: 163-168, 1998.
17. 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.
18. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.
19. MacMicking, J., Xie, Q.W., nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev immunol 15: 323-350, 1997.
20. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 357(pt 3):593-615, 2001.
21. 노대철, 최희철, 이승용, 김영호, 노문철, 김영국, 이현선. 호장근의 쿠마린에 의한 Raw264.7 세포주의 nitric oxide 생성 저해 활성. 생약학회지 31(3):181-188, 2001.
22. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Jeon, T.W., Yoo, W.K. Kim, S.H., Kim, H.J. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. J Ethno 100: 289-294, 2005.
23. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출액의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):771-776, 2003.
24. 신상우, 이영선, 박종현, 권택규, 서성일, 권영규. 당귀작약산이 마우스 대식세포주의 NO 생성 및 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 18(5):1443-1448, 2004.
25. Yhang, Y.H., Lee, D.S. The relationship of anorexia, nausea, vomiting and oral intake and identify the influence these side effects on the nutritional status in patients receivibg chemotherapy. Kor J Nursing 30(3):720-730, 2000.