

베타카로틴의 면역생물학적 연구

안영근[#] · 구자돈 · 김정훈 · 김봉희* · 조필형** · 구교임***
원광대학교 약학대학, *충남대학교 약학대학, **한풍제약, ***한양대학교 식품영양학과
(Received July 8, 1992)

Immunobiological Studies on Beta-Carotene

Young Keun Ahn[#], Ja Don Koo, Joung Hoon Kim, Bong Hee Kim*,
Phil Hyoung Cho** and Kyo Im Koo***

College of Pharmacy, Won Kwang University, Iri 570-749, Korea

*College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

**Hanpoong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul 137-060, Korea

***Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract—Effects of beta-carotene on the immunobiological responses were studied in ICR mice. ICR male mice were divided into 8 groups (10 mice/group), and beta-carotene at doses of 4, 20 and 100 mg/kg were orally administered to ICR mice once daily for 28 consecutive days. Cyclophosphamide (CY) was injected intraperitoneally (*i.p.*) to ICR mice with a single dose of 5 mg/kg body weight at 2 days before secondary immunization. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells (S-RBC). Immune responses were evaluated by humoral immunity, cellular immunity and non-specific immunity. The results of this study were summarized as follows; (1) Beta-carotene significantly increased the weight ratios of liver, spleen and thymus to body weight depending on dose, and significantly increased the increasing rate of body weight and the number of circulating leukocyte. (2) Beta-carotene dose-dependently increased hemagglutination titer, Arthus reaction and hemolytic plaque forming cell related to humoral immunity. (3) Beta-carotene significantly increased delayed-type hypersensitivity reaction and rosette forming cell related to cellular immunity. (4) Beta-carotene dose-dependently increased phagocytic activity, and significantly increased natural killer (NK) cell activity. (5) Beta-carotene dose-dependently inhibited reductions in humoral immunity, cellular immunity, NK cell activity and phagocytic activity by treatment with CY.

Keywords □ Beta-carotene, cyclophosphamide, hemagglutination titer, Arthus reaction, hemolytic plaque forming cell, delayed-type hypersensitivity reaction, rosette forming cell, phagocytic activity, natural killer cell activity, number of circulating leukocyte.

Beta-carotene은 vitamin A의 전구체로 녹황색 채소나 과일에 다량 함유된 carotenoids로서,^{1,2)} 식품의 착색료로 사용되고³⁾ 또한 망막의 기능이나 많은 조직의 상피세포분화와 증식을 정상으로 유지시키고, vitamin A 결핍시 오는 체반증상에 예방작용이 있다고 알려져 있다.^{4,5)}

이러한 beta-carotene은 대사과정에서 여러 형태로

전환되어 진다. beta-carotene은 약 30% 정도가 쉽게 직접 흡수되어 간장이나 지방조직에 저장되고, 나머지의 대부분은 소장점막에서 beta-carotene dioxygenase에 의해 2분자의 retinal로 산화되고, 다시 소장점막에서 nicotinamide dinucleotide phosphate (NADP) 의존성 retinal 환원효소에 의해 retinol로 환원되며, 다른 일부의 retinal은 산화에 의해 retinoic acid로 변환되어 문맥을 거쳐서 체내로 흡수된다. retinol은 지방산 ester로 되어 림프 chylomicron에 들

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

어가서 혈액 중으로 이동되어 최종적으로 간에 와서 retinol palmitate로 지방조직에 저장된다. 생체내에 들어온 beta-carotene의 대부분은 low density lipoprotein(LDL)에 결합해서 혈중으로 이동된다. 한편, 저장된 retinyl ester는 가수분해되어 retinol로 된후, retinol 결합단백질과 결합하며, 다시 이것은 prealbumin과 복합체를 형성해서 혈중순환으로 표적세포에 이송된다.

Vitamin A의 작용은 화학적 형태에 따라 달라지며, 주로 retinol은 생식과정에서 vitamin 작용을 위한 필수적인 물질이고, retinal은 시각작용을 가지며, retinoic acid나 그밖의 대사산물은 성장과 분화에 필수적인 인자로 작용되어진다.⁵⁻⁸ 그러나 과잉섭취된 retinal, retinol, retinoic acid 등은 *in vivo*, *in vitro*에서 이미 많은 급·만성독성연구가 보고되어져 있으나,⁹⁻²⁵ beta-carotene의 과잉섭취는 무해성으로 피부가 황색으로 변화하는 것 외에 거의 독성이 없다고 보고되어 있다.²⁶

한편, beta-carotene의 항암작용에 관한 연구로써, beta-carotene은 정상공기의 산소압보다 낮은 분압에서 free radical 및 일중항산소(singlet oxygen)의 포착제작용과 항산화작용이 있기 때문에 항암적 활성이 있다고 보고되었고,^{27,28} Peto 등²⁹은 beta-carotene의 암에 대한 방어작용은 장관으로부터 그대로 흡수된 beta-carotene 자체의 작용이라고 보고하였으며, Cutler³⁰는 beta-carotene과 retinol이 중요한 자연 항암물질임을 입증했으며, 또한 beta-carotene과 retinol은 중요한 항노화물질이라고 하여 이 가능성을 알기위해 혈청과 뇌조직중의 beta-carotene과 retinol의 농도와 포유동물의 최고수명잠재력(maximal lifespan potential)과의 사이에 정상관의 존재여부를 조사한 결과, beta-carotene에 대해서는 유의적 상관을 나타냈으나, retinol에 대해서는 나타내지 않았다고 보고되었고, 역학적 관찰에서 녹색 야채를 많이 섭취하는 것과 폐암, 특히 편평상피암 발생에 대한 위험이 낮아지는 것과의 역관계가 있고, 소화기 암, 유방암 및 기타 암종에서도 그러한 경향이 인정된다는 많은 보고가 있다.³¹⁻³⁵ 또한 beta-carotene, canthaxanthin, phytoene 등의 carotenoids가 UV조사에 의해서 유도된 생쥐 피부암의 발생을 저하시켰다고 보고되었고,³⁶ Alam 등³⁷은 7,12-dimethyl benzanthracene에 의해 유발된 흰쥐의 종양이 beta-carotene

투여에 의해서 감소되었다고 보고하였으며, Seifter 등³⁸은 생쥐에 *Moloney sarcoma virus*를 감염시킨 후 beta-carotene 식이를 투여한 결과 종양 빈도가 감소되고 임파구의 생산을 증가시킨다고 보고하였다. 또한, beta-carotene이 방사선으로 폭로된 생쥐에 있어서 Seifter 등³⁹은 임파구와 단세포 수가 증가함을 보고하였고, 또한 Seifter 등⁴⁰과 Rettura 등⁴¹은 생존기간이 증가함을 보고하였으며, Gerster⁴²은 흡연자는 비흡연자와 비교하여 beta-carotene의 혈중농도가 15% 정도 낮은 점으로 미루어 암을 유발할 수 있다고 주장하였으며, Stich 등⁴³과 Majumdar 등⁴⁴은 흡연자와 음주가는 정상인 보다 구강세포의 beta-carotene치가 현저히 낮았다고 보고하였고, Temple 등⁴⁵은 위암, 자궁경부암, 난소암, 유방암 및 기타 암종에 대해 beta-carotene이 유효하나 그 중에서도 특히 폐암이 가장 유효하다고 보고하였다. 또한, Alexander 등⁴⁶은 건강한 인체에 beta-carotene 180 mg/day을 투여한 결과 1주일 이후부터 혈액내 helper T cell이 유의성있게 증가하였고, 2주일 후에는 모든 T cell수가 증가하였다고 보고하였으며, Rhodes 등⁴⁷은 *in vitro*에서 retinoic acid에 의해 interferon 억제나 interferon억제로 유도된 인체의 종양이 beta-carotene에 의해 저지되었다고 보고하였고, Bendich 등⁴⁸은 흰쥐에 있어서 beta-carotene식이는 mitogens에 대해서 T 및 B 임파구반응을 증가시켰음을 보고하였다. 최근 beta-carotene이 hamster 종양에 있어서 Schwartz 등⁴⁹은 항종양반응에 있어 면역증강을 보고하였고, Shklar 등⁵⁰은 대식세포의 활성을 증가시켰음을 보고하였다.

이와 같은 beta-carotene의 항암작용과 항산화작용은 vitamin A와 마찬가지로 세포종식이나 면역현상에 관여하여 나타나는 것이 아닌가 생각되고, 또한 beta-carotene의 생체방어기능이 보고된 바 있으나 면역생물학적인 전반적 연구는 없다.

따라서 저자들은 beta-carotene의 용량에 따른 면역생물학적 반응에 미치는 영향을 규명하고자, 본 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물— 생후 5~6주령 체중 17~21g의 ICR 숫

컷 생쥐를 경남축산(경기도 화성소재)에서 분양받아 시판사료(제일사료 Co. : 조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.1% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.7% 이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후, 10마리를 1군으로 하고 전체를 8군으로 나누어 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 50~60%로 유지되는 항온 항습 사육실에서 4주간 사육하였다.

Beta-carotene 용액의 조제 및 투여—Beta-carotene (Sigma Co., Ltd.)을 체중 kg당 4, 20 및 100 mg이 되도록 olive oil에 용해시킨 후 4주간 1일 1회 일정한 시각에 경구투여하였다. 그리고 대조군과 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군은 olive oil 10 ml/kg을 위와 동일한 방법으로 투여하였다.

Cyclophosphamide 용액의 조제 및 투여—Cyclophosphamide (Sigma Co., Ltd.)는 사용 직전에 생리 식염수에 용해하여 2차면역 2일 전에 5 mg/kg을 복강내에 1회 주사하였다.

체중 및 장기의 중량계측—실험동물의 체중은 공식약품투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 최종 약품투여 2일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 적출하여, 그 중량을 측정하여 대체중 백분비를 구하였다.

항원의 조제—본 실험에서는 면양적혈구(Sheep red blood cell 이하 S-RBC)를 사용하였는데, 그 방법은 응성면양의 경동맥으로부터 heparin 처리 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver's액(pH 6.1)을 가하여 4°C 에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks balanced salt solution(이하 HBSS : Gibco Laboratories Co., Ltd.)에 부유시켜 사용하였다.

면역—원심 세척한 S-RBC를 Reed 등⁵¹⁾의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10^8 S-RBC/ml의 농도로 부유시키고 부유액 0.1 ml (1×10^7 S-RBC)를 생쥐의 미정맥에 주사하여 1차면역을 유도하였다. 2차면역은 1차면역 4일 후에 생쥐의 좌측후지측 척피내에 2×10^8 S-RBC/ml 부유액 0.05 ml (1×10^8 S-RBC)를 주사하여 면역하였다.

혈청의 분리 및 비동화—생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C 에서 30분간 비동화시킨 후 4°C 에서

보존하여 사용하였다.

적혈구응집소기(Hemagglutination titer 이하 : HA titer)의 측정^{52,53)}—S-RBC의 응집소기를 microtitration tray(Nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 비동화 혈청을 각 well에 HBSS로 2회 계열로 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C 에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집유형을 관찰판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소기로 하였다.

족척종창반응의 검사(footpad swelling test)—Arthus반응 및 지연형과민반응(delayed type hypersensitivity reaction 이하 : DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등⁵⁴⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 1차면역 4일 후에 S-RBC 0.05 ml (1×10^8)를 생쥐의 좌측후지측 척에 피내주사하였다. 주사후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co., Ltd.)로 측정하였으며, 종창정도의 측정기는 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다. 판독 기준은 Sugimoto 등⁵⁵⁾의 판독기준에 따라, 3시간 경과 후의 반응을 Arthus반응, 24시간 경과 후의 반응을 지연형과민반응(DTH)으로 간주하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

비장세포 부유액의 조제⁵¹⁾—비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium(이하 : MEM : Gibco Laboratories Co., Ltd.)에 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 사세포피를 제거하였으며, 한냉 MEM으로 4°C 에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포 수가 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험때마다 비장세포의 생존률 검사를 실시하였는데, 이 검사는 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 하였다. 즉, 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후 혈구계산판에서 무색 생세포와 적색으로 염색된 수를 측정하고, 그 백분율을 계산하였다. 이때 세포 생존률이 95% 이상 되었다.

비장세포의 rosette 형성세포수(이하 : RFC)의 측정

-비장세포의 rosette 형성세포수의 검사는 Garvey 등⁵⁶⁾ 및 Elliott 등⁵⁷⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 비장세포 부유액(2×10^7 cells/ml) 0.025 ml를 시험관에 넣은 후, HBSS에 부유한 S-RBC(2×10^8 cells/ml) 0.025 ml를 넣고 혼합하여 $200 \times G$ 에서 12분간 원심분리한 후, $4^\circ C$ 에서 2시간 방치하였다. 그 후 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후, 이 재부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경 관찰하였다. 검경시 비장세포에 S-RBC가 3개 이하 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cell(\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{viability}} \times 100$$

비장세포의 용혈반형성세포 수(plaque forming cell 이하; PFC)의 측정 - 1) 비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham⁵⁸⁾의 방법을 이용하여 다음과 같이 행하였다. 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, $400 \times G$ 에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 제거 후 $37^\circ C$ 의 0.83% NH_4Cl 용액에 부유시켜 3분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 HBSS에 부유시켜 적혈구 제거 비장세포수를 혈구계산판에 검경 관찰하였다.

2) S-RBC를 PBS로 4회 세척하고($400 \times G$, 5분) 마지막 세척 후 PBS에 4×10^9 S-RBC/ml의 농도로 부유시켰다.

3) 4×10^9 S-RBC 250 μ l, guinea pig complement (Gibco Lab. Co., Ltd.) 500 μ l를 혼합하여 ice bath 상에서 30분간 정치 후 사용하였다.

4) 상기 guinea pig complement와 4×10^9 S-RBC 혼합액 150 μ l, 비장세포 부유액 650 μ l를 잘 혼합하여 microchamber(Takahashi Giken Glass 76 \times 26 mm)에 100 μ l씩 주입하고 wax-vaseline(1:1)으로 밀봉하여 CO_2 incubator($37^\circ C$)에서 1시간 배양후 형성된 용혈반형성세포(plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다.

5) 백만개의 비장세포중 용혈반형성세포수(PFC/ 10^6 spleen cells) 및 비장세포 전체중의 용혈반형성세포수(PFC/total spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$\text{PFC/total spleen cells} = \left(\frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s$$

단, $a = \frac{650}{800}$ (배양혼합액 중의 비장세포 부유액의 비율)

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension.

V_m : volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension(ml)

Natural killer cell 활성도의 측정 - 약물투여 최종 일로부터 2일 후에 생쥐를 치사시켜 전술한 방법으로 비장세포를 분리하여 RPMI 1640 배지에 2×10^7 cells/ml의 농도를 현탁시켜 작동세포로서 이용하였다. 표적세포로는 YAC-I cell을 이용하였으며, Kiesseling 등⁵⁹⁾의 방법으로 sodium chromate- ^{51}Cr (에너지연구소에서 분양)를 표지한 후, 2×10^5 cells/ml의 농도로 부유시켜 사용하였다. 이때 세포생존률이 95% 이상 되게 하였다. 작동세포(임파구)와 표적세포의 비율은 100 : 1로 하였다. ^{51}Cr 이 표지된 표적세포(2×10^5 cells/ml) 100 μ l와 작동세포(1×10^7 cells/ml) 100 μ l를 96 well tissue culture plate(Flow Lab., U.S.A)의 각 well에 혼합한 후, $37^\circ C$ 5% CO_2 incubator(Forma, U.S.A)에서 5시간 incubation하였다. 이 tissue culture plate를 $500 \times G$ 에서 10분간 원심분리한 후, 상층액 100 μ l씩을 취하여 Gamma counter(Beckman, U.S.A)로 방사능을 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며, percent specific lysis를 다음의 식에 의하여 산출하였다.

% Specific lysis =

$$\frac{\text{c.p.m. in experiment} - \text{c.p.m. spontaneous release}}{\text{c.p.m. maximum release} - \text{c.p.m. spontaneous release}} \times 100$$

여기에서 c.p.m. spontaneous release는 실험군의 상정액 100 μ l의 방사선량, c.p.m. spontaneous release는 작동세포가 들어있지 않고 표적세포만 들어 있는 대조군의 상정액 100 μ l의 방사선량이고, c.p.m.

maximal release는 표적세포(10^4 cells in 100μ) triton X-100 1% 용액 100μ 를 가하여 얻었으며 표시된 방사능의 95% 이상이 되게 하였다. c.p.m. spontaneous release는 c.p.m. maximal release의 10% 이 내가 되게 하였다.

대식세포활성도의 측정—대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등⁶⁰⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물 투여 2일 후에 rotring ink를 멸균증류수에 녹인 1% gelatin 액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C 에 보관하였다. 위와 같이 조제한 콜로이드상 탄소현탁액을 생쥐체중 그림당 0.01 ml 씩 생쥐의 미정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부정맥혈관총(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20μ : micro-hemocrit)로 천자하여 20μ 의 혈액을 10분, 20분, 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate 용액 2 ml 가 든 vial에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼화하였다. 이어서 흡광도를 600 nm 에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient, corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{W}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

W : body weight

L : liver weight

S : spleen weight

K : phagocytic coefficient (측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph 곡선)

말초순환백혈구수의 측정—생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 Türk액으로 희석하여 혈구계산 판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

통계학적 분석⁶¹⁾—모든 자료는 mean \pm standard error (S.E.)로 나타내었으며, 유의성 검사는 Student's t-test로 행하였다.

실험결과

Beta-carotene이 생쥐의 면역생물학적 반응에 미치는 영향을 규명하고자 실시한 본 실험의 결과는

Table I—Effects of beta-carotene on the body weight in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (mg/kg)	Increasing rate for 28 days (%)
Control	—	13.38 \pm 3.19
Beta-carotene	4	17.16 \pm 2.42***
	20	16.94 \pm 3.69***
	100	15.50 \pm 1.89***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	16.04 \pm 4.81**** ^{ooo}
	20 + 5.0	15.75 \pm 4.31**** ^{ooo}
	100 + 5.0	15.46 \pm 1.52**** ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	12.35 \pm 1.85*

Beta-carotene were orally administered to ICR mice once daily for 28 consecutive days. Cyclophosphamide was injected intraperitoneally (*i.p.*) to ICR mice with a single dose of 5 mg/kg body wt. at 2 days before secondary immunization.

Each values represents the mean \pm S.E. from 10 mice. The significances of the difference as compared as control group; *, $p < 0.05$ and ***, $p < 0.001$.

The significances of the difference between beta-carotene plus cyclophosphamide-treated groups and cyclophosphamide-treated control group; ^{ooo}, $p < 0.001$.

Table II—Effects of beta-carotene on the liver weight in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (mg/kg)	Liver wt. / Body wt. $\times 100$
Control	—	4.66 \pm 0.29
Beta-carotene	4	4.71 \pm 0.36
	20	5.09 \pm 0.30***
	100	5.77 \pm 0.53***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	4.55 \pm 0.22**** ^{ooo}
	20 + 5.0	5.42 \pm 0.29**** ^{ooo}
	100 + 5.0	4.63 \pm 0.19 ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	4.27 \pm 0.38***

Each values represents the mean \pm S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ and ^{ooo}, $p < 0.001$)

다음과 같다.

체중의 변화—각군의 체중변화는 Table I과 같다. 즉, 대조군이 $13.38 \pm 3.19\%$ 의 체중증가율을 보인 것에 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg 투여군의 체중증가율은 각각 17.16 ± 2.42 , 16.94 ± 3.69 및 $15.50 \pm 1.89\%$ 로써 유의하게 증가하였으며, 특히 beta-carotene의 양이 증가함에 따라서 증가율은 둔화되었다.

Table III—Effects of beta-carotene on the spleen and thymus weights in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (mg/kg)	Spleen wt. / Body wt. × 100	Thymus wt. / Body wt. × 100
Control	—	0.81± 0.08	0.14± 0.02
Beta-carotene	4	0.82± 0.04	0.15± 0.03*
	20	0.82± 0.14	0.16± 0.09
	100	1.13± 0.24***	0.16± 0.02***
+ cyclophosphamide	4+5.0	0.87± 0.62	0.17± 0.02***°°
	20+5.0	0.92± 0.15***	0.17± 0.03***°
	100+5.0	0.85± 0.08***°°°	0.16± 0.08*°
Cyclophosphamide	5.0	0.94± 0.11*	0.18± 0.02***

Each value represents the mean± S.E. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I.

(* , p<0.05, ** , p<0.01, *** , p<0.001, ° , p<0.05, °° , p<0.01 and °°° , p<0.001)

Beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 16.04± 4.81, 15.75± 4.31 및 15.46± 1.52%로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 12.35± 1.85%에 비하여 유의하게 증가하였다.

간장의 중량변화—각군의 간장의 중량변화는 Table II에서 보는 바와 같이, 대조군의 간장중량비가 4.66± 0.29%인데 비해 beta-carotene 20 및 100 mg/kg 투여군은 각각 5.09± 0.36 및 5.77± 0.53%로써 유의하게 증가하였다.

한편 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 4.27± 0.38%에 비해 각각 4.55± 0.22, 5.42± 0.29 및 4.63± 0.19%로 유의성 있는 증가를 보였다.

비장과 흉선의 중량변화—비장과 흉선의 중량변화는 Table III에서 보는 바와 같이, 대조군의 비장의 중량비가 0.81± 0.08%인데 비해 beta-carotene 100 mg/kg 투여군은 1.13± 0.24%로써 유의한 증가를 보였고, beta-carotene 4 및 20 mg/kg 투여군에서는 각각 0.82± 0.14 및 0.82± 0.14%로써 유의성없는 증가를 보였다. 한편, beta-carotene 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군에서는 0.85± 0.08%로써 cyclophosphamide 단독투여군의 0.94± 0.11%에 비해 유의한 감소를 보였다.

또한, 대조군의 흉선의 대체중비가 0.14± 0.02%인데 비해 beta-carotene 4 및 100 mg/kg은 각각 0.15± 0.03%, 0.16± 0.02%로써 유의성있는 증가현상을 보

Table IV—Effects of beta-carotene on the hemagglutination titer in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	HA titer (log) # ²⁾
Control	—	3.67± 0.45
Beta-carotene	4	4.17± 0.28***
	20	4.50± 0.20***
	100	5.40± 0.22***
+ cyclophosphamide	4+5.0	2.83± 0.44***
	20+5.0	3.33± 0.38***°°°
	100+5.0	4.00± 0.40***°°°
Cyclophosphamide	5.0	2.83± 0.28***

#HA: Hemagglutinin

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC 4 days after sensitization.

²⁾On the 5th day, HA titers were assayed.

Each value represents the mean± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (***, p<0.001 and °°° , p<0.001)

였다. 한편 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 0.17± 0.02%, 0.17± 0.03%, 0.16± 0.08%로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 0.18± 0.02%에 비해 유의한 감소를 보였다.

적혈구응집소가에 미치는 영향—적혈구응집소가 (HA titer)는 Table IV에서 보는 바와 같이, 대조군의 HA titer가 3.67± 0.45인데 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 4.17± 0.28, 4.50± 0.20, 5.40± 0.22로써 beta-carotene양의 증가에 따라

Table V—Effects of beta-carotene on the Arthus reaction in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	FPSI ²⁾
Control	—	10.28 ± 2.17
Beta-carotene	4	12.54 ± 3.12***
	20	13.18 ± 1.48***
	100	15.25 ± 2.88***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	10.08 ± 1.13 ^{ooo}
	20 + 5.0	10.20 ± 0.99 ^{ooo}
	100 + 5.0	12.50 ± 1.30*** ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	7.91 ± 1.99***

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 4 days after sensitization.

²⁾Footpad thickness was measured immediately before challenge and 3 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_3 - T_0}{T_0} \times 100$$

Where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₃ is the left hind footpad thickness 3 hr after challenge.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (***, p < 0.001 and ^{ooo}, p < 0.001)

비례적으로 유의하게 증가하였다. 한편, beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 2.83 ± 0.44, 3.33 ± 0.38, 4.00 ± 0.40으로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 2.83 ± 0.28에 비해 용량의존적으로 증가하였고, 특히 beta-carotene 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군에서는 유의성있는 증가를 보여, beta-carotene이 cyclophosphamide에 의한 HA titer

의 억제효과를 저지하는 현상을 보였다.

Arthus 반응에 미치는 영향—Arthus 반응의 결과는 Table V에서 보는 바와 같이, 대조군의 Arthus 반응이 10.28 ± 2.17인데 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군은 각각 12.54 ± 3.12, 13.18 ± 1.48, 15.28 ± 2.28로써 beta-carotene의 양에 따라서 비례하여 유의하게 증가하였다. 한편, beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 7.91 ± 1.99에 비해 각각 10.03 ± 1.13, 10.20 ± 0.99, 12.50 ± 1.30으로 유의하게 증가하여 beta-carotene의 양이 증가함에 따라 cyclophosphamide에 의한 Arthus반응 억제효과를 저지하는 효과가 있음을 보여주었다.

비장세포의 용혈반형성세포수—비장세포의 용혈반형성세포(PFC)수에 대한 실험결과는 Table VII에서 보는 바와 같이, 10⁶ 농도의 비장세포에서는 대조군의 PFC가 16.25 ± 0.41인데 비하여 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg투여군의 PFC는 각각 19.50 ± 0.75, 22.50 ± 0.56, 24.80 ± 1.78로써 beta-carotene양이 증가함에 따라서 비례하여 유의하게 증가하였다. 또한 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군에서는 각각 15.40 ± 0.92, 17.50 ± 0.56, 20.50 ± 1.15로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 11.67 ± 0.72에 비해 beta-carotene의 양에 따라서 비례하여 유의한 증가를 보여, beta-carotene이 cyclophosphamide에 의한 PFC 억제효과를 유의성있게 저지하는 효과를 보였다.

또한 10² 농도의 비장세포 역시 대조군의 PFC가 18.80 ± 3.26인데 비하여 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군의 PFC는 24.41 ± 4.52, 26.78 ± 5.51,

Table VI—Effects of beta-carotene on the hemolytic plaque forming cell(PFC) in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (mg/kg)	PFC/10 ⁶ spleen cells	PFC/spleen (×10 ²)
Control	—	16.25 ± 0.41	18.80 ± 3.26
Beta-carotene	4	19.50 ± 0.75***	24.41 ± 4.52***
	20	22.50 ± 0.56***	26.78 ± 5.51***
	100	24.80 ± 1.78***	35.72 ± 7.56***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	15.40 ± 0.92*** ^{ooo}	18.21 ± 4.62 ^{ooo}
	20 + 5.0	17.50 ± 0.56*** ^{ooo}	22.82 ± 5.62*** ^{ooo}
	100 + 5.0	20.50 ± 1.15*** ^{ooo}	25.60 ± 8.97*** ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	11.67 ± 0.72***	15.20 ± 4.48***

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I.

(***, p < 0.001 and ^{ooo}, p < 0.001)

Table VII—Effects of beta-carotene on the delayed type-hypersensitivity(DTH) reaction in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	FPSI ²⁾
Control	—	16.35 ± 6.15
Beta-carotene	4	18.32 ± 4.50*
	20	21.06 ± 3.81***
	100	20.59 ± 4.12***
	+ cyclophosphamide	
	4 + 5.0	23.78 ± 2.98***
	20 + 5.0	25.88 ± 5.05**** ^{ooo}
	100 + 5.0	23.34 ± 3.12***
Cyclophosphamide	5.0	22.49 ± 6.09***

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 4 days after sensitization.

²⁾Footpad thickness was measured immediately before challenge and 24 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_{24} - T_0}{T_0} \times 100$$

Where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₂₄ is the left hind footpad thickness 24 hr after challenge.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (*, p<0.05, ***, p<0.001 and ^{ooo}, p<0.001)

35.72 ± 7.56으로써 용량의존적으로 유의한 증가현상을 보였다. beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 18.21 ± 4.62, 22.82 ± 5.62, 25.60 ± 8.97로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 15.20 ± 4.48에 비해 용량의존적으로 유의한 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 PFC 억제효과를 유의성있게 저지하였다.

지연형과민반응에 미치는 영향—지연형과민반응(DTH)의 결과는 Table VII에서 보는 바와 같이, 대조군의 DTH가 16.35 ± 6.15인데 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군은 각각 18.32 ± 4.50, 21.06 ± 3.81, 20.59 ± 4.12로써 유의하게 증가되었다. 한편 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 DTH가 22.49 ± 6.09인데 비해 beta-carotene 20 mg/kg 투여군에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 25.88 ± 5.50로써 유의성있게 증가하였고, beta-carotene 4 및 100 mg/kg 투여군에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 23.78 ± 2.98, 23.34 ± 3.12로 유의성없는 증가를 보였다.

Table VIII—Effects of beta-carotene on the rosette forming cell(RFC) in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	RFC ²⁾
Control	—	4.10 ± 0.45
Beta-carotene	4	4.98 ± 0.82***
	20	4.74 ± 0.72***
	100	6.05 ± 1.12***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	3.83 ± 0.50**** ^{ooo}
	20 + 5.0	4.10 ± 0.59 ^{ooo}
	100 + 5.0	4.52 ± 0.67**** ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	3.04 ± 0.31***

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 4 days after sensitization.

²⁾On the 5th day, RFC assay was performed.

$$\text{RFC(\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (**, p<0.01, ***, p<0.001 and ^{ooo}, p<0.001)

Table IX—Effects of beta-carotene on the natural killer cell activity in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	% Specific lysis of ⁵¹ Cr-labelled target cell(YAC-I) ¹⁾
		Effector : Target cell 100 : 1
Control	—	18.16 ± 3.73
Beta-carotene	4	22.24 ± 1.87***
	20	30.63 ± 5.59***
	100	21.97 ± 6.59***
+ cyclophosphamide	4 + 5.0	16.32 ± 2.63**** ^{ooo}
	20 + 5.0	25.26 ± 3.53**** ^{ooo}
	100 + 5.0	18.64 ± 3.77 ^{ooo}
Cyclophosphamide	5.0	14.39 ± 1.12***

¹⁾% Specific lysis was determined by a standard 4 hours ⁵¹Cr release assay and effector to target ratios were 100 : 1.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (**, p<0.01, ***, p<0.001 and ^{ooo}, p<0.001)

비장세포의 rosette 형성능에 미치는 영향—비장세포의 rosette 형성세포(RFC)에 대한 실험결과는 Table VIII에서 보는 바와 같이, 대조군의 RFC가 4.10 ± 0.45%인데 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg

Table X—Effects of beta-carotene on the phagocytic activity in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	Corrected phagocytic index ¹⁾
Control	—	5.20 ± 0.43
Beta-carotene	4	6.15 ± 0.31***
	20	6.32 ± 0.30***
	100	7.23 ± 0.45***
+ cyclophosphamide	4+5.0	4.30 ± 0.28****°°°
	20+5.0	4.84 ± 0.30****°°°
	100+5.0	5.62 ± 0.42****°°°
Cyclophosphamide	5.0	3.90 ± 0.23***

¹⁾Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weights of the liver and spleen. Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (***, p<0.001 and °°, p<0.001)

투여군은 각각 4.98 ± 0.82%, 4.74 ± 0.72%, 6.05 ± 1.12 %로써 유의한 증가를 보였다. 한편, beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군의 RFC는 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 RFC가 3.04 ± 0.31%인데 비해 각각 3.83 ± 0.50%, 4.10 ± 0.59%, 4.52 ± 0.67%로써 beta-carotene의 양에 따라 비례하여 유의한 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 RFC 억제효과를 유의하게 저지하였다.

Natural killer(NK) 세포의 활성화에 미치는 영향—N.K세포의 활성화에 대한 실험은 Table IX에서 보는 바와 같이, effector cell : target cell 비율이 100 : 1일 때, 대조군의 NK세포의 활성이 18.16 ± 3.73인데 비하여 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군은 각각 22.24 ± 1.87, 30.63 ± 5.59, 21.97 ± 6.59로써 유의하게 증가하였으나 고용량에서는 둔화되는 현상을 보였다. 한편 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 NK세포의 활성이 14.39 ± 1.12인데 비해 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 16.32 ± 2.63, 25.26 ± 3.53, 18.64 ± 3.77로써, cyclophosphamide에 의한 NK세포의 활성억제효과를 저지하는 효과가 뚜렷하였으나, beta-carotene 고용량에서는 저지효과가 둔화되는 현상을 보였다.

Table XI—Effects of beta-carotene on the number of circulating leukocyte in mice¹⁾

Drug	Dose (mg/kg)	Number of circulating leukocyte(/mm ³)
Control	—	7,075 ± 740
Beta-carotene	4	7,080 ± 443
	20	7,776 ± 561***
	100	7,284 ± 392*
+ cyclophosphamide	4+5.0	5,904 ± 481****°°°
	20+5.0	6,186 ± 370****°°°
	100+5.0	6,324 ± 194****°°°
Cyclophosphamide	5.0	5,298 ± 412***

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (*, p<0.05, ***, p<0.001 and °°, p<0.001)

대식세포의 활성화에 미치는 영향—대식세포의 탐식능력을 측정하여 phagocytic index로 환산한 결과는 Table X에서 보는 바와 같이, 대조군의 대식세포의 활성이 5.20 ± 0.43인데 비하여 beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 6.15 ± 0.31, 6.32 ± 0.30, 7.23 ± 0.45로써 beta-carotene 양이 증가함에 따라서 유의하게 증가하였다. 또한, beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군도 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 3.90 ± 0.23에 비해 각각 4.30 ± 0.28, 4.84 ± 0.30, 5.62 ± 0.42로써 beta-carotene이 cyclophosphamide에 의한 대식세포의 활성억제 효과를 beta-carotene의 양에 따라 비례하여 유의하게 저지하였다.

말초순환백혈구수에 미치는 영향—말초순환백혈구수는 Table XI에서 보는 바와 같이, 대조군의 백혈구수가 7,075 ± 740인데 비하여 beta-carotene 20 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 7,776 ± 561, 7,284 ± 392로 유의성있는 증가를 보였고, beta-carotene 4 mg/kg 투여군은 7,080 ± 443으로써 유의성없는 증가를 보였다. 한편, beta-carotene 4, 20 및 100 mg/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군에서는 각각 5,904 ± 481, 6,186 ± 370, 6,324 ± 194로써 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 5,298 ± 412에 비해 beta-carotene의 양에 따라 비례하여 유의성있게 증가함을 보여, cyclophosphamide의 백혈구수억제효과를 beta-carotene의 양이 증가함에 따라 저지하는 효과가 뚜렷하였다.

고 찰

체중 및 각 장기에 미친 작용—체중증가율에 있어 cyclophosphamide 단독투여군을 제외한 모든 beta-carotene 실험군에서 유의한 체중증가현상을 보였으며, beta-carotene 양의 증가에 따라서 그 증가율은 둔화되어 대조군과 유사하였다(Table I). 이는 cyclophosphamide는 개에서 골수장애와 백혈구감소 등을 일으켜 체중을 감소시켰다는 Wheeler 등⁶²⁾의 보고와 일치하는 점과 흰쥐에 retinoic acid를 과량투여시 독성에 의해 체중증가가 감소되었다는 Kampe¹¹⁾의 보고로 미루어, beta-carotene이 성장에 영향을 미치는 것으로 생각되고, 또한 면역억제제인 cyclophosphamide의 부작용인 체중감소를 beta-carotene이 저지하는 효과를 보인 것으로 생각된다.

간장의 중량도 cyclophosphamide 단독투여군을 제외한 모든 beta-carotene 실험군에서 beta-carotene의 양에 따라서 유의성 있는 증가를 보였다(Table II). 이는 retinoic acid의 간장중량감소가 인삼 ethanol 추출물투여에 의해 회복되었다는 것은 retinoic acid에 의한 간세포의 endoplasmic reticulum 장애를 인삼 ethanol 추출물이 저지시켰다는 Chung의 보고⁶³⁾와 cyclophosphamide가 간독성이 있다는 Vaughn 등⁶⁴⁾의 보고로 미루어, beta-carotene은 cyclophosphamide에 의한 간세포의 endoplasmic reticulum, protein 합성능 등의 장애에 회복효과가 있음이 사료된다.

비장 및 흉선의 대체중비도 beta-carotene의 양에 따라 증가하였으며, beta-carotene과 cyclophosphamide 병용투여군은 cyclophosphamide 단독투여군에 비해 비장 및 흉선의 대체중비는 감소를 보였다(Table III). 이는 cyclophosphamide 투여로 생쥐의 비장중량의 감소시 비장의 periarterial lymphatic sheath에 세포손상을 초래함을 보고한 Chung 등⁶⁵⁾과 cyclophosphamide가 생쥐비장의 germinal center에 심한 세포손상을 초래했다는 Stockman 등⁶⁶⁾의 보고와 cyclophosphamide의 투여량이 증가함에 따라 흉선의 중량이 감소하여 흉선의 T-cell이 감소하였다는 Wachsmuth⁶⁷⁾의 보고로 미루어, beta-carotene이 면역장기인 비장과 흉선에 영향을 미쳐 B 및 T-cell 의존성면역반응을 증가시킨 것으로 생각되고, 또한 beta-carotene은 cyclophosphamide에 의한 면역장기의 비

대에 유의한 회복효과가 있음이 사료된다.

체액성면역의 증강작용—적혈구 응집소기(HA titer) 반응은 면역적혈구에 대한 항체와 항원반응으로써 T-cell 의존성 항원에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데,⁵³⁾ 본 실험결과에서는 beta-carotene 양이 증가함에 따라서 HA titer가 현저하게 증가되었고, 또한 beta-carotene에 cyclophosphamide 병용투여군도 cyclophosphamide 단독투여군에 비해 HA titer가 beta-carotene의 양에 따라 비례하여 유의하게 증가하였다(Table IV). 이는 흰쥐에 있어서 beta-carotene 식이가 mitogens에 대해서 T 및 B 임파구를 증가시켰다고 보고한 Bendich 등⁴⁸⁾의 보고와 vitamin A 고용량이 항체생산을 증가시켰다고 보고한 Cohen 등⁶⁸⁾의 보고와 일치하는 점과 cyclophosphamide를 투여한 생쥐에 있어서 HA titer의 억제로 항체가 부족되었다는 Ha 등⁶⁹⁾의 보고로 미루어, beta-carotene이 생쥐에서 항체형성을 항진시켜 체액성면역반응을 증가시킨 것으로 사료된다.

Arthus 반응은 감작숙주에 주입된 항원이 항원-항체 면역복합체를 형성하여 조직에 침착하고 보체를 활성화시키며 항원에 의해서 자극된 비만세포로부터 유리된 histamine 및 leukotriene이 다형핵백혈구의 유주작용을 항진시키고 유도되어 온 다형핵백혈구가 lysosomal enzyme를 유리하여 염증반응을 촉진시키는 현상으로,⁵⁴⁾ 본 실험의 결과에서는 beta-carotene의 양에 따라서 Arthus 반응이 유의한 증가를 보였고, beta-carotene에 cyclophosphamide 병용투여군도 cyclophosphamide 단독투여군에 비해 용량의존적으로 유의한 증가를 보였다(Table V). 이는 beta-carotene이 항원-항체 복합체에 의한 보체계의 활성화를 촉진시킨 것으로 사료된다.

비장세포의 용혈반형성세포(PFC)수는 항체형성세포가 항원 및 보체와 결합하여 용혈현상을 일으킨 것으로, 본 실험결과에서는 모든 beta-carotene 실험군에서 beta-carotene의 양에 따라서 비례적으로 유의한 증가를 보였다(Table VI). 이는 retinoic acid에 의한 생쥐의 PFC 감소는 항체생산을 억제한다는 Chung⁶³⁾의 보고와 cyclophosphamide 투여에 의한 PFC의 감소는 immunoglobulin 합성억제 작용이라고 보고한 Ahn 등⁷⁰⁾의 보고로 미루어, beta-carotene이 immunoglobulin 합성을 항진시켜 B-cell 기능이 증가되어 체액성면역반응을 증가시킨 것으로 사료된다.

세포성면역의 증강작용—지연형과민반응(DTH)은 감작입과구에 의해서 lymphokine 등의 유리에 기인하는 세포대개형과민반응으로, 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁶⁾ 본 실험의 모든 beta-carotene 실험군에서는 대조군에 비해 유의성있는 DTH 증강작용이 있었다(Table VII).

비장세포의 rosette 형성세포(RFC)는 T-cell 및 대식세포가 모두 rosette cell을 형성할 수 있으나 대부분 T-cell이 깊이 관여하는 것으로 보고되고 있는데,⁷¹⁾ 본 실험의 결과에서는 모든 beta-carotene 실험군에서 대조군에 비해 유의한 RFC 수의 증가를 보였으나, cyclophosphamide 단독투여군은 현저한 RFC수의 감소를 보였다(Table VIII).

이는 건강한 인체에 beta-carotene 180 mg/day 투여한 결과 2주일 후에 helper T-cell과 T-cell이 증가하였다는 Alexander 등⁴⁶⁾의 보고와 흰쥐에 beta-carotene 식이가 T-cell수를 증가시킨다는 Bendich 등⁴⁸⁾의 보고와 vitamin A의 양이 직·간접으로 helper T-cell과 suppressor T-cell에 영향을 미친다는 Ahn 등⁷²⁾의 보고와 cyclophosphamide 투여로 DTH의 억제제는 suppressor T-cell에 영향을 끼칠 수 있음을 시준한 Zembala 등⁷³⁾과 Roellinghoff 등⁷⁴⁾의 보고로 미루어, beta-carotene이 cyclic AMP를 억제시켜 입과구의 mitogenesis를 증가시키고, T-cell 및 lymphokine 등의 생성을 항진시키고, 또한 macrophage활성을 증가시켜 비장세포의 rosette형성을 증가시켰을 가능성이 있고, helper T-cell의 유도를 항진시켜 세포성면역반응을 증가시킨 것으로 사료된다.

비특이적 면역의 증강작용—Natural killer(NK) cell은 종양의 성장⁷⁵⁻⁷⁸⁾과 전이⁷⁹⁻⁸²⁾에 대해서 저항하는 대과립입과구(large granular lymphocyte: LGL)의 일종으로 종양면역기전에 중요한 역할을 하며, 본 실험에서 숙주의 비특이성 면역반응을 측정하기 위하여 NK cell 활성을 측정하였는데, 본 실험에서 cyclophosphamide 단독투여군은 대조군에 비해 현저한 감소를 보였고, 기타 모든 beta-carotene 실험군에서 유의한 증가를 보였다(Table IX).

이는 Peto 등,²⁹⁾ Cutler,³⁰⁾ Alam 등³⁷⁾ 및 Michael 등⁴⁶⁾이 주장하고 있는 beta-carotene이 인체 및 동물에 항암작용 효과가 있다는 보고로 미루어, beta-carotene의 NK 세포활성증가효과는 특히 주목을 요하는 부분으로 항암효과가 기대되며, 이에 대한 정확한

기전에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

대식세포의 활성화는 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukine 등의 분비에 중요한 역할을 하여 그 탐식능이 세망내피계에 영향을 끼쳤는가를 측정하는 지표로써,⁸³⁾ 본 실험에서는 beta-carotene 투여군은 대조군에 비해 유의한 증가를 보였고, beta-carotene에 cyclophosphamide 병용투여군은 cyclophosphamide 단독투여군에 비해 유의한 증가를 보였다(Table X). 이는 beta-carotene이 대식세포의 활성을 증가시켰다는 Shklar 등⁵⁰⁾의 보고와 일치하는 점으로 미루어, beta-carotene이 T-cell의 증식과 lymphokine 등의 분비를 항진시킴으로써 대식세포의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다.

말초순환백혈구수는 대조군에 비해 beta-carotene 투여군에서 증가를 보였으며, cyclophosphamide 단독투여군에 비해 beta-carotene에 cyclophosphamide 병용투여군은 유의한 증가를 보였다(Table XI). 이는 beta-carotene이 방사선에 폭로된 생쥐에서 입과구와 단세포수가 증가하였다고 보고한 Seifter 등³⁹⁾의 보고와 cyclophosphamide가 인체에 있어서 백혈구감소작용이 있다고 보고한 Coggins 등⁸⁴⁾과 Nuguid 등⁸⁵⁾의 보고와 cyclophosphamide에 의한 혈소판감소증으로 골수의 depression을 일으킨다고 보고한 Well 등⁸⁶⁾의 보고로 미루어, 이러한 백혈구증가현상은 beta-carotene이 골수의 조절기능을 항진시켰을 가능성과 입과구의 활성화에 영향을 미쳐 백혈구의 생산을 촉진하여 백혈구수가 증가된 것으로 사료된다.

결 론

Beta-carotene(4~100 mg/kg, 경구투여)이 면역적 혈구 감작생쥐에서 나타나는 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실험한 결론은 다음과 같다.

1. Beta-carotene은 간장, 비장 및 흉선의 대체중비를 용량의존적으로 증가시켰으며, 체중증가와 백혈구수를 유의성있게 증가시켰다.
2. Beta-carotene은 체액성면역과 관계되는 적혈구 응집소, Arthus반응 및 용혈반형성세포수를 용량의존적으로 증가시켰다.
3. Beta-carotene은 세포성면역과 관계되는 지연형과민반응과 rosette 형성능을 유의성있게 증가시켰

다.

4. Beta-carotene은 대식세포의 활성을 용량의존적으로 증가시켰으며, NK세포의 활성은 유의성있게 증가하였다.

5. Beta-carotene은 cyclophosphamide에 의한 체액성 및 세포성면역 저하와 NK세포 및 대식세포의 활성저하를 저지하는 효과가 용량의존적으로 뚜렷하였다.

문 헌

- 1) John, R.: Human interferon action; Reciprocal regulation by retinoic acid and β -carotene. *JNCI* **70**, 833 (1983).
- 2) Editorial: Vitamin A, retinol, carotene and cancer prevention. *Br. Med. J.*, **281** (1980).
- 3) Klausner, A.: Algaculture; Food for thought. *Biol. Technol.*, **4**, 947(Nov. 1986).
- 4) Ohshima, H.: Vitamins and cancer prevention. *Toxicol. Prog.*, **6**, 624 (1983).
- 5) Goodman, L.S. and Gillman, A.: *The Pharmacological Basis of the Therapeutics*. 6th ed., p.1583 (1980).
- 6) Calabrese, E.J.: Nutrition and environmental health. *Vitamins* **1**, 32 (1980).
- 7) Machlin, L.J.: *Handbook of Vitamins*, p.24 (1984).
- 8) Tuckerman, M.M. and Turco, S.J.: *Human Nutrition*. 62 (1983).
- 9) Leelaprute, V., Boonpucknaving, V., Bhamarapravati, N. and Weerapradist, W.: Hypervitaminosis A in rats. *Arch. Pathol.*, **96**, 5 (1973).
- 10) Herold, M., Cahn, J. and Gomont, P.: Toxicology of vitamin A acid. *Acta Dermatovener(Stockholm), Suppl.*, **74**, 29 (1975).
- 11) Kampe, T.: Comparative toxicity of oral all-trans-retinoic acid and the aromatic retinoids Ro 10-9359 and Ro 12-7554 in rats. Hematologic and biochemical studies. *Drug Develop. Res.*, **3**, 49 (1983).
- 12) Gerhard, Z.: Pharmacology of vitamin A acid (β -all-trans retinoic acid). *Acta Dermatovener(Stockholm), Suppl.*, **74**, 21 (1975).
- 13) Malathy, S. and Vishwa, N.S.: Fatty liver in hypervitaminosis A; Synthesis and release of hepatic triglycerides. *Amer. Physiol. Soc.*, E511 (1978).
- 14) Bermahadt, I.B. and Dorsey, D.J.: Hypervitaminosis A and congenital renal anomalies in a human infant. *Obstetrics, Gynecol.*, **43**, 750 (1974).
- 15) Shaywita, B.A., Siegel, N.J. and Pearson, H.A.: Megavitamins for minimal brain dysfunctions for minimal brain dysfunction. *JAMA* **238**, 1749 (1974).
- 16) Frame, B., Jackson, C.E., Reynolds, W.A. and Umphrey J.E.: Hypercalcemia and skeletal effect in chronic hypervitaminosis A. *Ann. Inter. Med.*, **80**, 44 (1974).
- 17) Muentner, M.D., Perry, H.O. and Ludwig, J.: Chronic vitamin A intoxication in adults. *Am. J. Med.*, **50**, 129 (1971).
- 18) Jacques, E.A., Buschmann, R.J. and Layden, T.J.: The histopathologic progression of vitamin A induced hepatic injury. *Gastroenterol.*, **76**, 599 (1976).
- 19) Russel, R.M., Boyer, J.L., Bagheri, S.A. and Hruban, Z.: Hepatic injury from chronic hypervitaminosis A resulting in portal hypertension and ascites. *New Eng. J. Medicine* **291**, 453 (1974).
- 20) Oliver, T.K.: Chronic vitamin A intoxication. *Amer. J. Dis. Child.*, **95**, 57 (1958).
- 21) Rubin, E., Florman, A.L., Degnam, T. and Diaz, J.: Hepatic injury in chronic hypervitaminosis A. *Amer. J. Dis. Child.*, **119**, 132 (1970).
- 22) Pease, C.N.: Focal retraction and arrestment of growth of bones due to vitamin A intoxication. *JAMA* **183**, 980 (1962).
- 23) Welsch, C.W., Smith, M.C., Brown, C.K. and Crown, N.: Enhancement by retinyl acetate of hormone-induced mammary tumorigenesis in female GR/A mice. *JNCI* **67**, 935 (1981).
- 24) Love, A.M. and Vicker, T.H.: Hypervitaminosis A dysmelia in rats. *Br. J. Exp. Path.*, **52**, 656 (1971).
- 25) Shenefelt, R.E.: Gross congenital malformation. *Am. J. Path.*, **66**, 589 (1972).
- 26) Aoki, K., Ito, Y. and Sasaki, R.: Beta-carotene and chemoprevention of cancer. *Rinsho Kensa* **31**, 275 (1987).
- 27) Burton, G.W. and Ingold, K.U.: Beta-carotene; An unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**, 569 (1984).
- 28) Bendich, A.: The safety of beta-carotene. *Nutr. Cancer* **11**, 207 (1988).
- 29) Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. and Sporn, M.E.:

- Can dietary beta carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**, 201 (1981).
- 30) Cutler, R.G.: Vitamin information. *Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.A.)* **1**, 7627 (1984).
 - 31) Hennekens, C.H.: Issues in the design and conduct of clinical trials. *J. Natr. Cancer Inst.*, **73**, 1473 (1984).
 - 32) Wu, A.H., Henderson, B.E., Pike, M.C. and Pike, M.C.: Smoking and other risk factors for lung cancer in women. *J. Natr. Cancer Inst.*, **74**, 747 (1985).
 - 33) Ziegler, R.G., Mason, T.J., Stenhagen, A., Hoover, R., Schoenburg, J.B., Gridley, G., Virgo, P.W. and Fraumeni, J.F.: Carotenoid intake, vegetables and the risk of lung cancer among white men in New Jersey. *Am. J. Epidemiol.*, **123**, 1080 (1986).
 - 34) Shekelle, R.B., Lin, S., Raynor, W.J., Lepper, M., Maleza, C. and Rossof, A.H.: Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. *Lancet* **2**, 1185 (1981).
 - 35) Hennekens, C.H., Mayrent, S.L. and Eillett, W.: Vitamin A, carotenoids and retinoids. *Cancer Inst.*, **58**, 1837 (1986).
 - 36) Mathews-Roth, M.M.: Antitumor activity of β -carotene, canthaxantin and phytoene. *Oncol.*, **39**, 33 (1982).
 - 37) Alam, B.S. and Alam, S.Q.: Effect of different levels of beta-carotene on salivary gland tumors. *Fed. Proc.*, **44**, 770 (1985).
 - 38) Eli, S., Giuseppe, R., Jacques, P. and Stanley, M.L.: *Moloney murine sarcoma virus* tumors in CBA/J Mice; Chemopreventive and chemotherapeutic actions of supplemental β -carotene. *JNCI* **68**, 835 (1982).
 - 39) Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J., Straford, F., Weinzwieg, J., Demetriou, A.A. and Levenson, S. M.: Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin A or β -carotene in CBA mice given total-body gamma-radiation. *J. Nat. Inst. Cancer* **73**, 1167 (1984).
 - 40) Seifter, E., Levenson, S.M. and Rettura, G.: The lymphopoietic action of vitamin A and β -carotene. Proceedings of the 181st National Meeting of the American Chemical Society, Division of Agriculture and Food Chemistry. *Anaheim, CA. Abs.*, No. 13 (1981).
 - 41) Rettura, G., Barbul, A., Padawer, J. and Seifter, E.: Vitamin A-induced lymphocytosis and monocytosis. Proceedings of the 175th National Meeting of the American Chemical Society. Division of Agriculture and Food Chemistry. *Anaheim, CA. Abs. No.44* (1978).
 - 42) Helga, G.: Beta-carotene and smoking. *J. Nutr., Growth Cancer* **4**, 45 (1987).
 - 43) Stich, H.F., Hornby, H.P. and Dunn, B.P.: Beta-carotene levels in exfoliated mucosa cells of population groups at low and elevated risk for oral cancer. *Int. J. Cancer* **37**, 381 (1986).
 - 44) Majumdar, S.K., Shaw, G.K. and Thomson, A.D.: Blood β -carotene status in chronic alcoholics; A good biochemical marker for malnutrition. *Drug Alcohol Depend.*, **12**, 111 (1983).
 - 45) Norman, J.T. and Tapan, K.B.: Does beta-carotene prevent cancer? A critical appraisal. *Nutr. R.*, **8**, 685 (1988).
 - 46) Michael, A., Harold, N. and Richard, G.M.: Oral beta-carotene can increase the number of OKT4-cells in human blood. *Immunol. L.*, **9**, 221 (1985).
 - 47) John, R., Philip, S. and Paul, A.: Human tumour-induced inhibition of interferon action *in vitro*: Reversal of inhibition by β -carotene(provitamin A). *Cancer Immuno. Immunother.*, **16**, 189 (1984).
 - 48) Bendich, A. and Shapiro, S.S.: Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. *J. Nutr.*, **116**, 2254 (1986).
 - 49) Schwartz, J. and Shklar, G.: Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene algae extracts. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **45**, 510 (1987).
 - 50) Gerald, S. and Joel, S.: Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alpha-tocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract. *Eur J. Cancer Oncol.*, **24**, 839 (1988).
 - 51) Reed, N.D., Crowle, P.K. and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. *B. Sordet ed. Karger Baselip* p.184 (1984).
 - 52) Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.: Detection of complete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell egg albumin antigen unit.

- Brit. J. Exp. Path.*, **35**, 472 (1954).
- 53) Stavitsky, A.B.: Micro methods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).
- 54) Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to S-RBC in mice. *Immunol.*, **38**, 577 (1979).
- 55) Sugimoto, M., Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 32 (1975).
- 56) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussclorf, D.H.: *Methods in Immunology*, **3**, 499 (1980).
- 57) Elliott, B.E. and J.S. Haskill.: Characteristics of thymus-derived bone marrow-derived rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973).
- 58) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* **17**, 5 (1973).
- 59) Kiessling, R., Kleing, E. and Wigzell, H.: Natural killer cell in mouse. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 112 (1975).
- 60) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B.N.: Etude quantitative de l'activite granulopexique du systeme reticuloentherial chez la souris. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 43 (1954).
- 61) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 6th ed., Iowa State University Press, Iowa, p. 1 (1967).
- 62) Wheeler, A.G., Dansby, D., Ha-wkins, H.C., Payne, H.G. and Weikel, J.H.: A toxicologic and hematologic evaluation of cyclophosphamide in experimental animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **4**, 324 (1962).
- 63) Chung, Z.G.: The effect of panax ginseng extract on the immunosuppressed mice by retinoic acid. *Dept. Pharm. Won Kwang Univ. Graduate School* (1989).
- 64) Vaughn, W.P., Wilcox, P.M., Alderson, P.D. et al.: Hepatic toxicity of adjuvant chemotherapy for carcinoma of the breast. *Med. Pediatr. Oncol.*, **7**, 315 (1979).
- 65) Chung, H.T., Ha, T.Y. and Chung, D.H.: Histological changes of mouse spleen and lymph node by cyclophosphamide. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **13**, 55 (1978).
- 66) Stockman, G.D., Heim, L.R., South, M.A. and Trentin, J.J.: Differential effects of cyclophosphamide on the band T-cell compartments of adult mice. *J. Immunol.*, **110**, 277 (1973).
- 67) Wachsmuth, E.D.: In *Advances in Pharmacology and Therapeutics II*, Pergamon Press, Oxford and New York, **5**, 7 (1982).
- 68) Cohen, B.E. and Cohen, I.K.: Vitamin A adjuvant and steroid antagonist in the immune response. *J. Immunol.* **111**, 1376 (1973).
- 69) Ha, T.Y. and Chung, H.T.: Effect of cyclophosphamide on humoral and cellular immune response in mice. *J. Kor. Med. Assoc.*, **20**, 985 (1977).
- 70) Ahn, Y.K., Kim, J.H., Lee, S.K. and Kim, H.S.: The effect of eicosapentaenoic acid on the immune response in mice(I). *Yakhak Hoeji* **33**, 20 (1989).
- 71) Back, J.E. and Dardenne, M.: Antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972).
- 72) Ahn, Y.K., Kim, J.Y. and Kim, J.H.: Effect of vitamin A on the immune response in mice. *Yakhak Hoeji* **36**, 347 (1987).
- 73) Zembala, M. and Asherson, G.L.: The effect of cyclophosphamide and irradiation on cells which suppress contact sensitivity in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, **23**, 554 (1976).
- 74) Roellinghoff, M., Powitz, A.S., Pfizenmaier, K. and Wagner, H.: Cyclophosphamide sensitive T-lymphocytes suppress the *in vitro* generation of antigen specific cytotoxic T-lymphocytes. *J. Immunol.*, **112**, 564 (1974).
- 75) Hanna, N. and Fidler, I.J.: Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 801 (1980).
- 76) Harmon, R.C., Clark, E.A.O., Toole, G. et al.: Resistance of H-2 heterozygous mice to parental tumors. I. Hybrid resistance and natural cytotoxicity to EL 4 are controlled by the H-2D-Hh-I region. *Immunogenetics* **4**, 601 (1977).
- 77) Kiessling, R., Petrany, G., Klein, G. et al.: Non-T-cell resistance against a mouse Moloney lymphoma. *Int. J. Cancer* **17**, 272 (1976).
- 78) Petrany, G., Kiessling, R., Povey, S. et al.: The genetic control of natural killer cell activity and its association with *in vivo* resistance against a

- Moloney lymphoma isograft. *Immunogenetics* 3, 15 (1976).
- 79) Kiessling, R., Petrany, G., Klein, G. *et al.*: Genetic variation of *in vitro* cytolytic activity and *in vivo* rejection potential of non-immunized semisyngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int. J. Cancer* 151 (1975).
- 80) Hanna, N.: Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice in correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 26, 675 (1980).
- 81) Hanna, N. and Burton, R.C.: Definitive evidence that natural killer(NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J. Immunol.*, 127, 1754 (1981).
- 82) Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J. and Starkey, J.R.: Role of NK cells in tumor growth and metastases in beige mice. *Nature* 284, 622 (1980).
- 83) Hambach, A., Stiller-Winkler, R., Oberbarnscheidt, J. and Ewers, N.: Sind suppressor T-zellen die primären ziellen der immunotoxischen wirkungen von blei? *Zbl. Bart. Hyg.*, 1. Abt. Orig. B. 178, 361 (1983).
- 84) Coggins, P.R., Randin, R.G. and Eisman, S.H.: Clinical evaluation of a new alkylating agent: (cyclophosphamide). *Cancer* 13, 1254 (1960).
- 85) Nuguid, T.P. and Bacon, H.E.: Management of inoperable caranoma with particular reference to the use of cytoxan; preliminary report. *Dis. Colon. Rectum* 4, 62 (1961).
- 86) Wall, R.L. and Conrad, F.G.: Cyclophosphamide therapy; its use in leukemia lymphoma and solid tumors. *A.M.A. Arch. Internal Med.*, 108, 456 (1961).