

암유발생쥐에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 사이토카인의 생산에 미치는 염화아연의 영향

채 병 숙[#]

우석대학교 이공대학

(Received August 9, 2001; Revised September 17, 2001)

Effects of Zinc Chloride on the Lipopolysaccharide-induced Production of Cytokines in Tumor-bearing Mice

Byeong Suk Chae[#]

College of Science and Engineering, Woosuk University, Samrae-Up, Chonbuk, 565-701, Korea

Abstract — To determine effects of zinc on lipopolysaccharide (LPS)-induced production of proinflammatory cytokines and lymphokines in tumor-bearing ICR mice, this study has been investigated. Zinc chloride (Zn) at doses of 1 mg/kg was administered orally 30 minutes before *i.p.* injection of LPS (8 mg/kg) 5 times for 7 days. LPS greatly increased tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , in both serum and splenic supernatants compared with those in controls. However, Zn strongly decreased LPS-increased production of TNF- α and IL-1 β in splenic supernatants compared with those in controls and insignificantly also reduced in serum. LPS insignificantly decreased IL-2 levels in splenic supernatants compared with those in controls but significantly increased interferon (IFN)- γ levels. Zn didn't affect IL-2 production in splenic supernatants compared to controls but significantly enhanced the LPS-decreased production of IL-2. Zn significantly increased IFN- γ levels in splenic supernatants compared to controls and did not affect the LPS-increased production of IFN- γ . These findings suggest that Zn may strongly attenuate the LPS-induced pathogenesis of proinflammatory cytokines in tumor-bearing state and significantly up-regulate the LPS-induced function of T cells to produce IL-2 with maintaining normally the LPS-increased levels of IFN- γ .

Keywords □ Zinc, lipopolysaccharide, interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α , IL-2, interferon- γ , tumor-bearing mouse

아연은 면역활성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다.^{1,2)} 그러나 아연이 결핍되었을 때 감염에 대한 과민증이 상승되며 암에 대한 감시능력이 저하된다. 아연결핍은 인체 및 실험동물에서 T cell 및 B cell의 기능, natural killer(NK) cell의 활성화 및 T cell 증식을 활성화시키는 macrophage의 능력 등을 저하시켰고, *in vitro*에서 비장세포로부터 interferon (IFN)- γ 생산에 장애를 가져왔으며, 흰쥐에서 methyl-

benzyl-nitrosoamine에 의해 유도된 식도암을 촉진시켰다.³⁻⁵⁾ 아연이 결핍된 사람이나 암환자에서 T helper (Th) 2 cell보다 오히려 Th 1 cell의 기능 저하가 초래되었고, interleukin(IL)-2와 IFN- γ 의 생산, NK cell의 활성화 등이 감소되었다.⁶⁾ 아연은 *in vitro*에서 Th1 cell을 활성화시켜 IFN- γ 및 IL-2 생산을 증가시켰고,^{2,7)} IL-2 gene expression을 촉진시켰으며,⁸⁾ 암환자의 생존율을 증가시켰다.⁹⁾ 또한 아연은 억제된 NK cell 활성을 촉진시켰고,¹⁰⁾ human peripheral blood NK cell에 의한 IFN- γ 생산을 증가시켰다.¹¹⁾

Lipopolysaccharide(LPS)는 T-independent antigen으로써 macrophage를 강력하게 활성화시켜 tumor

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 063-290-1426 (팩스) 063-290-1424

E-mail: cbse@core.woosuk.ac.kr

necrosis factor(TNF)- α 및 IFN- γ 를 포함한 여러 cytokine을 유리시켜 중양의 용혈성 괴사 및 항암작용을 갖지만,¹²⁾ *in vitro*에서 trinitrophenyl-SRBC(sheep red blood cell)에 대한 Th cell의 활성을 억제하였다.¹³⁾ 또한 LPS는 그람음성균의 내독소로써, TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine의 과량생산을 유도하여 여러 병태생리적 현상을 유발한다.¹⁴⁾ 특히 암을 이식시킨 동물이 LPS의 치사효과에 대하여 더 과민한 것으로 나타났으며,^{15,16)} 암환자는 LPS에 의해 용량의존적으로 TNF- α 및 IL-6의 유리가 증가되었다고 보고되었다.¹⁷⁾

그런데 아연은 LPS로 유도되는 여러 병리적 현상에 대하여 보호작용을 갖으며, 이와 같은 보호효과는 아연이 LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokine의 효과 또는 생산 등을 저하시키는 것과 유관한 것으로 많은 연구가 이루어져 왔다. 아연은 IFN- γ 에 의해 자극된 keratinocyte의 TNF- α 유리를 감소시켰고,¹⁸⁾ TNF- α 에 의해 유도된 barrier dysfunction을 저하시켰으며,¹⁹⁾ 아연에 의해서 유도된 metallothionein은 TNF- α 에 대한 보호작용을 갖는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ 또한 아연은 환경에서 LPS에 의해 유도된 말초염증에서 증가된 IL-1 β 의 생산 및 염증초기의 과민증 등을 용량의존적으로 감소시켰다.²¹⁾ 그러나 이와는 반대로, 아연은 *in vitro*에서 LPS에 의해 유도된 IFN- γ 생산을 현저하게 증가시키지만, TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 유의성 있게 증가시켜 LPS로 인한 잠재적 위험성을 높인다고 Driessen 등²²⁾과 Wellinghausen 등²³⁾은 보고하였다.

암환자는 식욕부진으로 초래되는 영양결핍으로 인해 아연결핍증이 초래될 수 있으며, 더구나 아연의 혈중 농도가 낮게 나타났다.^{24,25)} 따라서 저자는 암진행상태에서 LPS와 함께 아연을 투여하면 LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokine의 병태생리학적 효과가 저하되면서 암에 대한 감시 및 면역증강작용에 있어서 중요한 역할을 하는 IL-2 및 IFN- γ 의 생산이 상승될 것으로 사료되었으나, 이에 대한 연구가 거의 이루어지지 않아서 본 실험을 실시하였고, 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물 - 생후 6주령 체중 17~21 g의 수컷 ICR

생쥐를 대한실험동물센터(충북 음성 소재)에서 분양받아 시판사료(제일사료 제품: 조단백질 22.5%이상, 조지방 35%이상, 조섬유 7.5%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.7%이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후 10마리를 1군으로 하고, sarcoma 180(1×10^5 cells/mouse)는 약물투여 10일 전에 복강에 이식시켰으며, 정상생쥐 1군(normal group)과 sarcoma 180이 이식된 4군(control, Zn투여군, LPS투여군 및 Zn와 LPS병용투여군)으로 나누어 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 50~60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 7일간 사육하였다.

Lipopolysaccharide(LPS)용액의 조제 및 투여 - LPS(*Escherichia coli* Serotype 0127:B8, Sigma Co., Ltd., U.S.A.)를 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 8 mg을 2일 투약 후 1일 휴약식으로 7일간 5회 일정한 시각에 복강내 주사하므로써 염증의 간헐적 지속상태를 유도하였고, 정상군과 대조군은 약물을 제외한 주사용 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

Zinc chloride(Zn)용액의 조제 및 투여 - ZnCl₂(Zn: Sigma Co., St. Louis, M.O., U.S.A.)을 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 1 mg을 LPS 투여 30분 전 7일간 5회 경구투여하였다.

항원조제 - 면양적혈구(sheep red blood cells: SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 용성면양의 경동맥으로부터 heparin처리한 주사기로 혈액을 취한 후 동량의 Alserver's 완충액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 phosphate-buffered saline(이하 PBS: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A., pH 7.4)로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution(이하 HBSS: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다.

면역 - 원심세척한 SRBC를 Reed 등²⁶⁾의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10^8 cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml(1×10^7 cells)를 각 실험 4일전에 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였다.

혈청의 분리 - TNF- α 와 IL-1 β 의 혈중농도를 측정하기 위하여 마지막 약물투여 3시간 후 생쥐의 심장에서 혈액을 채취하여 실온에서 2시간 동안 응고시킨 후, 2000×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 -70°C에서 보존하여 사용하였다.

비장세포 부유액의 조제 및 cytokine의 유도 - 비장을 정상 및 암유발 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 빙냉의 minimum essential medium(MEM: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하여 비장세포를 유리시키고, 4°C 400×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거 후 37°C의 0.83%(w/v) ammonium chloride 용액에 부유시켜 3분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 이 비장세포 부유액은 한냉 PBS로 4°C에서 3회 원심세척한 후, 비장세포수 1×10^6 cells/ml가 되도록 RPMI-1640 complete medium(10% fetal bovine serum, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM HEPES buffer 및 2 mM sodium pyruvate 함유)에 부유시켰다. 또한 매 실험때 마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 시킨 다음, 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정 후 그 백분율을 계산하였다.

비장세포 부유액 100 µl(1×10^6 cells/ml)을 96 well plate에 분주하고, TNF-α 및 IL-1β의 생산을 유도하기 위하여 RPMI-1640 complete medium에 녹인 최종농도 1 µg/ml인 LPS(*Escherichia coli* Serotype 026:B6, Sigma Co., Ltd., U.S.A.)를 mitogen으로 사용하였고, IL-2 및 IFN-γ의 생산을 유도하기 위해서는 최종농도 1.8 µg/ml인 concanavalin A(Con A: Sigma Co., Ltd., U.S.A.)로 자극하였다. 그런 다음 37°C 5% CO₂ incubator(Forma, U.S.A.)에 24시간 배양하였으며 상층액을 취하여 사용하기 직전까지 -70°C에 저장하였다.

Cytokine의 측정 - 혈청 및 비장세포 배양액 중 cytokine의 농도는 ELISA kit(R & D systems Inc., M.N., U.S.A.)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 실시하였고, ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 2배수로 흡광도를 측정하여 각 결과는 m²당 picogram 단위에서 정량하였다.

통계학적 분석 - 모든 자료는 means ± standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 students' *t*-test로 행하였다.

실험결과

Sarcoma 180 cell을 이식시킨 ICR 생쥐에 있어서 LPS에 의해 유도된 혈청 및 비장세포 배양액 중에서의 proinflammatory cytokine 생산 및 비장세포 배양액 중 lymphokine의 생상에 미치는 Zn의 영향에 대한 실험결과는 다음과 같다.

LPS에 의해서 유도된 TNF-α 생산에 미치는 Zinc의 영향 - 암유발 생쥐대조군의 TNF-α 농도는 정상군에 비해 혈청 및 비장세포 배양액에서 둘 다 유의성 있게 증가되었다. 암유발 생쥐들 중에서의 실험결과에 의하면, LPS투여군은 대조군에 비해 TNF-α의 농도가 혈청에서는 평균 66배까지 그리고 비장세포 배양액에서는 평균 40.0%까지 유의성 있게 증가되었다. Zn투여군은 대조군에 비해 TNF-α 농도가 혈청 및 비장세포

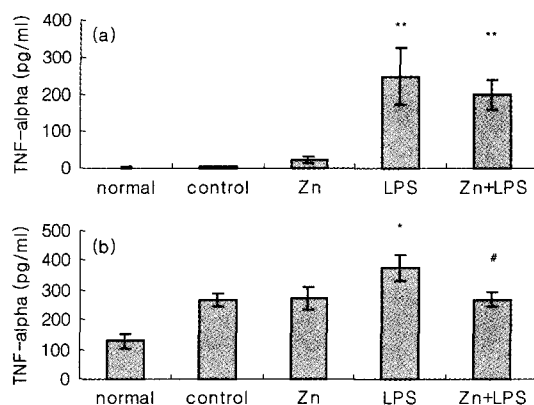


Fig. 1 - Inhibitory effects of Zinc chloride on LPS-induced production of TNF-α in tumor-bearing mice. All mice except normal group were transplanted with sarcoma 180 cells (1×10^5 cells/mouse) by *i.p.* injection 10 days before material administration. ZnCl₂ (Zn) at 1 mg/kg was administered orally 30 minutes before *i.p.* injection of lipopolysaccharide (LPS) (8 mg/kg) 5 times for 7 days in tumor-bearing mice and normal mice were given vehicle. Mice were immunized *i.v.* with SRBC (1×10^7 cells) 4 days prior to each measurement. The blood was collected from mice 3hrs after administration of the last LPS. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by mitogen LPS. TNF-α levels in serum (a) and splenic supernatants (b) were obtained using ELISA. Each value represents the mean ± S.E. of 10 mice. *P<0.05 and **P<0.01: Significantly different from the value in control mice. #P<0.05: Significantly different from the value in LPS treatment mice.

포 배양액 둘 다에서 거의 변화가 없었다. 그러나 Zn은 LPS에 의해서 증가된 TNF- α 농도를 혈청에서는 평균 20.4%까지 유의성 없이 감소시켰으며, 비장세포 배양액에서는 현저하게 감소시켜 대조군과 거의 같은 농도를 나타내었다(Fig. 1).

LPS에 의해서 유도된 IL-1 β 생산에 미치는 Zinc의 영향 - Fig. 2에서 보여주는 바와 같이, 암유발 생쥐대조군의 혈청 및 비장세포 배양액 중 IL-1 β 의 농도는 정상군에 비해 거의 차이를 보이지 않았다. 암유발 생쥐들 중에서는, LPS투여군은 대조군에 비하여 IL-1 β 농도가 혈청에서 평균 30배까지 그리고 비장세포 배양액에서는 평균 2.8배까지 각각 증가되었다. Zn투여군은 대조군에 비해 혈청 및 비장세포 배양액에서의 IL-1 β 생산에 있어서 거의 차이를 보이지 않았다. 그러나 Zn은 LPS에 의해 증가된 IL-1 β 농도를 혈청에서는 평균 39.5%까지 그리고 비장세포 배양액에서는 월등히 저하시켜 대조군과 거의 같은 농도를 나타내었다.

LPS에 의해서 유도된 IL-2 생산에 미치는 Zinc의 영향 - Fig. 3에서 보여준 결과는 Con A 자극에 의해 생산된 생쥐의 비장세포 배양액 중 IL-2 농도이다. 암유발 생쥐군의 비장세포 배양액 중 IL-2 농도는 정상군에 비해 약간 감소되었다. 암유발 생쥐들 중에서 보

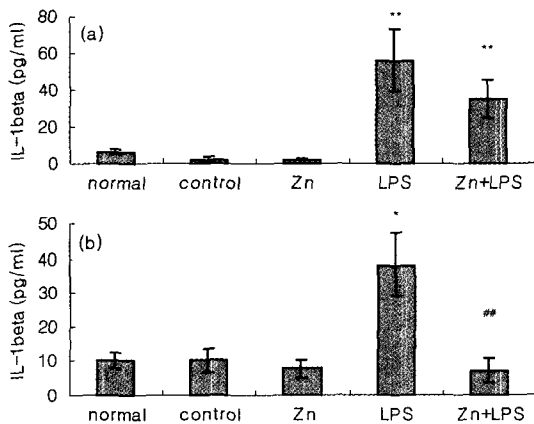


Fig. 2 - Inhibitory effects of Zinc chloride on LPS-induced production of IL-1 β in tumor-bearing mice. IL-1 β levels in serum (a) and splenic supernatants (b) were obtained using ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * P <0.05) and ** P <0.01): Significantly different from the value in control mice. ## P <0.01: Significantly different from the value in LPS treatment mice.

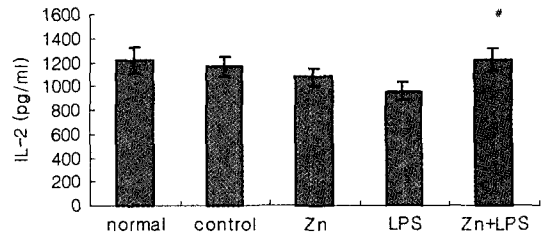


Fig. 3 - Effects of Zinc chloride on LPS-decreased production of IL-2 in tumor-bearing mice. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. IL-2 levels in supernatants were obtained using ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * P <0.05: Significantly different from the value in LPS treatment mice.

여준 결과에 의하면, LPS투여군은 비장세포 배양액의 IL-2 농도가 대조군이 1,163 \pm 83 pg/ml인데 비해 953 \pm 75 pg/ml로 평균 18.1%까지 약간 감소되었다. Zn투여군은 비장세포 배양액의 IL-2 농도가 대조군에 비해 거의 변화되지 않았다. 그러나 Zn은 LPS에 의해 감소된 비장세포 배양액의 IL-2 생산을 평균 128.6%까지 유의성 있게 증가시켜 정상군의 IL-2 농도 수준으로 상승시켰다.

LPS에 의해서 유도된 IFN- γ 생산에 미치는 Zinc의 영향 - IL-2에서와 마찬가지로, Fig. 4에서 보여주는 결과도 Con A 자극에 의해 생산된 생쥐의 비장세포 배양액 중 IFN- γ 농도이다. 암유발 생쥐대조군의 비장세포 배양액 중 IFN- γ 농도는 정상군이 4,240 \pm 126 pg/ml인데 비해 3,917 \pm 111 pg/ml로 유의성 없게 감

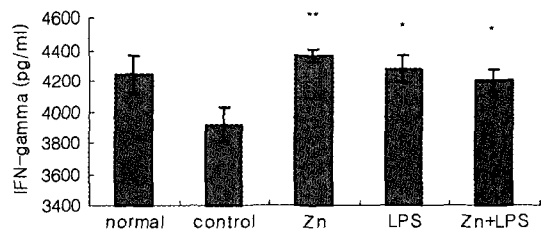


Fig. 4 - Effects of Zinc chloride on LPS-induced production of IFN- γ in tumor-bearing mice. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. IFN- γ levels in supernatants were obtained using ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * P <0.05) and ** P <0.01): Significantly different from the value in control mice.

소되었다. 암유발 생쥐들 중에서 얻어진 결과에 의하면, 비장세포 배양액 중 IFN- γ 농도가 LPS투여군은 $4,273 \pm 88$ pg/ml이고, Zn투여군은 $4,361 \pm 40$ pg/ml으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었으며 더구나 정상군의 결과와 거의 같은 수준에 달하였다. Zn과 LPS병용투여군에서는 비장세포 배양액 중 IFN- γ 농도가 $4,199 \pm 75$ pg/ml으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고, Zn이 비장세포 배양액 중 LPS에 의해 정상으로 회복된 IFN- γ 생산능력에 거의 영향을 주지 않았음을 나타내고 있다.

고 찰

본 실험은 암유발 ICR생쥐에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해서 생산된 TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine과 IL-2 및 IFN- γ 와 같은 lymphokine 등의 생산에 미치는 ZnCl₂(Zn)의 효과에 대해 연구하였고, Zn의 용량은 ICR생쥐에서 체액성 및 세포성 면역기능을 강력하게 증가시켰던 Ahn 등¹⁾의 보고에 의해 ZnCl₂ 1 mg/kg을 경구투여량으로 설정하였다.

본 실험에서 암유발생쥐군은 정상군보다 비장세포 culture supernatant에서 TNF- α 의 농도가 유의성 있게 상승되었으며, IL-2 및 IFN- γ 농도는 감소상태를 보여주었다. 정상상태보다 암유발 상태에서 이런 TNF- α 와 IL-1의 생산은 복강 macrophage로부터 더 증가되며,^{27,28)} *in vitro*에서 IFN- γ 생산능이 감소되었다고 보고되었다.²⁹⁾ 따라서 본 실험에서 암유발생쥐군은 sarcoma 180에 의한 암유발 상태에 있음을 보여준다.

LPS는 macrophage를 강력하게 활성화시켜 TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine을 과량생산하는데, 과량으로 생산된 TNF- α 는 endotoxin에 의해 유도된 septic shock의 주 원인이 되며, IL-1 β 는 고열을 일으키고 septic shock에서 TNF- α 의 치사효과를 상승시킨다.^{14,30)} 특히 암을 이식시킨 동물은 LPS의 치사효과에 대하여 더 과민하며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 암환자에서도 LPS에 의해 용량의존적으로 TNF- α 의 유리를 증가시켰다.²²⁾ 본 연구결과에서, Zn은 암이식으로 인해 증가된 TNF- α 의 생산에는 거의 영향을 끼치지 않았지만, 비장세포에서 LPS에 의해 증가된 TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 강력하게 억제시켰다(Fig. 1 및 Fig. 2). 또한 비록 유의성이 없다할지라도, Zn은 암유발생

쥐의 혈청에서도 LPS에 의해 증가된 TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 억제시켰다. 암진행상태에서 실시된 본 실험결과는 아연이 LPS로 유도된 septic shock으로부터 보호작용을 갖으며,¹²⁾ *in vivo* 및 *in vitro*에서 TNF- α 및 IL-1 β 로 인한 병태생리학적 현상을 저하시킨다^{23,24,27)}는 여러 연구들을 지지하고 있고, 또한 아연이 *in vitro*에서 LPS에 의한 TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 유의성 있게 증가시켰다는 Driessen 등²²⁾과 Wellingshausen 등²³⁾의 보고와 상반됨을 보여주었다. 따라서 Zn은 암진행상태에서 면역조절에 중요한 역할을 하는 TNF- α 및 IL-1 β 생산에는 영향을 주지 않지만, LPS에 의해 강력히 유도된 TNF- α 및 IL-1 β 의 과량생산을 차단하여 LPS로 인한 병태생리학적 작용을 저하시킬 것으로 사료된다.

IL-2는 활성화된 T cell에서 생산되며 T cell의 분화 및 증식에 있어서 중요한 역할을 한다. 본 실험에서, Zn은 Con A 자극에 의한 암유발생쥐의 비장세포에서 IL-2 생산에 거의 영향을 주지 못했지만, LPS에 의해 약간 감소된 IL-2 생산을 정상군의 수준으로까지 유의성 있게 상승시켰다(Fig. 3). 아연은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 Th 1 cell의 기능을 자극하여 IL-2의 생산을 증가시키지만^{3,7)} 단핵구가 고갈된 상태에서 분리된 T cell의 활성을 유도하지 못했으며,³¹⁾ 더구나 Garofago 등³²⁾은 암환자의 말초혈액 림파구의 mitogen에 대한 면역반응이 아연에 의해서 저하되었다고 보고하였다. LPS는 macrophage 활성을 강력하게 유도하지만 *in vitro*에서 Th cell의 활성을 억제하며,¹³⁾ Th 1 cell의 cytokine 생산능력을 감소시키는 것으로 나타났다.³³⁾ 그러나 Mattern 등³⁴⁾은 발암상태에서 LPS가 monocyte 존재하에서 Th cell의 기능을 자극하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험결과에서, LPS는 Th 1 cell의 활성을 억제하는 cytokine의 지배를 받아 IL-2의 생산을 저하시키지만, 암진행상태에서 LPS가 antigen presenting cell(APC)의 작용을 활성화시켜 Th cell의 기능을 자극하므로써 LPS의 Th cell 기능 억제작용과 상반되게 작용하여 LPS 투여로 인한 IL-2 생산이 약간 감소됨을 보여준 것으로 사료되며, 또한 Zn은 암으로 인해 활성이 억제된 monocyte/macrophage로 인해 APC의 기능이 억제되어 Th 1 cell 활성을 유도할 수 없지만 LPS의 APC 활성화 작용에 의해 Zn의 Th 1 cell 기능의 활성화가 유도되어 IL-2 생산을 정상수준이상으로 유의성 있게

회복시킨 것으로 사료된다.

IFN- γ 는 활성화된 T cell, macrophage 및 NK cell에 의해 생산되며 macrophage의 활성을 강화시켜 감염에 대한 저항력이나 발암에 대한 감시능력을 높이는 등 IL-2와 함께 세포성 면역에 있어서 중요한 역할을 한다. 본 실험에서, 암진행상태에서 Zn이 Con A에 의해 자극된 비장세포의 IFN- γ 생산을 IL-2 생산과 비의존적으로 유의성 있게 증가시켰음이 관찰되었다. 이 결과는 아연이 Th1 및 NK cell을 활성화시켜 IFN- γ 생산을 증가시켰다는 연구들^{11,35)}을 지지한다. 또한 아연과 LPS를 병용투여 시 human peripheral blood mononuclear cell 및 whole blood culture에서 IFN- γ 생산을 현저하게 증가시켰다는 Driessen 등²²⁾과 Wellinghausen 등²³⁾의 보고와 다르게 Zn와 LPS 병용투여에 의해서 유도된 IFN- γ 농도는 LPS 단독투여로 인한 IFN- γ 농도와는 거의 차이를 보이지 않았으며 거의 정상군의 수준으로 유지됨을 보여주었다(Fig. 4). IFN- γ 의 과량생산은 오히려 autoimmunity의 유도와 유관한 것으로 알려졌는데,³⁶⁾ 암진행상태에서 Zn은 LPS에 의해 정상 수준으로 회복된 IFN- γ 유리를 과하게 촉진하지 않고 거의 안정적으로 유지시키므로써 정상적 면역기능을 유도하는 것으로 사료된다. 그러나 암진행상태에서 아연과 LPS 병용투여 시 lymphokine 생산에 관한 명확한 기전, Th1/Th2 cell의 균형 및 아연의 용량에 따른 효과를 명확히 밝히기 위해 더 많은 연구가 요구된다.

결 론

Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 암유발 ICR생쥐의 cytokine 생산에 미치는 Zinc chloride(Zn)의 영향에 관하여 실험한 결론은 다음과 같다.

1. Zn은 암유발생쥐에서 암으로 인해 증가된 비장세포에서의 TNF- α 의 생산에는 거의 영향이 없었으나, LPS에 의해 유도된 비장세포의 TNF- α 및 IL-1 β 생산을 유의성 있게 억제시켰다.
2. Zn은 암유발생쥐에서 비장세포의 IL-2 생산에는 거의 영향이 없었지만, LPS에 의해 약간 감소된 비장세포의 IL-2 생산을 유의성 있게 상승시켰다.
3. Zn은 암유발생쥐에서 암에 의해 억제된 비장세포의 IFN- γ 생산을 유의성 있게 증가시켜 정상적으로 회복시켰으며, LPS에 의해 정상적으로 회복된 IFN- γ

의 생산은 거의 영향을 끼치지않았다.

이상의 연구결과, 암이 진행되는 상태에서 Zn은 LPS에 의해 유도되는 proinflammatory cytokine의 병태생리학적 효과를 저하시키고, LPS에 의해 약간 저하된 T cell의 IL-2 생산능을 증가시키며, LPS에 의해 정상적으로 회복된 IFN- γ 생산을 유지시켜 항암효과에 있어서 유효한 세포성 면역기능을 유도할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 우석대학교 학술연구비에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 안영근, 김정훈, 채병속, 차광재 : 염화아연이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 약학회지 **36**(4), 291 (1992).
- 2) Shankar, A. H. and Prasad, A. S. : Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(suppl), 447S (1998).
- 3) Keen, C. L. and Gershwin, M. E. : Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* **10**, 415 (1990).
- 4) James, S. J., Swendseid, M. and Makinodan, T. : Macrophage-mediated depression of T-cell proliferation in zinc-deficiency mice. *J. Nutr.* **117**, 1982 (1987).
- 5) van Rensburg, S. J., du Bruyn, D. B. and van Schalkwyk, D. J. : Promotion of methylbenzyl-nitrosamine-induced esophageal cancer in rats by subclinical zinc deficiency. *Nutr. Rep. Int.* **22**, 891 (1980).
- 6) Prasad, A. S., Beck, F. W., Grabowski, S. M., Kaplan, J. and Mathog, R. H. : Zinc deficiency: changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer subjects. *Proc. Assoc. Am. Physicians (CDQ)* **109**(1), 68 (1997).
- 7) Tanaka, Y., Shiozawa, S., Morimoto, I. and Fujita, T. : Role of zinc in interleukin 2 (IL-2)-mediated T-cell activation. *Scand. J. Immunol. (UCW)* **31**(5), 547 (1990).
- 8) Skerka, C., Decker, E. L. and Zipfel, P. F. : A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins

- Sp1 and EGR-1. *J. Biol. Chem. (HIV)* **270**(38), 22500 (1995).
- 9) Singh, K. P., Zaidi, S. I. A., Raisuddin, S., Saxena, A. K., Murthy, R. C. and Ray, P. K. : Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **14**(4), 813 (1992).
 - 10) Allen, J. I., Perri, R. T., McClain, C. J. and Kay, N. E. : Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J Lab. Clin. Med.* **102**, 577 (1983).
 - 11) Salas, M. and Kirchner, H. : Induction of interferon- γ in human leukocyte cultures stimulated by Zn^{2+} . *Clin. Immunol. Immunopathol.* **45**, 139 (1987).
 - 12) Mannel, D. N., Moore, R. N. and Mergenhagen, S. E. : Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect. immunol.* **30**, 523 (1980).
 - 13) Uchiyama, T and Jacobs, D. M. : Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS); Multifocal effects of LPS-induced suppression of the primary antibody response to a T-dependent antigen. *J. Immunol. U.S.A.* **121**, 2340 (1978).
 - 14) Morrison, D. C. and Ryan, J. L. : Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* **38**, 417 (1987).
 - 15) Moldawer, L. L., Georgieff, M. and Lundholm, K. : Interleukin 1, tumour necrosis factor- α (cachectin) and the pathogenesis of cancer cachexia. *Clin. Physiol.* **7**, 263 (1987).
 - 16) Argiles, J. M. and Lopez-Soriano, F. J. : The role of cytokines in cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* **19**, 223 (1999).
 - 17) Engelhardt, R., Mackensen, A., Galanos, C. and Andreesen, R. : Biological response to intravenously administered endotoxin in patients with advanced cancer. *J. Biol. Response Mod.* **9**(5), 480 (1990).
 - 18) Gueniche, A., Viac, J., Lizard, G., Charveron, M. and Schmitt, D. : Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. *Acta. Derm. Venereol. (OMQ)* **75**(1), 19 (1995).
 - 19) McClain, C., Morris, P. and Hennig, B. : Zinc and endothelial function. *Nutrition (BEU)* **11**(1 Suppl), 117 (1995).
 - 20) Satoh, M., Kondo, Y., Mita, M., Nakagawa, I., Naganuma, A. and Imura, N. : Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction. *Cancer Research* **53**(20), 4767 (1993).
 - 21) Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Kanaa, S., Saade, N. and Woolf, C. J. : Zinc reduces the hyperalgesia and upregulation of NGF and IL-1 beta produced by peripheral inflammation in the rat. *Neuropharmacology (NZZB)* **35**(5), 599 (1996).
 - 22) Driessen, C., Hirv, K., Kirchner, H. and Rink, L. : Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. *Immunology (GH7)* **84**(2), 272 (1995).
 - 23) Wellinghausen, N., Schromm, A. B., Seydel, U., Brandenburg, K., Luhm, J., Kirchner, H. and Rink, L. : Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **157**(7), 3139 (1996).
 - 24) Kristal, A. R., Stanford, J. L., Cohen, J. H., Wicklund, K. and Patterson, R. E. : Vitamin and mineral supplement use is associated with reduced risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **8**, 887 (1999).
 - 25) Magalova, T., Bella, V., Brtkova, A., Beno, I., Kudlackova, M. and Volkovova, K. : Copper, zinc and superoxide dismutase in precancerous, benign diseases and gastric, colorectal and breast cancer. *Neoplasma (NVO)* **46**(2), 100 (1999).
 - 26) 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. Sordetted. Karger Baselip.* p. 184 (1984).
 - 27) Gelin, J., Moldawer, L. L., Lonroth, C., Sherry, B., Chizzonite, R. and Lundholm, K. : Role of endogenous tumor necrosis factor α and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res.* **51**, 415 (1991).
 - 28) Alleva, D. G., Burger, C. J. and Elgert, K. D. : Tumor-induced macrophage tumor necrosis factor-alpha production suppresses autoreactive T cell proliferation. *Immunobiology* **188**(4-5), 430 (1993).
 - 29) Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N. and Matsushima, K. : Regulatory mechanisms for production of IFN-gamma and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J.*

- Immunol.* **154**, 2281 (1995).
- 30) Waage, A. and Espevik, T. : Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor/cachectin in mice. *J. Exp. Med.* **167**, 1987 (1988).
- 31) Wellinghausen, N., Martin, M. and Rink, L. : Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* **27**(10), 2529 (1997).
- 32) Garofalo, J. A., Strong, E., Cunningham-Rundles, S., Erlandson, E., Menendez-Botet, C., Schwartz, M. and Good, R. A. : Serum zinc in patients with epidermoid cancer of the head and neck. *Fed. Proc.* **38**, 713 (1979).
- 33) Lauw, F. N., ten Hove, T., Dekkers, P. E. P., de Jonge, E., van Deventer, S. J. H. and van der Poll, T. : Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after *in vivo* exposure of healthy subjects to endotoxin. *Infection and Immunity* **68**(3), 1014 (2000).
- 34) Mattern, T., Thanhauser, A., Reiling, N., Toellner, K. M., Duchrow, M., Kusumoto, S., Rietschel, E. T., Ernst, M., Brade H. and Flad, H. D. : Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J. Immunol.* **153**(7), 2996 (1994).
- 35) Sprietsma, J. E. : Zinc-controlled Th1/Th2 switch significantly determines development of diseases. *Med. Hypotheses (MOM)* **49**(1), 1 (1997).
- 36) Chantry, D. and Feldmann, M. : The role of cytokines in autoimmunity. *Biotechnol. Ther.* **1**, 361 (1991).