

과량의 아연에 노출된 생쥐의 사이토카인 생산에 미치는 인도메타신의 영향

채병숙* · 신태용*

우석대학교 이공대학, *우석대학교 약학대학

(Received April 12, 2002; Revised June 3, 2002)

Effects of Indomethacin on the Production of Cytokines in Mice Exposed to Excessive Zinc

Byeong Suk Chae* and Tae Yong Shin*

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

*College of Pharmacy, Woosuk University, Samrae-Up, Jeonbuk, 565-701, Korea

Abstract — Zinc plays an important role in immunobiological responses, while excessive zinc attenuates immune functions in a dose-dependent manner. Zinc excess has been reported to increase levels of plasma prostaglandin E₂ (PGE₂), which is known to inhibit production of Th (helper T) 1-associated cytokines and to induce inflammatory responses. Thus, this study was investigated the effects of indomethacin, a potent inhibitor of PGE₂ synthesis, on the proinflammatory cytokine and lymphokine production in ICR mice exposed to excessive zinc. Indomethacin at doses of 5 mg/kg was administered *i.p.* 30 minutes before zinc chloride (Zn) 30 mg/kg orally daily for 10 days. Excessive Zn remarkably increased tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β levels in both serum and splenic supernatants compared with those in controls, while indomethacin significantly reduced the excessive Zn-induced levels of IL-1 β . In serum, excessive Zn significantly decreased the levels of IL-2 and interferon (IFN)- γ compared with those in controls, whereas indomethacin significantly enhanced the excessive Zn-decreased levels of IFN- γ but did not affect the Zn-decreased levels of serum IL-2. In splenic supernatants, All of excessive Zn, indomethacin, and combination of Zn and indomethacin significantly enhanced IL-2 levels compared with those in controls, but indomethacin didn't affect the Zn-induced production of IL-2. These data, therefore, suggest that indomethacin significantly attenuated the *in vivo* and *ex vivo* IL-1 β production increased by excessive zinc and remarkably enhanced the *in vivo* excessive zinc-suppressed production of IFN- γ but not IL-2.

Keywords □ Excessive zinc, indomethacin, IL-1 β , TNF- α , IL-2, IFN- γ , PGE₂

아연은 생체의 필수미량원소이지만, 오염된 식품이나 식수, 공장에서 발생하는 zinc fume, 그리고 건강식품이나 영양제와 같은 질병의 예방이나 치료보조요법의 목적으로 과량의 아연에 노출되므로써, Recommended Dietary Allowance(RDA; 성인남자 15 mg zinc/d)의 10~15배 정도이상의 아연섭취로 독성을 유발한다. 과량의 아연은 위경련, 오심, 구토 등 급성독성증상을 보이고, 보다 장기적인 노출로 철과 구리 이용의 방해작용에 의한 빈혈, 성장장애 및 high density lipoprotein cholesterol 혈중농도 감소 등을 유발한다.¹⁻³⁾

또한 아연은 면역기능에 있어서 중요한 역할을 하지만, 고용량에 의해 용량의존적으로 면역반응이 저하됨이 잘 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾

고용량 아연은 구리결핍, 성장장애, 빈혈과 함께 면역기능 저하를 유발하였고,²⁾ RDA의 20배인 아연이 투여된 남자에서 phytohaemagglutinin에 대한 임파구 증식 저하와 chemotactic migration 및 macrophage의 활성화 등의 감소를 초래하였다.⁷⁾ 고용량 아연은 leukopenia,⁸⁾ 보체의 활성화 차단⁹⁾ 및 natural killer(NK) cell의 cytotoxicity 저하 등을 유발한다.¹⁰⁾ 또한 작업장에서 단기간 많은 양의 zinc fume 흡입은 metal fume fever와 폐에서 proinflammatory cytokine의 국소적 생산에 따른 염증을 유발하며¹¹⁾ zinc oxide는 bronchoalveolar lavage나 폐의 human mononuclear cell에서 TNF- α 및 IL-8 농도를 증가시키는 등^{12,13)} 고용량 아연은 단기간 노출로 염증반응이 유발되는 것으로 나타났다.

한편, PGE₂는 염증이나 발열반응을 일으키고 proinflammatory cytokine의 생산을 증가시키며, 면역억제체로서 Th1 cell에 의한 IL-2, IL-12 및 IFN- γ 생산을 차단하고 Th2 phenotype으로 향

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1426 (팩스) 063-290-1424
(E-mail) cbse@core.woosuk.ac.kr

한 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 알려졌다.^{14,15)} 또한 PGE₂ 합성차단제인 indomethacin은 TNF- α , IL-8 및 recombinant human IL-1 α 와 같은 proinflammatory cytokines 생산을 감소시켜 그들의 병리적 작용으로부터 보호하며¹⁶⁻¹⁸⁾ 억제된 T cell 활성 및 저하된 IL-2 생산을 회복시키는 작용을 갖는데,¹⁹⁾ 이는 PGE₂ 합성을 차단함으로써 면역기능 회복 및 염증에 따른 병리적 효과를 저하시킴을 보여주고 있다.

그런데 Song과 Adham의 보고²⁰⁾에 의하면 과량의 아연은 흰 쥐에서 PGE₂ 혈중농도를 증가시켰다고 보고하였다. 따라서 본 저자는 고용량의 아연이 PGE₂ 생산에 따른 proinflammatory cytokine 과량생산을 초래하여 전신적 병리학적 효과를 유발하며 T11 cell의 기능과 관련한 lymphokine 생산에 변화를 유발하여 면역기능 저하를 가져온다고 사료된다. 그런데 이런 cytokine 과 관련된 고용량의 아연의 효과에 대해서는 단지 zinc oxide fume과 관련된 국소적 proinflammatory cytokine 효과에 대한 연구가 일부 이루어져 있을 뿐 매우 미흡하며, PGE₂ 생산차단으로 고용량의 아연에 의한 proinflammatory cytokine의 과량생산에 대한 보호작용 및 저하된 Th1 cell 기능을 상승시키는 효과가 있을 것으로 사료되었으나 그에 대한 연구가 이루어지지 않았다. 따라서 고용량의 아연에 의한 cytokine 생산에 따른 변화와 그 변화에 미치는 indomethacin의 PGE₂ 합성 차단효과에 대하여 규명하고자 본 실험이 이루어졌고 이에 유의한 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물 - 생후 6주령 체중 17-21 g의 수컷 ICR 생쥐를 대한 실험동물센터(충북 음성 소재)에서 분양 받아 사판사료(제일사료 제품: 조단백질 22.5%이상, 조지방 35%이상, 조섬유 7.5%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.7%이상)로 1 주간 급식시켜 적응시킨 후 10마리를 1군으로 하고 온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50~60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 10일간 사육하였다.

Zinc chloride용액의 조제 및 투여 - ZnCl₂(Zn: Sigma Co., St. Louis, M.O., U.S.A.)을 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg 당 3) mg을 10일간 매일 일정한 시각에 경구투여하였다.

Indomethacin용액의 조제 및 투여 - Indomethacin(Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 5 mg을 Zn 투여 30분 전 10일간 복강내 주사하였다.

항원조제 - 면양적혈구(sheep red blood cells: SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 음성면양의 경동맥으로부터 heparin처리한 주사기로 혈액을 취한 후 동량의 Alserver's 완충액(pH 6.1)을 가하여 4 $^{\circ}$ 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 - 원심 세척한 SRBC를 Reed 등²¹⁾의 방법을 참고하여 HBSS에 1 \times 10⁸ cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml(1 \times 10⁷ cells)를 각 실험 4일전에 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였다.

혈청의 분리 - 마지막 약물투여 3시간 후 생쥐의 심장에서 혈액을 채취하여 실온에서 2시간 동안 응고시킨 다음, 2000 \times g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 -70 $^{\circ}$ C에서 보존하여 사용하였다.

비장세포 부유액의 조제 및 cytokine의 유도 - 비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium(MEM : Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 4 $^{\circ}$ C 400 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거 후 37 $^{\circ}$ C의 0.83%(w/v) ammonium chloride용액에 부유시켜 3분간 정지하여 적혈구를 용해시켰다. 이 비장세포 부유액은 한냉 PBS로 4 $^{\circ}$ C에서 3회 원심세척한 후, 비장세포수 1 \times 10⁶ cells/ml가 되도록 RPMI-1640 complete medium(10% fetal bovine serum, 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin, 1 mM HEPES buffer 및 2 mM sodium pyruvate 함유)에 부유시켰다. 또한 매 실험 때마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method²²⁾로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye용액을 가하여 5분 경과시킨 다음, 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정하고 그 백분율을 계산하였다.

비장세포 부유액 100 μ l(1 \times 10⁶ cells/ml)을 96 well plate에 분주하고, TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 유도하기 위하여 RPMI-1640 complete medium에 녹인 최종농도 1 μ g/ml인 LPS(*Escherichia coli* Serotype 026: B6, Sigma Co., Ltd., U.S.A.)를 mitogen으로 사용하였고, IL-2 및 IFN- γ 의 생산을 유도하기 위해서는 최종농도 1.8 μ g/ml인 concanavalin A(Con A: Sigma Co., Ltd., U.S.A.)로 자극하였다. 그런 다음 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ incubator (Forma, U.S.A.)에 24시간 배양하였으며 상층액을 취하여 사용하기 직전까지 -70 $^{\circ}$ 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 \pm standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 students' t-test로 행하였다.

실험결과

ICR 생쥐에 있어서 과량의 아연에 의해 유도된 혈청 및 비장 세포 배양액 중에서 proinflammatory cytokine 생산 및 비장세포 배양액 중 lymphokine의 생산에 미치는 indomethacin의 영향에 대한 실험결과는 다음과 같다.

과량의 아연에 의해서 유도된 TNF- α 생산에 미치는 indomethacin의 영향 - 혈청 중 TNF- α 농도는 대조군이 2.30 ± 1.50 pg/ml인데 비해 Zn 단독투여군은 13.13 ± 6.36 pg/ml로 약 5.7배 정도 유의성 있게 증가되었고, indomethacin 단독투여군은 검출되지 않았다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 TNF- α 농도가 26.70 ± 9.16 pg/ml로 대조군에 비해 약 11.6배정도 오히려 유의성 있게 증가되었으며 Zn 단독투여군에 비해서는 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 1a).

또한 비장세포 배양액에서, TNF- α 농도는 대조군이 130.78 ± 23.65 pg/ml인데 비해 Zn 단독투여군이 253.59 ± 49.86 pg/ml로 평균 93.9%정도 유의성 있게 증가되었으나, indomethacin 단독투여군은 유의성 있게 변화되지 않았다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 TNF- α 농도가 166.88 ± 62.57 pg/ml로 대조군에

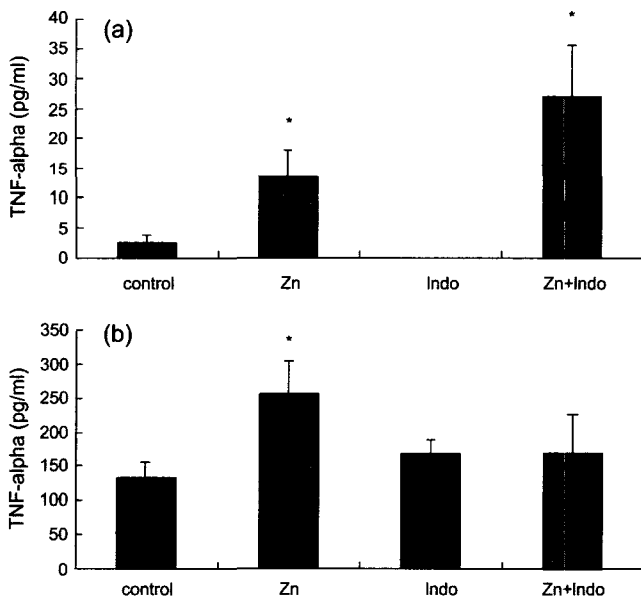


Fig. 1 - Effects of indomethacin on excessive Zn-induced production of TNF- α . Indomethacin (Indo) at doses of 5 mg/kg was administered *i.p.* 30 minutes before zinc chloride (Zn) 30 mg/kg orally daily for 10 days. Mice were immunized *i.v.* with SRBC (1×10^7 cells) 4 day prior to each measurement. The blood was collected from mice 24hrs after administration of the last Zn. Splenic supernatants were harvested 24 hrs post stimulating with mitogen LPS. Cytokine levels in serum (a) and splenic supernatants (b) were obtained using ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. *($P < 0.05$): Significantly different from the value in control mice.

비해 27.6%정도 유의성 없게 증가되었으나, Zn 단독투여군에 비해서는 유의성 없게 감소되었다(Fig. 1b).

과량의 아연에 의해서 유도된 IL-1 β 생산에 미치는 indomethacin의 영향 - 혈청에서의 IL-1 β 농도는 대조군이 6.58 ± 1.39 pg/ml인데 비해 Zn 단독투여군은 26.06 ± 8.87 pg/ml로 평균 4.0배정도 유의성 있게 증가하였고, indomethacin 단독투여군은 약간 감소되었다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 대조군에 비해 IL-1 β 의 농도가 6.85 ± 1.78 pg/ml로 변화가 없었으며, Zn 단독투여군에 비해서는 대조군 수준으로 98.6%정도 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2a).

비장세포 배양액에서 IL-1 β 의 농도는 대조군이 10.56 ± 2.16 pg/ml인데 비해 Zn 단독투여군은 48.36 ± 8.92 pg/ml로 평균 4.6배정도 유의성 있게 증가되었으며, indomethacin 단독투여군은 약간 증가되었다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 IL-1 β 농도가 18.90 ± 8.19 pg/ml로 대조군에 비해 약간 증가되었으나 대조군에 비해 증가된 Zn 단독투여군에 비해서는 약 79.0%정도 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 2b).

과량의 아연에 의해서 유도된 IL-2 생산에 미치는 indomethacin의 영향 - 혈청에서의 IL-2 농도는 대조군이 287 ± 44.92 pg/ml인데 비해 indomethacin 단독투여군은 255 ± 23.99 pg/ml로 거의 변화가 없었으나 Zn 단독투여군 및 Zn와 indomethacin 병용투여군에서는 검출되지 않을 정도로 유의성 있는 현저한 감

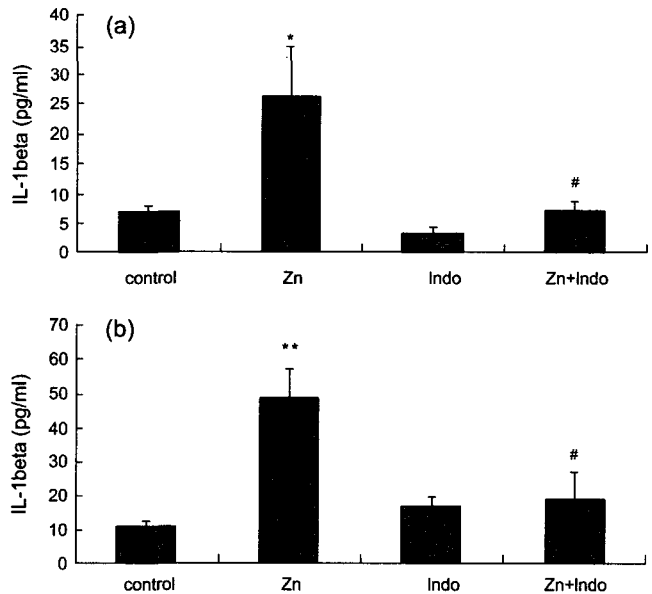


Fig. 2 - Inhibitory effects of indomethacin on excessive Zn-induced production of IL-1 β . Splenic supernatants were harvested 24 hrs post stimulating with mitogen LPS. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. *($P < 0.05$) and **($P < 0.01$): Significantly different from the value in control mice. #($P < 0.05$): Significantly different from the value in excessive Zn treatment mice.

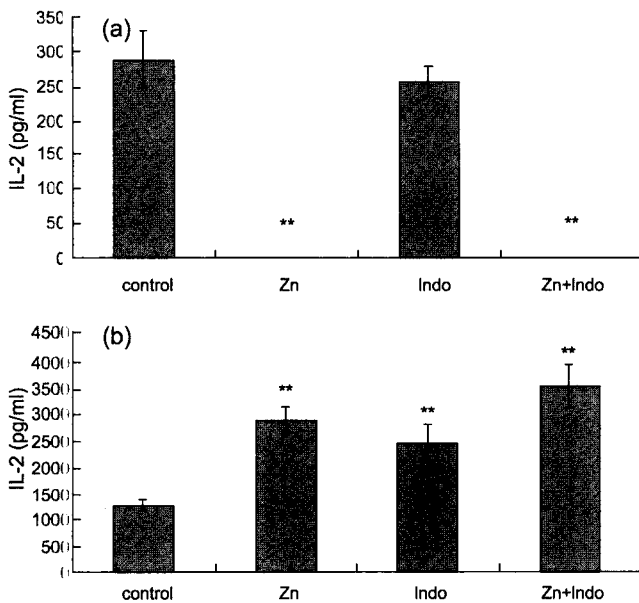


Fig. 3 – Effects of indomethacin on excessive Zn-induced production of IL-2. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. **($P < 0.01$): Significantly different from the value in control mice.

소를 보여주고 고용량 Zn에 의한 IL-2 생산억제에 있어서 indomethacin이 영향을 미치지 못했음을 나타내고 있다(Fig. 3a).

비강세포 배양액 중 IL-2 농도는 대조군($1,260 \pm 112.2$ pg/ml)에 비해 Zn 단독투여군은 $2,872 \pm 289.3$ pg/ml로 2.3배정도 유의성 있게 증가되었고 indomethacin 단독투여군은 $2,423 \pm 380.7$ pg/ml로 유의성 있게 증가되었다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 IL-2 농도가 $3,510 \pm 439.8$ pg/ml로 대조군에 비해 2.8배정도 유의성 있게 증가되었으며 Zn 단독투여군에 비해서도 39.6% 정도 약간 증가되었다(Fig. 3b).

과량의 아연에 의해서 유도된 IFN- γ 생산에 미치는 indomethacin의 영향 – 혈청 중에서 IFN- γ 농도는 대조군이 44 ± 3.27 pg/ml인데 비해, Zn 단독투여군은 20 ± 8.34 pg/ml로 54.5% 정도 유의성 있게 감소되었고 indomethacin 단독투여군은 47 ± 8.67 pg/ml로 변화되지 않았다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 IFN- γ 농도가 280 ± 86.85 pg/ml로 대조군에 비해 6.4배정도 유의성 있게 증가되었으며, Zn 단독투여군에 비해서도 14배정도 유의성 있게 현저한 증가를 보여주었다(Fig. 4a).

비강세포 배양액 중에서 IFN- γ 농도는 대조군이 $4,240 \pm 176.4$ pg/ml인데 비해 Zn 단독투여군 및 indomethacin 단독투여군은 각각 $4,302 \pm 159.5$ pg/ml 및 $4,400 \pm 154.6$ pg/ml로 거의 변화가 없었다. Zn와 indomethacin 병용투여군은 IFN- γ 농도가 $4,213 \pm 185.7$ pg/ml로 대조군에 비해 변화가 없었으며, Zn 단독투여군에 비해 약간의 감소를 보여주었다(Fig. 4b).

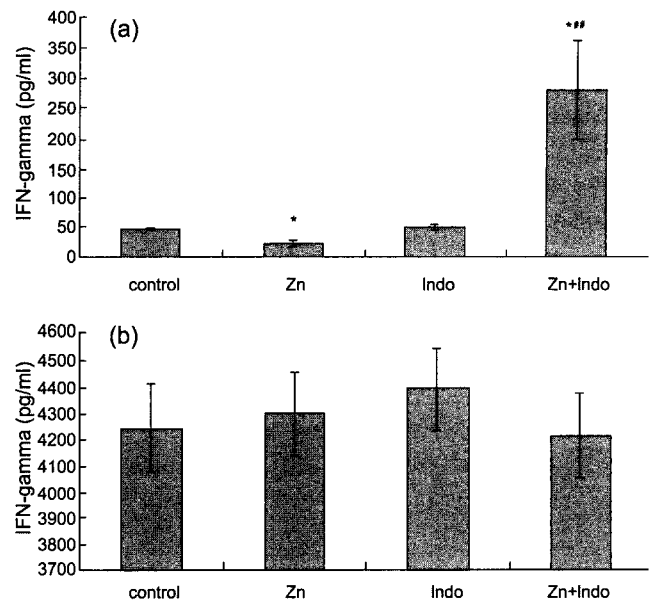


Fig. 4 – Effects of indomethacin on excessive Zn-induced production of IFN- γ . Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. *($P < 0.05$): Significantly different from the value in control mice. **($P < 0.01$): Significantly different from the value in excessive Zn treatment mice.

고 찰

본 연구에서, ICR생쥐에서 TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine과 세포성 면역반응에 중요한 역할을 하는 IL-2 및 IFN- γ 생산에 있어서 고용량 Zn의 영향과 그에 따른 indomethacin의 PGE₂ 차단효과에 대하여 관찰하였다. 본 실험에 사용된 고용량의 Zn은 안 등²³⁾의 보고에 의해 면역독성 용량으로 설정하였고, indomethacin의 용량은 흰쥐에서 LPS로 인해 유도되는 발열반응에 indomethacin 5 mg/kg 복강주사로 효과가 있었다는 Zampronio 등¹⁷⁾의 보고를 참고로 하여 결정하였다.

TNF- α 및 IL-1 β 과량생산은 열을 유발시키고 PGE₂와 함께 염증반응에 있어서 중요한 역할을 하며,²⁴⁾ PGE₂ 차단으로 proinflammatory cytokine의 생산이 저하되어 생존율이 증가된다.²⁵⁾ PGE₂ 합성차단제인 indomethacin은 TNF- α 생산저하작용을 가져 TNF- α 과량생산에 따른 보호효과를 갖는 것으로 알려졌다.^{16,26)} 본 연구결과에서 고용량의 Zn은 경구투여로 인해 혈청 및 비강세포 배양액에서 TNF- α 혈중농도를 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 1). 그런데 indomethacin은 비록 유의성은 없지만 과량의 Zn에 의해 증가된 혈중 TNF- α 생산을 더욱 증가시켰다(Fig. 1a). 이는 zinc oxide가 fume 흡입으로 bronchoalveolar lavage에서 TNF- α 생산을 증가시켰고,¹²⁾ *in vitro* human mononuclear cell에서 TNF- α 및 IL-8 유리를 증가시켰으며,¹³⁾

또한 열, 오한 및 근육통 등 감기증상과 매우 유사한 증상을 보여주는 metal fume fever를 앓고 있는 용접공은 아연의 높은 혈중농도를 보여주었다는 보고^{11,27)}등으로 미루어, 고용량 Zn은 순환계 TNF- α 의 과량생산을 유발하며 이러한 TNF- α 의 과량생산이 zinc fume fever와 유관할 것으로 사료된다. 그런데 본 실험에서 고용량 Zn과 indomethacin 병용투여시 TNF- α 의 농도는 고용량 Zn 단독투여보다 더 높은 결과를 보여주었는데, 이는 PGE₂가 IL-1 생산을 억제하지 않지만 TNF- α 생산을 억제한다는 Scales 등²⁸⁾의 보고를 뒷받침하고 있다. 또한 monocyte/macrophage에서의 TNF- α 분비는 IFN- γ 에 의해서 더욱 촉진된다는 보고^{23,29)}와 indomethacin의 PGE₂ 합성차단에 따른 IFN- γ 생산증가효과³⁰⁾로 미루어, 고용량의 Zn 단독투여보다 고용량의 Zn와 indomethacin의 병용투여에 따른 TNF- α 생산증가는 indomethacin이 PGE₂ 생산을 차단하여 TNF- α 생산의 억제를 막고 IFN- γ 생산을 증진시켜 TNF- α 생산을 약간 촉진시킨 것으로 사료된다.

IL-1 β 는 과량생산으로 고열이 유발되며 PGE₂ 생산 증가를 가져온다. 또한 indomethacin은 IL-1 β 에 의해 유도되는 발열을 차단한다.¹⁷⁾ 본 연구결과에서, 고용량 Zn은 IL-1 β 생산을 유의성 있게 증가시켰으며, 또한 indomethacin은 과량의 Zn에 의해 증가된 IL-1 β 농도를 혈청 및 비장세포 배양액에서 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 2). 이는 아연은 *in vitro* monocyte에서 IL-1 β 의 생산을 자극한다는 보고와,³¹⁾ 혈중 아연의 고농도와 zinc fume fever와의 유관성 등^{11,27)}으로 미루어, IL-1 β 농도증가는 Fig. 1에서 보여준 고용량 Zn에 따른 TNF- α 농도 증가와 더불어 zinc fume fever를 포함한 고용량 아연노출로 고열 등 병리적 현상을 유발할 것으로 사료되며, indomethacin은 고용량 Zn에 의해 유도된 PGE₂의 생산을 차단하여 PGE₂에 의한 IL-1 β 의 생산을 현저히 저하시킨 것으로 사료된다.

PGE₂는 Th1 cell에 의한 IL-2 및 IFN- γ 생산을 차단하여 Th2 cell의 발달을 가져오며³²⁾ macrophage로부터 IL-12 분비를 억제하는 작용을 갖으나,¹⁵⁾ indomethacin은 PGE₂에 의해서 억제된 T cell의 활성화 및 IL-2 생산을 회복시켰다.¹⁹⁾ IL-2에 대한 본 실험결과(Fig. 3a)에서, 고용량 Zn은 IL-2의 혈중농도를 현저히 감소시켜 용량의존적으로 세포성 면역기능을 저하시키며 PHA에 대한 T 임파구 증식을 저하시킨다는 연구들^{4,7,33)}을 지지하고 있지만, indomethacin은 고용량 Zn에 의해 억제된 IL-2 생산에는 영향을 주지 못했다. 따라서 고용량 Zn은 Th1 cell 활성을 저하시켜 *in vivo* IL-2 생산을 억제시키나 PGE₂ 합성을 차단하는 indomethacin이 저하된 IL-2 생산을 회복시키지 못한 것으로 보아, 고용량 Zn에 의한 *in vivo* IL-2 생산과 관련된 Th1 cell 기능 저하에 PGE₂가 크게 영향을 미치지 못함을 보여주고 있으며 그에 대한 명확한 기전을 위해 많은 연구가 요구된다. 다만 비장세포 배양액 중에서는 고용량 Zn이 IL-2 생산을 유의

성 있게 증가시켰는데(Fig. 3b), 이는 혈청에서와 상반된 결과를 나타낸다. 이것은 *in vivo*에서의 결과는 *ex vivo*의 경우보다 내분비계 및 면역과 관련된 보다 복잡한 영향을 받기 때문이며 그 차이에 대한 명확한 기전에 대하여 많은 연구가 뒤따라야 할 것이다.

IFN- γ 는 Th1 cell과 NK cell로부터 유래되는데, Th2 cell 효과를 차단하고 강력한 macrophage 활성화 및 NK cell의 세포독성을 증가시키는 등 다양하고 넓은 면역조절효과를 가지고 있다. PGE₂는 T cell로부터 IFN- γ 생산을 억제하며,^{20,34)} IFN- γ 생산을 촉진하는데 관여하는 IL-12의 분비를 억제하는 작용을 갖으나,¹⁵⁾ indomethacin은 PGE₂ 합성 차단에 따른 IFN- γ 생산을 증가시킨다고 보고되었다.³⁰⁾ 본 실험에서 고용량 Zn은 IFN- γ 혈중농도를 유의성 있게 감소시켰는데 indomethacin은 고용량 Zn에 의해 억제된 IFN- γ 혈중농도를 현저하게 증가시켰다(Fig. 4a). 이는 혈중 PGE₂를 증가시키는 고용량 아연이 T cell 기능 저하, macrophage의 활성화감소 및 NK cell의 cytotoxicity 저하 등을 유발시킨다는 보고로 미루어,^{7,10,33)} 고용량 아연에 의해 생산된 PGE₂는 T cell이나 NK cell의 활성을 억제시켜 혈중 IFN- γ 의 생산저하를 유의성 있게 초래하였으나, indomethacin의 PGE₂ 합성차단효과로 저하된 IFN- γ 생산이 현저히 증가된 것으로 사료된다.

결론

ICR 생쥐에서 과량의 zinc chloride(Zn)에 의해 변화된 cytokine 생산에 미치는 indomethacin의 영향에 관한 실험 결과는 다음과 같다.

1. 과량의 Zn은 혈청 및 비장세포 배양액에서 대조군에 비해 TNF- α 및 IL-1 β 농도를 유의성 있게 증가시켰으나, indomethacin은 과량의 Zn에 의해 증가되는 IL-1 β 농도를 유의성 있게 감소시켰다.

2. 과량의 Zn은 혈청 중에서 대조군에 비해 IL-2 및 IFN- γ 의 농도를 유의성 있게 감소시켰으나, indomethacin은 과량의 Zn에 의해 감소되는 IL-2 농도에는 영향이 없었고 저하된 IFN- γ 농도는 유의성 있게 증가시켰다.

3. 과량의 Zn은 비장세포 배양액에서 대조군에 비해 IL-2 농도를 유의성 있게 증가시켰으나, indomethacin은 과량의 Zn에 의해 증가되는 IL-2 생산에는 영향을 주지 않았다.

이상의 연구결과, 과량의 Zn은 *in vivo* 및 *ex vivo*에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 생산을 유의성 있게 증가시켰으나 indomethacin은 고용량 Zn에 의한 IL-1 β 과량생산을 유의성 있게 감소시켰다. 또한 고용량 Zn에 의해 *in vivo*에서 IL-2 및 IFN- γ 생산이 저하되었으나, indomethacin은 고용량 Zn에 의해 저하된 IFN- γ 생산이 현저히 증가되었다.

감사의 말씀

본 연구는 우석대학교 학술연구비에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

문헌

- 1) Barceloux, D. G. : Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37**(2), 279 (1999).
- 2) Fismire, G. J. : Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 225 (1990).
- 3) Prasad, A. S., Brewer, G. J., Schoemaker, E. B. and Rabbani, P. : Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *JAMA* **240**, 2166 (1978).
- 4) 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).
- 5) Keen, C. L. and Gershwin, M. E. : Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* **10**, 415 (1990).
- 6) Ling, H., Peng, R., Kong, R. and Li, Y. : Effects of high dietary zinc on mice (II)-Influence on growth, blood composition and immune function. *Wei Sheng Yan Jiu* **26**(5), 325 (1997).
- 7) Chandra, R. K. : Excessive intake of zinc impairs immune response. *JAMA* **252**, 1443 (1984).
- 8) Elack, M. R., Medeiros, D. M., Brunett, E. and Welke, R. : Zinc supplements and serum lipids in young adult white males. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**(6), 970 (1988).
- 9) Montgomery, D. W., Chvapil, M. and Zukoski, C. F. : Effects of zinc chloride on guinea pig complement component activity *in vitro*: concentration-dependent inhibition and enhancement. *Infect. Immunol.* **23**, 424 (1979).
- 10) Ferry, E. and Donner, M. : *In vitro* modulation of murine natural killer cytotoxicity by zinc. *Scand. J. Immunol.* **19**, 435 (1984).
- 11) Fuortes, L. and Schenck, D. : Marked elevation of urinary zinc levels and pleural-friction rub in metal fume fever. *Vet. Hum. Toxicol.* **42**(3), 164 (2000).
- 12) Fuschner, W. G., D'Alessandro, A., Wong, H. and Blanc, P. D. : Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environ. Res.* **75**(1), 7 (1997).
- 13) Fuschner, W. G., D'Alessandro, A., Hambleton, J. and Blanc, P. D. : Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 release from U937 human mononuclear cells exposed to zinc oxide *in vitro*. Mechanistic implications for metal fume fever. *J. Occup. Environ. Med.* **40**(5), 454 (1998).
- 14) Bietz, M. and Fox, B. S. : Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* **146**, 108 (1991).
- 15) van der Pouw Kraan, T. C. T. M., Boeije, L. C. M., Smeenk, R. J. T., Wijdenes, J. and Aarden, L. A. : Prostaglandin E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **181**, 775 (1995).
- 16) Kettelhut, I. C., Fiers, W. and Goldberg, A. L. : The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4273 (1987).
- 17) Zampronio, A. R., Sliva, C. A., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H., Pela, I. R. and Souza, G. E. : Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. *Am. J. Physiol* (3U8) **269**(6 Pt 2), 1469 (1995).
- 18) Hashimoto, M., Bando, T., Iriki, M. and Hashimoto, K. : Effect of indomethacin on febrile response to recombinant human interleukin 1-alpha in rabbits. *Am. J. Physiol.* **255**(4 Pt 2), R527 (1988).
- 19) Choudhry, M. A., Ahmad, S. and Sayeed, M. M. : Role of Ca²⁺ in prostaglandin E₂-induced T-lymphocyte proliferative suppression in sepsis. *Infect. Immun.* **63**(8), 3101 (1995).
- 20) Song, M. K. and Adham, N. F. : Relationship between zinc and prostaglandin metabolisms in plasma and small intestine of rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**(6), 1201 (1985).
- 21) Reed, N. D., Crowle, P. K. and Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immunodeficient animals. *B. Sordetted Karger Baselip.* p. 184 (1984).
- 22) Shapiro, H. M. : *Practical flow cytometry* 2nd ed., Wiley-Liss, New York, p. 129 (1988).
- 23) 안영근, 김정훈, 채병숙, 차광재 : 염화아연이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. *약학회지* **36**(4), 291 (1992).
- 24) Long, N. C., Otterness, I., Kunkel, S. L., Vander, A. J. and Kluger, J. : Roles of interleukin 1β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am. J. Physiol.* **28**, 724 (1990).
- 25) Strong, V. E., Mackrell, P. J., Concannon, E. M., Naama, H. A., Schaefer, P. A., Shaftan, G. W., Stapleton, P. P. and Daly, J. M. : Blocking prostaglandin E₂ after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock* **14**(3), 374 (2000).
- 26) Huang, W. T., Lin, M. T. and Won, S. J. : Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Infection and Immunity* **65**(7), 2656 (1997).
- 27) Noel, N. E. and Ruthman, J. C. : Elevated serum zinc levels in metal fume fever. *Am. J. Emerg. Med.* **6**(6), 609 (1988).
- 28) Scales, W., Chensue, S., Otterness, I. and Kunkel, S. : Regulation of monokine gene expression: prostaglandin E₂ suppresses tumor necrosis factor but not interleukin-1 alpha or beta m-RNA and cell associated bioactivity. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 416 (1989).
- 29) Gifford, G. E., Lohmann-Matthess, M. L. : Gamma interferon

- priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J. Natl. Cancer Inst.* **78**, 121 (1987).
- 30) 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).
- 31) Driessen, C., Hirv, K., Rink, L. and Kirchner, H. : Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* **13**(1), 15 (1994).
- 32) Hilkins, C. M., Vermeulen, H., van Neerven, R. J., Snijder, F. G., Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. L. : Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. *Eur. J. Immunol.* **25**, 59 (1995).
- 33) 채명숙, 신태용 : 염화이연의 세포성 면역독성에 미치는 황기추출물의 효과. *약학회지* **43**(1), 98 (1999).
- 34) Shin, H. C., Benbernou, N., Fekkar, H., Esnault, S. and Guenounou, M. : Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8(+) T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Cytokine* **10**(11), 841 (1998).