Kor. J. Food Hygiene 5 (3), 111-120 (1990)

Royal Jelly가 Cyclophosphamide의 免疫 毒性에 미치는 影響

표 명 윤
숙명여자대학교 약학대학

Effects of Royal Jelly on the Immunotoxicity of Cyclophosphamide

Myoung-Yun Pyo
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

ABSTRACT—Effects of royal jelly(RJ) on the immune system in normal and cyclophosphamide(CY)-treated mice were investigated. The results were as following:

1. Body weight, spleen weight, thymus weight, WBC, cell-mediated immunity (CMI, contact hypersensitivity to DNFB), humoral immunity (HI, Hemagglutinin-, Hemolysin-titer) were increased or decreased dependent on the day of administration of RJ in normal mice. But it showed no effect on liver weight and RBC.

2. Combined treatment with RJ in CY-treated mice on the day which RJ showed the increasing activities in normal mice inhibited the decrease of survival rate, body weight, spleen weight, WBC and CMI caused by CY, but no effect on the decrease of thymus weight and HI induced by CY.

Keywords□Immunotoxicity, Cyclophosphamide, Royal Jelly

예로부터 인체에 활력을 주는 등 생리작용이 다양한 신비한 물질로 알려져 건강식품으로 한국에서도 그 수요가 날로 증가되고 있는 roya jelly(이하 RJ라 함)는 여왕벌 및 그 幼蟲을 위한 먹이로서 일벌의 하인두선(hypopharyngeal gland) 및 하악선(mandibular gland)에서 분비되는 물질이다.

RJ는 産地, 채취시기 및 보관방법에 따라 각 성분의 정량적인 차이는 있으나 단백질, 지방, 탄수화물, 무기성분, 비타민 및 10-Hydroxydecenoic acid 등 다양한 성분을 함유하고 있음이 여러 연구를 통해 알려져 있으며,[1-3] 한국 RJ의 일반 성분에 관해서도 本 著者 등[4]이 보고한 바 있다.

또한, RJ는 효소작용,[5] 항균작용,[6] 항종양작용,[7] hormone에 대한 작용,[8] 혈류량 증가작용,[9] 방사선 장해에 대한 延命効果[11] 및 성장촉진작용 등을 나타낸다고 보고되어 있다. 한편, cyclophosphamide (이하 CY라 함)는 임상에서 臟器移植 후 나타나는 거부반응의 억제 및 항암제로 널리 사용되고 있는 약제로서 동물실험조건에 따라 면역반응을 증가 또는 억제시킬 수 있다고 보고[12,13]되어 있다. 그 기전에 대하여는 많은 연구가 이루어져 있으나, 체중감소, 구토, 빈혈, 혈소판 및 백혈구 감소 등 부작용이 심하여 장기적 사용에 어려움을 주고 있는 실정이다.

이와 같이, RJ의 생체기능에 관한 연구는 많이 진행되어 있으나 면역계에 대한 報文은 거의 없다. 그러므로 본 연구에서는 정상 마우스 및 CY로 처리된 마우스에 RJ를 투여하여 면역반응에 대한 RJ의 영향과 CY로 유발된 독성에 대한 RJ의 작용을 실

Received for Publication 2 August, 1990
Reprint request: Dr. M.Y. Pyo at the above address

험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물－체중 20g 안팎의 웅성 ICR 마우스를 구입하여 1주일 이상 동물실에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 중 고형 사료와 물을 충분히 주었다.

Royal Jelly액 및 Cyclophosphamide액 조제－1988년 7월초 경기도 정곡에 있는 농원의 싸리꽃에서 채취한 RJ를 냉동실에 보관하면서 사용하였으며, 마우스 체중 20g당 0.2 ml를 투여할 수 있도록 0.5% CMC-Na액에 현탁시켰다. CY액으로는 Alkyloxan^{R}1 vial(CY 200 mg, NaCl 90 mg 함유)을 멸균 증류수 10 ml에 용해시키고 생리식염수로 희석한 후 즉시 사용하였다.

약물의 투여－대조군 : 항원을 주사한 마우스에 CY 투여일에는 생리식염수를, RJ 투여일에는 0.5% CMC-Na액을 투여하였다. RJ군 : 항원 주사 전 또는 후에 1회(2500 mg/kg) 또는 연속 5일간 1일1회(500 mg/kg) 복강내에 투여하였다. CY군 : 항원을 주사한 다음날에 CY액을 1회 복강내에 주사하였다. CY와 RJ의 병용투여군 : 항원을 주사한 마우스에 CY와 RJ를 각각의 투여일에 주사하였다.

체중 및 장기 중량의 측정－매일 같은 시간에 실험동물의 체중을 측정하여 실험 개시일의 체중에 대한 증감율을 산출하였다. 장기 중량의 변화는 실험 최종일에 실험동물을 치사하여 비장, 흉선, 간장을 적출하고, 그 중량을 측정, 최종일의 체중에 대한 백분율을 구하여 나타내었다.

백혈구 및 적혈구 수의 측정－실험동물의 眼靜脈叢(orbital sinus)에서 heparin 처리한 모세관으로 채혈하여 백혈구 및 적혈구 수를 구하였다.

생존율 실험－CY액(500 mg/kg)을 복강내 1회 주사한 마우스를 대조군으로 하였으며, CY투여 전과 후 각 5일씩 1일1회 RJ 500 mg/kg을 투여한 실험군, CY투여 후 5일간 1일1회 RJ 500 mg/kg을 투여한 실험군, CY 투여 후 1회 RJ 2500 mg/kg을 투여한 실험군을 대조군과 동일 조건 하에서 사육하면서 30일간 생존율을 비교 관찰하였다.

접촉성 과민반응(Contact hypersensitivity)－접촉성 과민반응은 Phanuphak 등[14]의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, Clipper와 면도기를 사용하여 약 3 cm^2 정도 털을 제거한 마우스 복벽에 0.5% 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene(이하 DNFB라 함) 액 25 μl씩을 2일간 1일1회 점적하여 감작(sensitization)시켰으며, 마지막 감작 4일 후에 0.2% DNFB액 20 μl을 마우스 귀의 등쪽 면에 고루 도포하여 야기(challenge)시켰다. 耳腫脹値(ear swelling)는 Mitutoyo engineer's micrometer를 사용하여 야기시킨 후 24, 48, 72, 92 hr에 각각 귀의 동일 부위를 3회씩 측정하고, 각각의 평균치에서 기저치(최종 감작 후 4일 동안 동일부위를 3회 측정한 값의 평균치)를 빼어 산출하였다.

적혈구 응집소가(Hemagglutinin titer ; HA titer), **2-mercaptoethanol 내성 응집소가**(ME-HA titer) **및 용혈소가**(Hemolysin titer ; HL titer)－Herrlinger[15]와 Subba Rao 등[16]의 방법에 준하여 HA, ME-HA 및 HL titer를 측정하였다. 즉, 웅성 면양의 경동맥으로부터 heparin 처리한 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver's solution(pH 6.7)을 가하여 4℃에 보관하면서 2주 이내에 항원으로 사용하였다. 사용 직전에 이 면양 적혈구(sheep red blood cells ; SRBC)를 멸균생리식염수로 3회 원심분리하여 세척한 후 4×10^8/ml의 농도로 희석하여 그 부유액 0.2 ml를 실험동물의 마우스 복강내에 주사하여 면역(immunization)시켰다.

비활성화 혈청(inactivated serum)은 항원 주사 후 제 6일에 마우스의 경동맥을 절단하여 채취한 혈액에서 분리한 혈청을 56℃에서 30분간 방치함으로써 혈청중의 보체(endogenous complement)를 비활성화시켜서 얻고, 이를 응집소가 및 용혈소가 측정에 사용하였다.

HA titer는 실험동물에서 얻은 개개의 비활성화 혈청을 microtitation tray(Nunclon microtest tray)의 첫번째 well에서 25 μl 점적하여 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 2배 계열 희석하였고, 세척한 SRBC(2×10^8/ml) 25 μl을 각 well에 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 보온한 후 적혈구 응집 여부를 관찰하였다. 즉, 50% 이상 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 $\log_2$로 나타내어 그 혈청의 응집소가로 하였다. ME-HA titer의 측정은 HA titer

측정방법과 동일하나, 다만 2배 계열 희석하기 전에 PBS용액으로 희석한 0.15 M-ME액과 비활성화 혈청을 1 : 1로 혼화하여 37℃에서 30분간 방치하여 ME로 처리하였다.

HL titer는 HA titer 측정시와 같은 방법으로 비활성화 혈청을 희석하고 SRBC를 첨가한 각 well에 PBS액으로 20배 희석한 gunia pig serum을 25 μl씩 가한 다음 37℃에서 1시간 방치하여 50%이상 용혈을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 측정하여 $\log_2$로 나타내었다.

통계적 처리－모든 실험결과치의 유의성 검증은 Student's t-test로 실시하였다.

결과 및 고찰

생존율에 미치는 영향－Table 1은 Balb/c의 LD_{50}[13]에 해당하는 CY액 500 mg/kg을 복강내 주사한 마우스에 RJ를 투여하여 30일간의 생존율을 관찰한 것이다. CY주사 전과 후 각 5일간 1일1회 RJ 500 mg/kg을 투여한 실험군의 생존율은 75%, CY 주사 후 5일간 1일1회 RJ 500 mg/kg을 투여한 실험군과 CY주사 후 1회 RJ 2500 mg/kg을 투여한 실험군은 65%을 나타내어 RJ를 투여하지 않고 CY만을 주사한 대조군의 60%에 비해 RJ 투여군의 생존율이 약간 증가되는 경향을 나타내었다. 이 결과는 吉崎宏[11]가 마우스에 X선 500r를 전신 조사한 직후 RJ를 투여하여 보고한 延命効果와 비슷하다.

체중에 미치는 영향－마우스의 복강내에 CY, RJ를 병용투여한 후 체중의 변화를 관찰하여 나타낸 Table 2에서 보면, CY를 용량별로 1회 주사한 마우스의 체중은 대조군에 비해 투여량이 높아짐에 따라 유의적으로 크게 감소하였다. RJ를 단독 투여하였을 때에는 투여일에 따라 차이가 있고, 특히 day 0에 투여했을 때에 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다. 또한, CY와 RJ를 병용투여한 군은 CY 25 mg/kg군에 비해 유의적으로 체중이 증가되었으며, CY 300 mg/kg을 주사한 마우스에 RJ를 연속 5일간 투여한 경우에도 CY독성으로 인한 체중감소가 억제되었다.

장기 중량에 미치는 영향－실험군의 마우스에 CY, RJ 또는 CY와 RJ를 병용투여하여 비장, 흉선 또는 간장의 최종 체중에 대한 백분율을 구하였다(Table 3). CY의 용량이 높아짐에 따라 독성이 강해져, 300 mg/kg을 투여했을 때에는 비장의 체중에 대한 백분율이 0.24± 0.01%($p<0.01$), 흉선이 0.12± 0.02%($p<0.05$)로 대조군에 비해 감소되었다. 이는 Turk 등이 보고한 면역장기에 대한 독성과 일치하는 것이다. 그러나 간장에 대해서는 별로 영향을 나타내지 않았다.

정상 마우스에 투여일을 변화시켜 RJ 2500 mg/kg을 1회 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 비장이 증가되는 현상을 보였고, 특히 day-5 또는 day+1에 투여한 군의 비장은 1.35± 0.45%와 1.02± 12%로 매우 유의적으로 증가되었다. 그러나 흉선의 체중에 대한 백분율은 투여일에 따라 차이를 보여 day-5와 day-3에 1회 투여한 군에서는 유의성은 없

Table 1. Effect of Royal Jelly on survival rate (%) in Cyclophosphamide-treated mcie.

group	administration (i.p.)	days after CY injection										
		1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
CY (500 mg/kg)	day 0	100	95	90	85	75	65	65	60	60	60	60
CY (500 mg/kg)+ RJ (2500 mg/kg)	day 0, day+1	100	100	100	85	85	85	85	85	65	65	65
CY (500 mg/kg)+ RJ (500 mg/kg, ×5) RJ (500 mg/kg, ×5)+	day 0, day+1 ~ +5 day−5 ~ −1,	100	100	100	90	85	75	65	65	65	65	65
CY (500 mg/kg)+ RJ (500 mg/kg, ×5)	day 0, day+1 ~ +5	100	100	100	90	75	75	75	75	75	75	75

Number of mice in each group: 20

Table 2. Effect of Royal Jelly on body weight in normal and Cyclophosphamide-treated mice

group	administration (i.p.)	initial weight (g)	final weight (g)	increase rate (%)
Control	-	23.70±1.02	25.11±1.01	6.24±1.18
CY (12.5 mg/kg)	day+1	24.92±0.40	26.14±0.61	4.89±2.06
CY (25 mg/kg)	day+1	24.67±0.72	26.00±0.78	5.63-1.65
CY (50 mg/kg)	day+1	26.13±0.59	24.46±0.79	1.33±2.14*
CY (100 mg/kg)	day+1	23.54±0.84	23.75±1.06	0.79±2.12*
CY (200 mg/kg)	day+1	24.47±1.58	23.43±1.97	-3.63±3.28*
CY (300 mg/kg)	day+1	22.66±1.03	20.66±1.20	-8.98±2.14**
RJ (500 mg/kg, ×5)	day-5~-1	22.88±1.45	24.53±1.69	7.09±1.09
RJ (2500 mg/kg)	day-5	24.90±2.11	26.90±2.95	7.66±3.30
RJ (2500 mg/kg)	day-3	24.57±0.13	26.03±0.41	5.98±1.79
RJ (2500 mg/kg)	day-1	21.63±1.02	22.23±0.69	3.59±4.36
RJ (2500 mg/kg)	day 0	27.30±0.51	31.07±0.73	13.83±2.46*
RJ (2500 mg/kg)	day+1	25.67±1.27	26.03±1.58	4.24±3.86
RJ (2500 mg/kg)	day+3	28.60±0.38	29.10±0.86	3.21±2.80
RJ (500 mg/kg, ×5)	day+1~+5	23.28±1.62	25.50±2.15	9.29±2.03
RJ (500 mg/kg, ×5)+ CY (300 mg/kg)	day-5~-1, day+1	24.93±1.15	23.93±1.85	-4.38±3.79**
RJ (500 mg/kg, ×5)+ CY (25 mg/kg)	day-5~-1, day+1	22.69±0.86	25.61±1.25	12.67±2.18*#
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day-5, day+1	22.80±0.67	25.05±1.53	9.46±4.63
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day-3, day+1	25.30±0.64	29.10±1.20	13.85±2.44
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day 0, day+1	24.68±0.64	27.41±1.13	10.99±3.99**#
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day+3, day+1	23.59±0.80	25.00±0.86	6.08±1.99
RJ (500 mg/kg, ×5)+ CY (25 mg/kg)	day+1~+5, day+1	26.07±1.54	27.34±1.61	4.99±2.03

Final body weight of mice was measured on day+6.
Control gorup was injected with saline and 0.5% CMC-Na.
Each value is the mean±S.E. of 4-6 mice.
Significant difference from control group (*$p<0.05$, **$p<0.01$)
Significant difference from CY (25 mg/kg) group (#$p<0.05$)

었으나 0.15±0.04%와 0.16±0.03%로 대조군의 0.23±0.02%에 비하여 감소하였고, 그 외의 투여일에서는 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한, RJ 500 mg/kg을 1일 1회 5일간 투여한 실험군(day-5~-1)에서는 흉선의 백분율이 0.09±0.02%로 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. CY와 마찬가지로 RJ도 투여일, 투여방법에 관계없이 간장의 중량에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. CY(25 mg/kg, day+1)로 처리된 마우스에 RJ를 병용투여했을 경우에는 투여일, 투여방법에 따라 약간의 차이를 나타내나, 비장중량이 CY군(0.67±0.03%)에 배해 증가되는 경향을 보여 비장에 미치는 CY의 독성이 RJ로 인하여 억제되었음을 알 수 있었다. 그러나 CY의 흉선중량의 감소에 대한 RJ의 억제 효과는

Table 3. Effect of Royal Jelly on organ weight in normal and Cyclophosphamide-treated mice

group	administration (i.p.)	spleen/b.w. × 100	thymus/b.w. × 100	liver/b.w. × 100
Control	-	0.78 ± 0.05	0.23 ± 0.02	5.88 ± 0.14
CY (12.5 mg/kg)	day + 1	0.65 ± 0.03	0.18 ± 0.04	6.17 ± 0.25
CY (25 mg/kg)	day + 1	0.67 ± 0.03	0.19 ± 0.01	5.72 ± 0.18
CY (50 mg/kg)	day + 1	0.62 ± 0.05	0.22 ± 0.03	6.19 ± 0.30
CY (100 mg/kg)	day + 1	0.66 ± 0.11	0.17 ± 0.03	5.36 ± 0.13
CY (200 mg/kg)	day + 1	0.47 ± 0.08*	0.11 ± 0.04	6.34 ± 0.48
CY (300 mg/kg)	day + 1	0.24 ± 0.01**	0.12 ± 0.02*	5.32 ± 0.29
RJ (500 mg/kg, × 5)	day - 5 ~ - 1	0.63 ± 0.11	0.09 ± 0.02*	5.90 ± 0.30
RJ (2500 mg/kg)	day - 5	1.35 ± 0.45**	0.15 ± 0.04	6.78 ± 1.45
RJ (2500 mg/kg)	day - 3	0.83 ± 0.04	0.16 ± 0.03	5.67 ± 0.03
RJ (2500 mg/kg)	day - 1	0.69 ± 0.09	0.23 ± 0.04	5.56 ± 0.32
RJ (2500 mg/kg)	day 0	0.91 ± 0.27	0.23 ± 0.01	6.01 ± 0.51
RJ (2500 mg/kg)	day + 1	1.02 ± 0.12*	0.21 ± 0.03	5.65 ± 0.31
RJ (2500 mg/kg)	day + 3	0.87 ± 0.17	0.22 ± 0.02	6.24 ± 0.10
RJ (500 mg/kg, × 5)	day + 1 ~ + 5	0.74 ± 0.14	0.27 ± 0.08	5.80 ± 0.21
RJ (500 mg/kg, × 5) + CY (25 mg/kg)	day - 5 ~ - 1, day + 1	0.71 ± 0.05	0.21 ± 0.02	6.60 ± 0.15*##
RJ (2500 mg/kg) + CY (25 mg/kg)	day - 5, day + 1	0.77 ± 0.06	0.23 ± 0.02	6.59 ± 0.27*#
RJ (2500 mg/kg) + CY (25 mg/kg)	day - 3, day + 1	0.81 ± 0.05	0.19 ± 0.02	6.13 ± 0.21
RJ (2500 mg/kg) + CY (25 mg/kg)	day 0, day + 1	0.71 ± 0.03	0.19 ± 0.03	6.85 ± 0.25
RJ (2500 mg/kg) + CY (25 mg/kg)	day + 3, day + 1	0.92 ± 0.07##	0.19 ± 0.02	6.25 ± 0.24
RJ (2500 mg/kg) + CY (25 mg/kg)	day + 1 ~ + 5, day + 1	0.74 ± 0.04	0.16 ± 0.02	6.70 ± 0.30*##

Mice were scrified on day + 6.
Control group was injected with saline and 0.5% CMC-Na.
Each value is the mean ± S.E. of 4 - 6 mice.
Significant difference from control group (*$p<0.05$, **$p<0.01$)
Significant difference from CY (25 mg/kg) group (#$p<0.05$, ##$p<0.01$)

뚜렷하게 나타나지 않았다.

백혈구 및 적혈구 수에 미치는 영향—마우스의 복강내에 CY, RJ 또는 CY와 RJ를 병용투여한 후 순환말초혈액내의 백혈구와 적혈구 수를 측정하였다 (Table 4). CY를 용량별로 1회 주사한 마우스의 RBC수는 대조군과 거의 비슷하였으나, WBC수는 투여량이 높아짐에 따라 독성이 증가되어 대조군에 비해 100 mg/kg에서는 약 16.5%, 200 mg/kg에서는 약 22.4%, 300 mg/kg에서는 약 64.8%($p<0.01$) 감소되었다.

RJ를 정상 마우스에 투여한 군의 RBC수도 대조군과 거의 비슷하여 영향을 미치지 않았다. WBC수는 투여일, 투여방법에 따라 차이를 보여, day 0와 day + 3에 RJ를 투여 했을 때에는 대조군에 비해 현저히 유의적으로 증가(약 51.4%, 21.3%) 되었으나, 연속 5일간 투여시에는 오히려 감소되었다. 또한, CY(25 mg/kg, day + 1)로 처리된 마우스에 RJ를 병용투여한 경우에는 CY의 백혈구에 대한 독성이

Table 4. Effect of Royal Jelly on number of WBC and RBC in normal and Cyclophosphamide-treated mice

group	administration (i.p.)	WBC ($\times 10^3$/mm^3)	RBC ($\times 10^6$/mm^3)
Control	–	4.92±0.34 (0)	9.14±0.20 (0)
CY (12.5 mg/kg)	day+1	4.89±0.19 (−0.6)	9.03±0.23 (−1.2)
CY (25 mg/kg)	day+1	4.56±0.52 (−7.3)	9.30±0.23 (1.8)
CY (50 mg/kg)	day+1	5.55±0.73 (12.8)	8.94±0.54 (−2.2)
CY (100 mg/kg)	day+1	4.11±0.58 (−16.5)	9.37±0.58 (2.5)
CY (200 mg/kg)	day+1	3.82±0.25 (−22.4)	9.62±0.06 (5.3)
CY (300 mg/kg)	day+1	1.73±0.41 (−64.8)**	9.19±0.41 (0.6)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day−5 ~ −1	2.23±0.40 (−54.7)**	8.88±0.52 (−2.9)
RJ (2500 mg/kg)	day−5	4.18±0.39 (−15.0)	9.30±0.23 (1.8)
RJ (2500 mg/kg)	day−3	4.45±1.18 (−9.6)	9.37±0.58 (2.5)
RJ (2500 mg/kg)	day−1	4.26±0.74 (−13.4)	9.71±0.05 (6.2)
RJ (2500 mg/kg)	day 0	7.45±0.40 (51.4)*	8.95±0.54 (−2.1)
RJ (2500 mg/kg)	day+1	4.64±0.81 (−5.7)	9.59±0.74 (4.9)
RJ (2500 mg/kg)	day+3	5.97±0.28 (21.3)	9.62±0.06 (5.3)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day+1 ~ +5	3.55±0.73 (−27.9)	9.17±0.46 (0.3)
RJ (500 mg/kg, ×5)+CY (25 mg/kg)	day−5 ~ −1, day+1	4.34±0.38 (−11.8)	9.82±0.24 (7.4)
RJ (2500 mg/kg)+CY (25 mg/kg)	day−5, day+1	4.67±0.25 (−5.1)	8.93±0.28 (−2.3)
RJ (2500 mg/kg)+CY (25 mg/kg)	day−3, day+1	4.88±0.41 (−0.8)	9.30±0.92 (1.8)
RJ (2500 mg/kg)+CY (25 mg/kg)	day 0, day+1	5.06±0.56 (2.9)	9.17±0.46 (0.3)
RJ (2500 mg/kg)+CY (25 mg/kg)	day+3, day+1	5.14±0.29 (4.5)	9.02±0.26 (−1.3)
RJ (500 mg/kg, ×5)+CY (25 mg/kg)	day+1 ~ +5, day+1	5.00±0.50 (1.6)	8.81±0.27 (−3.6)

Mice were sacrified on day+6.
Control group was injected with saline and 0.5% CMC-Na.
Each value is the mean±S.E. of 4−6 mcie.
The number in parenthesis is percentage of each group to the control group.
Significant difference from control group (*$p<0.05$, **$p<0.01$)
Significant difference from CY (25 mg/kg) group (#$p<0.05$, ##$p<0.01$)

CY군과 유의적인 차이는 없었으나 대체로 감소하는 현상을 보여주었다.

세포성 면역반응에 미치는 영향—Phanuphak 등[14]은 마우스를 DNFB로 감작하고 4일 후 동일한 접촉원(DNFB)으로 야기시켰던 바, 야기 후 6시간까지는 ear swelling을 관찰할 수 없었고, 또한 DNFB에 대한 접촉성 과민반응을 면역혈청으로 정상 마우스에서 이행(transfer)시킬 수 없었다는 보고를 하였다. 그 결과 DNFB에 대한 접촉성 과민반응도 picryl chloride에 대한 과민반응과 마찬가지로 지연형(delayed type)이며 T-lymphocytes가 관여하는 세포성 면역반응(cell-mediated immunity, CMI)임이 밝혀졌다. 본 실험에서도 이 방법으로 마우스를 DNFB로 감작과 야기를 시키고 CY, RJ 또는 CY와 RJ를 병용투여하여 세포성 면역반응에 미치는 영향을 실험하였다(Table 5).

접촉성 과민반응은 보문에 따라 야기 후 24시간[14] 또는 48-72시간[18]에 최고치를 나타낸다고 하여 차이를 보이고 있다. 본 실험에서는 Table 5에서 보는 바와 같이 DNFB로 감작과 야기를 시킨 positive control군은 72시간에서 이종창치의 최고를 나타내고, 96시간에서는 감소하였다. 또한, 이 군은 용매만으로 감작시키고 DNFB로 야기를 시킨 negative control군의 이종창치에 비해 높은 수치를 나타내어

Table 5. Effect of Royal Jelly on contact hypersensitivity to DNFB in normal and Cyclophosphamide-treated mice.

group	administration (i.p.)	ear swelling ($\times 10^{-2}$ mm) 24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Normal	-	-0.09±0.23	0.17±0.30	0.66±0.56	1.00±0.52
Negative control	-	0.89±0.79	1.06±1.33	2.14±0.86	1.81±1.23
Positive control	-	1.86±0.72 (0)	3.28±0.62 (0)	6.03±0.89 (0)	3.78±1.00 (0)
CY (25 mg/kg)	day+2	0.67±0.32 (-64.0)	1.73±0.10 (-47.3)	4.39±0.87 (-27.2)	1.89±0.58 (-50.0)
CY (50 mg/kg)	day+2	0.74±0.60 (-60.2)	1.74±0.10 (-47.0)	3.63±0.58 (-39.8)	2.52±0.04 (-33.3)
CY (100 mg/kg)	day+2	-0.83±0.52 (-144.6)*	0.17±0.40 (-94.8)**	0.84±0.35 (-86.1)**	1.59±0.78 (-57.9)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day-5~-1	1.33±0.51 (-28.5)	2.75±0.55 (-16.2)	3.58±1.16 (-40.6)	2.92±0.93 (-22.8)
RJ (2500 mg/kg)	day-5	0.33±0.47 (-82.3)	2.33±0.49 (-29.0)	2.50±0.51 (-58.5)*	3.08±0.36 (-18.5)
RJ (2500 mg/kg)	day-3	3.94±1.41 (111.8)	5.19±1.23 (58.2)	6.03±1.55 (0)	4.86±1.09 (28.6)
RJ (2500 mg/kg)	day 0	4.46±0.74 (139.8)*	5.22±1.13 (59.2)	5.72±1.11 (-5.1)	4.39±0.37 (16.1)
RJ (2500 mg/kg)	day+3	2.11±0.79 (13.4)	3.56±1.19 (8.5)	4.55±1.67 (-24.5)	2.00±0.96 (-47.1)
RJ (2500 mg/kg)	day+5	1.55±0.60 (-16.7)	3.64±0.87 (11.0)	4.80±1.34 (-20.4)	3.31±0.84 (-12.4)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day+1~+5	0.45±0.19 (-75.8)	2.22±0.97 (-32.3)	2.89±0.68 (-52.1)*	1.78±0.69 (-52.9)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day-3, day+2	1.28±0.55 (-31.2)	1.86±0.91 (-43.3)	2.20±0.23 (-63.5)**#	2.53±0.68 (-33.1)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (100 mg/kg)	day-3, day+2	0.36±0.66 (-80.1)	1.19±0.71 (-63.7)	1.19±0.88 (-80.3)**	1.28±1.19 (-66.1)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day 0, day+2	1.78±0.74 (-4.3)	4.36±0.89 (32.9)	5.94±0.73 (-1.5)	4.20±0.68 (11.1)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (100 mg/kg)	day 0, day+2	-0.08±0.45 (-104.3)	0.50±0.52 (-84.8)*	1.09±0.44 (-81.9)**	1.42±0.66 (-62.4)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day+3, day+2	1.15±0.55 (-38.2)	2.70±0.82 (-17.7)	2.48±0.60 (-58.9)*	2.93±0.58 (-22.5)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (100 mg/kg)	day+3, day+2	-0.17±0.64 (-109.1)	1.25±0.23 (-61.9)*	3.92±1.16 (-35.0)&	3.67±0.52 (-2.9)

Normal group was sensitized and challenged with vehicle alone.
Negative control group was sensitized with vehicle and challenged with 0.2% DNFB.
Positive control and experimental groups were sensitized twice (day 0, +1) with 0.5% DNFB and challenged with 0.2% DNFB on day+5, and the ear swelling was measured 24, 48, 72, 96 hr later.
Each value is the mean±S.E. of 4-6 mice.
The number in parenthesis is percentage of each group to the positive control group.
Significant difference from positive control group (*p‡0.05, **p‡0.01)
Significant difference from CY (25 mg/kg) group (#p‡0.05, ##p‡0.01)
Significant difference from CY (100 mg/kg) group (& p‡0.05, && p‡0.01)

생체내에서 DNFB에 대해 특이적(specific)으로 감작되었음을 확인할 수 있었다.

CY를 DNFB 감작 후 제 1일에 용량별로 투여한 실험군은 시간 경과에 따라 정도의 차이는 있으나 positive control군에 비해 이종창치가 현저히 유의적으로 감소되었으며, 이 억제현상은 CY 투여량이 많아질수록 뚜렷하였다. 이 결과는 항원으로 감작 후 CY를 투여했을 때에는 세포성 면역반응이 억제된다는 보고들과 일치하는 것이다. Table 5에서 보면 RJ 투여와 항원 감작의 시간적 관계가 DNFB에 대한

Table 6. Effect of Royal Jelly on the antibody production to SRBC in normal and Cyclophosphamide-treated mice.

group	administration (i.p.)	HA titer (log_2)	ME-HA titer (log_2)	HL titer (log_2)
Control	-	4.92±0.28 (0)	2.52±0.34 (0)	5.35±0.43 (0)
CY (12.5 mg/kg)	day+1	4.00±0.55 (-18.7)	1.00±1.00 (-60.3)	6.00±0.55 (12.2)
CY (25 mg/kg)	day+1	2.84±0.41 (-42.3)**	0.44±0.22 (-82.5)**	3.68±0.68 (-31.2)*
CY (50 mg/kg)	day+1	0.50±0.50 (-89.8)**	0.00±0.00 (-100.0)	1.25±1.25 (-76.6)**
CY (100 mg/kg)	day+1	0.00±0.00 (-100.0)	0.00±0.00 (-100.0)	0.00±0.00 (-100.0)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day-5~-1	5.00±0.58 (1.6)	2.33±0.33 (-7.5)	6.00±0.58 (12.2)
RJ (2500 mg/kg)	day-5	2.67±0.67 (-45.7)*	1.33±0.33 (-47.2)	1.33±0.33 (-75.1)
RJ (2500 mg/kg)	day-3	3.67±0.88 (-25.4)	1.67±0.33 (-33.7)	5.00±0.58 (-6.5)
RJ (2500 mg/kg)	day-1	2.67±0.33 (-45.7)*	1.33±0.33 (-47.2)	2.00±0.58 (-62.6)**
RJ (2500 mg/kg)	day 0	2.67±1.33 (-45.7)*	1.67±0.33 (-33.7)	2.67±1.45 (-50.1)*
RJ (2500 mg/kg)	day+1	4.00±0.00 (-18.7)	1.00±1.00 (-60.3)	5.00±0.58 (-6.5)
RJ (2500 mg/kg)	day+3	5.00±1.00 (1.6)	1.00±1.00 (-60.3)	4.00±1.16 (-25.2)
RJ (2500 mg/kg)	day+5	5.33±0.88 (8.3)	2.33±0.67 (-7.5)	6.00±0.58 (12.2)
RJ (500 mg/kg, ×5)	day+1~+5	4.25±1.25 (-13.6)	2.50±0.50 (-0.8)	5.25±0.48 (-0.2)
RJ (500 mg/kg, ×5)+ CY (25 mg/kg)	day-5~-1, day+1	2.00±0.82 (-59.4)**	0.00±0.00 (-100.0)	4.25±1.55 (-20.6)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day-5, day+1	2.25±1.32 (-54.3)**	0.75±0.75 (-70.2)	4.00±1.69 (-25.2)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day-3, day+1	3.67±0.67 (-25.4)	1.67±1.67 (-33.7)	5.00±1.53 (-6.5)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day 0 day+1	3.33±0.33 (-32.3)	0.67±0.33 (-73.4)	4.33±1.33 (-19.1)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day+3, day+1	2.50±0.66 (-49.2)**	0.67±0.42 (-73.4)*	3.00±1.22 (-43.9)*
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day+5, day+1	3.00±0.66 (-39.0)**	0.60±0.40 (-76.2)*	4.71±1.06 (-12.0)
RJ (2500 mg/kg)+ CY (25 mg/kg)	day+1~+5, day+1	2.63±0.50 (-46.5)**	0.83±0.40 (-67.1)*	3.00±1.13 (-43.9)*

HA: Hemaglutinin; ME-HA: Mercaptoethanol resistant-HA; HL: Hemolysin; SRBC: Sheep red blood cells Mice were immunized with SRBC on day 0. Titers were assayed on day+6.
Each value is the mean±S.E. of 4-6 mice.
The number in parenthesis is percentage of each group to the control group.
Significant difference from control group (*$p<0.05$, **$p<0.01$)
Significant difference from CY (25 mg/kg) group (#$p<0.05$, ##$p<0.01$)

마우스의 세포성 면역반응에 영향을 미치는 인자로 생각된다. 즉, DNFB로 감작하기 5일 전에 RJ를 1회 또는 연속 투여하였을 때와 감작 후 5일째 RJ를 1회 또는 연속 투여하였을 때에는시간 경과에 따라 다소 차이는 있으나 이종창치가 positive control군에 비해 감소되었다. 그러나 감작하기 3일전 또는 동시에 RJ를 투여하였을 때에는 증가되었고 감작 후 제3일, 5일에 투여했을 때에는 별로 변화되지 않거나 약간 억제되었다. 이러한 현상은 procarbazine을 항원주사 4일 전에 투여했을 때에는 세포성 면역반응이 뚜렷이 억제되고 항원과 가까운 시일에 투여되면 약간 증가되거나 영향을 거의 나타내지 않지만 항원 주사

후에는 다시 억제작용을 나타낸다는 보고[19]와 유사하다. 감작하기 5일 전, 즉, 정지상태에 있는 lymphocytes에 RJ가 접촉하여 나타난 면역억제 작용이 procarbazine과 같이 T-suppressor cell을 활성화시킨 결과인지 또는 다른 기전에 의한 것인지는 연구되어야 할 것 같다.

또한, CY를 25 mg/kg 또는 100 mg/kg 주사한 마우스에 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 보이는 투여일에 RJ를 병용투여하여 CY로 인해 감소된 이종창치와 비교해 보면, 대부분의 실험군에서 CY의 세포성 면역반응 억제가 RJ의 투여로 유의성은 없었으나 약간 감소되는 현상을 나타내었다.

체액성 면역반응에 미치는 영향－적혈구 응집 및 용혈반응은 감작항원(본 실험에서는 SRBC)과 이에 대한 항체와의 특이적인 반응이다. 또한 19S-항체(Ig M)는 2-ME처리에 의해서 작은 단위로 분열되어 응집되는 성질을 잃게 되므로[20] 2-ME 감수성 항체라 하며, 2-ME로 처리한 후 측정된 응집가는 2-ME 내성 항체(Ig G)에 의한 것으로 볼 수 있다. 본 연구에서는 CY, RJ 또는 CY와 RJ를 병용투여한 후 체액성 면역반응에 미치는 영향을 보고자 실험군의 면역혈청의 HA, HL 및 ME-HA titer을 측정하였다 (Table 6).

항원주사 후 제1일에 CY를 주사한 투여군은 대조군에 비해 투여량이 높아짐에 따라 HA, HL 및 ME-HA titer가 유의적으로 감소하여, 항원 후 CY 투여시 체액성 면역반응이 억제되었음을 보고한 논문들과[21,22] 일치하였다. RJ는 항원주사 전 또는 동시에 1회 투여했을 때 대조군에 비해 현저하게 체액성 면역반응을 유의적으로 억제(약 25.4-45.7%)하였고, 항원주사 후 1회 또는 연속 투여하였을 때에는 약간 억제하거나 거의 변화를 주지 않았다. CY (25 mg/kg)과 RJ 병용투여군은 대조군에 비하여 대부분 유의적으로 감소하였으나 CY 투여군에 비해서는 유의한 차를 보이지 않아, CY로 억제된 체액성 면역반응은 RJ의 투여로 인하여 별로 영향을 받지 못한다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년도 문교부 학술연구조성비에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

정상 마우스와 cyclophospamide(CY)로 처리된 마우스에 royal jelly(RJ)를 투여하여 면역계에 미치는 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상 마우스에 RJ를 투여하였을 때에는 대조군에 비하여 마우스의 체중, 비장, 흉선, WBC 수, DNFB에 대한 접촉성 과민반응으로 측정된 세포성 면역반응 및 면양 적혈구에 대한 응집가와 용혈가로 측정된 체액성 면역반응이 투여일에 따라 증가 또는 감소되었고, RBC수와 간 중량은 영향을 받지 않았다.

2. 증가 작용을 보여준 투여일에 RJ를 병용투여함으로써, CY 처리로 인한 마우스의 생존율, 비장의 중량, WBC수 및 세포성 면역반응의 감소가 약간 억제되었으나, CY로 감소된 흉선의 중량 및 체액성 면역반응에는 영향을 나타내지 않았다.

참 고 문 헌

1. 竹中哲夫, 越後多嘉志：ロ-ヤルゼリの 一般化學成分造成, 玉川大學農學部 研究報告 **20,** 71(1980).
2. 竹中哲夫, 八竝一嘉, 越後多嘉志：貯藏中における ロ-ヤルゼリの 品質變化, 日本食品工業學會誌, **33,** 1(1986).
3. Lerker, G., P. Capella, L.S. Conte, F. Ruini and G. Giordani: Components of royal jelly II. The lipid fraction, hydrocarbons and sterols, *J. Apic. Res.* **21,** 178 (1982).
4. 魯 一協, 表明允, 文慶姬：韓國産 royal jelly의 一般成分 및 cyclophosphamide 處理 마우스에 미치는 効果, 숙대약학연구소 논문집 **5,** 41(1989).
5. 石黑伊三雄, 内藤純子, 田中きよ子：王乳中の 燐酸化合物の分布と phosphatase activityについて, 榮養と 食糧 **16,** 127(1963).
6. 飯塚廣, 小山洋之介：王乳の 抗菌性についと, 榮養

と 食糧 **17**, 203(1964).

7. Townsend, G.F., J.F. Morgan and B. Hazlett: Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukemia and ascitic tumors, *Nature* **183**, 1270 (1959).
8. Heyl, H.L.: An observation suggesting the presence of a gonadotropic hormone in royal jelly, *Science* **89**, 540 (1939).
9. Melampy, R.M. and A.J. Stanley: Alleged gonadotropic effect of royal jelly, *Science* **91**, 457 (1940).
10. 條田雅人, 中陳靜男, 及川降幸, 左藤和憲, 川旭, 秋山義郎：ロ-ルヒリ中の 血流量增加性因子につい と, 日本藥學雜誌 **98**, 139(1978).
11. 吉岐宏：放射線障害に 對する Royal Jellyの 延命 効果について, 基礎と 臨床 **9**, 1235(1975).
12. Askenase, P.W., B.J. Hayden and R.K. Gershon: Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses, *J. Exp. Med.* **141**, 697 (1975).
13. 表明允：Cyclophosphamide에 의한 세포성 면역반 응의 조정에 관한 연구, 淑大 論文集 **27**, 541(19 86).
14. Phanuphak, P., J.W. Moorhead and H.N. Claman: Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. 1. In vivo detection by ear swelling and correlation with in vitro cell stimulation, *J. Immunol.* **112**, 115 (1974).
15. Herrlinger, J.D.: *Antigenspezifische Unterdrückung der Antikorperbildung sensibilisierter Tiere,* Habil.-Schrift, Med. Fak. Univ. Kiel (1976).
16. Subba Rao, D.S.V. and B. Glick: Pesticide effects on the immune response and metabolic activity of chicken lymphocytes, *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* **154**, 27 (1977).
17. Turk, J.L. and L.W. Poulter: Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide, *Clin. exp. Immunol.* **10**, 285 (1972).
18. Roitt, I., J. Brostaff and D. Male: *Immunology,* Gower medicinal publishing, p.22.1-22.9 (1985).
19. 表明允：Procarbazine이 細胞性 免疫反應에 미치는 影響, 숙대약학연구소 논문집 **3**, 121(1987).
20. Deutsch, H.F. and J.I. Morton: Dissociation of human serum macroglobulins, *Science* **125**, 600 (1957).
21. Lemmel, E.M.: *Untersuchungen ünber die Wirkungsweise immunosuppressiver Substanzen,* Habil.-Schrift, Med. Fak. Univ. Mainz (1973).
22. Lagrange, P.H., G.B. Mackaness and T.E. Miller: Potentiation of T-cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide, *J. Exp. Med.* **139**, 1529 (1974).