

## 마우스에 있어서 酸敗 들기름 食餌가 免疫反應에 미치는 影響

安 榮 根 · 金 正 勳 · 朴 榮 吉

圓光大學校 藥學大學

### The Effect of Rancid perilla oil diet on the Immune Response in Mice

Young Keun Ahn, Jung Hoon Kim and Young Gil Park

College of Pharmacy, Won Kwang University

#### ABSTRACT

The effect of rancid perilla oil on the immune response in mice was studied.

ICR male mice were divided into 5 groups and were fed on the experimental diets for 4 weeks. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cell.

Immune responses were evaluated by antibody production, Arthus reaction, delayed type hypersensitivity (DTH), Rosette forming cell and macrophage activity.

Biochemical items were measured by serum protein and serum albumin. The weight of spleen, thymus and liver were measured. The rancid perilla oil diets decreased humoral and cellular immune responses, the number of peripheral circulating white blood cells and total protein and serum albumin.

These results showed that the high rancid perilla oil diet decreased more humoral and cellular immune response, the number of peripheral circulating white blood cells, and total protein and serum albumin than the low rancid perilla oil diet did.

#### 緒 論

우리나라에서 옛부터 많이 愛用되어온 食品으로서의 들깨는 民間療法으로 老化防止 및 強壯에 効果가 있다고 하여 널리 利用되어왔으며 東醫寶

鑑 및 方藥合編에서는 下氣, 止嗽 및 潤肺 等の 治療用 藥으로 記載되어 있었다. Mo는 들기름의 脂肪酸의 組成에 對하여 研究한 바가 있는데 linolenic acid가 58%로써 다른 植物油에 比하여 不飽和도가 훨씬 높다고 하였으며<sup>1)</sup>, Lee 등은 polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid

의 ratio (P/S ratio) 높은 들기름 함유飼料 投與動物群에 있어서 tocopherol의 不足으로 因한 症狀를 觀察 報告한 바 있다<sup>2)</sup>.

또 한편으로는 脂肪의 過酸化물을 rat에 投與하면 cholesterol의 血中値가 低下하나 肝臟에는 蓄積이 增加되고, 肝肥大症 및 肝臟壞疽가 생기며 血清中の glutamate-pyruvate transaminase의 活性値가 增加되며 erythrocyte와 lysosome membrane의 障害를 일으키고, 動脈硬化를 일으킨다고 報告하고 있으며<sup>3-8)</sup> Lim은 들기름의 短期毒性에 對하여 研究한 바 肝肥大症狀와 肝靜脈血管 周圍의 變化를 보고한 바 있다<sup>9)</sup>. Carol 등은 脂肪에 7, 12-dimethylbenzanthracene을 添加하여 動物의 乳房癌發生을 試驗한 바 低脂肪食에 比하여 高脂肪食이, 飽和脂肪添加群보다 不飽和脂肪添加群에서 그 發生率이 높았으며, 國家別 乳房癌發生率을 調査해 본 結果 같은 量의 脂肪을 攝取하였을때 植物性脂肪의 境遇가 動物性脂肪의 境遇보다 그 發生率이 높았다고 報告한 바 있다<sup>10)</sup>. Hopkins 등도 脂肪中 特히 不飽和脂肪이 tumor의 發生率을 높인다고 報告하였으며<sup>11)</sup>, Betenblum은 不飽和脂肪이 cocarcinogen으로 作用한다고 報告하였고<sup>12)</sup>, Hughes 등은 linoleic acid의 投與에 依하여 齧齒類의 皮膚同種移植生存率을 延長시킬 수 있다고 하였다<sup>13)</sup>. 한편 Mchugh 등도 linoleic acid 등의 高度不飽和脂肪酸이 腎臟移植時 免疫抑制劑의 補助劑로 使用할 수 있다고 하였는데 이는 高度不飽和脂肪酸에 依한 reticulo-endothelial system의 直接沮害에 起因한다고 하였다<sup>14)</sup>. Metin 등은 PHA와 purified protein derivative of tubercule 등에 依한 淋巴球幼若化反應이 飽和 및 不飽和脂肪酸의 存在에 依하여 抑制된다고 하였다<sup>15)</sup>. Kallmorgen 등은 高脂肪食餌에 依해 飼育한 흰쥐의 血清이 低脂肪食餌로 飼育한 흰쥐의 血清에 比하여 in vitro에서 mitogen의 作用을 顯著히 抑制한다고 하였으며<sup>16)</sup> Ibrahim 등은 高脂肪含有低熱量 食餌群이 低脂肪含有高熱量 食餌群에 比하여 自家免疫疾患이 顯著하게 발현한다고 하였다<sup>17)</sup>.

近來 食生活에서 食用油脂의 攝取가 一般的으로 增加하고 있으며, 特히 健康食品이라는 이름 아래 不飽和도가 높은 들기름 攝取가 增加할 것으로 豫想되며 또 高不飽和脂肪은 免疫低下를 유발함이 밝혀진 바 있어 이에 本著者는 酸敗들기름의 免疫毒性이 期待되어 本實驗을 着手한 바 有意性있는 結論을 얻었기에 報告하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗動物

生後 5~6週齡 體重 20g 前後의 ICR male mouse를 京南畜産(경기도 화성군)에서 分讓받아 5群으로 나누어 室內溫度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 유지한 環境에서 1週日間 適應시킨 후 4週間實驗食餌로 飼育하였다.

### 2. 酸敗들기름의 調製 및 投與

新鮮들기름은 바로 搾 것을 使用하고, 酸敗들기름은 자석교반기에서  $95^\circ\text{C}$ 에서 각 30시간, 100시간 및 120시간을 교반하면서 大氣中の 空氣와 作用시켜 過酸化物價(P.O.V)는 각각 50, 100 및 143으로 하였으며 요오드價(IV)는 각각 180, 172 및 140으로 하여 實驗食餌에 混合하여 調製하였다. 各各의 實驗食餌와 물은 任意로 먹거나 마시게 하였다.

### 3. 實驗食餌의 製造<sup>18,19)</sup>

實驗食餌의 造成은 Table 1과 같다. 正常食餌의 比率은 Takuji 등의 報告를 參考로 하였다.

### 4. 體重 및 臟器의 重量 計測

1) 體重; 實驗動物의 體重은 實驗 開始日과 最終日에 測定하였다.

2) 臟器의 重量; 實驗動物의 頸動脈을 切斷採血한 後 脾臟, 肝臟, 및 胸腺을 各各 摘出하여 그 外觀을 觀察하고 그 重量을 測定하여 對體重 百分比를 求하였다.

**Table 1. Composition of the experimental diet.**

(100 g diet, unit: g)

Dietary	Ingredients	Experimental animal group				
		Normal	(I)	Perilla oil (II)	(III)	(IV)
Carbonhydrate	Rice power	65	65	65	65	65
Protein	Casein	20	20	20	20	20
	Corn Oil	10				
Fat <sup>1)</sup>	Perilla Oil (I)		10			
	Perilla Oil (II)			10		
	Perilla Oil (III)				10	
	Perilla Oil (IV)					10
Salt mixture <sup>2)</sup>		4	4	4	4	4
Vitamin mixture <sup>3)</sup>		1	1	1	1	1

1) Fat;

- Corn Oil: Peroxide value 4, iodine value 204
- Perilla Oil (I) : Peroxide value 4, iodine value 204
- Perilla Oil (II) : Peroxide value 50, iodine value 180
- Perilla Oil (III) : Peroxide value 100, iodine value 172
- Perilla Oil (IV) : Peroxide value 143, iodine value 140

2) Salt mixture used had composition of Rogers and Harpers.<sup>21)</sup>

3) Vitamine mixture (per 1 gm)

Vitamine A (USE XIX)	5,000 IU	Choline citrate (KP III)	5 mg
Vitamine D (KP III)	400 IU	Folic acid (KP III)	0.5 mg
Vitamine B <sub>1</sub> (KP III)	5 mg	Calcium panthotenate (KP III)	5 mg
Vitamine B <sub>2</sub> (KP III)	5 mg	dl-methionine (KP III)	25 mg
Vitamine B <sub>6</sub> (KP III)	0.5 mg	Lysine HCl (KP III)	1 mg
Vitamine B <sub>12</sub> (KP III)	2 mg	Glycine (KP III)	1 mg
Vitamine C (KP III)	50 mg	Glutamic acid HCl	1 mg
Vitamine K (KP III)	0.2 mg	Minerals	75 mg
Nicotinic acid amide (KP III)	30 mg		

**5. 抗原의 製造 및 免疫**

1) 抗原의 製造 ; 本 實驗에서는 緬羊赤血球 (Sheep red blood cell ; 以下 S-RBC)를 使用하였다. 그 方法은 雄性緬羊의 頸動脈으로부터 heparin을 加한 注射器로 採血한 後 同量의 Alserver 氏液 (pH6.1)을 加하여 4°C에서 保存하여 2週日 以內에 使用하였다. 保存中인 S-RBC를 使用할 때에는 使用直前 phosphate buffered saline(以下 PBS)로 3回 遠心洗滌한 後 ml當 1×10<sup>8</sup> S-RBC/ml로 Hank's balanced salt solution(以下 HBSS)에 浮遊시켜 使用하였다.

2) 免疫 ; 遠心洗滌한 S-RBS를 Reed等의 報告를 參考하여<sup>22)</sup> PBS에 1×10<sup>8</sup> S-RBC/ml의 濃度

로 浮遊液 1 ml(1×10<sup>7</sup> S-RBC)를 mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施하였다. 2次免疫은 河等의 報告를 參考하여<sup>22)</sup> 1次免疫을 實施한 4日 後에 mouse의 左側後肢足蹠皮內에 2×10<sup>9</sup> S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml(1×10<sup>8</sup> S-RBC)를 注射하여 惹起시켰다.

**6. 赤血球의 凝集素價 및 溶血素價의 測定<sup>22,23)</sup>**

1) 血清의 分離 및 非動化

Mouse의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採取凝固시킨 後에 遠心分離하여 血清을 分離하고 56°C에서 30分間 非動化시킨 後 4°C에서 保存하여 使用하였다.

## 2) 赤血球凝集素價(Hemagglutination ; 以下 HA titer)의測定

S-RBC의凝集素價를 Microtitration tray (Nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이實施하였다. 즉各實驗動物로부터 얻은個體의非動化血清을各Well에 HBSS로 2倍系列로稀釋한後 HBSS에浮遊한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간放置하여赤血球의凝集類型을觀察判讀하였으며凝集을 일으키는血清의最高稀釋도를그血清의凝集素價로하였다.

## 3) 赤血球溶血素價(Hemolysin titer ; 以下 HY titer)의測定

S-RBC의量 및血清의稀釋은凝集素價測定時와同一하게實驗하였으며 S-RBC와稀釋血清이 들어있는各Well에 guinea pig complement를 20倍로稀釋하여 0.025 ml씩加한 다음 37°C에서 1시간放置하여溶血여부를觀察하였다. 이때에完全溶血을 일으키는血清의最高稀釋도를그力價로判讀하였다.

## 7. 足蹠腫脹反應測定(Foot pad swelling test)

Arthus 反應(immediated type hypersensitivity) 및遲延型過敏反應(delayed type hypersensitivity 以下 DTH)를測定하기爲하여河等이記述한方法에準하여<sup>23)</sup> 다음과 같이實驗하였다. 즉 1次免疫 4日後에 S-RBC 0.05 ml( $1 \times 10^8$ )를 mouse의左側後肢足蹠에皮下注射하였다.注射後一定時間이經過한後腫脹의두께를 0.01 mm 눈금 Microcaliper로測定하였으며腫脹程度의測定價는測定에 따른誤차를避하기爲하여 2回測定한數値를平均하였다.判讀의基準은 Sugimoto<sup>24)</sup> 등과河等<sup>26)</sup>의判讀基準에 따라 3時間의反應을 Arthus反應, 24時間經過後의反應을遲延型過敏反應으로看做하였다.足蹠腫脹指數는 다음과 같이表示하였다.

Foot pad swelling index

$$= \frac{\text{腫脹두께} - \text{正常두께}}{\text{正常두께}} \times 100$$

## 8. 脾臟細胞浮遊液의調製<sup>25)</sup>

脾臟을 mouse로부터無菌的으로摘出하여 Minimum essential medium(以下 MEM)에조심스럽게粉碎한後 nylon mesh로濾過하여死細胞를除去하였으며寒冷 MEM으로 4°C에서 3回遠心分離한後脾臟細胞가  $2 \times 10^7$  cell/ml가되도록 PBS에浮遊하였다.每實驗마다 이檢査는 trypan blue dye exclusion method으로 다음과 같이하였다. 즉試驗管에 0.3 ml의細胞浮遊液을 넣은後 0.1 ml의 trypan blue dye solution을加하여 5分間經過後血球計算板에서無色生細胞와青色으로染色된死細胞의數를센後 그百分率로計算하였다.

## 9. 脾臟細胞의 Rosette 形成細胞(RFC)의檢出

脾臟細胞의 Rosette 形成細胞의檢査는 Ga-Ney等 및 Elliott等이記述한方法에準하여<sup>25,26)</sup> 다음과 같이實施하였다. 즉脾臟細胞浮遊液 0.25 ml( $5 \times 10^6$  cell)와 S-RBC 浮遊液 0.25 ml( $5 \times 10^7$  cell)를試驗管에 넣고混合하여 200×g에서 12分間遠心分離한後 이再浮遊液 1滴을血球計算板에 떨어뜨리고 RFC를檢鏡觀察하였다.檢鏡時脾臟細胞에 S-RBC가 3個以上 부착한細胞를 RFC로判定하여 다음公式에準하여計算하였다.

$$\text{RFC} = \frac{\text{Number of Rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ Viability}} \times 100$$

## 10. 大食細胞의活性檢査

大食細胞의食食能力을測定하고자本實驗에서는 Biozzi等<sup>27)</sup>이記述한方法에準하여 다음과 같이實施하였다. 즉最終實驗食餌投與日 2日後에 carbon 즉 rotring ink를滅菌蒸溜수에 녹인 1% gelatin液으로 6倍稀釋하여懸濁液을調製하여本實驗期間동안密栓하여 37°C에保管하였다. 위와같이調製한 colloid狀炭素懸濁液을 mouse體重 g當 0.01 ml씩 mouse의尾靜脈內로注射하였다. 그후 mouse의眼窩後部靜脈血叢(retro

-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube (20  $\mu$ l: microbemacrit)로 穿刺하여 20  $\mu$ l의 血液을 10分, 20分, 30分 間隔으로 血液을 取血한 後 0.1% sodium carbonate(蒸溜水에 溶解한 液) 溶液 2 ml가 든 vial에 各各 넣어서 赤血球가 溶解되도록 잘 混和하였다. 이어서 吸光度를 600 mm에서 測定하고 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index } p = \frac{W_B}{W_S + W_L} \times \sqrt[3]{K}$$

$W_B$ : 體重

$W_S$ : 脾臟의 重量

$W_L$ : 肝臟의 重量

$K$ : Phagocytic coefficient (測定濃度の 10倍數를 log로 轉換하고 時間에 對하여 plot한 graphy 曲線)

### 11. 末梢循環白血球數의 測定

Mouse의 眼球靜脈叢으로부터 末梢血液을 採取하여 Türk液으로 稀釋하여 血球計算板上에 滴한 後 白血球 總數를 測定하였다.

### 12. 生化學的 檢査

#### 1) 血清蛋白質의 測定

血清 0.02 ml를 取하여 Biuret法에 依하여 다음과 같이 測定하였다<sup>29)</sup>. 즉 試驗管 A에 血清 0.02 ml를 取하고 試驗管 S에 標準液(7 g/dl albumin) 0.02 ml를 取하여 各 管에 發色試藥(Total protein color reagent=Biuret Reagent) 4.0 ml를 加하여 混和한 다음 30分 後(3時間 以內)에 發色試藥을 對照로 하여 545 nm에서 各各의 吸光度 E

A,  $E_s$ 를 測定하였다. 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{總血清蛋白濃度} = \frac{E_A}{E_S} \times 7 \text{ g/dl}$$

#### 2) 血清 albumin의 測定

BCG에 依한 albumin定量法에 準하여 測定하였다<sup>29)</sup>. 즉 血清을 試驗管 A, S에 發色試藥 5.0 ml(0.012% bromocresol green in 0.075 M, pH 4.2, citrated buffer solution Brij 35)를 加하여 混合, 25 $^{\circ}$ C 30分間 放置한 後 發色試藥을 對照로 하여 630 nm에서 比色, 各各의 吸光度를  $E_A, E_S$ 로 하고 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{血清 albumin 濃度} = \frac{E_A}{E_S} \times 4 \text{ g/dl}$$

통계분석: 모든 data의 유의성 檢정은 Student's t-test로 檢정하였다.

## 實 驗 結 果

Mouse에 있어서 酸敗들기름의 免疫反應에 미치는 影響을 究明하려고 實施한 本 實驗의 結果는 다음과 같다.

### 1. 體重, 肝臟, 脾臟 및 胸腺의 重量變化

#### 1) 體重의 變化

各各 群의 實驗開始 및 最終日의 體重變化는 Table 2와 같다.

正常對照群이 20.13 $\pm$ 16.25%의 體重增加를 보이는데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各 32.82 $\pm$ 11.62%, 29.32 $\pm$ 13.47%, 37.15 $\pm$ 15.91% 및 38.31 $\pm$ 11.40%로서 全群

Table 2. Effects of rancid perilla oil on the body weight increased rate of mice.

Group	Initial wt.(gm)	Final wt.(gm)	Increased rate (%)
Normal	20.91 $\pm$ 0.92	24.36 $\pm$ 3.91	20.13 $\pm$ 16.25
Perilla oil (I)	20.72 $\pm$ 0.63	27.52 $\pm$ 3.62	32.82 $\pm$ 11.62
Perilla oil (II)	20.63 $\pm$ 0.76	26.70 $\pm$ 3.10	29.32 $\pm$ 13.47
Perilla oil (III)	20.62 $\pm$ 0.63	28.26 $\pm$ 3.18	37.15 $\pm$ 15.91*
Perilla oil (IV)	20.66 $\pm$ 0.71	28.56 $\pm$ 2.58	38.31 $\pm$ 11.40**

Each value is the mean $\pm$ S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group. (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

의 體重이 正常群에 比하여 크며 特히 perilla oil III과 perilla oil IV를 投與한 群에서는 有意性있는 增加를 보였다.

### 2) 肝臟의 重量變化

肝臟對 體重重量比는 Table 3에서 보는바와 같이 正常對照群이  $4.79 \pm 0.57\%$ 인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $4.11 \pm 0.47\%$ ,  $4.16 \pm 0.57\%$ ,  $4.31 \pm 0.38\%$  및  $3.53 \pm 0.82\%$ 로서 有意性있는 差異를 보였다.

Table 3. Effects of rancid perilla oil on liver weight of mice.

Group	Liver wt. (gm)	Liver wt. / body wt. $\times 100(\%)$
Normal	$0.17 \pm 0.13$	$4.79 \pm 0.57$
Perilla oil(I)	$0.13 \pm 0.14$	$4.11 \pm 0.47^{**}$
Perilla oil(II)	$0.13 \pm 0.13$	$4.16 \pm 0.57^*$
Perilla oil(III)	$0.13 \pm 0.14$	$4.31 \pm 0.38^*$
Perilla oil(IV)	$0.01 \pm 0.23$	$3.53 \pm 0.82^{**}$

Rancid Perilla oil was fed for 4 week.

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group.

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 3) 肝臟의 體重變化

肝臟對 體重重量比는 Table 4에서 보는바와 같이 正常對照群이  $0.65 \pm 0.23\%$ 인데 比하며 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $0.65 \pm 0.23\%$ ,  $0.62 \pm 0.32\%$ ,  $0.73 \pm 0.33\%$ ,  $0.57 \pm 0.27\%$  및  $0.45 \pm 0.3\%$ 로서 增減이 있었으나 有意性있는 變化를 볼 수 없었다.

### 4) 胸腺의 重量變化

胸腺對 體重重量比는 Table 5에서 보는바와 같이 正常對照群이  $0.15 \pm 0.03\%$ 인데 比하여 perilla oil III을 投與한 群은  $0.19 \pm 0.04\%$ 로 有意性있는 增加를 보였으나, perilla oil I, II 및 IV를 投與한 群은 各各  $0.13 \pm 0.04\%$ ,  $0.13 \pm 0.05\%$  및  $0.10 \pm 0.04\%$ 로서 增加抑制를 보였으며, 特히 perilla oil IV를 投與한 群은 顯著한 增加 抑制效果를 보였다.

Table 4. Effects of rancid perilla oil on spleen weight of mice.

Group	Spleen wt.(mg)	spleen wt. / body wt. $\times 100(\%)$
Normal	$162.09 \pm 53.67$	$0.65 \pm 0.23$
Perilla oil (I)	$171.25 \pm 72.62$	$0.62 \pm 0.32$
Perilla oil (II)	$199.50 \pm 92.74$	$0.73 \pm 0.33$
Perilla oil (III)	$162.42 \pm 62.33$	$0.57 \pm 0.27$
Perilla oil (IV)	$130.70 \pm 95.86$	$0.45 \pm 0.32$

Rancid perilla oil was fed for 4 weeks.

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group.

Table 5. Effects rancid perilla oil on thymus weight.

Group	Thymus wt. (mg)	thymus wt. / body wt. $\times 100(\%)$
Normal	$34.14 \pm 8.71$	$0.15 \pm 0.03$
Perilla oil (I)	$36.27 \pm 12.45$	$0.13 \pm 0.04$
Perilla oil(II)	$36.14 \pm 15.68$	$0.13 \pm 0.05$
Perilla oil(III)	$53.86 \pm 10.66^{**}$	$0.19 \pm 0.04^*$
Perilla oil(IV)	$27.71 \pm 11.89$	$0.10 \pm 0.04^{**}$

Rancid perilla oil was fed for 4 week.

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group.

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

## 2. 體液性 免疫反應에 미치는 影響

### 1) Arthus 反應

Arthus反應의 結果는 Table 6에서 보는바와 같이 足趾腫脹의 두께는 正常對照群이  $26.17 \pm 3.02$ 인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $24.26 \pm 5.72$ ,  $25.17 \pm 9.62$ ,  $18.71 \pm 8.68$  및  $11.00 \pm 3.79$ 로서 全群이 抑制效果를 나타냈으며, 特히 perilla oil III과 IV를 投與한 群은 有意性있는 抑制效果를 보였다.

### 2) 赤血球凝集素價 및 赤血球溶血素價

赤血球凝集素價 및 赤血球溶血素價는 Table 7에서 보는바와 같다. 赤血球凝集素價(HA titer)는 正常對照群이  $4.00 \pm 1.00$ 인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $3.67 \pm 0.92$ ,  $2.67 \pm 1.70$ ,  $2.14 \pm 0.83$  및  $2.80 \pm 1.17$ 로

**Table 6. Effects of rancid perilla oil on the Arthus reaction in mice.**

Group	Arthus reaction
Normal	26.17±3.02
Perilla oil (I)	24.26±5.72
Perilla oil (II)	25.17±9.62
Perilla oil (III)	18.71±8.68*
Perilla oil (IV)	11.00±3.79*

Foot pad swelling was measured after intradermal. Challenge of 10<sup>8</sup> S-RBC/ml.

Foot pad Swelling index  

$$= \frac{\text{swelling of foot pad}}{\text{thickness of foot pad}} \times 100$$

At 4 hour FPSI was Arthus reaction.  
 Each value is the mean±S.D. of 18~20 mice.  
 Significant difference from normal group.  
 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

**Table 7. Effects of rancid perilla oil on antibody production in mice.**

Group	HA	HY
Normal	4.00±1.00	4.00±0.82
Perilla oil(I)	3.67±0.92	3.92±1.26
Perilla oil(II)	2.67±1.70*	4.00±1.60
Perilla oil(III)	2.14±0.83**	3.86±1.36
Perilla oil(IV)	2.80±1.17*	3.75±1.4

Mice were challenged with 10<sup>8</sup> S-RBC 4 days after sensitization.

On the 5th day, the HA and HY titer were assayed.  
 Each value is the mean±S.D. (log<sub>2</sub>) of 18~20 mice.  
 Significant difference from normal group.  
 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

서 減少를 보였으며 특히 perilla oil II, III 및 IV를 投與한 群은 有意性있는 抑制效果를 보였다.

赤血球溶血素價(HY titer)는 正常對照群이 4.00±0.82인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各 3.92±1.26, 4.00±1.60, 3.86±1.36 및 3.57±1.40으로서 有意性은 없었으나 全般的으로 抑制效果를 보였다.

**3. 細胞性免疫에 미치는 影響**

**1) 遲延型過敏反應**

遲延型過敏反應의 結果는 Table 8에서 보는 바와 같이 正常對照群이 10.86±5.77인데 比하여

perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各 7.62±4.35, 4.29±1.28, 5.67±3.19 및 5.00±2.77로 全般的으로 抑制되었으며 특히 perilla oil II, III 및 IV를 投與한 群은 有意性있는 抑制效果를 보였었다.

**Table 8. Effects of rancid perilla oil on the delayed type hypersensitivity reaction.**

Group	DTH
Normal	10.86±5.77
Perilla oil (I)	7.62±4.35
Perilla oil (II)	4.29±1.28**
Perilla oil (III)	5.67±3.19*
Perilla oil (IV)	5.00±2.77*

Foot pad swelling was measured after intradermal. Challenge of 10<sup>8</sup> S-RBC.

Foot pad Swelling index  

$$= \frac{\text{swelling of foot pad}}{\text{thickness of foot pad}} \times 100$$

At 24 hour FPSI was DTH.  
 Each value is the mean±S.D. of 18~20 mice.  
 Significant difference from normal group.  
 (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

**2) 脾臟의 Rosette 形成能**

各 群에서 觀察한 RFC를 %로 換算한 結果는 Table 9에서 보는 바와 같이 正常對照群이 12.89±7.08%인데 比하여 perilla oil I 및 II를 投與한 群은 各各 13.71±5.72% 및 16.61±4.74

**Table 9. Effects of rancid perilla oil on Rosette forming cell in mice.**

Group	RFC(%)
Normal	12.89±7.08
Perilla oil(I)	13.71±5.72
Perilla oil(II)	16.61±4.74
Perilla oil(III)	8.46±2.99
Perilla oil(IV)	5.26±3.03**

Mice were challenged with 1×10<sup>8</sup> SRBC/ml 4 days after sensitization.

On the 5th day RFC were assayed  

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

Each value is the mean±S.D. of 18~20 mice.  
 Significant difference from normal group. (\*\*p<0.01)

%로 有意性없는 增加를 보였으나 perilla oil III 및 IV를 投與한 群은  $8.46 \pm 2.99\%$  및  $5.26 \pm 3.03\%$ 로 減少를 보였으며 특히 perilla oil IV를 投與한 群은 顯著한 抑制效果를 보였다.

#### 4. 大食細胞의 活性과 末梢循環 白血球에 미치는 影響

##### 1) 大食細胞의 活性

大食細胞의 貪食能力을 測定하여 phagocytic index로 換算한 結果는 Table 10에서 보는 바와 같이 正常對照群이  $7.15 \pm 1.38$ 인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $7.21 \pm 0.87$ ,  $6.76 \pm 1.43$ ,  $6.24 \pm 0.57$  및  $7.03 \pm 0.58$ 으로 有意性없는 增加와 抑制效果가 있었다.

Table 10. Effects of rancid perilla oil on phagocyte activity in mice.

Group	Phagocyte index
Normal	$7.15 \pm 1.38$
Perilla oil (I)	$7.21 \pm 0.87$
Perilla oil (II)	$6.76 \pm 1.43$
Perilla oil (III)	$6.24 \pm 0.57$
Perilla oil (IV)	$7.03 \pm 0.58$

Phagocyte activity index is a constant from formula relating the cube root of K to the ratio of body weight to the weight of the liver and spleen.

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group.

##### 2) 末梢循環 白血球

各 實驗群을 4週間 飼育한 후 白血球의 數를 測定한 것은 Table 11과 같다. 正常對照群은

$7.166 \pm 1.344$ 인데 比하여 perilla oil III을 投與한 群은  $8.334 \pm 1.374$ 로 有意性없는 增加를 하였으나 perilla oil I, II 및 IV를 投與한 群은 各各  $6.300 \pm 1.255$ ,  $5.500 \pm 764$  및  $4.500 \pm 2.062$ 로 減少를 보였으며 특히 perilla oil II 및 IV를 投與한 群은 顯著한 減少를 보였다.

Table 11. Effects of rancid perilla oil on peripheral WBC in mice.

Group	WBC (mm <sup>3</sup> )
Normal	$7,166 \pm 1,344$
Perilla oil(I)	$6,300 \pm 1,255$
Perilla oil(II)	$5,500 \pm 764^{**}$
Perilla oil(III)	$8,334 \pm 1,374$
Perilla oil(IV)	$4,500 \pm 2,062^{**}$

Each value the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group. (\*\*:  $p < 0.01$ )

##### 5. 生化學的 檢査所見

各 實驗群을 4週間 飼育한 다음 測定한 總血清 蛋白質濃度 및 血清 알부민과 글로부린 濃度는 Table 12에서 보는 바와 같다. 總血清蛋白質濃度는 正常對照群에서  $7.06 \pm 1.08$  g/dl인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $6.58 \pm 1.25$  g/dl,  $6.44 \pm 0.79$  g/dl,  $6.12 \pm 1.14$  g/dl 및  $3.84 \pm 0.24$  g/dl으로 全群이 減少를 보였으며 특히 perilla oil IV를 投與한 群은 顯著한 減少를 보였다.

血清 albumin濃度는 正常對照群이  $5.16 \pm 0.49$  g/dl인데 比하여 perilla oil I, II, III 및 IV를 投與한 群은 各各  $5.02 \pm 0.36$  g/dl,  $3.51 \pm$

Table 12. Effects of rancid perilla oil on the serum protein, albumin and globulin in mice.

Group	Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Globulin (g/dl)	A/G ratio
Normal	$7.06 \pm 1.08$	$5.16 \pm 0.49$	$1.90 \pm 1.02$	$3.74 \pm 2.14$
Perilla oil (I)	$6.58 \pm 1.25$	$5.02 \pm 0.36$	$1.56 \pm 0.89$	$3.22 \pm 0.40$
Perilla oil (II)	$6.44 \pm 0.79$	$3.51 \pm 0.40^{**}$	$2.91 \pm 0.48^*$	$1.23 \pm 0.17^{**}$
Perilla oil (III)	$6.12 \pm 1.14$	$3.41 \pm 0.28^{**}$	$2.71 \pm 1.09$	$1.50 \pm 0.64^{**}$
Perilla oil (IV)	$3.84 \pm 0.24^{**}$	$3.08 \pm 0.35^{**}$	$0.78 \pm 0.23^{**}$	$4.38 \pm 1.37$

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of 18~20 mice.

Significant difference from normal group. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ )



0.40 g/dl,  $3.41 \pm 0.28$  g/dl 및  $3.08 \pm 0.35$  g/dl로  
 全群이 減少를 보였는데 특히 perilla oil II, III  
 및 IV를 投與한 群은 顯著한 減少를 보였다.

血清 globulin濃度は 正常群에서  $1.90 \pm$   
 $1.20$  g/dl인데 比하여 perilla oil IV를 投與한 群  
 은  $0.78 \pm 0.23$  g/dl로 顯著하게 減少하였으나  
 perilla oil II 및 III을 投與한 群은  $2.91 \pm 0.48$  및  
 $2.71 \pm 1.09$ 로 有意性있게 增加하였다.

血清 albumin과 血清 globulin濃度の 比는 正常  
 對照群이  $3.74 \pm 2.14$ 인데 比하여 perilla oil IV를  
 投與한 群은  $4.38 \pm 1.37$ 로 有意性없이 增加하였  
 으나, perilla oil II 및 III을 投與한 群은 各各  
 $1.23 \pm 0.17$  및  $1.50 \pm 0.64$ 로 顯著하게 減少하였  
 다.

## 考 察

脂肪酸이 免疫에 미치는 影響에 대하여 많은 報  
 告가 있으며 Offner等은 linolenic acid等の 不飽  
 和脂肪酸은 prostaglandin E<sub>1</sub>(P.G.E<sub>1</sub>) 및 P.G.E<sub>2</sub>  
 의 合成을 增加시키며 이와같이 增加된 P.G.E<sub>1</sub>,  
 P.G.E<sub>2</sub>에 依하여 淋巴球의 免疫反應이 抑制된다고  
 하였으며<sup>30)</sup> Weymann等은 in vitro에서 淋巴  
 球의 幼惹化反應이 脂肪酸의 量보다는 飽和, 不  
 飽和脂肪酸의 比率에 依해서 지배되며, 不飽和脂  
 肪酸이 飽和脂肪酸보다 抑制作用이 強하나 飽和  
 脂肪酸의 混合에 의해서 抑制를 減少시킬 수 있다  
 고 報告되어 있는 바<sup>31)</sup>, 이러한 影響은 人體의 방  
 어機能의 수식에 起因할 것으로 飼料되어 rancid  
 perilla oil의 過酸化物價가 增加됨에 따른 免疫反  
 應에 미치는 影響을 조사하였다.

本 實驗에서 實驗動物의 體重의 變化는 rancid  
 perilla oil의 過酸化物價가 增加됨에 따라 體重의  
 增加가 觀察되었으나 肝臟의 重量은 有意性있게  
 減少되었음은 過酸化物의 毒性에 의한 肝毒性의  
 効果에 起因하는 것으로 思料되었다.

胸腺의 重量은 正常對照群에 比하여 perilla oil  
 III을 投與한 群에서 有意性있게 增加하였으나  
 perilla oil IV를 投與한 群에서는 顯著한 減少를

보였다. 이러한 增加는 胸腺의 浮腫現象으로 보  
 였으나 減少하는 것은 胸腺細胞의 necrosis로 思  
 料되었다.

Arthus反應은 生體內 IgM, IgG 등의 過敏炎症  
 性 反應으로 多量의 多核白血球의 浸潤을 隨伴하  
 는 症狀으로 全群이 正常對照群에 比하여 減少를  
 볼 수 있었으며 특히 過酸化物價가 높은 rancid  
 perilla oil일수록 顯著하였다.

또한 赤血球 凝集과 溶血反應은 感作抗原에 對  
 한 特異抗體와 抗原과의 反應으로 凝集 또는 溶血  
 을 일으키는 現象이며 抗原-抗體反應을 쉽게 관  
 단할 수 있는 간편한 方法으로써 血中 免疫抗體의  
 消長을 測定하는데 널리 利用되고 있다<sup>32)</sup>.

本 實驗結果 赤血球 凝集素價 및 溶血素價는 正  
 常對照群에 比하여 rancid perilla oil의 過酸化物  
 價가 높을수록 抑制되는 傾向을 보였다. 이와같  
 은 過酸化物價가 높은 rancid perilla oil은 sup  
 pressor T cell의 作用을 亢進시켜 體液性 免疫  
 抗體의 減少에 起因한 것으로 思料된다.

遲延型 過敏反應은 惹起注射 후 18~48時間에  
 紅斑, 硬結 등이 나타나는 現象으로 感作 淋巴球  
 의 作用에 의한 lymphokines의 化學的 傳達因子  
 의 遊離에 依해서 成立되며 여기에 大食細胞가 깊  
 이 關여하는 것으로 알려져 있으며<sup>26)</sup> 細胞性 免疫  
 에 가장 좋은 指標로 利用되고 있다.

本 實驗에서 正常對照群에 比해 rancid perilla  
 oil의 投與群에서 有意性있는 減少가 있었다. 이  
 는 高脂肪食餌에 의한 細胞性 免疫抑制된다는  
 Kollmorgen의 報告와 일치하였으며<sup>16)</sup> 또한 過酸  
 化物價가 높은 rancid perilla oil이 強한 毒性을  
 나타낸다. 이는 Mertin 等の 報告로 미루어<sup>15)</sup>  
 rancid perilla oil에 의하여 增加된 cyclic AMP  
 의 作用에 의한 것으로 思料된다.

脾臟細胞의 rosette 形成細胞數는 Back 等<sup>34)</sup>  
 및 河等<sup>26)</sup>에 依하면 T cell 및 大食細胞가 모두  
 rosette를 形成할 수 있으나 대부분 T cell이 더  
 깊게 關여한다고 볼 수 있다. 이러한 觀點에서  
 rancid perilla oil의 過酸化物價가 높을수록 脾臟  
 細胞의 Rosette 形成細胞數가 減少하는 점으로

보아 이는 Wybran 등의 報告內容으로 보아<sup>35)</sup> rancid perilla oil이 helper T cell의 機能을 選擇적으로 抑制 또는 suppressor T cell의 機能亢進시킨 것으로 思料된다.

大食細胞의 活性은 抗原에 依한 免疫能의 發顯 및 Interleukine의 分泌에 重要한 役割을 하며 그 貧食能을 網狀組織內皮系에 影響을 끼쳤는가를 測定하는 重要한 指標로써 利用되고 있다.

本 實驗에서는 正常對照群에 比하여 rancid perilla oil을 投與한 群이 代체적으로 有意性없는 低下를 보였다. 이는 Kollmorgen 등의 報告로 미루어<sup>16)</sup> 大食細胞의 活性의 低下는 食餌脂質의 過酸化와 血清脂質에 影響을 미친 것으로 思料된다. 末梢血液內 白血球數에 미치는 影響은 正常對照群에 比하여 rancid perilla oil III群을 除外한 全群에서 減少를 보였다. 이와같은 末梢白血球의 減少는 過酸化脂質이 造血機能에 影響을 미쳐 白血球生成을 阻害하여 減少된 것으로 생각되며 또한 細網形成不全을 類推케 한다. 生化學的 檢査 所見에서 總血清蛋白의 量과 albumin의 量은 正常對照群에 比해 rancid perilla oil의 過酸化物價가 增加함에 따라 低下하는 것은 體內蛋白 代謝異狀으로 思料되며 이는 抗體生産의 低下를 나타낸다.

以上の 考察을 綜合하면 들기름의 過酸化物은 新鮮油에 比하여 全般的으로 免疫低下를 더욱 低下시켰다.

### 結 論

Mouse에 있어서 酸敗들기름이 免疫反應에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. 酸敗들기름 食餌(rancid perilla oil diet)는 體重을 顯著하게 增加시킨 反面 肝臟과 胸腺의 重量은 有意性있게 減少시켰다.

2. 酸敗들기름 食餌(rancid perilla oil diet)는 體液性免疫反應을 低下시켰다.

3. 酸敗들기름 食餌(rancid perilla oil diet)는 細胞性免疫反應을 低下시켰다.

4. 酸敗들기름 食餌(rancid perilla oil diet)는 末梢循環 白血球數를 低下시켰다.

5. 酸敗들기름 食餌(rancid perilla oil diet)는 總血清蛋白質, 血清알부민 및 血清글로부린의 濃度を 有意性있게 減少시켰다.

以上の 結果에서 高酸敗들기름 食餌는 低酸敗들기름 食餌보다 體液性 및 細胞性 免疫反應, 末梢循環 白血球數, 總血清蛋白質 및 血清알부민濃度を 더욱 減少시켰다.

### REFERENCES

1. Mo, S.M.: K.J.N., 8, 83 (1975)
2. Lee, Y.K.: Kwak, T.K., K. J. N, 9, 283 (1976)
3. Begkwitz E., Lang K., Leps M.: *Klin Wochschr*, 40, 515 (1962)
4. Darteshk; *Cesk Gastroenterol. Vyzia*, 16, 305 (1962)
5. Tappel A.L.; *Feed. Proc.*, 32, 1870 (1973)
6. Toen, E.V. and Collier, H.B.; *Canad. J. Biochem., Phys.*, 38, 957 (1960)
7. 佐藤文代, 水沼俊美, 岸野泰雄, 奥田拓道; *榮養と食糧*, 30, 313 (1977)
8. Kaneta K.S. and Shii K.: *Bulletin of the Japanese society of scientific Fishers* (1953)
9. 林鍾弼: 圓光大學校 大學院 學位論叢, 2輯, 145 (1979)
10. Carrol, K.K. Khor, H.T.; *Lipids*, 6, 415 (1971)
11. Hopkins, G.J., and West C.E.: *Life Sci.*, 19, 1103 (1979)
12. Berenblum, I., In progress in experimental tumor research (F. Homburger Ed.), Vol II Karger, Basel 21 (1969)
13. Hughes, D., Caspary E.A., Wisniewski, H.M.; *Immunosuppression by linoleic acid. Lancet*, 2, 501 (1975)
14. Mchugh, M.I., Wilkinson, R., Elliott, R.W., Field, E.J. et. al.; *Immunosuppression with polyunsaturated fatty acids in renal transplantation. Transplantation*, 24 (4), 203 (1975)

15. Mertin, T. Hughes, D.; Specific inhibitory action of polyunsaturated fatty acids in lymphocyte transformation by PHA and PPD. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, **48**, 203 (1977)
16. Kollmorgen, G.M.: Inhibition of lymphocyte function in rats fed highfat diet. *Cancer Research*, **39**, 3458 (1979).
17. Ibrahim, A.B., Gardner, J., Smith, A.D., Thompson, R.H.S.: Linoleic acid as a immunosuppressive agent. *Lancet*, **2**, 33 (1975).
18. Hans Kaunitz C.A., Slanetz, R.E., Johnson: *J. Amer. Oil Chemist. Soc.*, **38**, 301 (1961).
19. Minocher. C. Reporter and Robert. S. Harris.. *The Journal of the American Oil Chemist's Soc.*, **38**, 47 (1961).
20. Takuji Tanka, H. Mori, M. Fuji, M. Takahashi and Iwao Hirono: Carcinogenicity examination of betal quid II, effect of vitamin A deficiency on rats fed semipurified diet containing betal nut and calcium hydroxide. *Nutri. and Cancer*, **4**, 1260 (1983).
21. Rogers, Q.R., Harper, A.E.: Amino acid diets and maximal growth in the rats, *J. Nutr.* **87**, 267 (1965).
22. Reed, I.D., Crowle, P, K, and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships In immuno-deficient animals, B, Ssordet ed. Karger Baselip 134 (1984).
23. Ha, T.Y. and Rhee, H.K.: Effect of inosiplex on cellular and humoral immune response. *J. Kor. Soc. Microbial*, **1**, 57 (1981).
24. Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpm. J. MED. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1972).
25. Garvey, J. S., Cremer, N.E.: Sussclorf, D.H., *Methods in immunology*. 3rd, 449 (1980).
26. Elliott, B.E., J. S. Haskill.: Characteristics of thymus-derived bonemarrow-derived Rosette forming lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973)
27. Bizzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C., and Halpern, B.N.: Etude quantitative du lactivité granulo-plexique du system reticulo endothelial chez la souris., *C.R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 431 (1954)
28. Cornall C.J.: *Biol. Chem.*, **177**, 751 (1947)
29. Doumas *et. al.*; *Clin. Chim. Acta.*, **31**, 87 (1971)
30. Offner, H. Clausen, T.; Inhibition of lymphocyte response to stimulants induced by unsaturated fatty acids and prostaglandins. *Lancet*, **17**, 400 (1974)
31. Weyman, G. Belin, J., Smith, A.D.,; Thompson, R.H. S; Linoleic acid as a immunosuppressive agent. *Lancet*, **2**, 33 (1975)
32. Ahn, Y.K., Kim, J.H.; Effect of dietary fat on the immuntotoxicity of chloramphenicol. *YAK-HAK Hoeji*, **29**, 55 (1985)
33. Kim, J.H.; Immunobiological studies in mice treated with chemical carcinogen 3-methyl cholanthrene. *Dept. of vet. Med. Jeonbuk Natnl. Univ. Graduate School* (1983)
34. Back, J.F. and Dardenne, M.,; Antigen recognition by T lymphocytes. *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972)
35. Wybran, J., Garr, M.C., and Fudenberg, H.H.; The human Rosette forming cell as a marker of population of thymus derived cells. *J. Clin. Invest.*, **51**, 2537 (1972)