

Mouse에서의 Deoxynivalenol이 면역글로브린에 미치는 영향

이 국 천, 이 주 흥, 손 성 기, 주 영 국*

경상남도가축위생시험소북부지소, 경상남도종축장*

Effect of Deoxynivalenol on Immunoglobulin in the Mouse

Kuk-cheon Lee, Ju-hong Lee, Sung-gi Son, Young-kuk Joo*

Northern Branch of Gyeongnam Veterinary Service Laboratory, Gyeongnam Provincial Livestock Breeding Station*

Abstract

Mice were fed semi-purified diets containing 0, 2, 10 and 25 ppm(mg /kg) deoxynivalenol over 8 weeks and were assessed for effects on bodyweight gain, serum immunoglobulin levels and surface immunoglobulin bearing lymphocyte ratio.

1. The rate of body-weight gain was significantly reduced ($p<0.05$) at the 10 and 25 ppm of DON, whereas the mice ingesting the diet containing 2 ppm DON was not.
2. IgA in serum immunoglobulin was significantly increased ($P<0.05$) at the 10 and 25 ppm of DON, but IgG, IgM were decreased, whereas exposure to 2 ppm DON was not change.
3. Concentration of IgA from Peyer's patch of mice fed DON exhibited increased at 10, 25 ppm.
4. Lymphocytes surface marker studies revealed that IgA, IgG and IgM were 2.2%, 0.4% and 1.5% respectively. These results suggest that dietary exposure to DON alters regulation of IgA production

Keywords : Deoxynivalenol(DON), body-weight, immunoglobulin

서 론

Deoxynivalenol(DON)은 trichothecene mycotoxin 중의 하나이며, *Fusarium graminearum*에 의해서 생산되고, 전세계에 걸쳐서 각종

곡류에 오염되어 있다.¹⁻³⁾ DON은 여러곡물에서 자연적으로 발생하거나 곡물을 저장시 냉습한 곳에서 잘 발생한다. DON은 실험동물을 비롯하여 각종동물에서 사료섭취거부, 구토, 체중감소, 임파구감소, 번식장애, 피부괴사, 출혈,

방사능물질과 같은 효과 그리고 면역장기를 심하게 상해한다.^{3~5)} 돼지가 이 독소에 감수성이 높으며, 돼지에 DON을 투여하면 구토를 유발하기 때문에 이를 일명 vomitoxin이라고 한다.⁶⁾ 근래에 미국에서 많은 동물이 원인을 알수 없는 중독증상을 나타내어 가검물을 분석한 결과 80%의 가검물에서 DON이 검출되었다고 보고한바 있다.⁷⁾ Trichothecene은 단백질 합성과 DNA합성을 억제하며, 면역체계를 억제하는 성질이 있는데 소량의 mycotoxin에 의해서도 체액성면역과 세포성면역 체계가 영향을 받아 숙주의 생체방어기전이 저하된다.⁸⁾ 실험적으로 생쥐에 DON을 투여한 결과 장관계통과 골수, 임파절에 심한 상피세포의 괴사가 나타났고, 신장과 심장에 국소성괴사를 나타내었다고 한다.⁹⁾ Ueno⁵⁾ 등도 동물에 만성 DON 중독을 일으킨 결과 임파구 소실을 관찰 할 수 있었는데 이는 trichothecene이 면역반응을 변화시킨다고 하였다.

Robbaba¹⁰⁾은 면역적혈구를 감작시킨 동물에 DON을 경구적으로 투여한 결과 면역글로부린이 감소한다고 하였고, Tryphonas¹¹⁾ 등은 IgM이 현저히 감소한다고 하였다. DON이 면역반응에 미치는 영향은 여러학자들에 의해 계속연구되어 왔으나 DON과 IgA와의 상관관계는 널리 알려져 있지 않았다.^{12~15)} IgA는 점막에서 생체방어기전의 중요한 역할을 하는데, 항원과 결합하여서 항원의 흡수를 차단시킨다. 이 실험의 목적은 혈청 IgA에 미치는 DON의 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 체중이 20~22g 되는 ICR계통 생쥐 40마리를 사용하였고 한 cage에 한마리씩 분리 사육하면서 물은 자유로이 급식시켰다.

Toxin : DON(3, 7, 15-trihydroxy-12, 13-epoxy-trichothec-9-en-8-one, Sigma)을 ethanol에 녹여서 사용하였다.

Diet : Forsell et al의 방법에 따라 toxin을 정제된 분말 사료에 배합하여 농도를 2 ppm, 10ppm, 2ppm으로 맞추어 공시하였다.

혈청채취 : Ether로 마취시킨 생쥐의 retrobulbar plexus로 부터 헤파린이 처리된 모세시럽관으로 혈액을 채취, 혈청을 분리하고 -20℃에서 분석시기까지 보관하였다.

혈청 면역글로부린 측정 : Forsell⁴⁾의 방법에 따라 ELISA법으로 측정하였다. 96 well microtiter plates에 0.1M bicarbonate buffer(pH 9.6)으로 희석한 goat antimouse immunoglobulin(IgA, IgG, IgM ; Cappel)을 well당 100ul를 4℃에서 overnight하면서 coating시켰다. coating된 plate을 0.1M PBS-Tween 20으로 3차례 씻은 다음 1% OA-PBS 0.3ml를 각 well에 넣어 37℃에서 30분간 배양하였다. plate를 씻고, 20% FCS-RPMI-1640으로 희석한 sample 혹은 reference serum 50ul를 넣어 1시간 배양하였다. 배양후 씻고, goat antimouse Ig peroxidase conjugate 50 ul를 각 well에 넣고 37℃에서 30분간 배양하였다.

씻은 다음 100 ul stopping solution을 첨가하

여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 EIA minireader 2(Dynatech product) 450nm에서 측정하고 농도는 standard reference curve로 부터 산출하였다.

Peyer's patch 세포부유액의 처리 : Frangakis¹⁶⁾의 방법에 따라 생쥐의 소장에서 Peyer's patch를 채취하고 incomplete medium(ICM)에 모은 다음 효소처리액 20ml를 분주한 사례에 옮기고 shaker incubator에서 배양하였다.

Dissociate된 세포를 10% FCS(Fetal Calf Serum) 10ug/ml gentamicin, 2mM glutamin, 15mM HEPES 등이 함유된 complete medium(CM) 20ml를 분주한 50ml centrifuge tube에 넣고, 450×g에서 원심분리, 침전된 세포를 CM으로 세척하고 0.4% trypan blue로 염색, 세포수를 계산한후 세포농도를 5.0×10⁵ cell/ml로 조정 한 다음 37℃ CO₂ incubator에

서 3일간 배양하고, 면역글로부린 측정은 ELISA법으로 측정하였다.

비장세포 부유액으로 처리 : Czerkinsys et al¹⁷⁾의 방법에 따라 spleen을 20% FCS, 2mM L-Glutamin, 1% sodium pyruvate, 5×10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 1% nonessential amino acid 및 penicillin(100 IU/ml), streptomycin(100 ug/ml)이 첨가된 RPMI-1640으로 씻은 다음 세절하여 방치한후 10분간 원심분리, 침전세포를 Tris-buffer 0.83% ammonium chloride와 FCS 1ml를 첨가하여 원심분리, 세척후 trypan blue로 염색, 세포수를 계산하고 FITC Goat antimouse immunoglobulin(IgA, IgG, IgM)으로 염색한후 형광현미경하에서 관찰하였다.

결 과

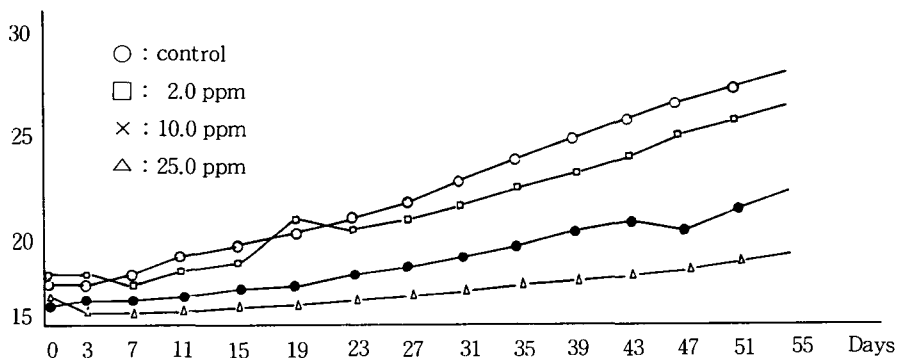


Fig. 1 Body-weight gains in ICR mice fed DON in the diet for 8 weeks.

DON에 체중증식에 미치는 효과(그림 1) : DON이 체중 증식에 미치는 영향을 조사하였던 바 10, 25ppm 처리군에서는 체중증식 효과가

유의적으로(P<0.05) 감소하는 경향을 나타내었으나 반면에 2ppm 처리군에서는 변화가 없었다.

Table 1. Serum immunoglobulin concentration in mice following dietary DON exposure (Mean±S.E)

Treatment (ppm)	Serum levels of immunoglobulins($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	IgG	IgM	IgA
Control	3.71±0.12	2.85±0.11	2.15±0.1
DON 2	3.62±0.13	2.22±0.11	2.27±0.13
10	3.45±0.12	2.29±0.12	3.03±0.17
25	3.20±0.11	2.27±0.13	3.19±0.24

* P < 0.05

DON이 혈청면역 글로부린에 미치는 영향(표 1) : 혈청내에서의 면역글로부린은 IgA는 2ppm 농도에서 약간 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았고, 10ppm 농도에서는 유의성 있게 증가하였다. 25ppm 농도에서는 2주째부터 증가하기 시작하여 6주째에 이르러서는 최고의 증가를 보였다.(p<0.05) 반면에 IgG와 IgM은 각 처리군에서 큰변화가 없었고 오히려 조금씩 감소하는 경향을 나타내었으며 그 감소하는 정도는 IgG에 비하여 IgM이 더욱 감소하였다. DON이 Peyer's patch에서 IgA 합성에 미치는

Table 2. Total Peyer's patches IgA of mice following dietary DON

Treatment (ppm)	IgA Log 10($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	2	10	25
8 weeks	1.28±0.58	1.29±0.47	2.12±0.39*	2.51±0.32**

* : P < 0.05

** : P < 0.01

는 영향(표 1) : Peyer's patch에서의 IgA의 합성은 혈청면역글로부린과 비슷한 경향을 나타내었으며 10, 25ppm 처리군에서는 대조군보다 IgA 농도가 증가하였으나 2ppm 처리군에서는 증가현상을 볼수 없었다. DON이 임파구 표면 면역글로부린에 미치는

Table 3. Percentage of cells containing surface immunoglobulin in spleen cell preparations.

Treatment (ppm)	Percentage immunoglobulin(%)		
	IgA	IgG	IgM
Control	0.75	0.5	1.3
DON 2	0.76	0.7	1.2
10	1.8	0.6	1.4
25	2.2	0.4	1.5

영향 표 3 : IgA에서는 DON의 처리농도가 2, 10, 25 ppm으로 증가할 수록 임파구 표면 면역 글로부린은 0.76, 1.8, 2.2%로 증가하는 경향을 나타내었고 IgG와 IgM은 0.4, 1.5%로 변화가 없었다.

고 찰

Trichothecene은 Fusarium에 의하여 생산되는 mycotoxin 중의 하나이며, 보리, 밀, 콩과 같은 곡류에서 잘 발생한다.¹¹ 이 독소를 섭취하면 구토, 피부괴사, 번식장애 등을 유발한다.^{5,17, 18} 동물에서 소량만 섭취하여도 면역체계가 억제된다고 한다.¹⁹

Vesonder²⁰ 등과 Greenhalgh²¹, Pathre²² 등은 쌀에서도 다른곡류와 마찬가지로 DON이 발생한다고 보고하였다. Pather²³, Bennett²³ 및 Ehrlich²⁴ 등은 DON을 정제하는 방법을 소개하였다. 8주동안 생쥐에 DON을 투여한 결과 체중 증가와 IgA생산조절기전에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 본 실험에서 체중 증가와의 감소현상은 DON 10ppm 농도에서 나타나기 시작하였으나, Pollmann²⁵ 등은 돼지에서 2ppm 농도에 나타난다고 하였다.

이러한 차이는 품종의 차이에서 오는 것으로 생각되어진다. 본 실험에서 사료섭취거부 반응은 10ppm에서는 관찰되지 않았고, 25ppm에서 관찰되었지만 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 Schuh²⁶ 등 및 Trenholm²⁷ 등은 돼지에서 1ppm의 농도에서 사료섭취 거부 반응을 관찰할 수 있었다고 하였는데 이로 미루어보아 돼지가 이독소에 더 감수성이 높은것으로 생각된다. 장점막에서 주된 면역글로부린은 IgA이며,

IgA는 여기서 외부로부터 들어오는 항원을 막아주는 첫 관문역할을 하며, 항원과 결합하여서 항원을 중화시키고 항원의 흡수를 방지한다.

그러나 혈청내에서의 IgA의 역할에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지않다. 본 실험에서 IgG와 IgM은 감소하는 경향을 보였는데 이는 Foesell⁴ 등의 결과와 일치하며, 이러한 결과는 DON이 IgA 합성에 영향을 미칠 수 있는 최소량은 2ppm이며, IgA의 최고농도는 10ppm에서 관찰할 수 있었다고하나 본 실험에서 IgA 합성에 영향을 미칠 수 있는 최소농도는 2ppm에서 나타나지 않았고 최고농도는 25ppm에서 나타났다.

같은 품종을 사용하였지만 이러한 차이가 나는 것은 본 실험에 사용된 생쥐가 Forsell¹¹ 사용한 생쥐보다 건강상태가 좋았기 때문이 아닌가 생각된다.

Peyer's patch에서의 IgA의 농도는 10, 25ppm에서 증가되었는데, 이는 소장의 peyer's patch는 특수하게 임파구집단으로 구성되어 있기 때문인것 같다. 또한 DON이 Peyer's patch 내에서 IgA를 생산해내는 B cell을 자극하기 때문에 IgA의 농도가 증가하는 것 같다. 비장에서 임파구를 분리하여 시험관내에서 IgA를 측정할결과 IgA 농도가 증가하였는데 이는 중요한 의미를 갖는것 같다. 왜냐하면 Schiff 등은 합성된 많은량의 IgA은 간장의 "IgA pump" 기능에 의해서 담관으로 수송하므로서 IgA 농도를 조절하거나, 간장에서 분해된다고 하였는데 본 실험에서는 DON이 오히려 IgA의 분해기전보다는 합성기전에 더 영향을 미치는 것같기 때문이다. 따라서 IgA 농도가 증가된것은 간장의 분해기전이 차단되었기 때문인것 같

다. 그러나 또한가지 고려해야할 것은 spleen 입파구 배양액에서 IgA 농도가 증가한 것으로 보아서 DON이 IgA 합성조절 기능에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 배제할 수는 없다.

결 론

마우스에 Deoxynivalenol(DON)을 2, 10, 25ppm씩 8주간 투여하여 체중의 변화와 혈청 면역 글로부린을 조사하였던바,

1. 10, 25ppm 처리군에서는 체중증식 효과는 유의적으로 ($p<0.05$) 감소하는 경향이었고 2ppm 처리군에서는 나타나지 않았다.
2. 혈청면역 글로부린은 10, 25ppm 처리군에서 IgA는 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였으나 2ppm 처리군에서는 변화가 없었다.
3. DON이 Peyer's patch에서의 IgA합성에 미치는 영향은 IgA는 2ppm 처리군에서는 변화가 없었으나 10, 25ppm 처리군에서는 유의성 있게($p<0.01$) 증가하였다.
4. DON이 입파구 표면 Ig에 미치는 영향은 IgA는 DON처리 농도가 증가할 수록 1.8%, 2.2%로 입파구 표면 면역 글로부린의 증가하는 경향을 나타내었으나 IgG, IgM은 0.4%, 1.5%로 변화가 없었다.

참 고 문 헌

1. Ichinoe M, Kurata H, Suoiura Y, et al. 1983. Chemotaxinomv of Gibberella zeae with special reference to production of trichothecenes and zearlene. Appl. Envir Microbiol. 46:1364.
2. Mirocha C J, Pathre S V, Schauerhamer B, et al. 1976. Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. Appl Envir Microbiol. 32:553~556.
3. Vesonder R F, Ciegler A. 1979. Natural occurrence of vomitoxin in Austrian and Canadian corn. Eur J Appl Microbiol Biotech. 31:280.
4. Forsell J, Witt M F, Tai J H, et al. 1986. Effects of 8 weeks exposure the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol(vomitoxin) and zearalenone. FD chem Toxicol. 24:213~219.
5. Ueno Y. 1983. General toxicology. In Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects. NewYork. Elsevier. p135.
6. Foesyth D M, Yoshizawa T, Morooka N, et al. 1977. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol in swine. Appl Envir Microbiol. 34:547~552.
7. Cote L M, reynolds J D, Vesonder R F, et al. 1984. Survey of vomitoxincontaminated feed grains in Mid-western United States, and associated health problems in swine. J Am Vet Ass. 184:189~192.
8. Miller K, and H A C Atkinson. 1987. The in vitro effects of trichothecenes on the immune system. Mechanisms and models in toxicology. Arch Toxicol Suppl. 11:321~324.
9. Forsell J H, Jensen R, Tai J H, et al.

1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol(vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Fd Chem Toxic.* 25:155~162.
10. Robbaba-Barnat S, Lafarge C, Cohen H, et al. 1988. Immuno-suppressive Properties of deoxynivalenol. *Toxicology.* 48:155~166.
 11. Tryphonas H, Iverson F, Ying S, et al. 1986. Effects of deoxynivalenol(vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice. *Toxicol Lett.* 30:137~150.
 12. Witt M F, Hart L P and Pestka J J. 1985. Purification of deoxynivalenol(vomitoxin) by water-saturated silica gel chromatography. *J Agric Food Chem.* 33:745~748.
 13. William L C, Pestka J J and Hart L P. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol(vomitoxin) and several analogues. *J Agri Foos Chem.* 36:663~668.
 14. Dixon D E, Warner R L, Ram B P, et al. 1991. Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxin zearalenone and a-zearalenol. *J Agric Food Chem.* 35:122~126.
 15. Roscoe W, Ram B P, Hart L P, et al. 1986. Screening-for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agri Food Chem.* 34:714~717.
 16. Frangakis M V, Koopman W J, Kiyono H, et al. 1981. An enzymatic method for preparation of dissociated murine peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immuno.* 126:33~44.
 17. Czerkinsky C C, nilsson L A, Nygren H, et al. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells *J Immuno Methods.* 65:109~121.
 18. Joffe A. 1978. *Fusarium paeae* and *F. sporotrichoides* as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In *mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses.* Sth ed. New York : Marcel Dekker. 21.
 19. Pier A C, Richard J L and Cysewski S J. 1980 Implications of mycotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Ass.* 176:719~724.
 20. Vesonder R F, Cigler A, Jensen A H, et al. 1976. Co-identity of the refusal and emetic principle from fusarium infected corn. *Appl Envir Microbiol.* 31:280.
 21. Greenhalgh R, Gilbert J, King R R, et al. 1984. Synthesis, Characterization, and occurrence in bread and cereal product of an isomer of 4-deoxynivalenol (vomitoxin). *J Agric Food Chem.* 32:1416~1420.
 22. Pathre S V, Mirocha C J. 1977. Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence. In *mycotoxins in human and animal health.* Park

- Forest South. IL Chem-arcital. : 229.
23. Bennett G A, Peterson R E, Plattner R D, et al. 1981. Assay method for Vomitoxin. J Am oil Chem Soc. 58:1002~1005.
 24. Ehrlich K C & Lillehoj E B. 1984. Simple method for isolation of 4-Deoxynivalenol from rice inoculated with *Fusarium graminearum*. Environ Microbiol. 48:1053~1054.
 25. Pollmann D S, Koch B A, Seitz L M, et al. 1985. Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets. J Anim Sci. 60:239.
 26. Schuh M, Leibetseder J & Glowitschnig E. 1982. Chronic effects of different levels of deoxynivalenol (vomitoxin) on as well as histopathological changes in fattening pigs. Proceedings of the 5th international IUPAC symposium Austria. : 273.
 27. Trenholm H L, Hamilton R M, Friend D W, et al. 1984. Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol) contaminated wheat effect on swine, poultry, and dairy cattle. J Am Vet Med Ass. 1985:527.