

## Vomitoxin의 면역 독성효과

김 종 수·김 용 환  
경상대학교 수의과대학  
(1991. 10. 3 접수)

### Immunotoxic effects of vomitoxin

Jong-shu Kim, Yong-hwan Kim  
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
(Received Oct 3, 1991)

**Abstract** : The present study were carried out to investigate the effects of Vomitoxin(Deoxynivalenol, DON) induced dysregulation of IgA synthesis. The data presented here demonstrate that exposure to dietary DON increases serum IgA and concurrently decreases IgG and IgM. Peyer's path(PP) and splenocytes from mice fed dietary DON produced increased IgA in mitogen stimulated and macrophage(MØ) perform essential role for Ig synthesis and was affected by the presence of DON. The synthesis and secretion of IgM and IgG under the presence of DON do not require T cell helper activity, whereas those of IgA do require such activity. These results suggest that dietary DON alters the regulation of IgA production and may act as an immunostimulator.

### 서 론

Mycotoxines은 곰팡이의 2차 대사산물로서<sup>1,2</sup> 사람이나 동물이 이를 섭취하면 피부괴사, 신경장애, 임파구, 백혈구감소, 빈혈, 태아의 사산 및 유산유발, 종양유발과 같은 질병을 일으키며<sup>3-5</sup> 특히 골수, 임파절, 비장, 흉선 및 장점막의 peyer's patch와 같은 면역장기에 치명적인 상해를 가하여 숙주로 하여금 각종 질환에 대한 생체방어기전을 저하시킨다.<sup>4,7</sup> 즉, Salazer et al<sup>8</sup>은 생쥐에 trichothecenes mycotoxin을 투여한후 *Candida albicans*를 접종한 결과 candidiasis에 대한 감수성이 현저하게 증가한다고 보고하였으며 Fromentin et al<sup>9</sup>은 diacetoxyscirpenol을 처리한 생쥐에 *Cryptococcus neoformans*을 접종하여 관찰한 결과 T-dependent antigens의 자극에 의한 체액성 면역반응이 현저하게 감소한다고 하였고, Rosenstein et al<sup>10</sup>은 생쥐에 Fusarium mycotoxin을 투여한 결과 T-dependent antigen의 자극에 의한 체액성 면역반응이 증가한다고 하였다. 또한 Rosenstein et al<sup>11</sup>은 trichothecenes mycotoxin을 처리한 동물에 피부이식을 한 결과 피부이

식거부반응율이 현저하게 증가한다고 하였다. Friend et al<sup>12</sup>과 Lafarge et al<sup>13</sup>은 T-2 toxin을 처리한 생쥐에서는 mitogen에 대한 B와 T cell의 분화가 늦어진다고 하였다. Lafarge et al<sup>14</sup>은 T-2 toxin이 생체와 시험관내에서 임파장기의 DNA 사슬에서 single-strand를 파괴하나 간장조직에서는 그런 변화가 없었다고 한다. Tryphonas et al<sup>15</sup>은 생쥐에 DON 독소를 투여한 결과 혈청항체가 감소하였고, 면역적혈구에 대한 plaque 형성이 감소한다고 하였다. Fusarium 산성독소의 하나인 zearalenone이나 이와 유사한 물질인 diethylstilbestrol이 면역기전에 미치는 영향에 대하여 Pung et al<sup>16</sup>은 생쥐에 *Listeria monocytogenes*을 감염시킨 결과 숙주의 방어기전이 현저하게 감소하였고 interleukin 2 생산도 억제된다고 하였으며, Dean et al<sup>17</sup>은 종양유발 감수성이 증가한다고 하였고, Boorman et al<sup>18</sup>은 macrophage 기능이 변화된다고 하였고, Kalland와 Campbell<sup>19</sup>은 natural killer-cell activity가 감소된다고 하였으며, Luster et al<sup>20</sup>은 delayed hypersensitivity 반응이 억제된다고 하였다. 주로 IgG, IgM, IgE에 대한 연구는 많이 수행되었지만 IgA에 대한 연구는 다소

· 이 논문은 1990년도 한국과학재단 일반기초 연구비에 의하여 수행되었음.

경시되어져 왔다. 그러나 면역반응을 일으킬 수 있는 개체에 있어서 모든 감염의 주경로는 mucosal surface이므로 이에 대한 연구가 다소 수행된 바 있다. Crabbe et al<sup>21</sup>과 Bazin et al<sup>22</sup>은 생쥐에 ferritin과 면양적혈구를 경구적으로 투여한 결과 IgA생성은 증가하지만 IgM, IgG 증가는 없었다고 하였다. 같은 항원을 비경구적으로 투여한 경우 반대로 IgG와 IgM의 생성은 억제된다고 하였다. 이와같이 경구적으로 투여되는 항원에 대한 생체반응기전 즉, 일련의 항체처리과정과 초기의 세포면역반응은 장관의 Peyer's patches(PP)에서 주로 일어난다고 한다.<sup>23</sup> 이 PP는 항원이나 mitogen 자극에 대하여 IgA를 합성 및 분비하는 B cell의 sources로 알려져있다.<sup>24,25</sup> Elson et al<sup>24</sup>과 Clancy<sup>25</sup>은 PP로부터 임파구를 분리하여 시험관내에서 IgA를 분비하는 B-lymphocytes는 T-cell에 의하여 조절된다고 하였으며, Pang et al<sup>27</sup>은 종양을 가진사람의 장관막 임파절과 말초혈액으로부터 임파구를 분리하여 비교시험한결과 말초혈액보다는 장관막 임파절 임파구에서 IgA 합성이 더욱 현저하다고 하였다. John et al<sup>24</sup>은 생쥐에 *Giardia muris*를 접종하여 PP에서의 면역반응과 T-cell 조절기능을 연구한 결과 *G. muris* 감염시에는 PP의 임파구수가 현저하게 증가한다고 하였고, Lycke와 Holmgren<sup>28</sup>은 cholera toxin을 경구투여한 생쥐장의 lamina propria와 PP에서 투여한 항원에 대한 memory cell이 존재함을 증명하였다. 최근들어 trichothecene이 생쥐에서 백혈병과 각종 종양유발 인자로서 작용한다는 보고가 있다.<sup>29</sup> 이와같이 각종 항원에 대한 mucosal surface에 있어서 면역글로부린의 조성에 미치는 연구는 많이 진행되어 있으나 trichothecene중 특히 DON이 면역체계에 미치는 연구는 드물고 특히 국내에서는 이 DON에 대한 연구는 극히 찾아보기 힘들다. 따라서 이 DON이 immuno system에 미치는 영향을 추후 코자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**공시동물:** 체중이 15~18g 되는 swiss 계통 수컷 생쥐 40마리를 사용하였고 한 cage에 한마리씩 분리사육하면서 물은 자유로이 급식시켰다.

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

**Diet:** Forsell et al<sup>30</sup>의 방법에 따라 toxin을 정제된 분말사료에 배합하여 공시하였다. DON을 ethanol에 용해한 후 농도가 1,000ppm되도록 분말사료에 넣어서 완전히 섞은다음, fume hood에서 ethanol을 증발시켰다. 이를 stock용으로 냉암소에 보관하고 이 stock용 사료를 각각 2, 10, 25ppm 농도가 되도록 DON이 함유되지 않은

분말사료와 혼합하여 각 처리군에 공급하였다.

**실험군과 독물투여:** 실험군은 처리군(2, 10, 25ppm)과 대조군, 사료제한군으로 나누었고 처리군은 각 농도별로 DON이 함유된 사료를, 대조군은 DON이 함유되지 않은 사료를, 사료제한군은 DON처리군이 섭취하는 사료의 량을 평균하여 그 평균량을 DON이 함유되지 않은 사료를 4일 간격으로 일정한 량을 공급하였다.

**Serum채취:** Ether로 마취시킨 마우스의 retrobulbar plexus로부터 해파란이 처리된 모세시험관으로 혈액을 채취 원심분리하여 혈청을 분리하고 -20°C에서 분석시까지 저장하였다.

**복강 대식세포의 처리:** Macrophages(M $\phi$ ) 분리는 Miller와 Atkinson<sup>31</sup>의 방법에 따라 thioglycollate broth 5ml를 마우스 복강에 주사하고 48시간 후 phosphate buffered saline으로 마우스 복강을 씻어내어 세포를 세척하였다. 10% fetal calf serum이 첨가된 RPMI 1640 배지 ml당 세포의 농도가 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>이 되게 하여, M $\phi$ 가 함유된 용액 5ml를 35mm petri dish에 넣고 한시간동안 배양하였다. 부착하지 않은 세포들은 RPMI 1640으로 두번 세척하여 제거하고, 37°C versen 용액 5ml를 각 petri dish에 넣은 후 5분간 배양하였다. 배양후 petri dish 전표면을 versen용액으로 여러차례 pipetting하여 표면에 부착해 있는 세포를 분리한다음 5%FCS가 함유되어 있는 4°C RPMI 1640 10ml를 넣어 놓은 50ml conical tube에 세포부유액을 옮기고 4°C, 200 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고, cell pellet를 4°C complete RPMI-5 용액으로 회석하고 얼음위에서 보관하면서 세포수를 계산하였다.

**비장세포 부유액의 처리:** 비장세포 부유액은 czerkinsys et al<sup>32</sup>의 방법에 따라 각 마우스에서 분리한 spleen을 20% Fetal calf serum, 2mM L-Glutamine(Sigma), 1% sodium pyruvate(Sigma), 5 $\times$ 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol(Sigma), 1% nonessential amino acid(Sigma) 및 penicillin(100U/ml), streptomycin(100 $\mu$ g/ml)(Gibco)이 첨가된 RPMI-1640으로 씻은 다음 forcep로 세척하여 세포가 침전되게 10분동안 방치한후 450 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 Tris-buffered 0.83% ammonium chloride와 FCS 1ml를 첨가하여 1500rpm에서 5분간 원심분리후 두번 세척하고 trypan blue로 염색, 세포수를 계산하여 사용하였다.

**Peyer's patches 세포 부유액의 처리:** PP 분리 및 세포배양은 Frangakis et al<sup>33</sup>의 방법에따라 마우스의 small intestine으로부터 마리당 평균 8~10개의 Peyer's patch를 무균적으로 채취하여 Incomplete medium(ICM)에 모은 다음 PP를 distase(protease from bacillus polymyxa; Sigma)용액20ml를 분주한 petri dish에 옮기고 37°C s-

haker incubator에서 30분간 배양하였다. 배양후 solution 만 제거하고 신선한 enzyme solution 20ml를 즉시 보충, 다시 30분간 배양, 이과정을 3~4번 반복시행한후 dissociated PP cells을 10% FCS, 10 $\mu$ g/ml gentamicin, 2mM glutamin, 15mM HEPES이 함유된 complete medium(CM) 20ml를 분주한 50ml centrifuge tube(Falcon 2070)에 넣고, 450 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 CM으로 2번 세척하고 0.4% trypan blue로 염색, 세포수를 계산한후 세포농도를 5.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml로 조정하였다.

**임파구 부유액으로부터 T 및 B cells의 분리:** T 및 B cells 분리는 Coligan et al<sup>34</sup>의 방법에 따라 멸균 nylon wool colum에 complete RPMI-5 50ml를 채우고, 3way cock로 잠근후 건조방지를 위해 complete RPMI-5 2-3ml을 증충하고 수평을 유지하면서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 부란기에서 45분이상 보존하였다. 상기한 PP 및 spleen cells 분리법에 따라 분리한 single-cell suspension에서 적혈구를 용혈시키고, 37 $^{\circ}$ C로 가온한 다음 complete RPMI-5로 7.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 부유시켰다. stopcock를 열고 배지를 완전히 제거하고 세포부유액을 첨가한 다음, 30 $^{\circ}$ C complete RPMI-5 0.5ml를 첨가하여 모든 세포가 column을 통과하도록 하였다. stopcock 잠근후 건조방지기 위하여 수직을 유지하면서 colum을 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 부란기에서 45분간 배양하였다. 여기에 RPMI-5를 19G 주사기로 채운다음 stopcock를 열고 비흡착 T 세포를 분리하여 적정농도를 조정 사용하였다. B cell 분리는 비장세포 부유액으로부터 percoll gradients법을 이용하여 T cell을 제거하고 B cell을 분리하였다.

**Immunoglobulin 측정:** 혈청 immunoglobulin은 coligan et al<sup>34</sup>의 방법에 따라 radial immunodiffusion(RID)으로 측정하였다. RID-agarose gel은 6.98g sodium barbital, 6.0g sodium chloride 및 0.1g thimerosal을 함유한 용액을 38% HCl로 pH 7.6으로 조정후 10g의 agarose를 첨가 9ml 시험관에 분주하고 goat antimouse immunoglobulin(cappel)을 RID agarose gel 9ml에 섞어 RID plats에 분주하였다.

Goat anti-mouse IgA( $\alpha$  chain specific)는 1:60, IgM(m $\mu$  chain specific)은 1:70, IgG(gamma chain specific)는 1:50으로 희석 사용하였으며 plate를 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 굳히고 3mm holes를 만들어 serum sample 혹은 마우스 표준혈청(cappel) 10 $\mu$ l씩 첨가하여 사용하였다. IgA 혈청 sample은 0.85% saline에 1:1로, IgM은 1:3, IgG는 1:6으로 희석, RID plates를 24 혹은 48시간 4 $^{\circ}$ C의 humid chamber에서 배양하고 침전밴드는 표준혈청에서 나타난 밴드를 기준으로 vernier caliper로 측정하였다.

**시험관내에서의 면역글로부린 측정:** 시험관내에서의 면역글로부린 측정은 Casale et al<sup>35</sup>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 ml당 10 $\mu$ l를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하면서 coating시켰다. Coating 된 plates를 0.1M PBS-Tween20으로 3차례 씻은다음, 1% OA-PBS 0.3ml를 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. Plate를 PBS-Tween으로 4차례 씻고, 20% FCS-RPMI-1640으로 희석한 sample(IgA 1:2, IgG, IgM 1:4) or reference serum 50 $\mu$ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 배양후 PBS-Tween으로 5번씻고, goat anti-mouse Ig peroxidase conjugate(IgA, 1:500, IgG, IgM 1:750 in 20% FCS-RPMI-1640) 50 $\mu$ l를 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 배양후 PBS-Tween으로 6번 세척하고 100 $\mu$ l ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate를 각 well에 넣어 발색시킨후 100 $\mu$ l stopping solution을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 EIA minireader 2(Dynatech product) 450nm에서 측정하였고 농도는 standard reference curve로부터 산출하였다.

## 결 과

**DON1 혈청 면역글로부린에 미치는 영향:** IgA는 2ppm 농도에서 6주째 약간 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았고, 10ppm 농도에서 4주와 6주째 유의성있는 증가를 보였다(p<0.05). 25ppm 농도에서는 2, 4, 6주 모두 증가하였으며 6주째는 고도의 유의성있는 증가를 나타내었다(p<0.01). 2ppm농도에서 IgG와 IgM은 별다른 변화가 없었고, 10ppm 농도에서 IgM은 변화가 없었으나 IgG는 4, 6주째 감소하는 경향을 나타내었다. 25ppm 농도에서 IgA는 전실험기간을 통하여 현저하게 증가하는 반면에 IgG, IgM은 다같이 감소하였으며 그 감소하는 정도는 IgM에 비하여 IgG가 더욱 감소하였다(Table 1).

사료섭취 거부로인한 결과가 혈청면역글로부린에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위해서 "restricted control group"을 설정하고 이 처리군에는 DON처리군이 섭취하는 사료의량을 평균하여 그 평균량을 공급하여 비교한 결과 IgA는 대조군은 물론 restricted control group에 비하여 현저히 증가한 반면 IgG, IgM은 restricted control group보다 감소하였다(Fig. 1).

앞 실험에서 DON처리는 생체내 IgA합성을 증가시켰는데 이 IgA합성증가에 systemic compartment 즉, PP와 spleen이 어떤 영향을 주는지 규명하고자 PP와 spleen에서 임파구를 분리하여 측정하였다. IgA는 PP와 spleen에서 10ppm 농도 6주째 증가하였고(p<0.05), 25p-

**Table 1.** Serum Ig concentrations in mice following dietary exposure to DON

Ig Log<sub>10</sub>(μg/ml)

Weeks Ig Concentration (ppm)	0			2		
	A	G	M	A	G	M
	0	2.86±0.12	3.68±0.11	2.12±0.11	2.71±0.13	3.72±0.12
2	2.75±0.14	3.71±0.14	2.24±0.17	2.65±0.13	3.69±0.18	2.53±0.18
10	2.87±0.51	3.70±0.16	2.31±0.15	2.76±0.08	3.66±0.16	2.48±0.11
25	2.83±0.15	3.61±0.17	2.33±0.13	3.19±0.13**	3.48±0.09*	2.31±0.17*

• p<0.05

Weeks Ig Concentration (ppm)	4			6		
	A	G	M	A	G	M
	0	2.74±0.10	3.87±0.11	2.50±0.20	2.72±0.08	3.91±0.18
2	2.68±0.09	3.86±0.14	2.48±0.19	2.79±0.11	3.84±0.13	2.43±0.16
10	2.86±0.13*	3.68±0.17*	2.45±0.12*	2.98±0.10*	3.61±0.16*	2.48±0.11
25	3.46±0.12**	3.45±0.13**	2.39±0.13**	3.86±0.11**	3.39±0.13**	2.25±0.17*

• p<0.05

\*\* p<0.01

**Table 2.** Effect of dietary DON on in vitro Ig(A, G, M) production by isolated PP lymphocyte

(Ig concentration Log<sub>10</sub>(ng/ml))

Weeks Ig Concentration (ppm)	2			4			6		
	A	G	M	A	G	M	A	G	M
	2	1.24±0.11	5.84±0.20	6.90±0.17	1.57±0.14	5.96±0.08	6.92±0.13	1.32±0.09	6.04±0.17
2	2.01±0.07	5.42±0.16	6.81±0.12	2.15±0.05	5.35±0.12	6.67±0.15	2.78±0.14	5.25±0.14	5.67±0.14
10	2.42±0.18	4.81±0.14	5.98±0.07	2.68±0.10	4.61±0.16	5.89±0.14	3.67±0.12*	4.51±0.14*	4.91±0.11*
25	3.04±0.09*	4.53±0.13	5.63±0.19	3.81±0.09*	4.32±0.15*	4.81±0.06**	4.46±0.11**	4.17±0.11**	3.94±0.08**

• p<0.05

\*\* p<0.01

**Table 3.** Effect of dietary DON on in vitro Ig(A, G, M) production by isolated splenic lymphocyte

(Ig concentration Log<sub>10</sub>(ng/ml))

Weeks Ig Concentration (ppm)	2			4			6		
	A	G	M	A	G	M	A	G	M
	2	0.75±0.12	4.42±0.14	4.81±0.11	0.81±0.14	4.32±0.11	5.01±0.18	0.78±0.11	4.21±0.14
2	1.54±0.16	4.21±0.11	4.72±0.14	1.81±0.17	4.10±0.13	4.51±0.12	2.35±0.13	4.02±0.16	4.32±0.14
10	2.11±0.19	4.11±0.17	4.21±0.13	2.63±0.16	4.01±0.17	4.22±0.14	3.43±0.11*	3.91±0.13	4.01±0.16
25	2.86±0.14*	4.03±0.16	4.01±0.17	3.67±0.12**	3.91±0.15	4.13±0.11	4.12±0.12**	3.78±0.4**	3.72±0.13*

• p<0.05

\*\* p<0.01

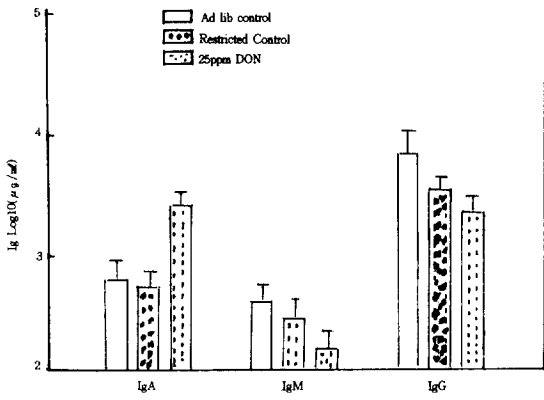


Fig 1. Serum immunoglobulin isotype profile following dietary DON exposure.

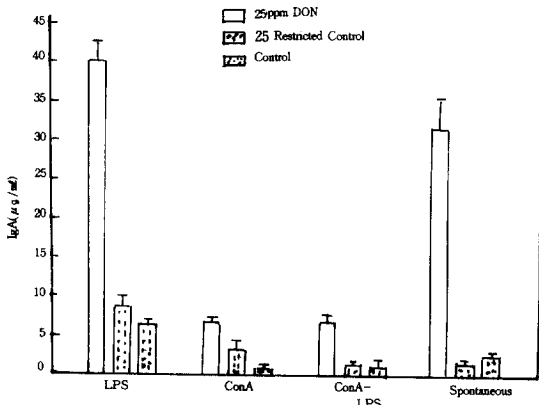


Fig 2. Effect of dietary DON *in vitro* IgA production by isolated splenocytes.

pm 농도에서는 2주째부터 증가하여 6주째는 대조군보다 현저한 증가를 한 반면 ( $p < 0.01$ ) IgG, IgM은 6주째 10ppm 농도에서 약간 감소하였다. 25ppm 농도에서는 현저하게 감소하였으며 감소하는 정도는 IgM에 비하여 IgG가 더 감소하는 경향을 나타내었다(Table 2,3).

DON 처리군, 사료제한 대조군과 대조군에 LPS와 다른 mitogen의 첨가가 IgA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Con A, LPS와 Con A, spontaneous(non-mitogen)군의 성적을 비교하였다. LPS로 자극한 임파구는 대조군과 사료제한 대조군에 비하여 약 500%나 IgA 합성을 증가시켰고 이러한 경향은 Con A, Con A와 LPS 처리군에서도 나타났다. 더 흥미로운 것은 spontaneous 군에서도 DON 처리군이 대조군과 사료제한군보다 현저하게 증가하였다(Fig 2).

DON의 Ig 합성기능에 대한 macrophage의 영향: DON의 IgA의 합성기능에 MØ가 어떠한 영향을 미치는가

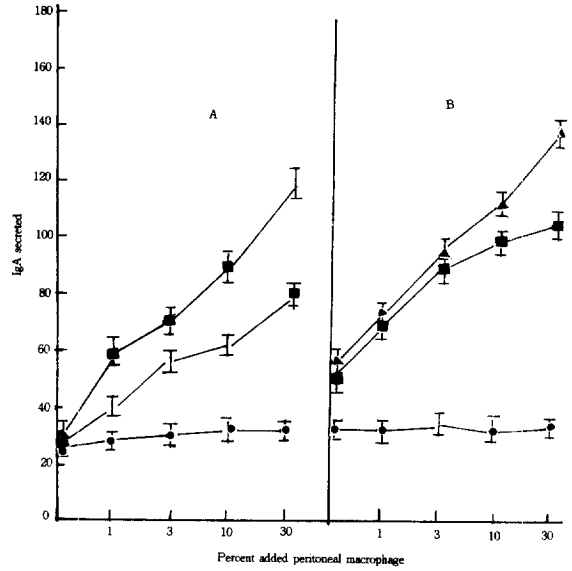


Fig 3. Effect of addition of peritoneal macrophage on the synthesis of IgA to DON with LPS( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in Spleen(A) and Peyer's patch(B). ●: DON, ■: DON+MØ, ▲: DON+MØ+LPS

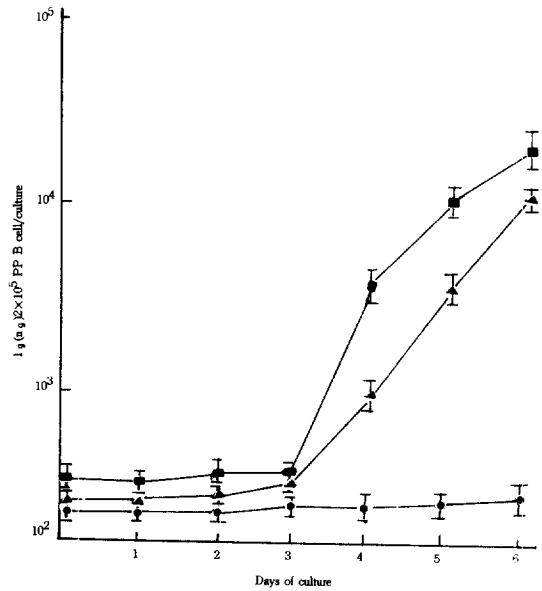


Fig 4. Time kinetics of isotype-specific Ig biosynthesis *in vitro* by Peyer's patch(PP), highly purified B cell in the presence of LPS( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ---: IgA, ▲: IgG, ■: IgM

를 확인하기 위하여 DON 25ppm을 처리한 마우스의 비장과 PP에서 분리한 임파구에 MØ를 첨가하지 않은 것과 MØ를 첨가한 것, MØ에 LPS를 첨가한 실험군의 성적을 비교하였다. MØ 또는 MØ와 LPS를 첨가한 것이 MØ를 첨가하지 않은 것에 비하여 IgA의 합성이 증가

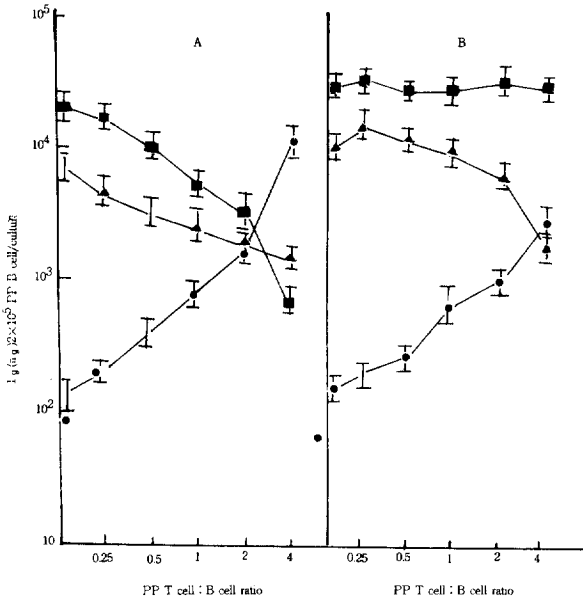


Fig 5. Effect of graded numbers of Con A-induced peyer's patch(PP) and spleen T cell on each of class-specific Ig biosynthesis in fresh PP B cell A. PP T cell : B. spleen T cell  
 ○---○, IgA; ▲---▲, IgG; ■---■, IgM

였고, MØ의 첨가율이 증가 할수록 IgA의 합성은 증가 하였으며 비장세포에서는 MØ의 첨가율이 30%일때 약 90%가량 증가하였고(Fig 3 A), PP cell에서는 110%까지 증가하는 현상을 나타내었다(Fig 3 B). 따라서 DON은 MØ 존재하에서 IgA 생산을 자극하는 기능이 증가하는 것을 알 수 있었다.

**1g 합성에 대한 T cell의 조절기능 :** DON을 처리하지 않은 순수분리한 PP B cell( $2 \times 10^5$  cell)에 B cell mitogen인 LPS( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 첨가하여 6일동안 배양한 결과 IgG, IgM은 3일 이후부터 현저하게 증가하는 반면 IgA는 거의 증가하지 않았다(Fig 4). T cell을 첨가함으로써 PP cell에서 IgM합성은 현저하게 억제되었으며 이 억제효과는 T cell의 첨가비율이 증가할수록 IgM 합성과 분비는 더욱 억제되었고(Fig 5 A), 비장세포에서는 커다란 변화가 없었다(Fig 5 B).

IgG는 T cell을 첨가함으로써 PP, 비장세포에서 다같이 현저하게 억제되었다(Fig 5 A, B). IgA는 T cell을 첨가함으로써 IgG, IgM과는 달리 현저하게 합성이 증가하였다(Fig 5 A, B). DON을 처리한 마우스에서 Ig 합성에 T cell이 어떤 영향을 미치는가를 알기위하여 DON(25ppm)을 처리한 마우스 PP와 비장세포에 T cell을 첨가한 결과 DON을 처리하지 않았을 때와 비슷한 경향을 나타내었으나 그 정도가 더욱 심하였으며(Fig 6 A, B), 이는 DON이 T cell의 help or suppress activity에 영향을 주는 것으로 생각된다.

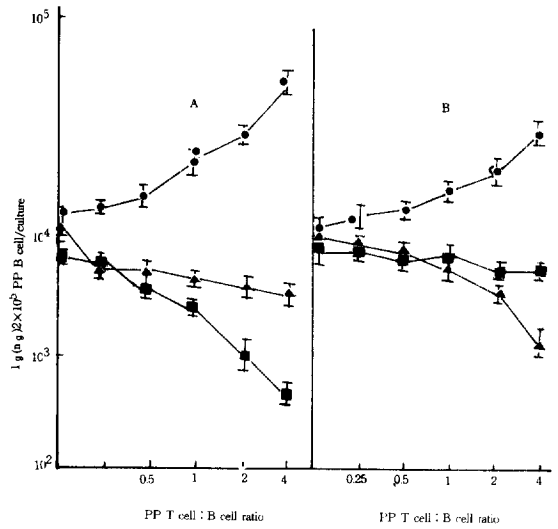


Fig 6. Effect of graded numbers of Con A-induced Peyer's patch(PP) and spleen T cell on each of class-specific Ig biosynthesis in fresh PP B cell of mice treated with 25 ppm DON. A. PP T cell : B spleen T cell ○---○, IgA; ▲---▲, IgG; ■---■, IgM

## 고 찰

Trichothecenes은 단백질합성과 DNA합성을 강력하게 억제하기 때문에 일반적으로 면역억제물질로 알려져 있다.<sup>31</sup> 또한 Pier et al<sup>36</sup>은 소량의 mycotoxin에 노출되어도 생체의 immunogenesis와 저항기전이 손상을 받게 되며 체액성 및 세포성면역에 영향을 미쳐 어떤 감염원에 대한 생체방어기전에 큰 변화를 초래한다고 한다. 이러한 mycotoxin에 사람이나 동물이 노출되면은 alimentary toxic aleukia, leukopenia, anemia, bone marrow aplasia 등과 같은 현상이 나타나며<sup>37</sup>, 최근들어 trichothecene deoxynivalenol의 면역기전에 미치는 연구들이 진행되고 있다.<sup>31</sup> Cooray<sup>38</sup>은 시험관내에서 T-2 toxin과 diacetoxyscirpenol이 임파구 blastogenesis를 억제한다고 보고하였으며 DON과 3-acetyldeoxynivalenol은 사람과 쥐의 말초혈액 임파구의 blastogenesis를 억압한다고 하였다.<sup>39</sup> Ig은 어떤 감염원에 대항하는 주된 물질이며 경구적으로 들어온 항원에 대한 면역반응은 intestine에 있는 특수한 임파양 조직인 Peyer's patches에서 일어나고 있다고 하는데 여기에 있는 "M" cell이 intestine을 통하여 항원을 흡수한다고 한다. 흡수된 항원은 PP의 T와 B cell에 노출되면 B cell은 IgA를 생산하게된다. 항원에 감염된 B cell은 PP를 떠나서 mesenteric lymph nodes를 거쳐 thoracic duct로 가고 이어 순환혈액을 따라서 순환하게 되는데 이 기간중에 B cell은 IgA를 생산할 수 있는 plasma cells 혹은 memory cells로 전환되어 마지막에는 mucosal tissues로 다시되돌아와서 항원에 대

한 specific IgA를 생산하게 된다.<sup>40</sup>

본 실험에서 DON은 혈청면역글로부린에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 특히 IgA 합성에 커다란 영향을 미치고 IgG, IgM 합성이 억제되었는데 이는 Forsell et al<sup>30</sup>과 일치하는 결과를 나타내었다. IgG, IgM의 감소현상은 restricted control group보다 더 억제되는 것으로 보아 사료섭취제한이 이 IgG, IgM 합성에 영향을 미치는 것으로 생각되나 충분한 자료가 없으므로 단정하기는 어렵다. 다만 DON이 다른 trichothecene이나 cycloheximide와 같이 단백질합성에 있어서 Polypeptide chains의 elongation을 억제하기 때문인 것으로 생각되며 Ig 생산의 isotype-specific dysregulation개념을 뒷받침해 주는 것 같다. 본 실험 2ppm에서는 변화가 없었으나 Forsell et al<sup>30</sup>은 2ppm이 threshold DON level이었다고 하고 10ppm에서 최고혈청농도를 나타낸다고 하여 본 실험의 25ppm과 다소 차이를 보였는데 이는 동물의 strain이나 또는 동물개체의 건강상태 등에 원인이 있다고 생각되지만 측정방법의 차이도 있을 것이라 생각된다. Miller와 Atkinson<sup>31</sup>은 DON을 처리한 마우스에서 Ig에 관해서는 언급하지 않았지만 입파구 blastogenesis가 소량의 DON (0.005n g/ml)을 처리하였을 경우는 증가하지만 대량 (50n g/ml)의 DON을 처리하였을 경우에는 현저하게 억제된다고 하였고 또한 DON 자극으로 말미암아 interleukin-1(IL-1)의 생산이 증가한다고 하였다. 본 실험에서는 입파구 blastogenesis와 IL-1의 생산은 측정하지 않았지만 DON의 영향으로 면역체계에 변화가 온다는 것은 그들의 결과와 일치하였다.

본 실험에서 DON이 생체내 IgA 합성을 증가시켰는데 이 IgA 합성증가에 systemic compartment인 PP와 spleen이 생체내 IgA 합성에 관련이 있는 것으로 생각되는데 이는 DON이 IgA의 분해보다는 합성에 더 영향을 미치는 것으로 보이며 간장에서 많은 양의 IgA가 분해되기 때문이다. Mestecky와 McGhee<sup>50</sup>은 간장이 순환하고 있는 polymeric IgA를 담즙으로 수송함으로써 혈청내 IgA 농도를 조절하는 "IgA pump" 기능을 가진다고 하였다. 따라서 DON에 의한 분해작용이 차단됨으로 농도가 증가한 것으로 생각된다. 그러나 PP와 비장세포배양에서도 IgA 합성이 증가한 것으로 보아 DON은 IgA 합성의 조절작용에 영향을 주는 것 같다. DON 처리군, 사료제한 대조군과 대조군에 LPS와 다른 mitogen을 첨가한 결과 정도의 차이는 있지만 각군에서 DON 처리군이 대조군과 사료제한 대조군에 비하여 IgA의 합성과 분비가 현저히 증가하였으며 더욱 흥미로운 것은 spontaneous군에서도 DON 처리군이 다른 두 군보다 IgA합성이 증가하였는데 이는 PP와 spleen IgA 입파구가 이미 DON에 노출되어 자극을 받았기 때문에 IgA를 생산하는 B cells을

자극할 mitogen이 필요하지 않으므로 다른 mitogen의 자극은 영향을 미치지 못한 것으로 생각된다. 본 실험에서 DON 처리군의 PP, 비장세포 배양액에 MØ를 첨가한 결과 MØ를 첨가하지 않은 것에 비하여 IgA 합성이 증가하는 현상을 나타내었고, LPS를 첨가하면 그 정도가 더욱 현저하게 증가하였는데 이는 DON이 MØ 존재하에서 IgA 합성조절기능의 activity를 증가시킨 것으로 볼 수 있다. 이러한 성적은 Hersh와 Harris<sup>41</sup>가 항원자극에 대한 MØ-lymphocyte 상호작용을 연구한 결과 MØ가 없으면 입파구가 항원에 대한 blastogenesis반응이 일어날 수 없다고 하면서 MØ가 항원에 대한 입파구 blastogenesis 반응에 필수적으로 요구된다고 하였고, Waldron et al<sup>42</sup>은 complete freund's adjuvant로 감작시킨 기니픽에서 phytohemagglutinin에 대한 입파구 blastogenesis는 변화가 없었으나 MØ를 첨가함으로써 입파구 blastogenesis가 현저하게 증가하였다고 한다. Musoplat et al<sup>43</sup>도 소에 *Mycobacterium bovis*를 접종하여 입파구 blastogenesis를 관찰한 결과 MØ의 존재유무에 따라 입파구 blastogenesis는 현저하게 차이가 난다고 하였으며, Miller와 Atkinson<sup>31</sup>은 MØ와 DON 배양액에 phytohemagglutinin을 첨가할 경우 MØ를 첨가하지 않은 것보다 입파구 blastogenesis가 현저하게 증가하는 것으로 보아 MØ는 항원에 대한 입파구 blastogenesis에 중요한 역할을 할뿐만 아니라 본 실험에서 나타난 것처럼 Ig 합성에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

DON을 처리하기 전 Ig 합성에 대한 T cells의 조절기능을 규명하기 위해서 순수분리한 PP의 B cells에 B cells mitogen인 LPS를 첨가하여 6일동안 배양한 결과 IgG, IgM은 현저하게 증가하는 반면 IgA는 영향을 받지 않았으나 PP T-cells을 첨가하므로 정도의 차이는 있지만 PP와 비장세포에서 IgG, IgM은 현저하게 억제되고 IgA는 증가하였다. 즉, PP T-cells에 의해 PP에서 IgA의 합성이 증가한 것은 T cells의 signal에 의해 PP IgA B cell의 활성이 증가한다는 것 즉, T cell suppression에 대한 감수성이 감소되었거나 아니면 T cell help 기능에 대한 감수성이 증가했다고 볼 수 있으며 이는 IgA 생산에 있어서 비장과 PP에서 T cell helper와 T cell suppress의 기능이 서로 다르다는 것을 의미하는 것 같다. 또한 IgA 합성을 위한 T cell helper 기능은 PP에서 현저하고, IgA T cell suppressor기능은 비장에서 현저하게 나타난다는 것을 짐작할 수 있다. 따라서 IgG, IgM의 합성과 분비에는 T cell helper 기능이 필요없다는 것을 의미하며, IgA의 합성과 분비에는 T cell helper 기능이 필요하다는 것을 알 수 있는데 이와같은 성적은 마우스<sup>24,44~49</sup>와 사람<sup>27</sup>의 성적과 일치하였다.

DON을 처리했을 때의 Ig 합성에 대한 T cells의 조절

기능을 알아보기 위하여 DON을 6주간 투여한 마우스에서 순수분리한 PP의 B cell에 앞의 실험조건과 같이 처리하여 관찰한 결과 DON을 처리하지 않았을 때와 비슷한 경향이 나타났으나 그 합성과 억제 정도의 정도가 더욱 현저하게 나타났다. 이는 T cell helper 기능과 T cell suppression 기능이 DON과 협력작용을 하였을 것으로 추측되지만 이 실험에 대한 결과보고가 많지 않으므로 결론적으로 단정지우기는 어려운 상태이다.

## 결 론

Trichothecene mycotoxin 계열의 mycotoxin DON으로 인한 IgA 합성의 dysregulation을 규명하기 위해서 DON(2. 10, 25ppm)이 함유된 사료를 마우스에게 공급한 결과 serum IgA는 현저하게 증가하였고 IgG, IgM은 감소하였으며, PP와 비장세포 배양에서도 *In vivo*에서 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Ig 합성에 M $\phi$ 와 T cells도 영향을 미쳤는데 IgA의 합성과 분비에는 T cell의 helper 기능이 필요하지만 IgG, IgM의 합성에는 요구되지 않았다. 이러한 결과는 dietary DON이 IgA 생산의 조절기능에 영향을 주는 것으로 추측되며 면역촉진의 역할도 하는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Yoshizawa T, Morooka N. In mycotoxins in human and animal health. Edited by Rodricks CW, Hesseltime and Mehlman A. Chemorbital, park Forest South, IL, 1977; 309~312.
2. Ichinoe M, Kurate H, Sugiura Y, et al. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl. Envir. Microbiol* 1983; 46 : 1364~1369.
3. Vesonder RF, Ciegler A, Jensen A, et al. Co-identity of the refusal and emetic principle from *Fusarium* infected corn. *App Envir Microbiol*. 1976; 31 : 280~284.
4. Cote LM, Reynolds D, Vesonder RF, et al. Survey of vomitoxin-contaminated feed grains in midwestern United states and associated health problems in swine. *J AM Vet Med Ass* 1984; 184 : 189~191.
5. Lindenfelser LA, Lelihoj EB, Burmeister HP. Aflatoxin and Trichothecene toxins: Skin tumour induction and synergistic acute toxicity in which mice. *J Natl Cancer Inst* 1974; 74 : 113~116.
6. Patterson DSP, Matthews JG, Shreeve BJ, et al. The failure of trichothecene mycotoxins and whole culture of *Fusarium tricinctum* to cause experimental

- haemorrhagic syndromes in calves and pigs. *Vet Rec* 1979; 105 : 252~255.
7. Pestka JJ, Tai JH, Witt MF, et al. Suppression of immune response to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Fd Chem Toxic* 1987; 25 : 297~304.
8. Salazar S, Formentin H, Mariat F. Effects of diacetoxyscirpenol on experimental candidiasis of mice. *Acad Sci* 1980; 29 : 877~881.
9. Formentin H, Salazar S, Mariat F. Experimental cryptococcosis in mice treated with diacetoxyscirpenol a mycotoxin of *Fusarium*. *Sabouraudia* 1981; 19 : 311~313.
10. Rosenstein Y, Kretschmer R, Lafarge FC. Effect of *Fusarium* toxins, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune response. *Immunology* 1981; 44 : 555~561.
11. Rosenstein Y, Lafarge FC, Lespinats, et al. Immunosuppressive activity of *Fusarium* toxins: Effects on antibody synthesis and skin grafts of crude extracts T-2 toxin and diacetoxyscirpenol. *Immunology* 1979; 36 : 11~117.
12. Friend SCE, Babiuk LA, Schiefer HB. The effects of dietary T-2 toxin on the immunological function and helps simplex reactivation in swiss mice. *Toxic Appl Pharmac* 1983; 69 : 234~244.
13. Lafarge FC, Lespinats G, Lafont P, et al. Immunosuppressive effects *Fusarium* extracts and trichothecenes: Blastogenic response of murine splenic and thymic cell to mitogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160 : 302~311.
14. Lafarge FC, Decloitre F, Mousset S, et al. Induction of DNA single-strand breaks by T-2 toxin a trichothecene metabolite of *Fusarium*: Effects on lymphoid organs and liver. *Mutation Res* 1981; 88 : 115~123.
15. Tryphonas H, O-Grady L, Arnold DL, et al. Effects of deoxynivalenol on the humoral immunity of mice. *Toxicology Lett* 1984; 23 : 17~24.
16. Pung OJ, Tucker AN, Vore SJ, et al. Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility to mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. *Infect Immun* 1985; 50 : 91~96.
17. Dean JH, Luster MI, Boorman GA, et al. The effect of adult exposure to diethylstilbestol in the



- mouse, alteration in tumor susceptibility and host resistance parameters. *J Reticuloendothel Soc* 1980;28 : 571~576.
18. Boorman GA, Lcester MI, Dea JH, et al. The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse on macrophage functions and numbers. *J Reticuloendothel Soc* 1980;28 : 547.
  19. Kalland T, Campbell T. Effects of diethylstilbestrol on human natural killer cells *in vitro*. *Immunopharmacology* 1984;8 : 19~24.
  20. Luster MI, Boorman GA, Dean JH, et al. The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse: alteration d in immunological functions. *J Reticuloendothel Soc* 1980;28 : 561.
  21. Crabbe PA, Nash H, Bazin H, et al. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral parenteral immunization with feeritin. *J Exp Med* 1969;130 : 723.
  22. Bazin H, Levi G, Doria G. Predominant contribution of IgA antibody forming cells to an immune response detected in extra-intestinal lymphoid tissues of germ-free mice exposed to antigen by oral route. *J Immunol* 1970;105 : 1049~1054.
  23. John RC, Martin FH, Robert LO. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *Giardia muris* infection in BALB/C Mice *Cellular Immunology* 1986;97 : 44~50.
  24. Elson CO, Heck JA, Strober W. T-cell regulation of murine IgA synthesis. *J Exp Med* 1979;149 : 632~643.
  25. Richman LK, Graeff AS, Yarchan R. et al. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J Immunol* 1981;128 : 2079~2086.
  26. Clancy R, Cripps AW, Chipchase H. The regulation of human gut B lymphocytes by T lymphocytes. *Gut* 1984;25 : 47~51.
  27. Pang G, Yeung S, Clancy RL, et al. Regulation of IgA secretion in polyclonally induced *in vitro* human lymphocyte cultures. *Clin Exp Immunol* 1986;64 : 158~165.
  28. Lycke N, Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and Peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. *Scand J Immunol* 1986;23 : 611~616.
  29. Schoental R, Joffe AZ, Yagen B. Cardiovascular lesions and various tumors found in rats given T-2 toxin, a trichothecene metabolite of *Fusarium*. *Cancer Res* 1983;39 : 2179~2189.
  30. Forsell JH, Witt MF, Tai JH, et al. Effects of 8-week exposure of the B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mouse to dietary deoxynivalenol and zearalaenone. *Fd Chem Toxic* 1986;24 : 213~219.
  31. Miller K, Atkinson HAC. The *in vitro* effects of trichothecenes on the immune system. *Fd Chem Toxic* 1986;24 : 545~549.
  32. Czerkinsky C, Nilsson LA, Nygren H, et al. A solid-phase Enzyme-linked Immunosorbent assay for enumeration of specific antibody-secreting cells, *J. of Immunol. Methods* 1983;65:109~121.
  33. Frangakis MV, Koopman WJ, Kiyono H, et al. An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J. of Immunol. Methods* 1982;60 : 33~44.
  34. Coligam JE, Kruisbeek AM, Margulies DH. et al. *Current Protocols in immunology*. 1st ed. New York : Greene publishing Assoc. : at and Wiley-Interscience, 1991; 321~324.
  35. Casale WL, Pestka JJ, Hart LP. Enzyme-Linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for Deoxynivalenol and several Analogues. *J of Agric & Food Chem* 1988;367 : 663~668.
  36. Fier AC, Richard JL, Cysewski SJ. Implication of mycotoxins in animal disease, *J Am Vet Med Ass* 1989;176 : 719~724.
  37. Ueno Y. Trichothecenes-Chemical biological and toxicological aspects. In *Developments in food science*, 4. Edited by Y. Ueno. P. 135. Elsevier, Amsterdam.
  38. Cooray R. Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency on human lymphocytes. *Fd Chem Toxic* 1984;22 : 529~534.
  39. Atkinson HAC, Miller K. Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte blastogenesis. *Toxicology Lett* 1984;23 : 215~221.
  40. Pierce NF, Cray WC, Determinants of the localization, magnitude and duration of a specific mucosal IgA plasma cell response in enterically immunized

- rats. *J Immunol* 1982;128 : 1311~1318.
41. Hersh EM, Harris JE. Macrophage-lymphocyte interaction in the antigeninduced blastogenic response of the antigen-induced blastogenic response of Human peripheral blood leukocytes. *J of Immunology* 1973;111 : 58~64.
  42. Waldron JA, Horn RG, Rosenthal AS. Antigen-induced proliferaton of guinea pig lymphocytes *in vitro* : Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T-lymphocytes. *J of Immunology* 1973;111 : 58~64.
  43. Muscoplat CC, Thoen CO, Chen AW, et al. Macrophage-Dependent lymphocyte immunostimulation in cattle infected Mycobacterium bovis and with Mycobacterium avium. *Infection & Immunity* 1974;10 : 675~677.
  44. Carlson JR, Heyworth MF, Owen RL. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *Giardia Muris* infection in BALB/C mice. *Cellular Immunology* 1986;97 : 44~50.
  45. Kiyono H, Barnum LM, Pitts AM, et al. Isotype-specific immunoregulation: IgA-binding factors produced by Fc  $\alpha$  receptor-positive T cell hybridomas regulate IgA responses. *J Exp Med* 1985;161 : 731~747.
  46. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Characteristics and regulatory function of murine con A-induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen: Mechanism regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patches B cells. *J. of Immunol.* 1982;129 : 475~483.
  47. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Mechanism regulation IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 1983;157 : 433~450.
  48. Kawanishi H, Ozato K, Strober W. The proliferative response of cloned Peyer's patch switch T cells to syngeneic and allogeneic stimuli. *J of Immunology* 134;3586~3591.
  49. Hoover RG, Dieckgraefe BK, Lynch RG, T cells with Fc receptors for IgA *J of Immunology* 1981;127 : 1560~1562.
  50. Mestecky J, Mcghee R. Immunoglobulin A(IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA Biosynthesis and immune response. *Advances in Immunology* 1987;40 : 177~184.
-