

T-2 Toxin이 병아리 비장세포의 유전질 발생에 미치는 영향

전향숙 · 정덕화* · 이서래**

한국식품개발연구원, *경상대학교, **이화여자대학교

Effect of T-2 Toxin on the Mitogen-Induced Blastogenesis in Chick Splenic Cell

Hyang-Sook Chun, Duck-Hwa Chung* and Su-Rae Lee**

Korea Food Research Institute, *Gyeongsang National University,

**Ewha Woman's University

Abstract

The effects of T-2 toxin on mitogen-induced blastogenesis of chick splenic cells were investigated. The [³H] thymidine incorporation in splenic cells stimulated by lipopolysaccharide and concanavalin A were equally inhibited as the concentration of T-2 toxin was increased. The effective dose of T-2 toxin causing a 50% reduction of [³H] thymidine incorporation was inbetween 1.0 and 5.0 ng/ml for both mitogens. Mitogen-induced blastogenesis in chick splenic cells showed differences among experimental groups with different exposure time of T-2 toxin, exhibiting the most inhibition in the experimental group exposed to T-2 toxin at both embryonic and chick periods.

Key words: T-2 toxin, blastogenesis, chick splenic cell, lipopolysaccharide, concanavalin A

서 론

T-2 toxin[3-hydroxy-4,15-diacetoxy-8-(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxy- Δ^9 -trichothecene]은 1960년대 후반 Gilgan 등^(1,2)에 의해 *Fusarium tricinctum*으로 오염된 옥수수에서 최초로 분리된 이래 많은 연구자들에 의하여 곡물 및 사료의 오염원으로 검출되고 있으며⁽³⁾, 소련에서의 식중독성 무백혈증⁽⁴⁾, 일본에서의 말의 대량폐사⁽⁵⁾, 미국에서의 가축들의 대량폐사⁽⁶⁾ 등 여러 중독사건의 원인물질임이 밝혀졌다.

T-2 toxin은 사람이나 동물이 섭취했을 경우 소장에서 쉽게 흡수되어 체내에 확산되는 독성이 강한 Type A군 trichothecene계 곰팡이 독소이며 사료 섭취량 감소, 성장을 저해, 피부괴사, 구토, 설사, 신경장애, 면역기능의 억제, 생식기관의 기능억제, 조혈기관의 장애 등의 독성을 나타낸다^(3,7). 특히 T-2 toxin에 의한 장애는 임파절, 비장, 흉선 및 장점막의 peyer's patch와 같은 면역조직에 치명적인 상해를 가하여 각종 질환에 대한 생체방어기전을 저하시킨다. Lafarge 등⁽⁸⁾은 T-2 toxin을 투여한 생쥐에서 mitogen에 의한 임파구의 blastogenesis는 현저히 억제되었다고 하였으며, Buening 등⁽⁹⁾은 소에 있어서, 김⁽¹⁰⁾은 기니피그에 있어서, mitogen에 의한 임파구 반응이 T-2 toxin에 의해 현저히 억제되었다고 보고하

였다. 이와 같이 항원자극에 대한 면역반응을 mitogen 자극에 의한 임파구의 blastogenesis로 측정된 연구는 약간 있으나 발달시기별로 T-2 toxin이 달리 노출되었을 때 mitogen 자극에 의한 임파구의 blastogenesis에 미치는 T-2 toxin의 영향에 대한 것은 거의 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 태아(embryo)시기의 이용이 편리하며, 형태학적 발육이 포유동물과 유사하고 T-2 toxin에 대한 감수성이 비교적 높은 병아리⁽¹¹⁾를 실험동물로 하여 T-2 toxin이 발달시기별 mitogen 자극에 의한 비장세포의 유전질 발생(blastogenesis)에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

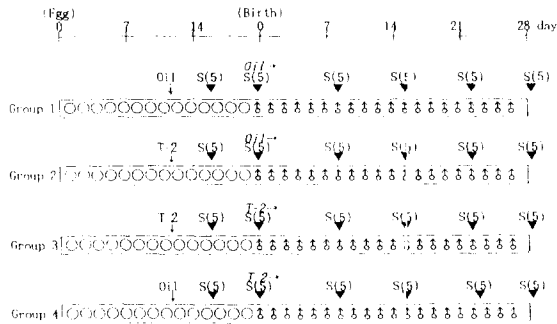
실험동물

평균 무게가 55±0.5g되는 합형 816호 10일배 종란을 실험실에서 37.5°C의 온도와 상대습도 60%가 유지되는 항온기에 넣어 배양하면서 부화시킨 병아리를 사용하였고, 사육시 물과 식이는 자유로이 급식시켰다.

실험군과 T-2 toxin 투여

실험군은 Fig. 1과 같이 4군으로 나누어 대조군(제 1군)은 옥수수기름만 주입하였고, 제 2군은 예비실험 결과 60%의 생존율을 나타낸 1.0 µg/embryo의 T-2 toxin을 10 일째 되는 chick embryo에 1회만 주입하였다. 이때 T-2 toxin은 옥수수기름에 녹인 후 난각을 70% ethanol로 소독한 다음 21 gauge의 주사침으로 구멍을 뚫어 주사

Corresponding author: Hyang-Sook Chun, Rice Utilization Center, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea



- Oil : 10 μ l of corn oil injected into egg yolk
- T-2 : 1.0 μ g of T-2 toxin/10 μ l of corn oil injected into egg yolk
- S() : Numbers of sacrificed egg and chick
- T-2 \rightarrow : T-2 toxin(1.0 mg/kg) orally injected three times per week
- Oil \rightarrow : 10 μ l of corn oil orally injected three times per week
- Group 1 : T-2 untreated (Control)
- Group 2 : T-2 treated during embryo period only
- Group 3 : T-2 treated during embryo and chick periods
- Group 4 : T-2 treated during chick period only

Fig. 1. Classification of experimental groups for the toxicity testing of T-2 toxin in chick

기로 종난 난황에 10 μ l씩 주입하고 파라핀으로 봉하였다⁽¹¹⁾. 제 3군은 embryo 시기에는 2군과 동일하게 주고 병아리 출생후에는 주당 3회 1 mg/kg body wt.의 양으로 경구투여 하였다. 제 4군은 embryo 시기에는 옥수수기름만 투여하고 출생후에 주당 3회 1 mg/kg body wt.의 양으로 경구투여하였다. 실험동물은 부화 후 1주, 2주, 3주, 4주째 되는 시기에 몸무게를 측정한 후 희생시켜 비장세포를 분리하였다.

비장세포의 분리

Concanavalin A 및 lipopolysaccharide 등의 mitogen 자극에 대한 반응을 알아 보기 위하여 부화 후 1, 2, 3, 4주째에 해당하는 실험체를 5마리씩 에테르로 마취시킨 다음 알콜로 복부를 소독한 후 비장을 제거하였다. 제거된 비장을 RPMI-1640(Sigma)배지도 세척한 다음 forcep으로 세절하는 조작을 반복하여 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포는 10% fetal calf serum(Gibco), penicillin(100 U/ml, Gibco), streptomycin(100 μ g/ml, Gibco)이 첨가된 RPMI-1640배지에 넣어 이물질이 침전되게 10분 동안 방치한 후 상징액을 1500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포를 Tris-buffered 0.83% ammonium chloride로 처리 한 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리를 행하여 두번 세척하고 trypan blue로

염색하여 세포수를 3×10^5 cell/ml로 조정하여 실험에 사용하였다. 시험관 내에서 mitogen 자극에 대한 병아리 비장세포의 반응은 무처리한 부화후 1주령 병아리의 비장세포를 무균적으로 분리한 다음 동일한 과정으로 처리하였다.

Mitogen assay

분리된 세포부유액을 세포배양 플레이트(Falcon 3047; 24 well, 3.6 ml 짜리)에 1 ml씩 분주하고, *in vitro* 시험의 경우에만 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 T-2 toxin을 0.005~50 ng/ml 농도가 되도록 0.01 ml씩 넣어 주었으며, concanavalin A 4 μ g, lipopolysaccharide 2 μ g을 첨가한 후 CO₂ 배양기에 넣고 CO₂ 농도를 5%로 조정하면서 72시간 배양하였다⁽¹²⁾. 세포를 수거하기 10시간 전에 methyl-H³ thymidine(NEN product, USA)을 각 well에 1 μ Ci씩 넣어 배양한 후 membrane 필터(0.45 μ m, mixed cellulose형)로 세포를 수거하였다. 세포가 수거된 필터를 scintillation vial에 넣고 0.5 N HCl 0.5 ml을 가하여 필터를 녹인 다음 cocktail(Atomlight, Dupont사)을 10 ml씩 가하여 liquid scintillation counter(Beckman LS-6000TA)로 β -counting하였다.

통계처리

실험결과는 평균치와 표준편차로 표현하였고 실험군 간의 유의성은 5% 수준에서 ANOVA test와 Scheffe의 다범위 검정(multiple range test)으로 검정하였다. 모든 통계분석은 SAS를 사용하여 personal computer로 처리하였다.

결과 및 고찰

체중 및 비장 무게에 미치는 T-2 toxin의 영향

Chick embryo 시기와 부화후 성장시기에 T-2 toxin을 달리 노출시킴에 따라 병아리의 체중 및 비장의 무게 변화를 측정된 것은 Table 1과 같다.

체중은 대조군에 비해서는 T-2 toxin을 노출시킨 2, 3, 4군이 낮은 경향을 나타냈으나 유의성은 없었으며, T-2 toxin을 노출시킨 2, 3, 4군 사이에서도 유의적 차이가 없었다. 비장의 무게 역시 전 처리 기간을 통하여 T-2 toxin을 노출시킨 2, 3, 4군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의성은 없었으며, T-2 toxin을 노출시킨 2, 3, 4군 사이에서도 유의적 차이가 없었다.

비장세포의 유전질 발생에 미치는 T-2 toxin의 영향

시험관 내에서 T-2 toxin이 병아리 비장세포의 유전질 발생(blastogenesis)에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. B-cell mitogen인 lipopolysaccharide 및 T-cell mitogen인 concanavalin A의 자극에 대해 T-2 toxin의 농도가 증가함에 따라 [³H] thymidine incorporation의 억제정도도 증가하는 경향을 나타내었다. 본 연

Table 1. Sequential changes in body and spleen weights¹⁾ of chicks treated with T-2 toxin

Item ¹⁾	Experimental group ²⁾	Weeks after treatment			
		1	2	3	4
Body weight(g)	1	71.6 ± 2.1	107.5 ± 11.8	186.5 ± 22.2	276.9 ± 51.0
	2	70.5 ± 2.6	111.6 ± 18.9	174.9 ± 18.0	278.8 ± 29.8
	3	74.0 ± 2.5	103.6 ± 18.9	173.9 ± 12.2	239.9 ± 32.6
	4	71.6 ± 2.0	108.1 ± 10.0	148.3 ± 24.8	233.4 ± 25.2
Spleen weight(g)	1	0.06 ± 0.09	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.27 ± 0.07
	2	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.31 ± 0.07
	3	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.22 ± 0.05
	4	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.37 ± 0.11

¹⁾Body and spleen weights (mean ± S.D., n=5) were not significantly different by Scheffe multiple range test among groups within the same week.

²⁾1: T-2 untreated(control)

2: T-2 treated during embryo period only

3: T-2 treated during embryo and chick periods

4: T-2 treated during chick period only

Table 2. Inhibition of [³H]thymidine incorporation by T-2 toxin in chick splenic cells stimulated with mitogens lipopolysaccharide(LPS) or concanavalin A(con A)

T-2 toxin dosed(ng/ml)	LPS treated (cpm/culture set)	Inhibition of [³ H]incorp.(%)	Con A treated (cpm/culture set)	Inhibition of [³ H]incorp.(%)
0.00	26,291 ± 3,439	100.0	28,759 ± 2,728	100.0
0.005	26,577 ± 2,087	101.1	31,007 ± 2,700	107.8
0.05	21,551 ± 2,131	82.0	27,324 ± 3,823	98.5
0.50	20,400 ± 2,290	77.6	26,420 ± 2,109	91.9
1.00	20,734 ± 2,138	78.9	19,049 ± 3,011	66.2
5.00	10,144 ± 1,370	38.6	13,346 ± 2,128	46.4
50.00	2,526 ± 810	9.6	2,017 ± 1,132	7.0

Cultures containing 1 ml splenic cells(3×10^5), 0.01 ml T-2 toxin and 2 µg LPS or 4 µg con A were incubated for 72 hrs and 1 µCi methyl-³H thymidine were incorporated 10 hrs before cell harvest. All cultures were run in triplicate and expressed as mean ± S.D..

Table 3. The effect of T-2 toxin on the [³H]thymidine incorporation in chick splenic cells stimulated with lipopolysaccharide

Test group ¹⁾	³ H Thymidine incorporated(cpm/culture set), after birth			
	1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1	²⁾ 21,159 ± 3,966 ^{a, 3)}	33,182 ± 1,611 ^{ab}	33,178 ± 1,396 ^a	31,602 ± 2,285 ^{ns, 4)}
2	16,563 ± 1,733 ^b	34,072 ± 1,538 ^a	23,582 ± 4,655 ^b	27,907 ± 2,458 ^{ns}
3	7,987 ± 2,778 ^c	15,728 ± 800 ^c	12,509 ± 589 ^c	22,742 ± 2,641 ^{ns}
4	34,419 ± 2,244 ^a	22,270 ± 1,801 ^{bc}	18,336 ± 1,224 ^{cb}	26,472 ± 7,367 ^{ns}

¹⁾Test group

1: T-2 untreated(control)

2: T-2 treated during embryo period only

3: T-2 treated during embryo and chick periods

4: T-2 treated during chick period only

²⁾Mean ± S.D. of triplicate runs

³⁾Means with same letters in the same column are not significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffe multiple range test.

⁴⁾NS: not significant

구에서 사용된 두 mitogen에 대해 50% 억제를 나타내는 T-2 toxin의 농도는 1.0~5.0 ng/ml 범위이었다.

T-2 toxin에 실험동물 및 인체가 노출되면 그 독성으로

인하여 실험동물 및 인체의 여러가지 면역기능이 억제된다고 한다.⁽¹³⁾ 따라서 T-2 toxin에 의한 면역기능의 변화는 노출시기에 따라 차이가 있을 것이라는 가정하에

Table 4. The effect of T-2 toxin on the ^3H thymidine incorporation in chick splenic cells stimulated with concanavalin A

Test group ¹⁾	^3H Thymidine incorporated(cpm/culture set), after birth			
	1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1	²⁾ 42,698 ± 9,757 ^{a, 3)}	21,180 ± 5,379 ^{ns 4)}	30,811 ± 6,574 ^a	36,507 ± 1,696 ^a
2	17,460 ± 882 ^{ab}	20,156 ± 4,691 ^{ns}	18,894 ± 1,086 ^{ab}	26,433 ± 2,993 ^b
3	4,042 ± 1,074 ^b	21,811 ± 3,426 ^{ns}	14,664 ± 4,157 ^b	20,704 ± 2,146 ^c
4	25,698 ± 5,057 ^{ab}	18,624 ± 6,975 ^{ns}	20,710 ± 2,132 ^{ab}	36,812 ± 391 ^a

¹⁾Test group

- 1: T-2 untreated(control)
 2: T-2 treated during embryo period only
 3: T-2 treated during embryo and chick periods
 4: T-2 treated during chick period only

²⁾Mean ± S.D. of triplicate runs

³⁾Means with same letters in the same column are not significantly different at $\alpha=0.05$ by Scheffe multiple range test.

⁴⁾NS: not significant

T-2 toxin 투여시기를 달리한 병아리의 비장세포에서 concanavalin A 및 lipopolysaccharide 등의 mitogen 자극에 대한 반응을 알아 보았다.

Lipopolysaccharide에 대한 비장세포의 반응을 살펴본 결과는 Table 3과 같이 T-2 toxin투여 시기가 다름에 따라 mitogen 자극에 대한 반응에 차이가 있는 것으로 나타났다. 특히 T-2 toxin을 투여하지 않은 대조군에 비해 제 3군(chick embryo시기와 부화후에도 계속 T-2 toxin을 투여한 실험군)은 그 반응이 가장 낮은 경향을 나타냈다. 그러나 이때 1, 2, 3주에서만 유의적이었고 4주째는 유의적인 차이가 없었다.

Table 4는 concanavalin A에 대한 비장세포의 반응을 살펴본 결과이다. Concanavalin A에 대한 반응도 lipopolysaccharide에 대한 반응과 마찬가지로 T-2 toxin투여 시기가 다름에 따라 mitogen 자극에 대한 반응에 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 제 3군이 2군이나 4군에 비해 가장 억제되는 경향을 나타내었으나 2주에서는 이러한 경향이 뚜렷하지 않았다.

위의 결과를 종합해 볼 때 T-2 toxin 노출시기에 따라 T-cell 및 B-cell mitogen에 의한 비장세포의 blastogenesis가 다르게 영향을 받는 것으로 생각된다. 즉 부화하기 전과 부화후 계속 T-2 toxin에 노출시킨 제 3군이 가장 영향을 많이 받은 것으로 나타났고 부화전 혹은 부화후 어느 한 시기에만 T-2 toxin에 노출된 2군, 4군도 비교적 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 경우 T-2 toxin을 투여한 병아리가 대조군에 비해 비장세포의 blastogenesis가 억제되는 경향을 보여 T-2 toxin이 동물의 면역반응에 영향을 주는 것으로 추측되었다. 이러한 상태에서 감염이 일어나면 동물은 더 심한 손상을 입을 것으로 예상된다.

본 실험에서 나타난 비장세포의 blastogenesis가 억제되는 결과는 생쥐⁸⁾와 소¹⁰⁾를 대상으로 한 실험에서도 보고되었으며, 사람에서는 T-2 toxin이 대장암세포의 분

열과 DNA합성을 억제하는 것으로 나타나 T-2 toxin의 세포독성을 이용하여 항암 치료에 이용하는 방안도 제시되고 있다¹³⁾.

요 약

시험관 내에서 T-2 toxin이 병아리 비장세포의 blastogenesis에 미치는 영향을 살펴본 결과, B-cell mitogen인 lipopolysaccharide 및 T-cell mitogen인 concanavalin A 자극에 대해 T-2 toxin의 농도가 증가함에 따라 억제 정도가 증가하는 경향을 나타내었다. 노출시기를 달리하여 T-2 toxin을 투여한 병아리의 비장세포에서 mitogen 자극에 대한 반응을 알아 본 결과, 부화하기 전과 후에 계속 T-2 toxin에 노출시킨 실험군은 가장 영향을 많이 받은 것으로 나타났고 부화전 혹은 부화후 어느 한 시기에만 T-2 toxin에 노출된 실험군은 비교적 영향을 적게 받는 것으로 나타났다.

문 헌

1. Gilgan, M.W., Smalley, E.B. and Strong, F.M.: Isolation and partial characterization of a toxin from *Fusarium tricinctum* on moldy corn. *Arch. Biochem. Biophys.*, 114, 1(1966)
2. Bamberg, J.R., Riggs, N.V. and Strong, F.M.: Structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*. *Tetrahedron*, 24, 3329(1968)
3. Scott, P.M.: The natural occurrence of trichothecenes In *Trichothecene Mycotoxins*. Beasley, V.R.(ed), CRC Press Inc., Boca Raton, p.10(1989)
4. Joffe, A.Z.: *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* as principal causal agent of alimentary toxic aleukia. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Marcel Dekker, New York, p.21(1978)
5. Ueno, Y., Ishii, K., Sakai, K., Kanaeda, S., Tsunoda, H., Tanaka, T. and Enomoto, M.: Toxicological ap-

- proaches to the metabolites of *Fusaria*. IV. Microbial survey on "bean-hull poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, nesolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani* M-1-1. *Japan. J. Exp. Med.*, **42**, 187(1972)
6. Hue, I.C., Smalley, E.B., Strong, F.M. and Ribelin, W. E.: Identification of T-2 toxin in mouldy corn associated with a lethal toxicoses in dairy cattle. *Appl. Microbiol.*, **24**, 684(1972)
 7. Ellison, R.A. and Kotsonis, F.N.: *In vitro* metabolism of T-2 toxin. *Appl. Microbiol.*, **27**, 423(1974)
 8. Lafarge, F.C., Lespinates, G., Lafont, P., Loissillier, F., Mousset, S., Rosenstein, Y. and Frayssinet, C.: Immuno-suppressive effects of *Fusarium* extracts and trichothecenes: Blastogenic response of murine splenic and thymic cells to mitogens. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **160**, 302(1979)
 9. Buening, G.M., Mann, D.D., Hook, B.S. and Osweiler, G.D.: The effects of T-2 toxin on the bovine immune system: Cellular factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 411(1982)
 10. 김종수: 기니피그에서 실험적 trichothecene(T-2) 독소 중독증. 서울대학교 대학원 박사학위 논문(1986)
 11. Verrett, M.J., Scott, W.F., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K. and Thomas, C.A.: Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 265(1980)
 12. Gunner, V.A.: *In vitro* studies of chicken lymphoid cells. *Acta Path. Microbiol. Scand.*(Section B), **78**, 641 (1970)
 13. Mann, D.D., Buening, G.M., Hook, B.S. and Osweiler, G.D.: Effect of T-2 toxin on the bovine immune system: Humoral factors. *Infect. Immunol.*, **36**, 1249(1982)
 14. Agreloce, S.: Synthesis of DNA in human fibroblasts treated with T-2 toxin and HT-2 toxin (the trichothecene metabolite of *Fusarium* species) and the effects of hydroxyurea. *Toxicol. Lett.*, **5**, 155(1980)
-
- (1994년 7월 5일 접수)