

Aflatoxin B1의 면역억제작용

문은이, 이동권, 표석능*
성균관대학교 약학대학

Immunosuppressive Effect of Aflatoxin B1

Eun-Yi MOON, Dong-Kwon RHEE and Suhkneung PYO*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon City, Kyunggi-do 440-746

Abstract – Aflatoxin B1 (AFB1) has been reported to directly suppress the immune responses. In the present study, the effect of AFB1 on immune functions was investigated. Splenic lymphocytes were treated with various doses of the mitogens (lipopolysaccharide, concanavalin A) in the presence of AFB1. AFB1 pretreatment decreased the number of plaque forming cells (PFC) in a dose-dependent manner. Antibody production of IgM and IgG class was significantly decreased in AFB1-treated splenic cells. In addition, when animals were exposed to AFB1, the susceptibility of bacterial infection as well as the growth of tumor cells was increased. These data suggest that AFB1 affected the immune function and humoral immunity impaired by AFB1 treatment contributed to pathological process.

Keywords □ aflatoxin, LPS, PFC

Aflatoxin B1(AFB1)은 *Aspergillus flavus* 곰팡이의 2차 대사물질로서 동물에서 간 종양이나 다른 암을 유발하는 것으로 알려져 있었다(Robens와 Richard, 1992). 또한, AFB1은 면역계에도 면역 억제 효과가 있음이 보고되어 왔다(Corrier, 1991). CD-1이나 Balb/C 생쥐에 AFB1을 낮은 용량으로 반복하여 노출시키면 T세포 의존성 항체생성세포수를 감소시키며 phytohemagglutinin(PHA), pokeweed mitogen(PWM) 및 lipopolysaccharide(LPS)같은 mitogen에 대한 세포증식을 억제함이 알려졌다(Reddy 등, 1987; Reddy와 Sharma, 1989). Bodine 등(1984)은 PHA에 의해 증식되는 면역세포가 AFB1에 의해 억제된다고 하였으며 Paul 등(1977)은 AFB1이 소의 세포성 면역을 감소시킨다고 하였다. Savel 등(1970)은 AFB1이 사람에게 대해서도 영향이 있을 것임을 제시하였으며, 다른 연구자들에 의해서 돼지나 다른 가축에 대해 AFB1이 면역 억제 효과가 있다고 알려져 왔다(Cysewski 등, 1978; Patterson 등; George; 1994).

위와 같은 보고들에도 불구하고 AFB1이 면역 억제 효과를 나타내는데 있어 시험관내 실험방법을 이용한 체액성 면역에 대한 영향을 연구한 보고는 아직 없다. 따라서 본 연구는 AFB1의 생체내 노출시 나타나는 면역 억제 효과를 보고한 이전의 연구를 참고로 하여 마우스 비장 세포를 사용한 시험관 내의 방법을 이용하여 AFB1의 체액성 면역

억제 작용에 대한 영향을 검토하였으며, 특히, ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) 방법을 이용하여 배지로 분비된 항체의 양을 측정하였다.

실험방법

실험동물과 시약

CD-1 생쥐는 일본의 Charles River Breeding Laboratories로부터 공급받아 사용하였다. 모든 시약은 특별한 언급이 없으면 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. RPMI 1640과 소혈청 및 기니아피크 보체는 미국 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

생쥐 비장세포의 분리

6-8주령의 생쥐를 경추 탈골로 죽인 후 무균상태하에서 비장을 꺼내어 5 ml의 RPMI1640 배지가 있는 60 mm petri dish에 넣었다. 5 ml의 주사기를 이용하여 비장 세포를 분리시킨 후 잘 현탁하여 원심분리관에 옮겨서 1000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 버린 후 신선한 배지를 가하여 현탁시킨 후 세포 수를 조정하였다.

LPS와 ConA에 의한 세포증식측정

조제한 생쥐의 비장세포를 96-well plate에 well당 2×10^5 개의 세포를 넣고 다양한 농도의 LPS와 concanavalin A(ConA)를 첨가하고 AFB1은 최종 농도가 $10 \mu\text{M}$ 과 $50 \mu\text{M}$ 이 되도록 하였으며 전체 배양 부피는 $200 \mu\text{l}$ 로 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 MTT를 가하여 4시간 더 배양한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하므로써 세포의 증식을 측정하였다.

비장세포의 용혈반형성세포수(Plaque forming cell)의 측정

항체를 생성하는 세포수를 측정하기 위하여 Jerne과 Nordin(1963)이 사용한 방법을 수정하여 행하였으며 간단히 서술하면 다음과 같다. 조제한 마우스의 비장세포를 24-well plate에 well당 5×10^6 개의 세포를 넣고 LPS를 100 µg/ml이 되도록 첨가하였으며 AFB1은 최종 농도가 0.5, 5, 10, 25, 50 µM이 되도록 하였으며, 전체 배양 부피는 1 ml로 하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 항체 생성 세포수(PFC)를 측정하였다. PFC는 현탁시킨 세포배양액 100 µl, 3배 희석시킨 기니픽 보체 25 µl, TNP-hatenized sheep red blood cell(SRBC) 25 µl를 350 µl의 0.25% agar와 혼합한 후 그중 200 µl를 petri dish에 옮겨서 덜개유리로 고루 퍼지게한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양후 생성되는 PFC의 수를 세고 희석배수를 고려하여 10⁶개의 세포당 PFC수로 표시하였다.

TNP-haptenization

소의혈청을 넣지 않은 RPMI1640 배지로 세척한 SRBC를 cacodylate 완충액(44.8 g/L, pH6.9)으로 한번 더 세척후 37°C에서 20 ml cacodylate 완충액에 picrylsulfonic acid 40 mg을 녹인것과 10분간 반응시켰다. 원심분리하여 50 ml cacodylate 완충액에 glycyl-glycine 40 mg을 녹인것으로 세척후, 소의혈청을 넣지 않은 RPMI1640배지로 두번 세척하여 사용하였다.

배지내 항체 측정

항체 측정을위한 ELISA는 Vunakis와 Langone(1980)의 방법에 따라 행하였으며, 간단히 서술하면 다음과 같다. 항폴리클론 항체를 plate에 coating하기 위하여 마우스 폴리클론항체를 carbonate-bicarbonate 완충액(pH9.6)에 160배 희석하고 평평한 96-well plate에 200 µl씩 넣어 4°C에서 overnight하였다. 0.1%Tween과 1%BSA를 포함한 PBS(PBS-Tween, pH7.4)로 3번 세척한 후 LPS와 AFB1을 가하여 48, 72, 96시간동안 배양한 비장세포 배양액을 항폴리클론 항체가 coating된 96-well plate에 100 µl씩 가하여 37°C에서 3시간동안 배양하였다. PBS-Tween으로 3번 수세후 alkaline phosphatase가 결합된 anti-IgG, IgM 및 폴리클론 항체를 각각 가하여 2시간동안 37°C에서 배양하였다. PBS-Tween으로 3번 수세후 diethanolamine 완충액(pH9.8)에 4-nitrophenyl phosphate를 1 mg/ml로 녹인후 100 µl씩 가하고 상온에서 30분간 배양하고 405 nm에서 흡광도를 측정정한 후 표준 곡선으로부터 각각의 항체 농도를 계산하였다.

감염 및 종양 생성측정

Com oil에 400 µg/kg 및 800 µg/kg로 현탁시킨 AFB1을

격일로 2주간 경구투여하였다. 감염시키고자하는 균으로서 Staphylococcus aureus Smith와 이식하고자하는 종양세포인 sarcoma-180(ATCC TIB61)을 사용하였으며, AFB1을 마지막 투여한 다음날에 감염과 이식을 실시하여 각각 생존여부를 관찰하였다. 감염균은 Muller Hinton Agar에서 18시간동안 배양한 후 집락을 취하여 10⁸생균수/ml이 되도록 6% Mucin(미국 Difco사)으로 조정한 후 0.5 ml씩 생쥐에 복강 투여로 감염시켰으며, 종양 세포는 생쥐의 복강내에서 2-3차례 계대한 후에 4×10^6 cells/ml로 조정한 후 생쥐에 0.5 ml씩 복강 투여로 이식하였다.

통계처리

실험결과는 평균치와 실험오차를 계산 하였고, 대조군과의 차이를 Student t-test를 사용하여 검정하였으며, p값이 5%미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정 하였다.

결과 및 고찰

AFB1은 Aspergillus속 곰팡이의 대사 산물로서 주로 간에 대한 영향이 많이 연구되어져 왔으나, 최근에는 면역계에 대한 억제효과도 있어 관심을 끌고 있다. 특히, 세포성 면역 및 1차 면역에 대한 영향에 대해 연구가 많이 이루어졌으나 B림과구가 관여하는 체액성 면역에 대한 연구보고는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 항체를 생성하는 세포수나 분비되는 항체의 양에 AFB1이 어떠한 영향을 주며 이러한 영향이 생체 내에서의 AFB1에 의한 면역 억제 작용에 대한 연구 결과와의 상관성을 논하고자 하였다.

AFB1이 면역 기관인 비장 세포로부터 얻은 세포에 대하여 어떤 효과를 가지는지 알아보기 위하여 LPS와 ConA를 이용하여 세포증식에 대한 효과를 보았다. 10 µM과 50 µM의 AFB1은 T림과구 mitogen인 ConA의 농도가 0.078-10 µg/ml인 범위에서 농도 의존적인 세포증식 억제효과를 나타내었는데, 세포증식이 가장 많이 일어난 ConA의 농도인 2.5 µg/ml에서 10 µM의 AFB1은 세포증식을 70%까지 억제시켰고, 50 µM의 AFB1은 50%까지 세포증식을 억제시켰다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 AFB1이 세포성 면역을 감소시킨다는 이전의 연구결과와 일치하는 것이었다(Paul등, 1977). AFB1은 B림과구 mitogen인 LPS의 농도가 0.78-100 µg/ml인 범위에서 농도 의존적인 세포증식 억제효과를 나타내었는데, 세포증식이 가장 많이 일어난 LPS의 농도인 20 µg/ml에서 10 µM의 AFB1은 세포증식을 66%까지 억제시켰고, 50 µM의 AFB1은 56%까지 세포증식을 억제시켰다(Fig.2). 따라서 이러한 결과는 AFB1이 체액성 면역의 억제에도 관여하고 있음을 시사하였다.

앞의 결과로부터 AFB1이 체액성 면역에 직접 영향을 주는지 알아보기 위하여 항체 생성 세포의 수를 측정하였다. LPS로 자극시킨 비장세포중 B림과구에 의해 폴리클론 항

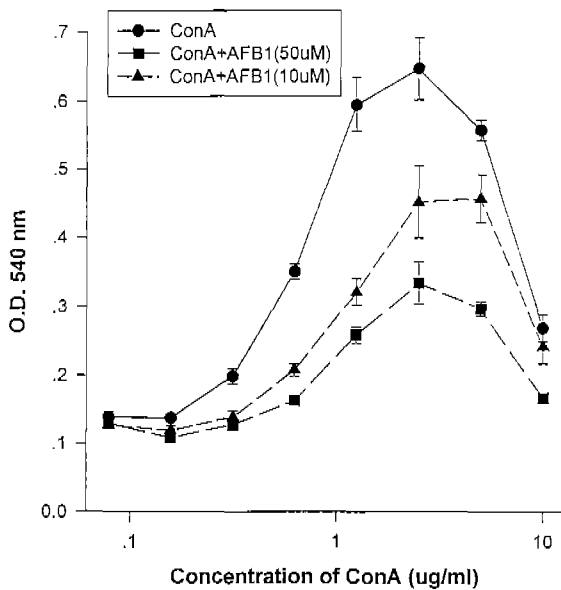


Fig. 1. Effect of various doses of AFB1 on blastogenesis of splenocytes in response to concanavalin A. Splenocytes were treated with various doses of concanavalin A in the presence of aflatoxin B1 for 48 hours. The proliferation of splenocytes was assessed by a MTT assay. Cell density was measured as OD 540 nm. AFB1-treated groups were significantly different from ConA-treated group at all dose range of ConA ($p < 0.05$).

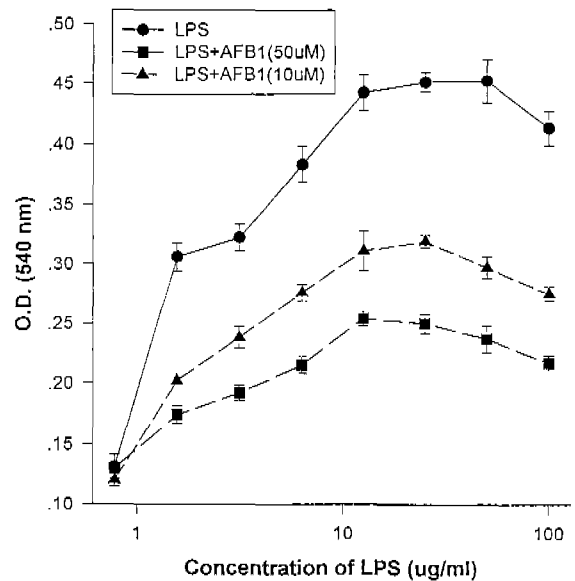


Fig. 2. Effect of various doses of AFB1 on blastogenesis of splenocytes in response to LPS. Splenocytes were treated with various doses of LPS in the presence of aflatoxin B1 for 48 hours. The proliferation of splenocytes was assessed by a MTT assay. Cell density was measured as OD 540 nm. AFB1-treated groups were significantly different from LPS-treated group at all dose range of LPS ($p < 0.05$).

체가 생성되는데, 항체생성 세포 주위의 SRBC가 항체와 보체가 동시에 결합할 때 용해되는데 이때 생성되는 plaque의 수를 비교하므로서 항체생성 B림파구 수에 대한 AFB1의 영향을 알아보았다.

Fig. 3에서 보는 바와같이 항체생성세포 수가 농도의존적으로 AFB1에 의해 감소하고 있음을 알 수 있었다. 5 μ M의 AFB1은 항체 생성 세포 수를 대조군에 비하여 80%까지 감소시켰으며 농도가 증가함에 따라 더욱더 감소시켜 50 μ M에서는 50%이하까지 항체생성 세포수를 감소시켰다. 이로서 AFB1이 체액성 면역을 담당하고 있는 B림파구에 영향을 주고 있음을 직접적으로 확인할 수 있었다.

항체 생성 세포 즉 활성화된 B림파구는 항체를 생성하여 세포막까지 운반한 후에 세포 밖으로 분비되어 혈액을 통해 감염부위로 이동하여 작용한다고 알려졌다(Burgess와 Kelly, 1987). 따라서 생성된 항체의 양에 대한 영향을 알아보기 위하여 비장 세포를 LPS로 자극시키고 AFB1과 함께 배양하였을 때 배지내에 존재하는 폴리클론 항체와 IgM 및 IgG의 양을 ELISA방법으로 측정하였다. 이로서 감염원과 암세포의 제거에대한 B림파구의 역할에 영향을 주는지 예측할 수 있을 것이다. ELISA를 하기위하여 Coating에 사용한 폴리클론 항체는 IgG, IgM 및 IgA에대한 항체를 포함하는 것으로서 LPS에의해 유도되는 IgG, IgM 및 IgA의 총량을 측정하였으며, 1차 면역반응에의해 생성된 IgM과 2차

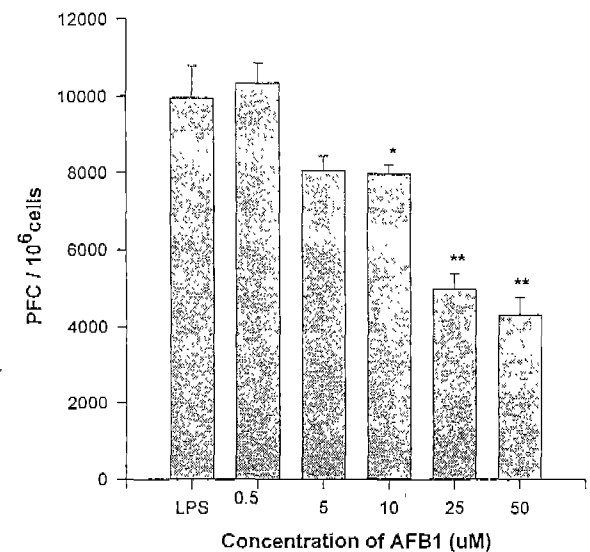


Fig. 3. Effect of AFB1 on the number of antibody plaque forming cell. Splenocytes were treated with 100 μ g/ml LPS in the presence of aflatoxin B1 for 48 hours. The formation of antibody was assessed by PFC assay. The numbers of PFC were expressed as per 10⁶ cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from LPS-treated group.

면역반응에의해 생성된 IgG의 양을 차례로 측정하였다. 48, 72, 96시간에 있어서 10 μ M과 50 μ M의 AFB1은 농도의존적으로 폴리클론항체와 IgM 및 IgG 모두의 생성을 감

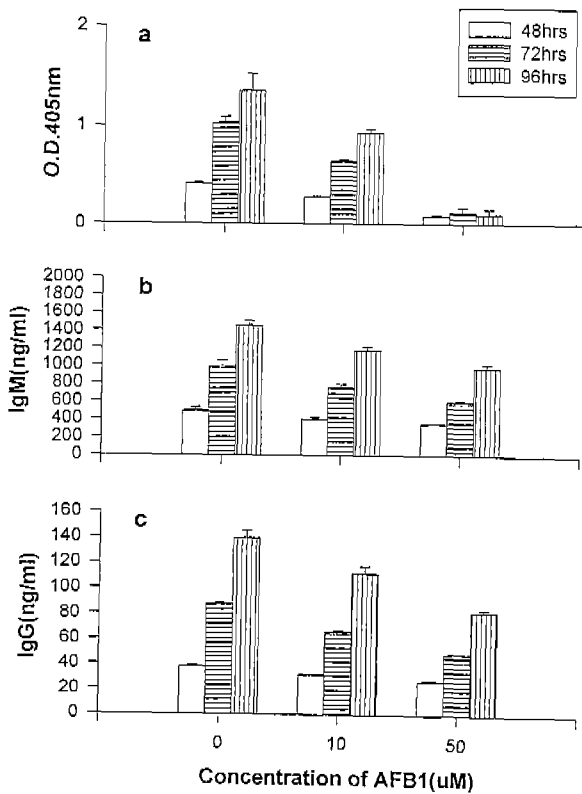


Fig. 4. The effect of AFB1 on the production of polyclonal antibody (a), IgM (b) and IgG(c). Splenocytes were incubated in the medium containing LPS(100 μg/ml) and AFB1 for 48, 72, 96hrs. Supernatants that were collected at designated time were used for the determination of each antibody concentration. Anti-mouse polyclonal antibodies (1:160 dilution) were coated at 96-well plate overnight. After supernatants were added to each well and incubated for 2 hours, anti-mouse polyclonal antibodies conjugated with alkaline phosphatase (AP) were added. Reaction of AP substrate, p-nitrophenylpyrophosphate, was assessed as OD 405 nm. AFB1-treated groups were significantly different from LPS-treated group at all designated time (p<0.05).

소시킴을 알 수 있었다 (Fig. 4). 48시간 배양한 경우 10 μM에서 폴리클론항체의 생성을 67%까지 억제하였고, IgM의 생성은 82%까지 억제하였으며, IgG의 생성은 83%까지 억제하였다. 50 μM의 AFB1은 폴리클론항체의 생성을 20%까지 억제시켰고, IgM의 생성은 72%까지 억제시켰으며, IgG의 생성은 72%까지 억제시켰다. Fig. 4.에서 보는 바와같이 LPS에 의한 항체의 생성은 시간에따라 비례적으로 증가하며, IgM이 IgG에 비하여 많이 생성되고 있음을 알 수 있었다. 이는 1차 면역 반응시에는 IgM이 주로 생성된다고 알려져 있어 (Davis와 Metzger, 1983) 이경우에 있어서 LPS에 의한 면역 반응은 주로 1차 면역반응이었음을 알 수 있었다. 항체가 분비되어 배지중에 존재하려면 항체 생성 세포에 의해 항체생성이 선행되어야 하며 이것이 운반되

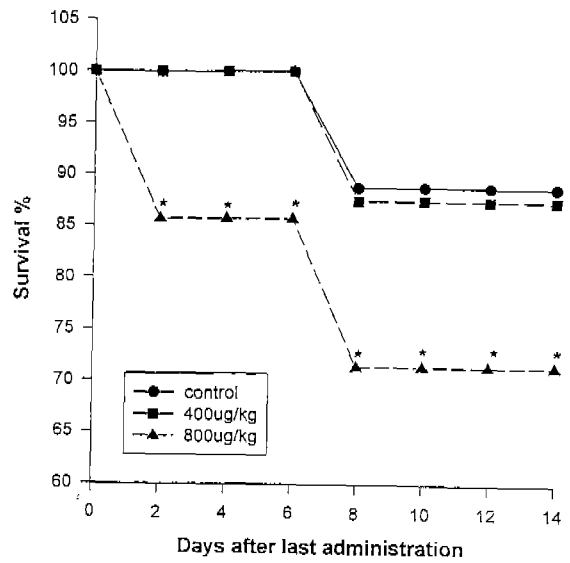


Fig. 5. Effects of AFB1 on survival of mice infected with *Staphylococcus aureus* Smith. AFB1 was orally administered to mice at 400 and 800 ug/5 ml/kg dissolved in corn oil on alternate day for 2 weeks. Mice was intraperitoneally infected with *Staphylococcus aureus* Smith on the next day after last administration. Mice were observed every other day for 2 weeks. The experiments was repeated three times. *p<0.05; Significantly different from control group.

어 세포 밖으로 분비되는 단계를 거쳐야 할 것이므로 항체 생성 세포수와 분비된 항체의 양을 측정하여 보므로서 AFB1이 체액성 면역의 어느 단계를 억제하는 것인지를 예측할 수 있게 되었다. 따라서 AFB1은 항체를 생성하는 기능뿐만 아니라 항체를 분비하는 기능도 억제된다고 사료된다. 이상과 같이 AFB1이 시험관 내에서 면역억제 효과를 나타내는 것이 비특이적인 세포독성에 의한 것이 아니라 특이적으로 면역억제 작용에 기인한 것임을 AFB1의 비장 세포에 대한 세포독성 시험을 행하므로서 알 수 있었다. 즉, AFB1은 10 μM과 50 μM에서 cell viability에 영향을 주지 않았다(데이터를 별도로 기재하지 않았다).

B림파구에서 생성된 항체는 세균이나 암세포를 제거하는 기능을 가지고 있는데 항체가 직접 세균이나 암세포에 결합한 후 보체가 결합하면 용해되어 버리는 경우와 세균이나 암세포에 항체가 결합한 후 노출된 Fc부분에 대해 대식세포의 식작용이 촉진되고 용이하게 되므로서 제거되는 것으로 알려져 있다(Morgan과 Weigle, 1987). 따라서 위에서 얻은 실험 결과가 본 실험 조건하에서 AFB1이 생체의 감염이나 종양의 성장에 대한 방어 능력의 감소를 초래할 것인지 알아보려고 하였다. 즉, 생체가 AFB1에 반복해서 노출될 경우, B림파구가 항체 생성을 감소시키면 체액성 면역에 의한 방어 능력이 저하되므로 감염균이나 종양의 제거능력이 감소하리라 예상되기 때문이다. CD-1 생쥐에 AFB1을 400 μg/kg와 800 μg/kg으로 2주간 격일로 경구 투

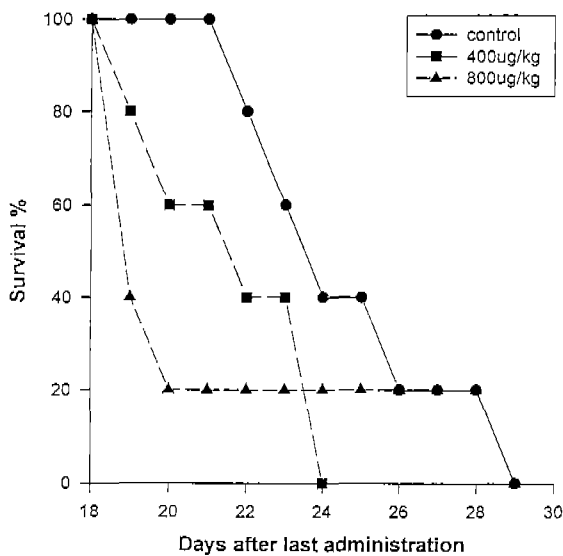


Fig. 6. Effects of AFB1 on survival of mice injected with tumor cells. AFB1 was orally administered to mice at 400 and 800 µg/5 ml/kg dissolved in corn oil on alternate day for 2 weeks. Sarcoma-180 was intraperitoneally grafted on the next day after last administration. Mice were observed every day for 30 days. The experiment was repeated three times. AFB1-treated groups were significantly different from control group ($p < 0.05$).

여한 경우에 *Staphylococcus aureus* Smith에 대한 감염 감수성이 증가되어 생존일 수가 감소하였는데(Fig. 5), 감염 후 8일째부터 400 µg/kg를 투여한 경우는 대조군에 비하여 생존율이 크게 차이가 없으나 800 µg/kg를 투여하였을 때 대조군에 비하여 생존율이 80%까지 감소되었다. 또한 생쥐에 종양세포 sarcoma-180을 이식한 경우에 있어서도 AFB1은 생명연장율을 감소시켰는데(Fig. 6), 암세포 이식 후 19일부터 대조군과 AFB1투여군 사이에 뚜렷한 생존율의 차이를 보여 400 µg/kg를 투여한 경우 80%의 생존율을 보였고 800 µg/kg를 투여한 경우는 40%의 생존율을 보였다. 암세포 이식 후 21일까지 400 µg/kg를 투여시 생존율이 60%까지 감소되었고 800 µg/kg를 투여에서는 생존율이 20%까지 감소되었음을 알 수 있었다. 이는 AFB1이 면역세포의 항체생성에 영향을 주어 생체의 방어 능력을 저하시켰기 때문인 것으로 사료된다. 실제로 항체는 세균을 제거하는데 중요한 역할을 하며 암세포 항원에 대한 항체는 antibody-dependent cell mediated cytotoxicity 또는 complement dependent cell lysis에 의해 암세포 제거를 유도할 수 있다고 알려져 있다 (Frank, 1979; Lowell, 1980). 그러나 AFB1이 세포성 면역을 억제한다는 보고(Paul, 1977)도 있기 때문에 위와같은 결과를 단지 B림프구에 국한되어 일어난 결과라 단정지을 수는 없으나 본 연구결과는 B림프구에 대한 시험관내 실험의 결과가 생체내 실험의 결과와 일치하여 AFB1이 체액성 면역을 억제하는 효과가 있음을 시사

하였다. 이러한 결과는 AFB1이 면역계에 대하여 억제작용이 있다는 보고(Reddy 등, 1987; Reddy와 Sharma, 1989)와도 일치하여 AFB1의 면역계에 대한 정보를 늘릴 수 있게 되었다고 사료되며 또한 AFB1의 면역 억제 작용에 작용기전을 밝히기 위한 기본 자료로 활용할 수 있을 것이다.

참고문헌

- Bodine, A. B., Fisher, S. F. and Gangjee, S. (1984). Effect of aflatoxin B1 and bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci.*, **67**, 110-114.
- Burgess, T. L. and Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of protein. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **3**, 243-293.
- Corrier, D. E. (1991). Mycotoxicosis: Mechanisms of immunosuppression, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **30**, 73-87.
- Cysewski, S. J., Wood, R. L., Pier, A. C. and Baetz, A. L. (1978). Effects of aflatoxin on the development of acquired immunity to swine erysipelas. *Am. J. Vet. Res.*, **39**, 445-448.
- Davis, D. R. and Metzger M. (1983). Structural basis of antibody function. *Annu. Rev. Immunol.*, **1**, 87-118.
- Frank, M. M. (1979). The complement system in host defence and inflammation. *Rev. Inf. Dis.*, **1**, 483-501
- George, J. J., Robert, R. H., Audrey, Z., Davis, R. H. and John, D. G. (1994). Respiratory aflatoxicosis: Suppression of pulmonary and systemic host defense in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **125**, 198-205.
- Jerne, N. K. and Nordin, A. A. (1963). Plaque formation in agar by antibody-producing cells. *Science*, **140**, 405-407.
- Lowell, G. H. (1980). Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity. *J. Immunol.* **125**, 1278-1284.
- Miller, D. M., Stuart, B. P., Crowell, W. A., Cole, R. J., Goven, A. J. and Brown, J. (1978). Aflatoxicosis in swine: Its effects on immunity and relationship to salmonellosis. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, **21**, 135-146.
- Morgan, E. L. and Weigle, W. O. (1987). Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin. *Adv. Immunol.*, **40**, 61-134.
- Patterson, D. S. P., Shreeve, B. J., Robert, A. B., Brush, P. J., Glancy, E. M. and Krough, P. (1981). Effect on calves of barley naturally contaminated low concentrations of aflatoxin B1. *Res. Vet. Sci.*, **31**, 213-218.
- Paul, P. S., Johnson, D. W., Mirocha, C. J. and Soper, B. S. (1977). *In vitro* stimulation of phyto mitogen and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 2033-2035.
- Reddy, R. V. and Sharma, R. P. (1989). Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. *Toxicology* **54**, 31-44.
- Reddy, R. V., Taylor, M. J. and Sharma, R. P. (1987). Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B1. *Toxicology*, **43**, 123-132.
- Robens, J. F. and Richard, J. L. (1992). Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **127**, 69-94.
- Roitt, I. M., Brostoff, J. and Male, D. K. (1993). Immunology,

Gower medical publishing, London.

Savel, H., Forsyth, B., Schaeffer, W. and Cordella, T. (1970). Effect of aflatoxin B1 upon phytohemagglutinin-transformed human lymphocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**,

112-115.

Vunakis, H. V. and Langone, J. J. (1980). Methods in enzymology vol.7, Immunochemical technique, pp 419-439, Academic press.