

## Benzo(a)pyrene이 마우스 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

오동일\* · 김광혁† · 이충한\*\* · 정현기\* · 박재선\* · 장명웅

고신대학교 의학부 미생물학교실  
\*소아과학교실  
\*\*외과학교실

## Effects of Benzo(a)pyrene on Natural Killer Cell Activity of Mice

Dong-Il Oh\*, Kwang-Hyuk Kim†, Chung-Han Lee\*\*, Hyun-Kee Chung\*, Jae-Sun Park\*\*  
and Myung-Woong Chang

*Dept. of Microbiology, College of Medicine Kosin University, Pusan 602-702, Korea*  
*\*Dept. of Pediatrics, College of Medicine Kosin University, Pusan 602-702, Korea*  
*\*\*Dept. of Surgery, College of Medicine Kosin University, Pusan 602-702, Korea*

### Abstract

Benzo(a)pyrene(B(a)P), an extensively studied polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH), is a common contaminant produced through the burning of fossil fuels, particularly coal, and from the exhaust products of internal combustion engines. It produces a wide range of toxicities, including carcinogenicity in experimental animals. B(a)P has been shown to suppress systemic immunity in experimental animals, which may contribute to the growth of the chemical-induced tumors.

Using colorimetric MTT assay natural killer(NK) cell-mediated growth inhibition of tumor cell was measured in normal and B(a)P-exposed C57BL/6 mice. Non-adherent splenocytes of normal or B(a)P-exposed mice were cultured with Yac-1 cells at four different effector/target(E/T) cell ratios ranging from 200/1, 100/1, 50/1, and 25/1 in an assay volume of 0.1 ml. After the optical density of culture wells containing MTT solution was measured at a wavelength of 540 nm, the percentage of dead cells relative to the control target cell number was calculated. The NK activity of B(a)P-exposed mice was markedly lower than that of non-exposed mice group at all E/T ratios.

These results indicated that suppression of NK cell activity may play a role in allowing for the growth of tumors.

*Key words : Benzo(a)pyrene, Natural killer cell, C57BL/6 mouse*

### 서 론

자연살해(natural killer, NK)세포는 large granular lymphocytes(LGLs)로서 특정의 암세포나 바이러스에 감염된

세포 등을 파괴하며 종양의 형성이나 바이러스감염에 대한 숙주방어에 관여할 뿐만 아니라 체액성면역이나 조절작용을 조절하고 있다.<sup>1,2)</sup> 대다수의 NK세포가 CD16과 CD56과 같은 세포 표면항원을 발현하고 있다. LGLs는 사람 말초혈

† Corresponding author

액 림프구의 5-10%를 점유하고 있고 최소한 그 70%가 NK활성을 나타내고 있다.<sup>3)</sup> NK세포의 활성화는 대조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)와는 비의존적으로 작용하여 방어적 항암면역에서 큰 역할을 담당하게 된다.<sup>4,5)</sup> NK세포에 대한 모노클론항체로 NK세포를 제거시킨 동물은 암세포 성장을 억제할 수 없음이 동물실험 결과 밝혀졌고 NK세포활성에 대하여 interferon이나 interleukin-2와 같은 면역활성 물질이 증강작용을 나타낸다는 것 또한 밝혀졌다.<sup>6-11)</sup> Lymphokine-activated killer(LAK) 세포는 바로 NK세포가 활성화되어 나타난 결과로 보고되고 있다.<sup>12-14)</sup>

Benzo(a)pyrene(B(a)P)은 1932년 Cook에 의해서 coal tar로부터 분리된 polycyclic aromatic hydrocarbon물질로서 발암성이 높은 물질로 알려져 있다. 사람들은 주거 환경속에서 공기오염이나 흡연, 식품을 통하여 B(a)P에 노출된다. B(a)P는 cytochrome P-450 의존성 monooxygenase에 의해서 발암성 물질로 활성화 된다. B(a)P는 생체에서 국소적 혹은 전신적으로 발암에 관계하여 구강, 피부, 기관지 등에서 암을 유발한다.<sup>15,16)</sup>

면역계는 생체내에서 일부 암생성을 제어하는데 있어서 중요한 역할을 담당하기 때문에 면역계에 미치는 B(a)P의 영향에 대한 연구는 상당히 진행되고 있다. 지금까지 보고된 바로는 B(a)P가 면역을 억제, 특히 항체생성을 억제한다는 실험결과들이 있으나 면역반응 전반에 걸친 억제효과는 아직 결정된 바 없다.<sup>17-19)</sup>

본 실험에서는 B(a)P가 암세포에 대한 대표적인 세포성 방어능을 나타내는 NK세포활성에 미치는 효과를 봄으로서 B(a)P와 같은 발암물질이 생체의 세포성면역계에 미치는 영향을 관찰하여 암세포 제어에 관계하는 작용자세포의 기능변화를 탐색하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

암컷 C57BL/6 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 한국생공(충남, 대전)으로부터 구입하여 시험에 사용하였다.

### 2. 시료

Benzo(a)pyrene은 Sigma chemical Co.(St.Louis, U.S.

A.)에서 구입하여 사용하였다.

### 3. Natural Killer(NK)세포활성의 측정을 위한 시험

#### 1) 표적암세포(target tumor cell line, TTC)의 준비

NK세포에 대한 표적세포로서는 마우스 T lymphoma 유래의 세포주인 Yac-1세포를 25 cm<sup>2</sup> 플라스틱 후라스코(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에서 10 % 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2 mM L-glutamine(Gibco, Grand Island, U.S.A.), 100 IU /ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B(Gibco, Grand Island, U.S.A.)를 포함시킨 RPMI 1640 배지(complete RPMI 1640)로 부유배양시켜 유지시켰다.

#### 2) 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포의 분리는 Mishell 등<sup>20)</sup>의 방법에 의거하여 시행하였다. 즉 경부를 달구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 4 $^{\circ}$ C의 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco, Grand Island, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, U.S.A.)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포부유액을 15 ml 원심관(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에 옮긴 후 2 - 3분 동안 실온에 방치한 다음 세포부유액의 상층액을 새로운 15 ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 300 g에서 5 - 10분 원심한 후 HBSS로 1회 원심 세척한 다음 혼입된 적혈구를 tris-buffered 0.87% NH<sub>4</sub>Cl용액으로 3분간 처리한 후 HBSS로 2회 원심 세척하여 사용하였다.

#### 3) 작동세포(effector cells, EC)의 준비

##### (1) 시료의 *in vitro* 노출

마우스 비장세포를 complete RPMI 1640배지에 부유시킨 다음 배양기에서 1시간동안 배양한 후 non-adherent cell만을 수거하여 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포/ml로 세포농도를 조절한 다음 세포 ml당 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 B(a)P를 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g/되게 가하여 2시간 동안 노출시켰다. 대조군으로서는 DMSO를 5% 포함시킨 phosphate buffered saline(PBS)액에 노출시킨 군으로 하였다. 시간이 경과된 후 세포를 PBS로 3회 원심 세척하여 작동세포로 사용하였다.

##### (2) 시료의 *in vivo* 노출

DMSO에 녹인 B(a)P액을 마우스 복강내로 투여시킨 후 비장을 분리하여 비장세포 부유액을 준비하는 과정은 2)와 동일하다. 시료의 투여량은 마우스 당 0.5 mg 으로 하였으며 1, 2, 3회 투여군으로 나누어 1회 투여군은 1일에, 2회투여군은 1일과 3일에, 3회투여군은 1일, 3일, 5일에 시료를 투여하였다. 비장의 분리는 7일에 시행하였다. 대조군으로는 시료를 포함시키지 않은 DMSO액만을 투여한 마우스 군을 사용하였다.

4) 세포성장 저해시험(tumor cell growth inhibition test, TCGIT)<sup>21-23)</sup>

Effector/target cell ratio(E/T ratio)는 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1로 하였다. 96 wells microplate를 사용하여 well당 TTC의 수를 1,000개씩 분주(50 $\mu$ l)한 다음 EC를 상기한 비율에 준하여 중첩 분주(50 $\mu$ l)하였다. 대조군으로는 각 세포농도의 작용자세포만의 배양, 표적세포만의 배양 그리고 배지만의 배양 well들을 준비하였다. 사용 배지로는 complete RPMI 1640배지에 2-mercaptoethanol, 10<sup>-5</sup>M을 추가하여 사용하였다. 각각의 시험은 triplicate로 시행하였다.

분주가 완료된 plate는 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 4일 동안 배양하였다. 4일 배양 후에 plate의 각 well에 MTT(PBS 1 ml 당 5 mg의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)액 10 $\mu$ l씩을 적하하고 4.5시간 추가 배양하였다. 시간이 경과된 후 10% SDS-0.02M HCl액 25 $\mu$ l씩을 well에 적하하여 실온과 암실조건에서 하룻밤 방치하였다. Optical density(OD)는 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

OD에서 나타난 수치로 부터 % dead cell(% D)은 다음과 같은 식으로 부터 산출되었다.<sup>21)</sup>

$$\%D = \left(1 - \frac{OD_{effector + target} - OD_{effector}}{OD_{target} - OD_{blank}}\right) \times 100$$

#### 4. 통계학적 분석

실험적은 평균 또는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈으며 구간간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하였고 P값이 0.05 이하일 때 유의있는 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. *In vitro* 시료노출에 따른 마우스의 NK세포활성

정상마우스의 비장세포에 B(a)P를 노출시킨 후 나타나는 NK세포활성은 B(a)P의 용매로 사용했던 DMSO만을 노출시킨 대조군에 비하여 뚜렷한 감소를 보임으로서 *in vitro*에서의 시료노출에 의한 NK세포활성의 저하를 나타냈다. 즉, 200/1의 E/T ratio에서 ml당 시료를 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g/ 작용시켰을 때 각각 -33.60, -28.38, -29.06, -19.44 %를 나타낸 반면 대조군에서는 60.47%를 나타냄으로서 모든 시료군에서 매우 유의한 차로 NK세포활성의 감소를 나타냈다(P<0.01)(Fig. 1).

### 2. *In vivo* 시료노출에 따른 마우스의 NK세포활성

*In vivo* 시험에서 정상마우스의 복강내로 B(a)P액을 투여한 후에 분리된 비장세포가 나타내는 NK세포활성은 시료의 노출빈도에 따른 차이를 보기 위하여 1회, 2회, 3회 투여군으로 나누어 시험하였다. 대조군에서도 시료군과 마찬가지로 시료의 용매만을 시료의 노출빈도와 맞게 투여하여

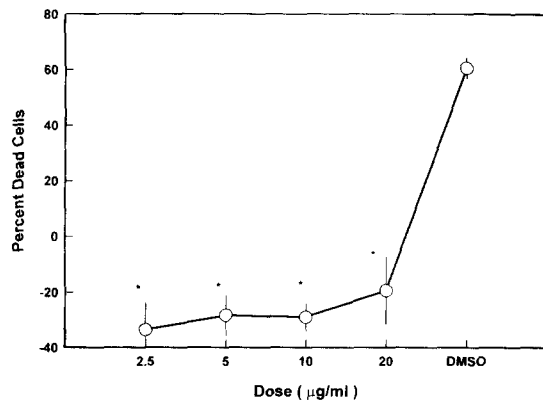


Fig. 1. NK cell mediated cytotoxicity in benzo(a) pyrene and DMSO(control)-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1. Values shown are means $\pm$ standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicate. \*Significantly different from the control value(P < 0.01)

시험하였다.

먼저, 200/1 E/T ratio에서 B(a)P 0.5 mg을 1회 투여한 군에서는 대조군에 비하여 NK세포활성의 감소를 보였지만 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 2회 및 3회투여군에서는 유의성있는 감소를 나타냈다(P<0.05)(Fig. 2). 100/1 E/T ratio에서는 모든 시료투여군에서 매우 유의한 감소를 나타냈다(P<0.01)(Fig. 3). 50/1에서는 1회 투여군에서 유의한 감소(P<0.05), 2회 투여군에서 매우 유의한 감소(P<0.01)를 나타냈으나 3회 투여군에서는 감소는 나타냈으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 4). 25/1에서는 모든 군에서 감소를 보였지만 3회 투여군에서만 매우 유의성있는 감소를 보였다(P<0.01)(Fig. 5).

B(a)P은 비교적 낮은 농도의 노출에도 동물에서 암을 일으키는 물질로서 사람의 건강에 해를 끼치는 대표적인 공기 오염물질이 되고 있다. 이러한 물질에 노출되었을 때 암형성과정에 중요한 역할을 담당하고 있는 면역계는 그 기능의 억제를 보이게 된다. 이러한 면역억제는 특히 항체

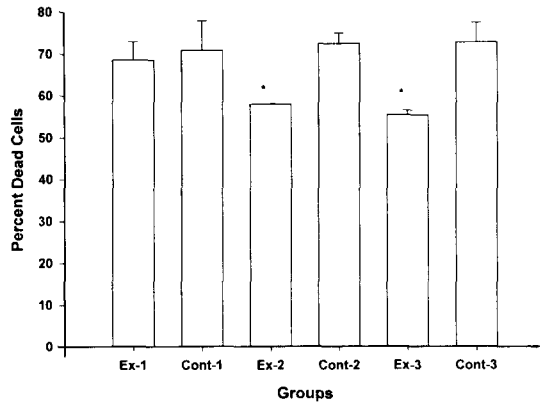


Fig. 2. NK Cell mediated cytotoxicity in benzo(a) pyrene-exposed female mice at the effector/target cell ratio of 200/1. Mice were i.p. injected with 0.5mg of benzo(a) pyrene(one time, Ex-1; two times, Ex-2; three times, Ex-3) and DMSO(one time, Cont-1; two times, Cont-2; three times, Cont-3). Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures. \*Significantly different from the control value(P<0.05)

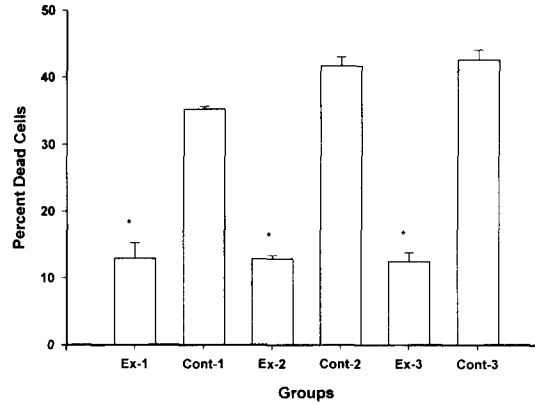


Fig. 3. NK cell mediated cytotoxicity in benzo(a) pyrene-exposed female mice at the effector/target cell ratio of 100/1. Mice were i.p. injected with 0.5mg of benzo(a) pyrene(one time, Ex-1; two times, Ex-2; three times, Ex-3) and DMSO(one time, Cont-1; two times, Cont-2; three times, Cont-3). Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures. \*Significantly different from the control value(P<0.01)

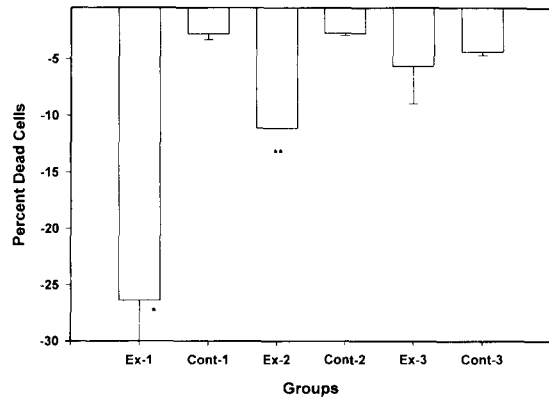


Fig. 4. NK cell mediated cytotoxicity in benzo(a) pyrene-exposed female mice at the effector/target cell ratio of 50/1. Mice were i.p. injected with 0.5mg of benzo(a) pyrene(one time, Ex-1; two times, Ex-2; three times, Ex-3) and DMSO(one time, Cont-1; Two times, Cont-2; three times, Cont-3). Value shown are means±standard deviations for triplicate cultures. \*Significantly different from the control value(\*P<0.05, \*\* : P<0.01)

## Benzo(a)pyrene이 마우스 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

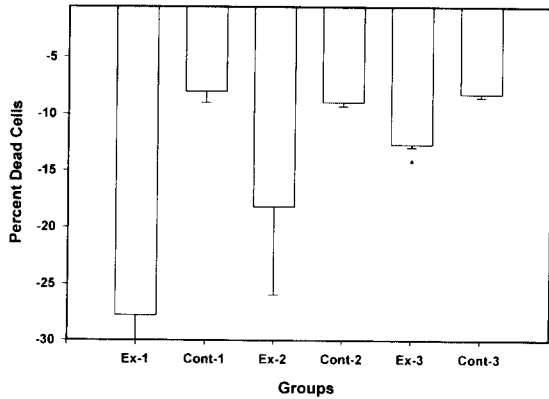


Fig. 5. NK cell mediated cytotoxicity in benzo(a) pyrene-exposed female mice at the effector/target cell ratio of 25/1. Mice were i.p. injected with 0.5mg of benzo(a) pyrene(one time, Ex-1 ; two times, Ex-2 ; three times, Ex-3) and DMSO(one time, Cont-1 ; two times, Cont-2 ; three times, Cont-3). Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures.

\*Significantly different from the control value(P <0.01)

생성이나 대식세포의 항원 처리능력과 cytokine생성능에 심대한 손상을 주게 된다.<sup>16,24,25)</sup>

정상마우스로부터 분리한 비장세포에 B(a)P를 노출시킨 후 나타낸 NK세포활성의 경우, 대조군에서는 뚜렷한 표적 암세포 살해효과를 보인 반면 시료 노출군들에서는 오히려 표적암세포의 성장을 촉진시킴으로서 작용자세포로서의 기능을 상실하고 있음을 알 수 있다. 또한 시료농도의 고저에 따른 차이가 크지 않으며 아주 낮은 농도(2.5µg/ml)에서도 NK세포기능 억제효과를 보이고 있다(Fig. 1).

정상마우스의 복강내로 B(a)P를 반복 투여시킨 후에 분리시킨 비장세포가 나타내는 NK세포활성은 2회와 3회 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 보여줌으로서 분명한 반복노출의 결과로 생각된다(Fig. 2). 그러나 E/T ratio가 100/1 이하로 낮아 졌을 때, 유의한 억제효과는 투여횟수에 따라 각 각 차이를 보이고는 있으나 모든 시험군들이 대조군보다는 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 3-5). 따라서 B(a)P가 마우스의 면역계에 미치는 영향은 타 연구자들이 밝힌 항체생성의 저하, 대식세포의 항원처리능

력 및 cytokine생성능의 손상 등의 결과 뿐만 아니라 암형성에 지대한 영향을 미치는 NK세포의 활성화도 크게 저하시킴을 알 수 있었다.

## 요 약

발암물질인 benzo(a)pyrene(B(a)P)이 암세포에 대한 세포성 방어능을 나타내는 자연살해(Natural Killer, NK)세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시료를 C57BL/6 마우스에 노출시킨 후 NK세포활성을 MTT시험법을 이용하여 측정하였다. 정상 및 시료노출군 마우스의 NK세포활성은 표적세포인 Yac-1세포에 대한 사멸세포백분율(percent dead cell)로서 측정하였다.

정상마우스의 비장세포에 B(a)P를 노출시켰을 때 노출군들은 시료농도에 따른 활성화에 큰 변화는 없었으나 낮은 농도(2.5µg/ml)의 노출에서도 정상에 비하여 현저히 낮은 활성치를 보였다.

정상마우스에 시료를 투여한 후에 분리한 비장세포의 NK세포활성치는 E/T ratio 200/1에서, 1회 투여보다는 2-3회 투여군에서 유의한 감소를 나타냄으로서 반복노출의 효과를 보였다.

본 시험을 통하여 B(a)P는 마우스 면역계에 미치는 효과 중 암형성에 지대한 영향을 주는 NK세포활성을 크게 저하시킴을 알 수 있었다.

## 감사의 글

1997년 고신대학교 의학부 장기려기념 간연구소 연구비의 일부 지원에 의해 이루어졌으며 이를 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 하운문, 김광혁, 전무형, 우종설, 임수덕 : 한국정상인 말초혈액 림프구의 Natural Killer(NK)활성치에 관한 연구, 대한의학협회지, 24, 503(1981).
2. Trincheri G. : Biology of natural killer cells, *Adv Immunol.*, 47, 187(1989).
3. Antonelli P., Stewart II W. and Dupont B. : Distribution of natural killer activity in peripheral blood, cord blood, thymus, lymph nodes, and spleen and the effect of in vitro with interferon preparation,

- Clin. Immunol. Immunopathol.*, 19, 161(1981).
4. Nouri A. M. E., Hussain R. F., Dos Santos A. V. L., Mansouri M. and Oliver R. T. D. : Intensity of class I antigen expression on human cell lines and its relevance to the efficiency of non-MHC-restricted killing, *Br. J. Cancer*, 67, 1223(1993).
  5. Nouri A. M. E., Mansouri M., Hussain R. F., Dos Santos A. V. L. and Oliver R. T. D. : Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 180, 63(1995).
  6. Anderson T. M., Ibayashi Y., Tokuda Y., Colquhoun S. D., Carmack E. and Golub S. H. : Effects of systemic recombinant interleukin-2 on natural killer and lymphokine activated killer activity of human tumor infiltrating lymphocytes, *Cancer Res.*, 48, 1180(1988).
  7. Balkwill F. R. and Burke F. : The cytokine network, *Immunol. Today*, 10, 299(1989).
  8. Gidlund M., Orm A., Wiggzell H., Senik A. and Gresser I : Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers, *Nature*, 273, 759(1987).
  9. Grimm E. A., Mazumder A., Zhang H. Z. and Rosenberg S. A. : Lymphokine-activated killer cell phenomenon : Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 155, 1823(1982).
  10. Reynolds C. W. and Herberman R. B. : In vitro augmentation of rat natural killer cell activity, *J. Immunol.*, 126, 1581-1585(1981).
  11. Seaman W. E., Slesinger M., Eriksson E. and Koo G. C. : Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1 : Reduction in host defence against malignancy without loss of cellular or humoral immunity, *J. Immunol.*, 138, 4539(1987).
  12. Archimbaud E., Bally M. and Dore J. : Inducibility of lymphokine activated killer(LAK) cells in patients with myelogenous leukemia in complete remission and its clinical relevance, *Br. J. Haematol.*, 77, 328(1991).
  13. Fries R. U. and Golub SH : Characteristics and mechanism of IFN-gamma-induced protection of human tumor cells from lysis by lymphokine-activated killer cells, *J. Immunol.*, 140, 3686(1988).
  14. Grim E. A. and Wilson D. J. : The human lymphokine-activated killer cell system : V. Purified recombinant interleukin-2 activates cytotoxic lymphocytes which lyse both natural killer-resistant autologous and tumors and tritrophenyl-modified autologous peripheral blood lymphocytes, *Cell. Immunol.*, 94, 568(1985).
  15. Ladics G. S., Kawabata T. T., Munson A. E. and White KL Jr : Evaluation of murine splenic cell type metabolism of benzo(a)pyrene and functionality in vitro following repeated in vivo exposure to benzo(a)pyrene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116, 258(1992).
  16. Wojdani A., Attarzadeh M., Woldetsadik G. and Alfred LJ : Immunocytotoxicity effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on mouse lymphocytes, *Toxicol.*, 31, 181(1984).
  17. Blanton R. H., Lyte M., Myers M. J. and Bick P. H. : Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells, *Cancer Res.*, 46 : 2735(1986).
  18. Dean J. H., Luster M. I., Boorman G. A., Lauer L. D., Leubke R. W. and Lawson L. : Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener of benzopyrene in B6C3F1 mice, *Clin. Exp. Immunol.*, 52, 199(1983).
  19. Stjernsward J. : Effectsof noncarcinogenic and carcinogenic hydrocarbons on antibody-forming cells measured at the cellular level in vitro, *J. Natl. Cancer Inst.*, 36, 1189(1966).
  20. Mishell B. B. and Shiigi S. M. : *Selected methods in cellular immunology* 1st ed., pp. 4-27, San Francisco, WH Freeman and Co.(1980)
  21. Garbin F., Eckert K. and Maurer H. R. : Evaluation of the MTT and SRB assays for testing LAK cell-mediated growth inhibition of various adherent and non-adherent tumor target cells, *J. Immunol. Methods*, 170, 269(1994).
  22. Hussain R. F., Nouri A. M. E. and Oliver R. T. D. : A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay, *J. Immunol. Methods*, 160, 89(1993).
  23. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55(1983).
  24. Myers M. J., Schook L. B. and Bick P. H. : Mechanisms of benzo(a)pyrene-induced modulation of antigen presentation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242, 399(1987).
  25. White K. L. and Holsapple M. P. : Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo(a)pyrene but not the noncarcinogenic congener benzo(e)pyrene, *Cancer Res.*, 44, 3388(1984).