약학회지 제 50 권 제 4 호 244~253 (2006)
Yakhak Hoeji Vol. 50, No. 4

藥學會誌

Chrysene이 BALB/c계 마우스의 면역기능에 미치는 영향

전태원 · 김춘화 · 이상규 · 김기환 · 전인혜 · 이동주 · 정혜민 · 정태천#
영남대학교 약학대학
(Received July 10, 2006; Revised August 9, 2006)

Effects of Chrysene on the Immune Functions in Female BALB/c Mice

Tae Won Jeon, Chun Hua Jin, Sang Kyu Lee, Ghee Hwan Kim, In Hye Jun, Dong Ju Lee, Hemin Jeong and Tae Cheon Jeong#
College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

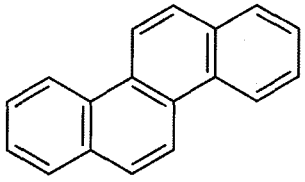
Abstract — Effects of chrysene on immune functions were studied in female BALB/c mice. When mice were treated po with chrysene for 7 consecutive days, the antibody response was suppressed dose-dependently. Chrysene induced the enzyme activities of CYP 1A and 2B time- and dose-dependently. In *ex vivo* lymphocyte proliferation, chrysene inhibited splenocyte proliferation by LPS and Con A. Moreover, the numbers of $CD4^+IL\text{-}2^+$ cells were reduced by chrysene. In conclusion, chrysene-induced immunotoxicity might be mediated, at least in part, via IL-2 production, and caused by mechanisms associated with metabolic activation.

Keywords □ chrysene, immunosuppression, antibody response, metabolic activation, interleukin-2

다환 방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)는 산불, 유기화합물의 분해, 화석연료 및 내연기관의 연소 등에 의해 자연적으로 환경에 오염이 되고 있는 물질로써, 대부분 지방친화성이 커서 체내 흡수 시 축적성이 매우 크며, 체내에서 대사과정을 거치면서 발암성이 유발되는 것으로 알려져 있다.[1-3] 1976년에 Jerina와 Daly에 의해 최초로 'bay-region theory'가 제안되어 체내에서 benzo ring의 diol epoxide 생성여부가 PAH의 발암성을 결정하는 주요 체내 대사 경로임이 알려진 이래,[4] PAH의 발암성에 관한 연구는 상당히 많이 이루어져 방향족 환의 수 및 위치에 따라 발암성의 정도에 차이를 보인다는 사실이 알려졌다.[5] 또한 PAH는 일상생활에서도 노출 가능성이 매우 커서, 담배연기, 대기, 음식물 및 음용수 중에도 상당량이 존재하며, 시험동물에서는 피부암, 피하육종 및 기관지암 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.[6]

면역계는 체외에서 유입되는 세균이나 바이러스 등의 항원에 대한 생체의 방어기구로써 매우 중요하며, 여러 내분비계에 의해 그 기능이 조절되므로 내분비계 장애물질을 비롯한 각종 환경오염물질들에 생체가 노출될 때 피해를 많이 받게 되는 독성 표적 중의 하나이다. 이렇게 면역계가 영향을 받게 되면 면역기능의 이상항진, 억제 또는 알러지 유발 등의 장해가 나타나게 되고, 2차적으로 유입된 세균이나 바이러스에 대한 생체의 효과적인 대응이 어렵게 된다. 이러한 이유 때문에 선진 각 국에서는 화학물질에 의한 면역계의 영향을 평가하기 위한 많은 시험법들을 독성시험기준에 수재하여 화학물질의 독성으로부터 국민의 건강을 수호하기 위한 조치를 강구하고 있다.

본 연구에서 시험물질로 선택한 chrysene(Fig. 1)은 환경에 존재하는 PAH의 주된 구성요소로서 잘 알려져 있다. 몇몇 발암성



M.W., 228.3

Fig. 1 – Structure of chrysene used for this study.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2819 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) taecheon@yumail.ac.kr

Table I – PAH lists of IARC evaluations classified by groups

Groups	PAHs
1	No chemical
2A	Benz[a]anthracene, Benzo[a]pyrene and Dibenz[a,h]anthracene
2B	Benzo[b]fluoranthene, Benzo[j]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Dibenz[a,h]acridine, Dibenz[a,j]acridine, 7H-Dibenzo[c,g]carbazole, Dibenzo[a,e]pyrene, Dibenzo[a,h]pyrene, Dibenzo[a,i]pyrene, Dibenzo[a,l]pyrene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene and Naphthalene
3	Anthanthrene, Anthracene, Benz[a]acridine, Benz[c]acridine, Benzo[ghi]fluoranthene, Benzo[a]fluorene, Benzo[b]fluorene, Benzo[c]fluorene, Benzo[ghi]perylene, Benzo[c]phenanthrene, Carbazole, **Chrysene**, Coronene, Cyclopenta[cd]pyrene, Dibenz[a,c]anthracene, Dibenz[a,j]anthracene, Benzo[e]pyrene, Dibenzo[a,e]fluoranthene, 1,4-Dimethylphenanthrene, Fluoranthene, Fluorene, 2- and 3-Methylfluoranthenes, 1-Methylphenanthrene, Perylene, Phenanthrene, Pyrene and Triphenylene
4	No chemical

Group 1: The agent is carcinogenic to humans. Group 2A: The agent is probably carcinogenic to humans. Group 2B: The agent is possibly carcinogenic to humans. Group 3: The agent is not classifiable as to carcinogenicity in humans. Group 4: The agent is probably not carcinogenic to humans.

연구에서는 chrysene을 마우스 피부에 적용 시, 피부암을 유발하며, 피하주사를 통한 국소 암의 유발도 관찰됨이 보고되었다.[6] 주산기 마우스를 대상으로 피하 및 복강투여 시, 간암 발병률이 증가하였다는 결과와 대사활성 효소계 적용 시, *Salmonella typhimurium* 균주에 대한 복귀돌연변이를 유발하였다는 연구 결과도 보고되었다.[6] 이처럼 chrysene에 대한 지금까지의 연구는 발암성 여부에 초점이 맞추어져 있었다.

1983년에 국제암연구기구(IARC)는 발암성의 정도에 따른 PAH의 분류에서 chrysene을 Group 3으로 분류하였다.[6] 이 분류에서 PAH는 Group 1부터 Group 4까지로 나누어지며, 각 group에 속하는 PAHs의 종류는 Table I에 나타내었다. 이 분류 중에서 Group 2A(유력발암물질)는 사람에 대한 발암성의 가능성이 충분히 있는 화학물질을, Group 2B(후보발암물질)는 사람에 대한 발암성의 가능성이 있는 화학물질을, 그리고 Group 3(인체 비발암성물질)은 사람에 대해 발암성이 있다고 분류할 수 없는 화학물질을 포함하고 있다. 지금까지 연구되어 알려진 바에 의하면, 발암성 PAH 중에서 면역독성과의 상관성이 제대로 연구되어 있는 것은 TCDD와 같은 유기염소계 화합물과 benzo[a]pyrene 정도이었다. Jeon 등[7]은 Group 2B로 분류된 benzo[k]fluoranthene을 급성 및 아급성으로 암컷 BALB/c 마우스에 투여 하였을 때 현저한 면역 억제 현상이 나타남을 보고하였다. 그러나 chrysene의 경우 Group 3에 분류되어 인체 발암성이 없는 것으로 알려져 있어 면역독성학적인 측면에서의 상관성 연구 결과는 극히 제한적이었다. White 등[8]은 몇몇 PAH에 의한 면역 억제현상을 구조-활성의 상관성 측면에서 연구하였는데, chrysene의 경우, 4개의 benzo ring과 2군데의 bay-region을 갖지만 그 면역독성 유발의 정도는 미약한 것으로 보고하였다.

본 연구에서는, 일상생활에서 반복적으로 노출되고 있는 다양한 PAH 중에서 chrysene의 면역계에 미치는 독성 정도를 평가하고, *in vivo* 및 *in vitro* 시험방법을 활용하여 면역독성을 유발하는 기작을 이해하는데 목적을 두고 있다. 방법적으로는, chrysene이 면역계에 영향을 주는지를 우선적으로 판단하기 위해, 암컷 BALB/c계 마우스를 대상으로 단회 및 1일 1회, 7일 연속적으로 chrysene을 투여한 후, 미국 NTP(National Toxicology Program) 및 식약청 독성시험기준에 포함되어 있는 면역독성지표 중, *in vivo* 항체생성능, 비장 및 흉선 임파구의 표현형 및 비장세포 증식능과 같은 지표를 활용하여 시험하였으며, 더불어 면역독성의 유발 기전을 이해하기 위해 간 조직 cytochrome P450(CYP) 효소 활성도 및 비장세포의 cytokine 생산 세포수를 측정하여 면역기능에 미치는 chrysene의 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

시약

시험에 사용된 시약 중, chrysene은 Aldrich사(Milwaukee, WI)로부터, alserver's solution, DEAE-dextran, agar, bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide(DMSO), 7-ethoxyresorufin, methoxyresorufin, 7-pentoxyresorufin, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH 및 corn oil은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 2-Mercaptoethanol (2-ME), lipopolysaccharide(LPS), concanavalin A(Con A), fetal bovine serum(FBS), Earle's balanced salt solution(EBSS), guinea pig complement, L-glutamine, penicillin G-streptomycin solution 및 RPMI 1640 배지는 GIBCO사(Grand Island, NY)로부터, CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit는 Promega사(Madison, WI)에서, 그리고 BD Cytofix/Cytoperm PlusTM(with GolgiPlugTM) kit는 BD Biosciences사(San Diego, CA)로부터 구입, 시험에 사용하였다. Flow cytometry를 이용한 시험에 사용된 모든 항체는 Pharmingen(San Diego, CA)으로부터 구입하였다. 면양적혈구(sheep red blood cell; SRBC)는 영남대학교 생물자원학부로부터 제공받았다. 기타 시약은 특급으로 구입, 사용하였다.

시험동물

4주령의 특정병원체 부재 BALB/c계 암컷 마우스(BALB/cAnNCrjBgi)를 Charles River Korea(서울, 한국)로부터 구입하였으며, 무작위로 폴리카보네이트 cage에 5마리씩 분리, 수용하여 최소한 2주 이상 순화시켜 시험에 사용하였다. 사육환경조건은 시험 종료 시까지 온도 22±3°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150~300 Lux를 유지하였으며, 시험기간의 사육기간 중, 동물실의 온·습도는 자동 온·습도 측정기에 의하여 매시간 마다 측정하였다. 전 시험기간 동안 물과 사료는 제한 없이 공급하였다.

투여 및 처치

투여용량은 예비시험의 결과를 바탕으로, chrysene을 30, 60 및 120 μmole/kg/10 m*l*로 결정하였으며, 용매는 corn oil을 사용하였다. 급성투여의 경우, 1회 경구 투여하였고, 아급성 투여의 경우는 1일 1회, 7일간 연속적으로 경구 투여하였다. Chrysene을 투여한 동물의 부검은 마지막 투여 시간으로부터 24시간 후에 실시하였다. 부검 당일 모든 동물은 경추탈구 한 후, 비장, 흉선 및 간장을 적출하여 각 장기의 중량을 측정한 후, 다음 시험에 제공하였다. 이와는 달리 *in vivo* 항체생성능 시험은, 단회 투여의 경우는 chrysene을 1회 투여한 뒤 30분 후, 그리고 아급성 투여의 경우는 1일 1회, 4일간 4회의 chrysene을 투여한 뒤 30분 후에 5×10^8의 SRBC를 함유한 0.5 m*l*의 EBSS를 각 동물에 복강 투여하여 감작시켰다. 이 때 7일 연속 투여의 경우는 남은 3일간 동안 계속적으로 chrysene을 투여하였다. 두 경우 모두 SRBC를 감작시킨 날로부터 4일 뒤에 무균적으로 적출한 비장을 이용하여 항체생성 세포수를 측정하였다.

SRBC에 대한 항체생성능 측정

부검일에 비장을 적출하여 3 m*l* EBSS에 재현탁 시켰다. 비장세포액 100 μ*l*를 2.9 m*l*의 EBSS에 옮겨 30배 희석한 후, 변형한 Jerne plaque assay를 이용하여 항체생성 세포(antibody forming cells; AFCs)를 측정하였다.[9] 항체생성 세포수의 측정방법을 간단히 설명하면, 먼저 EBSS에 agar를 0.5%가 되도록 제조하여 끓여 녹인 후 여기에 0.05%의 DEAE-dextran을 넣었다. 이것을 48°C의 항온 수조에 놓고 350 μ*l*를 항온수조에 미리 준비한 시험관에 분주하였다. 여기에 비장세포 100 μ*l*를 가하고 미리 EBSS로 3회 세척해 놓은 SRBC 25 μ*l*와 기니픽으로 부터 분리한 보체 25 μ*l*를 각각 가하여 고르게 섞은 다음, Petri dish에 200 μ*l*를 취하고 cover glass로 살짝 덮어 용액이 골고루 퍼지도록 하였다. 그 다음, 상온에서 약 10분간 방치하여 agar를 굳히고, 수분을 포화시킨 37°C의 항온기에서 약 3시간 배양시켜 plaque의 형성을 유도하였다. 형성된 plaque의 수를 Stereomaster plaque viewer를 사용하여, ×20의 배율에서 각각 측정하고, 비장세포액 내의 세포수를 Coulter counter(Coulter, Miami, FL)로 측정하여, 결과를 AFCs/10^6 spleen cells 또는 AFCs/spleen으로 환산하여 표현하였다.

Flow cytometry를 이용한 표면항원 분석

Chrysene을 단회 및 7회 투여한 후, 각 동물에서 비장 및 흉선을 적출하여 각각 3 m*l*의 EBSS용액에 넣고 주사기 plunger를 이용하여 단일 세포액을 제조하였다. 각 세포액은 EBSS로 다시 한 번 원심세척하고, 비장 및 흉선세포에 대해서 T-세포 및 B-세포의 구성비를 FACSCalbur(Becton-Dickinson, Mountain View, CA) 장비를 이용하여 Jeon 등의 방법[7]에 준하여 측정하였다. 총 세포수는 Coulter counter(Coulter, Miami, FL)로 측정하였다. Fc blocking를 위해 purified anti-mouse CD16/CD32 Fc receptor를 사용하였고, 비장의 경우, 총 T 세포는 Peridinin chlorophyll-a protein(PerCP)-conjugated anti-mouse CD3e (clone: 145-2C11)로 염색하였고, B 세포는 R-Phycoerythrin(R-PE)-conjugated anti-mouse CD45R/B220(clone: RA3-6B2)을 이용하여 염색하였다. 흉선 및 비장의 CD4 T세포(helper T 세포)와 CD8 T세포(suppressor/cytotoxic T 세포)의 비율을 측정하기 위해 FITC-conjugated anti-mouse CD4(clone: GK1.5) 및 R-PE-conjugated anti-mouse CD8a(clone: 53-6.7)을 이용하여 염색하였다. 방법을 간단히 설명하면, 먼저 anti-mouse CD16/CD32 Fc receptor(1 μg/tube)로 4°C 하에서 15분간 Fc receptor를 blocking 했다. 그리고 2개 또는 3개 씩 anti-mouse monoclonal antibodies(1 μg/tube)를 조합하여 ice에서 30분간 염색하였다. 적혈구를 용혈시키기 위해 BD lysis buffer(PharMingen, San Diego, CA)로 정확히 10분간 용혈과정을 거친 뒤 PBS로 2회 세척하였다. 그리고 0.3 m*l*의 PBS를 각 tube에 넣은 후 잘 섞고, Cell Quest software(Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였다.

S-9 분획의 분리 및 CYP 효소 활성도 측정

부검 당일 적출한 간 조직에 4배량의 냉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4)을 가하여 균질화시켰다. 이 균질액을 4°C, 9,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액, S-9 분획을 얻었고 이 분획은 0.5 m*l*씩 분주 후, -70°C에 보관하여 효소 활성 측정에 사용하였다. S-9 분획 내의 단백질은 bovine serum albumin을 표준품으로 삼아 Lowry 등의 방법[10]에 준하여 정량하였다.

Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD) 활성은 Blank 등의 방법[11]에 준하여 약간 변형된 방법으로 측정하였다. 반응용액은 2 mg/m*l*의 bovine serum albumin, 10 μM dicumarol, 5 mM glucose 6-phosphate, 5 units/m*l*의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 5 μM NADPH를 가한 0.1 M potassium phosphate

완충용액(pH 7.4)을 사용하였으며, 기질로는 2.5 μM의 7-ethoxyresorufin을 사용하였다. 반응 생성물인 resorufin은 585 nm에서의 형광을 측정하여 정량하였고, 그 결과를 pmole resorufin/min per mg protein으로 표현하였다. Methoxyresorufin O-demethylase(MROD) 및 pentoxyresorufin O-dealkylase(PROD) 활성은 Lubet 등의 방법[12]에 준하여 EROD 활성 측정과 동일한 방법으로 측정하였다. 모든 시험조건 및 반응물의 조성은 EROD 활성 측정과 동일하고 기질의 경우에만 2.0 μM의 pentoxyresorufin 및 methoxyresorufin을 사용하였다.

비장세포 증식능 측정

Chrysene 투여에 의한 *ex vivo* 및 *in vitro* 임파구 증식능에 미치는 영향을 측정하였다. *Ex vivo* 임파구 증식능 측정의 경우, chrysene을 아급성으로 투여한 동물을 대상으로 하였으며, in vitro의 경우, 경추탈구로 희생시킨 무처치 동물로부터 무균적으로 적출한 비장세포를 이용하였다. Mitogen으로는 B-임파구 증식능을 측정하기 위하여 LPS를, T-임파구 증식능의 측정을 위하여 Con A를 사용하였다. *In vitro* 측정의 경우, chrysene을 10^{-2}, 10^{-1}, 100 및 10 μM/ml의 농도가 되도록 DMSO에 용해시켜 사용하였다. 방법적으로는 *ex vivo* 및 *in vitro* 모두 무균적으로 적출한 비장을 단일세포액으로 만들고 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 5% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100 μg streptomycin 및 5×10^{-5} M 2-ME를 함유하는 RPMI 1640 complete 배지에 균질화하고 세포의 농도를 *ex vivo*의 경우는 1.11×10^6 세포/ml로, *in vitro*의 경우는 1.25×10^6 세포/ml이 되도록 조정하였다. *Ex vivo*의 경우 180 μl를 그리고 *in vitro*의 경우는 160 μl의 세포액을 Costar 96-well 배양접시(Cambridge, MA, USA)에 분주하고 LPS(10 μg/ml) 또는 Con A(2 μg/ml)를 조제하여 well 당 총용량이 200 μl가 되도록 통일시켰다. 모든 처리가 끝난 후, plate를 37°C의 CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하여 유약화 반응을 유도하였다. 세포유약화 반응의 측정을 위해서 배양 시작 후, 3일째에 Promega 사제의 Cell Titer 96® AQueous Non-radioactive Proliferation kit를 사용하였다. 20 μl의 dye를 각 well에 처리하고 37°C의 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하여 발색을 유도한 다음 ELISA reader(TECAN A-5082, Austria)를 이용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 비장세포의 증식 정도는 Abs490/well로 표현하였다.

비장세포 내 cytokine 생산세포의 검출

Chrysene을 투여한 mice의 비장세포액을 1×10^6 세포/ml의 농도가 되도록 5% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100 μg streptomycin 및 5×10^{-5} M 2-ME를 함유하는 RPMI 1640 complete 배지에 균질화하고, 이것을 24 well plate에 Con A(2 μg/ml) 및 recombinant interleukin-2(rIL-2)와 함께 넣고 37°C의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 다시 Brefeldin A(10 μg/10^6 cells)를 첨가한 후 5시간 동안 배양하고 staining buffer로 4°C, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 세척하였다. 세포를 flow tube에 옮긴 후 Fc receptor의 blocking을 위해 purified anti-mouse CD16/CD32 Fc receptor(1 μg/10^6 세포/tube)를 넣고 ice에서 20분간 방치하였다. 이어서 FITC-conjugated anti-mouse CD4(clone: GK1.5)로 냉암소에서 30분간 염색하였다. 세척 후 고정 및 투과 과정을 위해 Cytofix/Cytoperm solution®(100 μl/tube)을 넣고 냉암소에서 20분간 incubation 시켰다. 1× Perm/Wash solution®(1 ml/tube)을 넣고 4°C, 1,500 rpm에서 10분간 2회 원심분리하였다. 여기에 anti-cytokine mAbs(PE-conjugated anti-mouse IL-2)를 함유한 Perm/Wash solution®을 100 μl 넣고 냉암소에서 30분간 incubation 하였다. 마지막으로 1× Perm/Wash solution®(1 ml/tube)으로 2회 원심분리하여 세척 후 staining buffer(300 μl/tube)를 넣고 잘 섞은 후 flow cytometry로 분석하였다.

통계처리

각 시험의 결과는 평균±표준오차로 표현하였고, 시험군 결과의 통계적 유의성은 SPSS를 이용하여 one-way ANOVA에서 유의한 값이 관찰되는 항목에 대하여 용매대조군과 각 용량군 사이의 유의수준 $P<0.05$ 및 $P<0.01$로 Dunnett's *post-hoc* test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

Chrysene이 면역기능에 미치는 영향을 평가하기 위해, BALB/c계 암컷 마우스를 대상으로 단회 및 아급성(1일 1회, 7일간 연속)으로 30, 60 및 120 μmole/kg을 경구로 투여하였다. 면역계에 대한 독성시험의 가장 큰 특징은 면역계를 구성하고 있는 세포들이 매우 다양하여, 한두 가지 시험을 통하여 면역독성 여부를 판단하는 것이 아니고 tier system으로 구성된 여러 가지 시험을 통하여 종합적으로 판단하고 있다는 점이다. 따라서 본 논문에서는 면역기능의 평가 지표로서 체중 및 장기무게의 변동과 함께 미국의 EPA에서도 적극 권장하고 있으며, 가장 널리 사용되고 민감한 지표로 알려진 SRBC에 대한 항체생성능을 *in vivo*에서 시험하였다.[13] 또한 면역독성의 평가는 주로 비장 및 흉선세포를 이용하여 시험하므로, 이들 장기를 구성하는 주요 세포인 B-세포 및 T-세포(T-helper 및 T-cytotoxic) 중에서 어느 세포가 chrysene의 주요 독성 표적인지를 확인하기 위해 비장 및 흉선 임파구의 표면항원 분석을 flow cytometry를 이용하여 실시하였다.

체중 및 장기무게 변동

Chrysene을 단회 투여하였을 때, 120 μmole/kg 투여군에서 대

Table II – Acute effects of chrysene on body and organ weight changes in female BALB/c mice

Chrysene (μmole/kg)	Body weight (g)	Absolute organ weight			Relative organ weight (% body weight)		
		Liver (g)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Liver	Spleen	Thymus
Vehicle	22.9±0.5	1.17±0.03	159±7	73±7	5.11±0.11	0.69±0.03	0.32±0.03
30	22.3±0.4	1.16±0.02	155±4	80±4	5.23±0.07	0.69±0.01	0.36±0.02
60	22.1±0.4	1.16±0.04	150±5	67±6	5.21±0.12	0.68±0.03	0.30±0.03
120	22.4±0.6	1.11±0.05	140±3	75±4	4.92±0.11	0.62±0.02	0.33±0.01

Female BALB/c mice were treated orally with chrysene in corn oil at 10 ml/kg once. Thirty minutes later, mice were immunized with SRBCs intraperitoneally. The body and organ weights were determined 4 days later. Each value represents mean±S.E. of five animals.

Table III – Subacute effects of chrysene on body and organ weight changes in female BALB/c mice

Chrysene (μmole/kg)	Body weight (g)	Absolute organ weight			Relative organ weight (% body weight)		
		Liver (g)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Liver	Spleen	Thymus
Vehicle	21.2±0.7	1.00±0.03	135±8	73±3	4.74±0.09	0.64±0.02	0.35±0.02
30	20.6±0.5	0.95±0.02	131±7	72±7	4.61±0.05	0.64±0.03	0.35±0.03
60	21.5±0.5	1.11±0.04	136±9	70±6	5.17±0.13*	0.63±0.03	0.33±0.03
120	21.9±0.6	1.03±0.04	127±5	71±5	4.71±0.08	0.58±0.02	0.32±0.02

Female BALB/c mice were treated orally with chrysene in corn oil at 10 ml/kg for 7 consecutive days. Four days before necropsy, mice were immunized with SRBCs intraperitoneally. Each value represents mean±S.E. of five animals. The asterisks indicate the values significantly different from the vehicle control (VH) at $P<0.05$ (*).

조군에 비해 비장의 무게가 감소하는 경향을 보였으나, 단회 투여로는 유의성 있는 영향을 미치지 못했다(Table II). Chrysene을 1일 1회, 7일간 연속하여 투여하였을 때, 체중 및 장기무게 변동을 Table III에 나타내었다. 비장 무게의 경우 다소 감소하는 경향만 보였을 뿐 통계적으로 유의한 변화는 나타내지 않았으며, 흉선의 무게 역시 별다른 변동을 나타내지 않았다. 간의 상대무게가 60 μmole/kg 투여군에서 대조군에 비해 약 9%의 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다. 이 결과에서는 chrysene의 투여회수에 따른 대표적인 면역장기인 비장의 무게 변동은 야기되지 않음을 보여주고 있다.

항체생성능에 미치는 영향

Chrysene의 급성 투여로 인한 *in vivo* 항체생성능을 측정하기 위해, chrysene의 투여 30분 후에 SRBC를 복강으로 투여하여 면역시켰으며, 4일 뒤 비장을 적출하여 시험을 실시하였다(Fig. 2A). Chrysene의 투여로 항체생성능이 감소하는 경향은 보여주었으나, 통계적 유의성은 없었다.

Chrysene의 아급성 투여로 인한 항체생성능의 평가를 위해, chrysene을 1일 1회, 7일간 투여한 후, 24시간째에 부검하여 적출한 비장을 대상으로 시험을 실시하였다. 이때 항체를 생성시키기 위한 SRBC의 감작은 부검 4일 전에 SRBC의 복강주사로 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 2B에 나타내었다. 대조군에 대한 항체생성 억제정도를 AFC/10^6 spleen cells로 계산하여 비교해 볼 때, chrysene을 30, 60 및 120 μmole/kg 용량으로 투여한 군에서 각각 21%, 27% 및 47%($p<0.05$) 정도 용량의존적인 억제를 나타내었다. 그러나 비장세포수의 변화는 없었다. 이러한 결과로부터 투여회수에 따라 chrysene의 항체생성능 억제 현상이 더욱 강력히 나타남을 알 수 있었고, 7회 연속 투여 시, 투여 용량이 증가함에 따라 시험에 사용된 동물의 체액성 면역능이 현저히 저하됨을 확인할 수 있었다.

비장 및 흉선 임파구의 표면항원 변화

Chrysene에 의해 유도된 면역독성의 주요 독성 표적이 비장과 흉선을 구성하는 세포 중에서 어느 세포가 되는지를 판단하기 위하여 SRBC로 면역시키지 않고 아급성으로 chrysene을 투여한 BALB/c계 암컷 마우스를 대상으로 flow cytometry를 이용하여 비장 및 흉선 임파구의 표현형 변화를 측정하였다(Fig. 3과 4). 또한 chrysene의 투여로 인한 체중 변화 및 장기 무게 변동도 함께 관찰하였다. Chrysene의 아급성 투여로, 흉선의 절대 및 상대 무게는 60 및 120 μmole/kg 투여군에서 대조군에 비해 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 간장과 비장의 무게 및 체중의 변화는 없었다(결과는 나타내지 않았음).

Chrysene 투여에 따른 비장 및 흉선 세포의 표현형 변화를 flow cytometry로 분석한 결과를 바탕으로 백분율로 계산하였을 때, 뚜렷한 백분율의 변화를 나타내지 않았다. 비장 및 흉선의 전체 세포수를 바탕으로 절대 세포수를 각각 표면항원에 대해 계산한 경우, 대조군에 대한 비장의 전체 세포, 총 T 세포, $CD4^+$와 $CD8^+$ 세포 및 B 세포수의 변동은 관찰할 수 없었으나(Fig. 3), 흉선의 전체 세포, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ 및 $CD4^-CD8^+$ 세포수는 대조군에 비해 투여 용량이 증가함에 따라 다소 감소

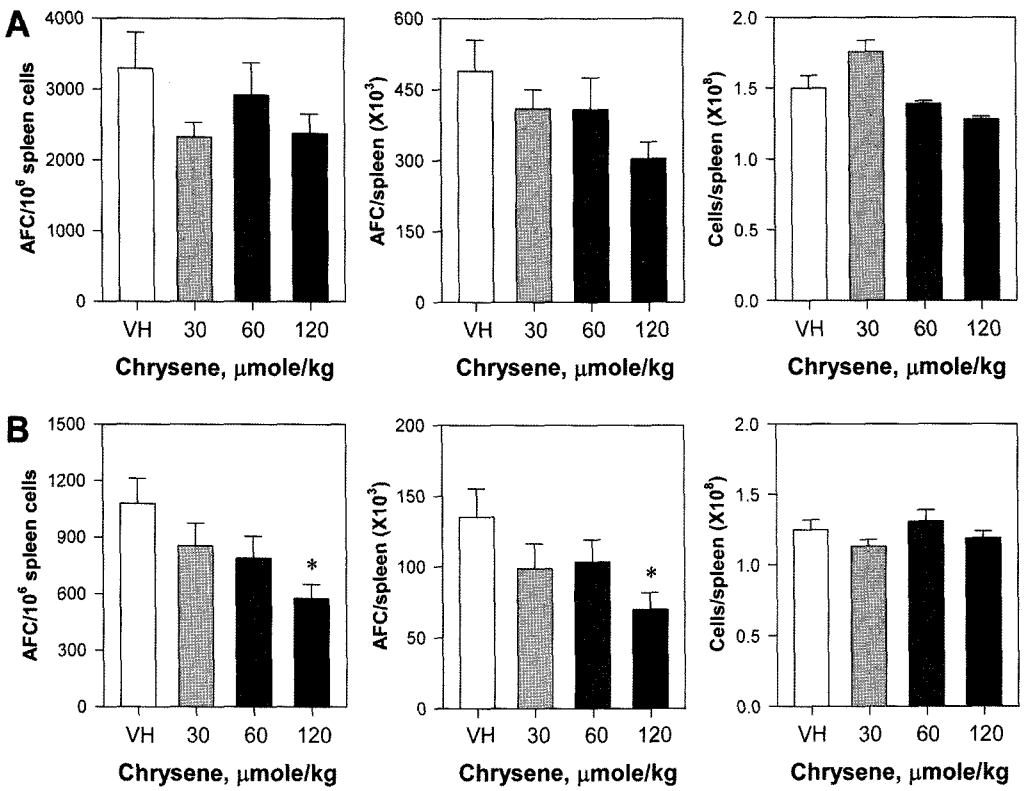


Fig. 2 – Effects of chrysene on T-dependent antibody response in female BALB/c mice. (A) Acute treatment. Mice were treated orally with chrysene in corn oil at 10 ml/kg once. Thirty min later, mice were immunized with SRBCs intraperitoneally. Four days later, the numbers of antibody-forming cells (AFCs) were enumerated. (B) Subacute treatment. Mice were treated orally with chrysene in corn oil at 10 ml/kg for 7 consecutive days. Four days before enumerating the numbers of AFCs, mice were immunized with SRBCs intraperitoneally. Each bar represents the mean±S.E. of 5 animals. The asterisks indicate the values significantly different from the vehicle control (VH) at $P<0.05$ (*).

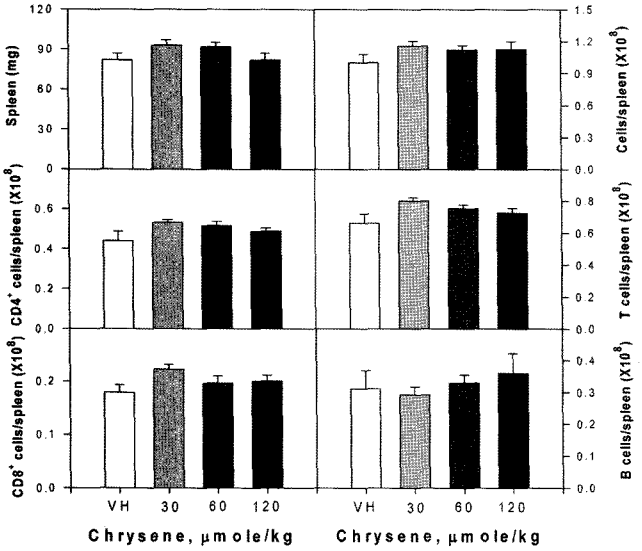


Fig. 3 – Subacute effects of chrysene on splenic lymphocyte subpopulations in female BALB/c mice. Mice were treated orally with the given dose of chrysene in corn oil at 10 ml/kg for 7 consecutive days. Each bar represents the mean number of cells±S.E. of 5 animals. VH, vehicle.

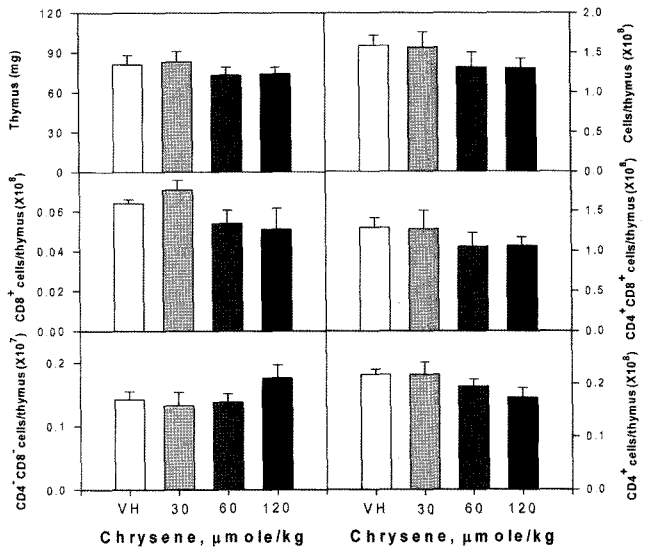


Fig. 4 – Subacute effects of chrysene on thymocyte subpopulations in female BALB/c mice. Mice were treated orally with the given dose of chrysene in corn oil at 10 ml/kg for 7 consecutive days. Each bar represents the mean number of cells±S.E. of 5 animals. VH, vehicle.

하는 경향을 보여 주었다(Fig. 4).

간 조직 CYP 효소 활성도 및 비장세포 증식능 변동

일반적으로 PAHs가 돌연변이원성과 발암성을 나타내기 위해서는 대사활성화과정이 요구되며, 이 과정을 통해 생성된 활성 중간대사체가 생체에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[14] 또한 이 활성 중간대사체는 마이크로좀의 혼합기능 산화효소계의 작용에 의해 형성되는데, 특히 CYP와 epoxide hydrolase 효소의 작용을 통해 주로 일어나는 것으로 알려져 있다.[15] CYP에 의해 chrysene은 대사되어 chrysene 1,2-diol, 3,4-diol 및 5,6-diol과 같은 대표적인 대사체 및 몇몇 기타 대사체를 생성시키는 것으로 알려져 있다.[16] Chrysene의 대사체 연구와 관련하여 여러 연구자들의 보고[17,18]에 따르면, CYP 1A 유도제로 알려진 3-methylcholanthrene을 투여하여 CYP 1A 활성을 유도시킨 랫트 간 마이크로좀에 의해 chrysene이 대사될 때, chrysene 3,4-diol의 생성율이 다른 대사체의 생성율 보다 증가하였음이 알려져 있다. Chrysene의 대사체를 대상으로 실시한 유전독성 시험에서 chrysene 3,4-diol이 1,2-diol 보다 더 강한 독성을 나타냄도 보고되었다.[19] 이러한 문헌을 종합해보면, chrysene이 대사될 때, CYP 효소에 의해 활성 중간대사체가 생성되며, 특히 CYP 1A 효소의 작용으로 chrysene 3,4-diol의 생성율을 증가시켜 보다 강한 독성 현상을 유발한 것으로 판단된다.

비장 세포의 특징 중 하나는 CYP 대사계를 갖고 있지 않다는 것이며, 면역독성학적 연구 방법에서 비장세포의 증식능 평가는 유용한 방법이지만 PAH와 같이 CYP의 대사과정이 요구되는 경우는 그 결과의 해석에 어려움이 따를 수 있다. 본 연구에서는 chrysene의 면역독성 유발기전을 밝히는 일환으로 대사활성화 과정의 요구 여부를 확인하였다. 먼저 chrysene의 대사에 관여하는 간 조직 CYP 1A-dependent EROD와 MROD 및 CYP 2B-dependent PROD 활성 변동을 측정하기 위해 chrysene을 급성 및 아급성으로 투여한 BALB/c계 암컷 마우스의 간 조직으로부터 분리한 S-9 분획에서 chrysene 투여로 인한 CYP 효소 활성의 유도 정도를 평가하였다. 그리고 면역억제 정도의 평가 지표로서, chrysene이 CYP 대사계를 갖고 있지 않는 비장세포에 직접적으로 작용하여 증식능에 미치는 영향을 in vitro에서 측정하였고, *in vivo* 상태에서 간 조직의 CYP 대사계에 의해 생성

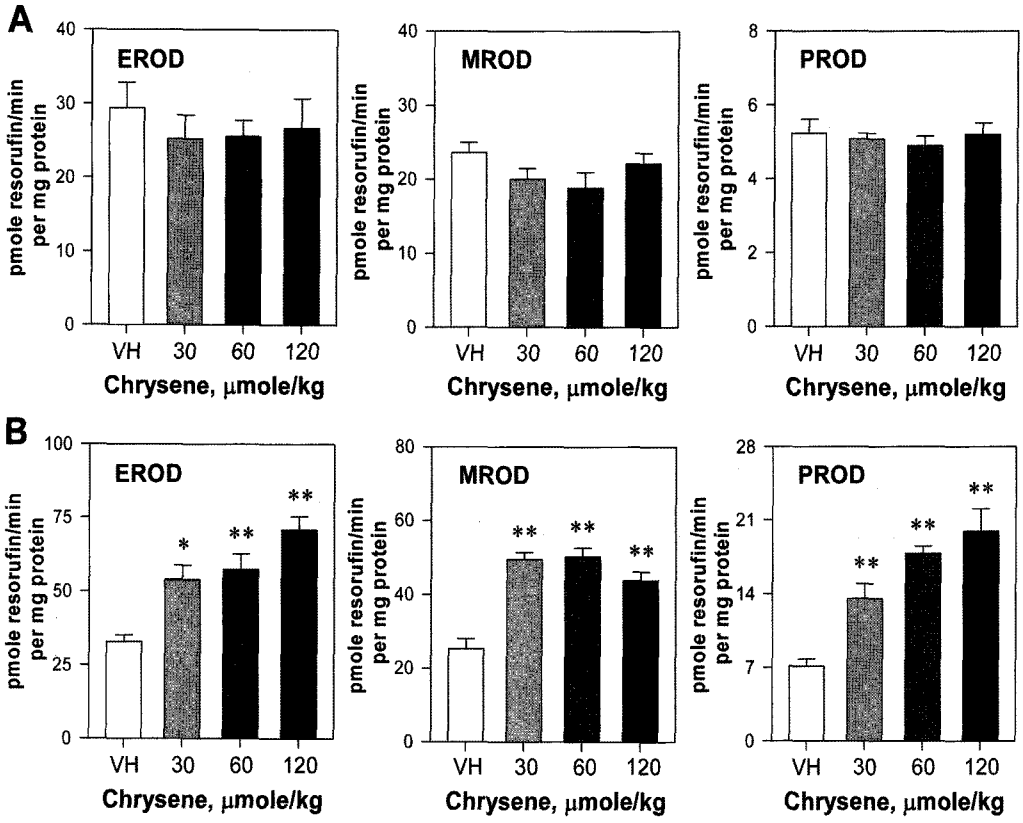


Fig. 5 – Effects of chrysene on hepatic cytochrome P450-associated monooxygenase activities in female BALB/c mice. (A) Acute treatment. S-9 fractions were prepared from the mice used in Table II. (B) Subacute treatment. S-9 fractions were prepared from the mice used in Table III. Each value represents the mean±S.E. of 5 animals. The asterisk indicates the values significantly different from the vehicle control (VH) at $P<0.05$ (*) or $P<0.01$ (**). EROD, ethoxyresorufin O-deethylase; MROD, methoxyresorufin O-demethylase; PROD, pentoxyresorufin O-dependentylase.

된 활성대사체가 간접적으로 비장 세포의 증식능에 미치는 영향 또한 *ex vivo* 비장세포 증식능 시험을 통해 평가하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이, chrysene을 단회 투여하였을 때는 CYP 1A 및 2B 효소활성의 변동을 나타내지 않았으나(Fig. 5A), 7회 연속 투여하였을 때, EROD 활성의 경우 각각 64%, 75% 및 115% 정도 투여 용량이 증가할수록 통계적으로 유의한 활성 유도현상이 관찰되었다. MROD 활성의 경우, 저용량 투여군에서 최대로 활성이 유도되었으며, PROD 활성의 경우, EROD 활성의 결과와 비슷한 양상을 나타내었다. 이 결과로부터 chrysene의 아급성 투여로 인해 EROD와 MROD 효소 활성이 유도된 것으로 볼 때, CYP 1A의 작용으로 chrysene 3,4-diol과 같은 활성중간대사체의 생성이 증가할 것으로 추측된다. LPS 또는 Con A에 의한 *in vitro* 비장세포 증식능에 미치는 chrysene의 영향을 측정한 결과(Fig. 6), 본 연구에서 사용된 chrysene의 농도에서는 직접적인 비장세포 증식능의 억제현상은 관찰되지 않았다. 하지만 *in vivo*에서 chrysene을 아급성으로 투여한 마우스를 대상으로 LPS 또는 Con A에 의한 *ex vivo* 비장세포의 증식능에 미치는 영향을 평가하였을 때(Fig. 7), LPS와 Con A에 의한 비장세포의 증식능을 120 μmole/kg의 chrysene 투여로 인해 대조군에 비해 각각 20% 및 38% 정도 억제시키는 결과를 나타내었다.

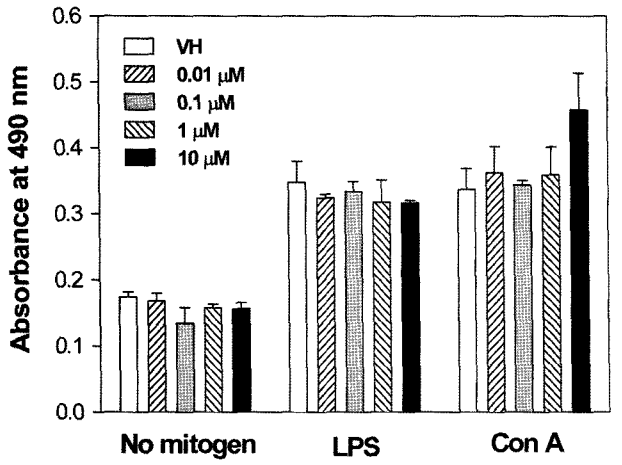


Fig. 6 – Effects of chrysene on *in vitro* lymphoproliferative responses in splenocyte cultures from female BALB/c mice. Splenocytes isolated from normal mice were cultured with a given concentration chrysene for 72 hr in the presence of either bacterial lipopolysaccharide (LPS) or concanavalin A (Con A). Each bar represents the mean absorbance at 490 nm/well±S.E. of triplicate cultures.

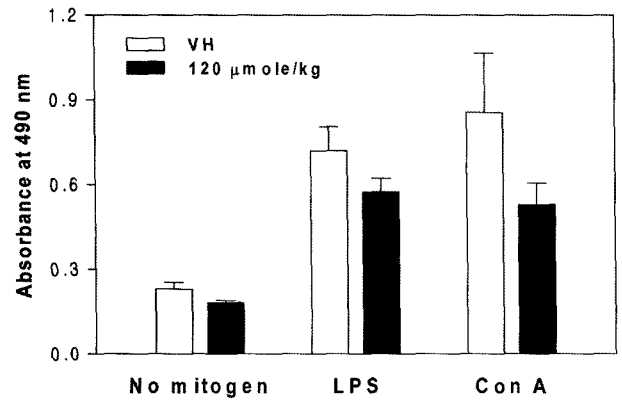


Fig. 7 – Effects of chrysene on *ex vivo* lymphoproliferative responses in splenocyte cultures from female BALB/c mice. Splenocytes isolated from chrysene-treated mice (120 μmole/kg for 7 days) were cultured for 72 hr in the presence of either bacterial lipopolysaccharide (LPS) or concanavalin A (Con A). Each bar represents the mean absorbance at 490 nm/well±S.E. of 5 animals.

비장세포 내 cytokine 생산 세포수 변동

PAH는 다양한 기전을 통해 면역계에 영향을 미치는데, 그 기전 중 하나로서 면역세포의 cytokine 생성 변화는 매우 중요시되고 있다.[20-22] 본 연구에서는 이러한 cytokine 중에서 면역세포 특히 T-세포의 성장과 분화 과정 및 기능에 있어서 중요한 역할을 담당하는 IL-2[23]의 변동에 미치는 chrysene의 영향을 flow cytometry를 이용하여 평가하였다. Chrysene을 7회 연속 투여

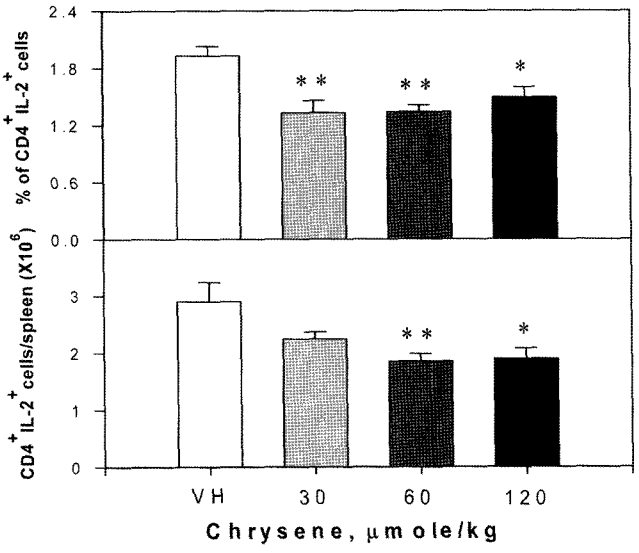


Fig. 8 – Effects of chrysene on splenic intracellular IL-2 production in female BALB/c mice. Splenocytes isolated from chrysene-treated female BALB/c mice were cultured for 12 hr in the presence of concanavalin A. Each bar represents the mean±S.E. of 5 animals. The asterisks indicate the values significantly different from the vehicle control (VH) at $P<0.05$ (*) or $P<0.01$ (**).

함으로 인해 CD4 표면항원을 가지면서 IL-2 양성인 세포 ($CD4^+IL2^+$)수가 투여 용량이 증가됨에 따라 대조군에 비해 각각 23%, 36% 및 35% 정도 통계학적으로 유의하게 감소하는 결과를 보여 주었다(Fig. 8). 이러한 결과로부터, chrysene에 의한 면역 억제 현상이 부분적으로는 비장 CD4 세포의 IL-2 생성 억제와 같은 기전으로 유발되었을 것으로 사료되어진다.

결론적으로, BALB/c계 암컷 마우스를 대상으로 chrysene을 1일 1회 7일간 연속하여 30, 60 및 120 μmole/kg 용량으로 경구 투여 하였을 때, 가장 민감한 면역기능 평가 지표로서 SRBC에 대한 항체 생성능이 용량의존적으로 억제되었다. 이와 같은 chrysene에 의해 나타난 면역기능 억제 결과의 기전을 CYP 효소에 의한 대사활성화 과정의 요구와 세포 내 cytokine 생성 세포수에 미치는 영향 측면에서 평가한 결과, chrysene의 투여로 인한 간조직 CYP 1A 효소 활성의 유도와 IL-2 생성 세포수의 감소 현상이 관찰되었다. 따라서 CYP 효소활성의 유도를 통해 활성 중간대사체의 생성이 증가하여 비장세포와 같은 면역세포계에 악영향을 미친 것으로 판단되며, 또한 IL-2 생성 세포수의 감소로 면역 세포들의 성장과 분화에 영향을 미쳐 chrysene에 의한 면역억제 현상이 유발된 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 국립독성연구원 용역사업과제와 한국과학재단 특정기초연구과제 (R01-2003-000-10560-0)의 지원으로 수행되었습니다.

문 헌

1) Ishiwatani, R. and Takahisa, H. : Organic geochemistry of a 200-meter core sample from lake Biwa. II. Vertical distribution of mono- and dicarboxylic acids and polynuclear aromatic hydrocarbons. *Proc. Jpn. Acad.* **51**, 436 (1975).
2) Baum, E. : Occurrence and surveillance of polycyclic aromatic hydrocarbons, Gelboin, H. and Ts'O, P. (eds.), Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 45 (1978).
3) McMahon, C. and Tsoukalas, S. : Polynuclear aromatic hydrocarbons in forest fire smoke, Jones, P. and Freudenthal, R. (eds.), Carcinogenesis, Vol. 3. Raven Press, New York, p. 61 (1978).
4) Jerina, D. and Daly, J. : Oxidation at carbon, Parker, D. and Smith, R. (eds.), Drug Metabolism from Microbes to Man, Taylor and Francis, London, p. 13 (1976).
5) Thakker, D., Yagi, H., Nordqvist, M., Lehr, R., Levin, W. W., Wood, A., Chang, R., Conney, A. and Jerina, D. : Polycyclic aromatic hydrocarbons and carcinogenesis: the bay-region theory, Acros, J., Woo, Y., Argus, M. and Lai, D. (eds.), Chemical Induction of Cancer, Vol. IIA. Academic Press, New York, p. 727 (1982).
6) International Agency for Research on Cancer : IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 32. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental data (1983).
7) Jeon, T. W., Jin, C. H., Lee, S. K., Lee, D. W., Hyun, S. H., Kim, G. H., Jun, I. H., Lee, B. M., Yum, Y. N., Kim, J. K., Kim, O. H. and Jeong, T. C. : *In vivo* and *in vitro* immunosuppressive effects of benzo[k]fluoranthene in female BALB/c mice. *J. Toxicol. Environ. Health* **68**, 2033 (2005).
8) White, K. L. Jr., Lysy, H. H. and Holsapple, M. O. : Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: a structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology* **9**, 155 (1985).
9) Kaminski, N. E., Barnes, D., Jordan, S. D. and Holsapple, M. P. : The role of metabolism in carbon tetrachloride-mediated immunosuppression. *In vivo* studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **102**, 9 (1990).
10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
11) Blank, J. A., Tucker, A. N., Sweatlock, J., Gasiewicz, T. A. and Luster, M. I., Alpha-naphthoflavone antagonism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced murine ethoxyresorufin O-deethylase activity and immunosuppression. *Mol. Pharmacol.* **32**, 168 (1987).
12) Lubet, R. A., Meyer, R. T., Cameron, J. W., Nims, R. W., Burke, M. D., Wolff, T. and Guengerich, F. P. : Dealkylation of pentoxyresorufin; A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 43 (1985).
13) Luster, M. I., Portier, C., Pait, D. G., Rosenthal, G. J., Germolec, D. R., Corsini, E., Blaylock, B. L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W., White, K. L. Jr., Munson, A. E. and Comment, C. E. : Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**, 71 (1993).
14) Sims, P. : The metabolic activation of chemical carcinogens. *Br. Med. Bull.* **36**, 11 (1980).
15) Conney, A. : Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* **42**, 4875 (1982).
16) Pangrekar, J., Kole, P. L., Honey, S. A., Kumar, S. and Sikka, H. C. : Metabolism of chrysene by brown bullhead liver microsomes. *Toxicol. Sci.* **71**, 67 (2003).

17) Nordqvist, M., Thakker, D. R., Vyas, K. P., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D. E., Thomas, P. E., Conney, A. H. and Jerina, D. M. : Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.* **19**, 168 (1981).
18) Shappell, N. W., Carlino-MacDonald, U., Amin, S., Kumar, S. and Sikka, H. C. : Comparative metabolism of chrysene and 5-methylchrysene by rat and rainbow trout liver microsomes. *Toxicol. Sci.* **72**, 260 (2003).
19) Glatt, H., Wameling, C., Elsberg, S., Thomas, H., Marquardt, H., Hewer, A., Phillips, D. H., Oesch, F. and Seidel, A. : Genotoxicity characteristics of reverse diol-epoxides of chrysene. *Carcinogenesis* **14**, 11 (1993).
20) Lyte, M., Blanton, R. H., Myers, M. J. and Bick, P. H. : Effect of in vivo administration of the carcinogen benzo(a)pyrene on interleukin-2 and interleukin-3 production. *Int. J. Immunopharmacol.* **9**, 307 (1987).
21) Myers, M. J., Blanton, R. H. and Bick, P. H. : Inhibition of IL-2 responsiveness following exposure to benzo(a)pyrene is due to alterations in accessory cell function. *Int. J. Immunopharmacol.* **10**, 177 (1988).
22) Pallardy, M. J., House, R. V. and Dean, J. H. : Molecular mechanism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunosuppression: evidence for action via the interleukin-2 pathway. *Mol. Pharmacol.* **36**, 128 (1989).
23) Smith, K. A. : Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**, 1169 (1988).