Kor. J. Food Hygiene 5 (1, 2), 41-48 (1990)

항산화제의 면역억제 및 항진연구 II

– 항산화제인 Proply gallate가 세포 면역기능에 미치는 영향 –

柳忠珪 · 黃美瓊

梨花女子大學校 藥學大學

Immune Suppression and Stimulation of Antioxidants II -Effect of Propyl gallate on Murine Cell Mediated Immune Functions-

Chung-Kyu Ryu and Mi-Kyung Hwang

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

ABSTRACT-Propyl gallate used as an antioxidant was examined for its effects on murine immune system.

As immunotoxicology assay parameters, we adopted circulating leukocytes and immunoorgan weights for pathotoxicology, delayed hypersensitivity and colloidal carbon clearance for cell mediated immuntity.

Propyl gallate's effects were observed as follows;

1) Propyl gallate decreased circulating leukocyte counts, dose dependently.

2) Propyl gallate decreased delayed hypersensitivity reaction.

3) Phagocytic index were similar in the test and control groups.

Keywords□Propyl gallate, Immune function, Circulating leukocyte count, Delayed hypersensitivity, Colloidal carbon clearance.

의약품, 식품 첨가물 등의 사용 빈도가 증가하고 있으며, 이러한 화학물질은 비의도적이든 치료 목적이든 섭취시 간에 정상적 면역체계의기능에 영향을 미칠 수 있다.

면역응답에 대한 식품첨가물 효과를 예견하는 screening assay들은 개발되고 검토되어야 할 과제이며, 면역반응을 억제하거나 증가시키는 화합물의 검출은 chemical safety assessment program의 중요한 부분을 차지하고 있다.

식품 첨가물의 propyl gallate는 유지의 산화 과정에서 생성되는 free radical이나 과산화물에 작용하여 이들에 의한 산화의 연쇄 반응을 중단시키는 phenol성 항산화제이다. Omaye 등은 phenol 성 항상화제를 먹힌 실험동물이 성장률의 저하, 체중의 감소, 간비대를 포함하는 다양한 변화를 일으킴을 보고한 바 있다.[1]

필자 등은 전보에서 propylgallate가 체액성 면역기능을 억제시킨다는 결과를 보고하였다.[2] 최근의 연구는 cyclooxygrenase (CO)와 lipoxygenase (LPO) pathway의 생성물이 면역반응의 중요한 조절자이고, 항산화제가 이러한 반응들을 조절함으로써 면역기능에 영향을 줄 수 있다고 보고하고 있다.[3] 실지로 같은 phenol성 항산화제인 BHA, BHT가

Received for publication 3 May, 1990

Reprint request; Dr. C.K. Ryu at above address

Table 1. Experimental design

Parameter	Procedure Performed
1. Pathotoxicology	-Circulating Leukocytes -Lymphoid Organ Weights
2. Humoral Immunity	-Direct IgM Plaque Forming Cells -Antibody Mediated Hypesensitivity (Arthus) Reaction
3. Cell Mediated Immunity	-Delayed Hypersensitivity Reaction to Heat-Aggregated BSA using Footpad Swelling Technique
4. Macrophage Function	-Carbon Clearance Test

SRBC(sheep red blood cell)에 대한 immune response를 억제시켰다는 보고가 있었고[4], caffeic acid도 specific LPD inhibitor로 밝혀져 있다.[5] 또한 propyl gallate의 *in vitro* antibody response의 억제도 보고된 바 있다.[6]

이에 본 실험에서는 propyl gallate가 정상 웅성 마우스의 세포 면역기능에 미치는 영향을 *in vivo*로 검토하였다.

실험 재료 및 방법

실험동물 및 처리－실험동물은 6～8주 체중 20± 2 g의 웅성 BALB/c 순종 마우스와 웅성 ICR 마우스를 1주일 이상 동물실 환경에 적응시킨 후 사용하였고, 동물실은 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였다. Propyl gallate는 LD_{50}의 1/100과 1/10 용량 (26 mg/kg, 260 mg/kg)을 corn oil로 현탁하여 일를 경구투여하였다. 대조군은 corn oil을 사용하였다.[2] 실험동물의 circadian rhythm을 고려하여 시료의 투여와 실험은 가능한 한 오전 9시에서 오전 11시 사이에 행하였다.

면역반응에 있어서 parameter는 macrophage function과 cell mediated immunity를 사용하였고, 본 실험에서 행한 방법[2]을 Table 1에서 나타내었다.

시약 및 기구－propyl gallate, bovine serum albumin, complete Freund's adjuvant는 sigma사 제품을, guinea pig complement는 Gibco사, Pelikan drawing ind (17Black India)는 Pelikan A.G사 제품을 사용하였다.

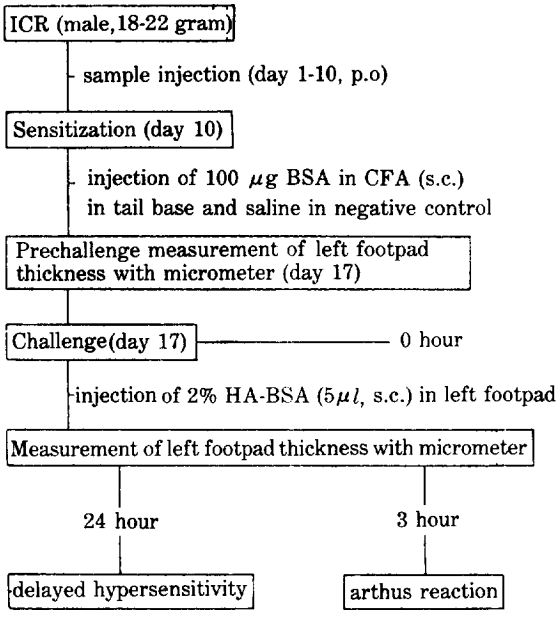
CO_2 incubator는 Forma Scientific, model 3158을, micrometer는 Mitutoyo MFG사 제품을, UV spectrophotometer는 Shimadzu UV-240을 사용하였다.

항체 매개 과민반응과 지연형 과민증[7-21]－항체 매개 과민반응은 serum에 의해 이루어지는 반면, 지연형 과민증은 T 세포에 의해 매개되는 것으로[7-21] 항원에 대한 과민증은 CFA를 첨가한 항원으로 감작시킨 마우스에서 7～8일 후에 나타난다. 과민증은 항원의 heat-aggregated form으로 challenge 시킴으로서 발생하는 발바닥의 부어오른 정도에 의해 측정된다.[8,10]

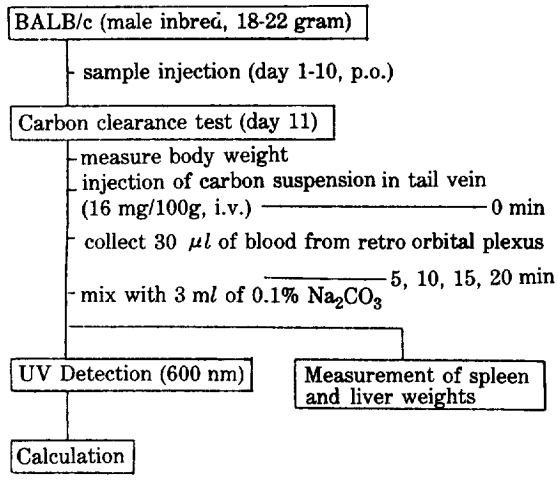
Sensitizing BSA antigen의 조제는 다음과 같다 ; 10 mg의 BSA를 2.5 ml의 멸균 생리식염수에 녹이고, 5 ml의 주사기로 2.5 ml의 CFA를 잘 혼들어 취한 다음 antigen solution에 주입시켰다. 백색의 유화상태가 될 때까지 반복하고 이를 sensitizing antigen으로 하였다. Challenging antigen(2% HABSA)은 다음과 같이 조제하였다. BSA 100 mg을 5 ml의 멸균 생리식염수에 녹이고 73℃ 수조에서 1시간 동안 가열하여 젤라틴상의 덩어리가 되게 하였다. 가열하는 동안 수증기의 증발을 방지하기 위해 두껑이 있는 시험관을 사용하였다.

실온에서 서서히 식힌 후 5 ml의 생리식염수를 첨가하여 300 g, 4℃에서 10분간 원심분리하고 상등액에 함유된 가용성 BSA를 제거한 후 0～5℃에 저장하였다.

실험방법 : 실험동물은 웅성 ICR 마우스를 군당 8마리 씩으로 하였으며, propyl gallate(26 mg/kg, 260 mg/kg)를 10일간 경구로 투여하고 10일째 sensitizing antigen을 tail base에 마우스 당 50μl 씩 피하 주사하여 감작시켰다. 이 때 negative control은 sensitizing antigen 대신 saline을 사용하였다. 감작 후 7일 뒤에 2% HA-BSA로 발바닥 두께를 측정한 마우스의 발바닥에 30 μl씩 피하 주사하여 challenge 시키고, 3시간 (Arthus reaction)과 24시간



Scheme 1. Procedure for assays of delayed hypersensitivity and arthus reaction in male ICR outbred mice.



* Phagocytic Index; the negative slope from the straight line of the logarithm of blood carbon absorbance against time by means of the least square method

Corrected Phagocytic Index

$$=\frac{W_b}{W_s+W_l}\times\sqrt[3]{K}$$

W_b, W_s and W_l are body, spleen and liver weight, respectively.

Scheme 2. Procedure for assay of colloidal carbon clearance test as macrophage function in male BALA/c inbred mice

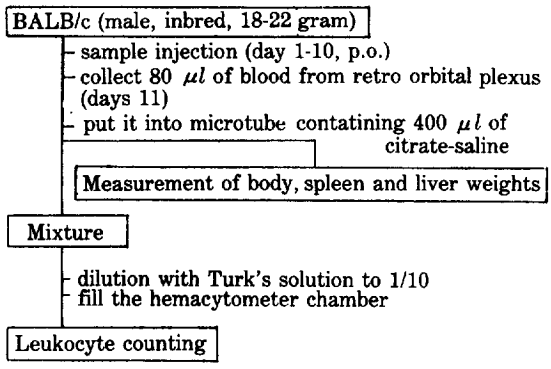
(delayed hypersensitivity reaction) 후에 각각 발바닥 두께를 micrometer로 측정하여 증가치를 계산하였다. 발바닥 두께는 마우스의 발 아래 부분에 광원을 설치하고 micrometer로 좁혀 들어갈 때 불빛이 더 이상 보이지 않는 점으로 하였다(Scheme 1).

Colloidal Carbon Clearance—B.N. Halpern *et al.*[22] 과 G. Biozzi *et al.*[23]의 방법에 기초하였으며 이 방법에 사용된 colloidal carbon suspension은 90% 이상이 간과 신장에 존재하는 macrophage에 의해 제거되며 alveolar macrphage는 관계하지 않는다.[22-24] 시간에 대한 carbon의 혈중농도는 $C=Co\times10^{-kt}$로 표시되고, 여기서 k값는 세망 내피조직의 phagocytic activity를 반영하는 phagocytic index이다. PI는 동물에 있어 개체간 변동이 심하여, 간과 비장의 무게와 연관되어 있다. 또한 이러한 장기에서의 상대적 혈류량이 중요한 인자의 하나이다. 따라서 이를 보정한 corrected phagocytic index(α)는 PI 그 자체보다 개체간 변동을 훨씬 줄일 수 있다 (Scheme 2).

1) 시약의 조제 : colloidal carbon suspension 액은 다음과 같이 조제하였다 ; 80 mg carbon/ml인 Pelikan ink(Pelikan drawing ink, 17 Black India, Pelikan AG W. Germany)를 사용하였으며 carbon 입자는 주로 250~300 A으로 ink에 광택을 주고 suspension을 안정화시키는 organic shellac이 함유되어 있다.

동물 주입시에는 Peilkan ink를 콜로이드 시약의 안정화를 위해 1% gelatin을 함유하는 멸균 생리식염수로 5배 희석하여 사용하였다. Suspension은 gelatin의 응고를 방지하기 위해 주사전 40℃를 유지하였다.

2) 실험 방법 : 각 용량의 propyl gallate를 6 BALB/c 마우스에 10일간 투여하고, 마지막 투여 24시간 후에 carbon clearance test를 행하였다. Carbon clearance test는 오전 9시에서 오후 1시 사이에 행하였으며, 실험에 앞서 마우스의 무게를 미리 재고 16 mg/100 g을 마우스의 꼬리 정맥에 주사하



Scheme 3. Procedure for circulating leukocyte counts and measurement of immunoorgan weights (Spleen and Liver) in normal male BALB/c inbred mice.

였다. 투여는 2분 간격으로 대조군과 처리군 사이에 교대로 행하였으며, 정맥을 확장시키기 위해 주사 부위에 xylene을 발라 주었다. 5분, 10분, 15분, 20분 간격으로 retro orbital plexus로부터 30 μl의 혈액을 모아 0.1% sodium carbonate 용액 3 ml 중에 가하여 적혈구를 용해시키고 600 nm에서 UV spectrophotometer로 혈액중의 carbon 양을 측정하였다. 실험 후 마우스는 치사시켜 간과 비장의 무게를 재고 PI와 CPI를 계산하였다(Scheme 2).

혈중 백혈구 수와 면역 장기—웅성 BALB/c 순종 마우스에 propyl gallate 각 용량을 10일간 경구 투여하고, 마지막 투여 24시간 후에 retro orbital plexus로부터 채혈하여 hemacytometer로 백혈구 수를 계산하였다. 채혈에 앞서 마우스의 무게를 재고 치사시킨 후 간과 비장의 무게를 재어 상대적 면적 장기의 비를 구하였다(Scheme 3).

통계 분석 : 모든 실험 data는 mean± standard error로 나타내었으며, 유의성 검정은 students t-test에 의하였다.

결과 및 고찰

Propyl gallate 투여가 면역반응에 미치는 영향에 관한 실험결과는 다음과 같았다. 세포성 면역반응으로서, HA-BSA에 대한 지연형 과민증은 웅성 ICR 마우스에서 억제되었다($p<0.05$, $p<0.01$). DH Index는 각각 54.5%와 85.7% 감소되었다. Fig. 1에 표시되어 있다.

비장 macrophage와 Kupffer cell의 비특이적 탐식능력을 측정하기 위해 웅성 BALB/c 순종 마우스에서 colloidal carbon particle의 clearance를 관찰하였고, 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Propyl

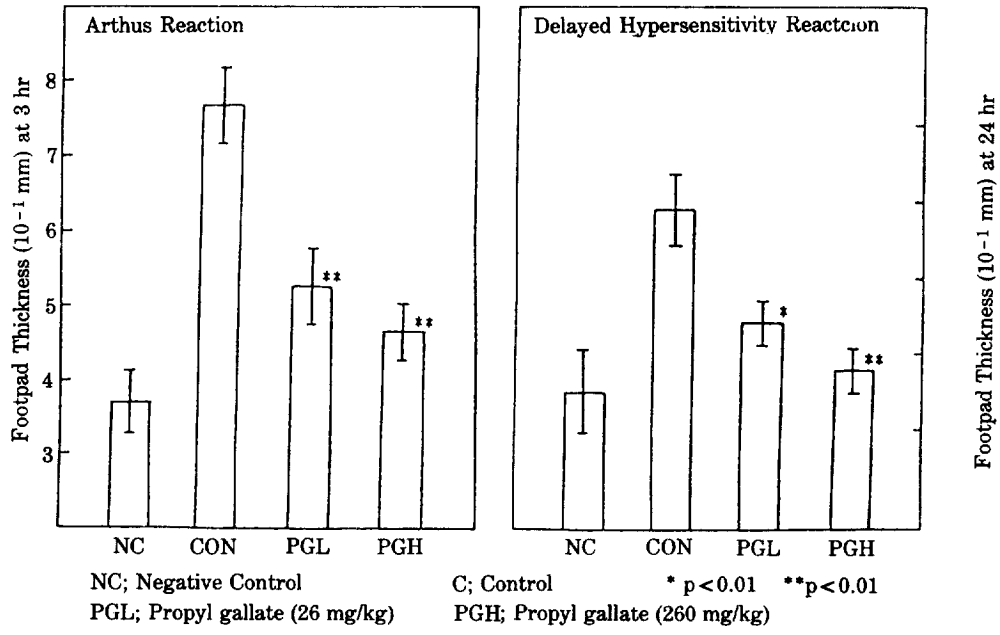
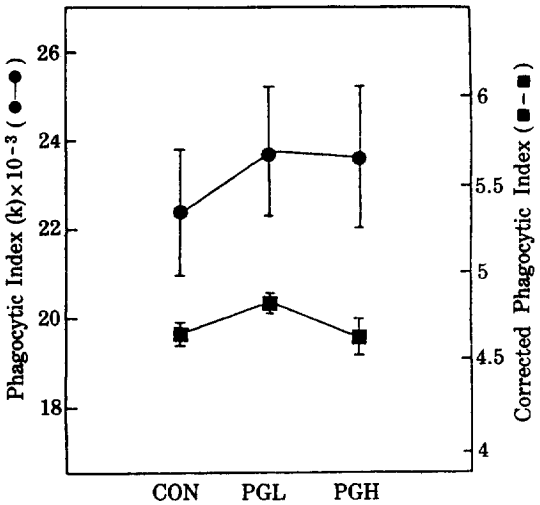


Fig. 1. Effect of propyl gallate on arthus and delayed hypersensitivity reaction in normal male ICR outbred mice



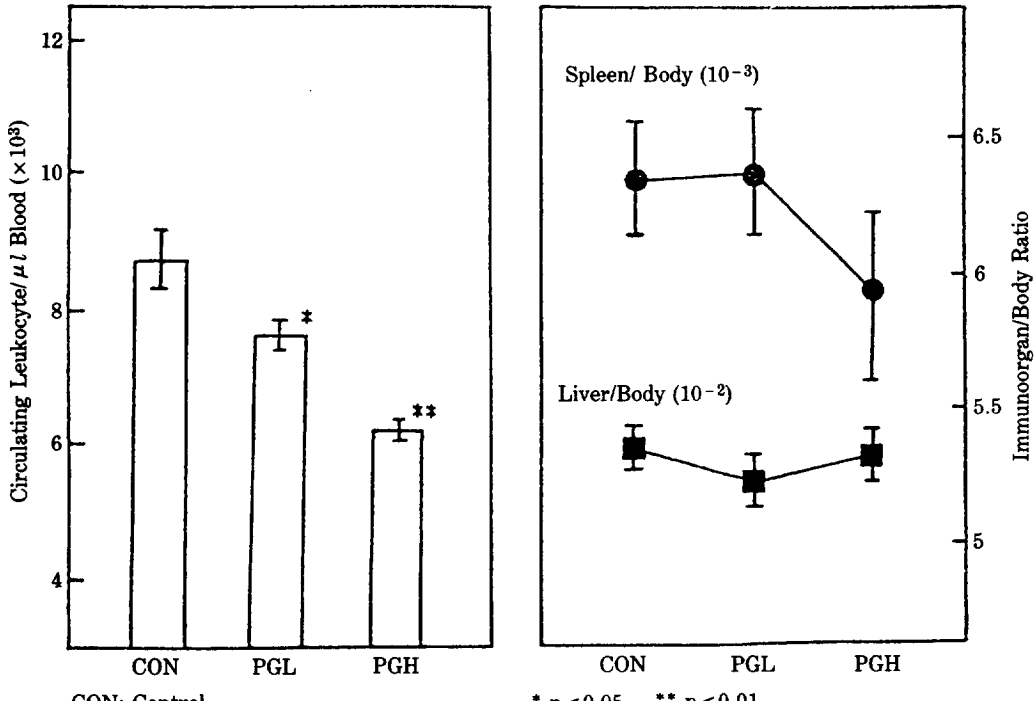
CON; Control
PGL; Propyl gallate (26 mg/kg)
PGH; Propyl gallate (260 mg/kg)

Fig. 2. Effect of propyl gallate on colloidal carbon clearances as macrophage function in normal male ICR mice

gallate 처리군은 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다.

정상 웅성 BALB/c 순종 마우스에 있어 혈중 백혈구 수는 corn oil 투여 대조군에 비해 용량 의존적으로 감소하였으며, 상대적 면역장기 무게는 propyl gallate 260 mg/kg 투여군에서 spleen/body의 경우 다소 감소되는 양상을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

식품 첨가물 면역기능과 숙주 방어체계에 역 영향을 미친다는 보고가 늘어나고 있고, 이의 일환으로 본 실험에서는 propyl gallate가 특히 면역기능으로 지연형 과민증에, 비특이 면역으로 carbon clearance, 혈중 백혈구 수와 면역 장기에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 전보[2]에서 필자 등은 propyl gallate가 체액성 면역을 유의적으로 감소시키는 결과를 얻었다. propyl gallate에 노출된 정상 웅성 마우스에서 세포성, 체액성 면역은 유의적으로 감소하였고, 이는 면역체계가 propyl gallate에 대해 민감한 표적



CON; Control
PGL; Propyl gallate (26 mg/kg)
PGH; Prpyl gallate (260 mg/kg)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Fig. 3. Effect of propyl gallate on the circulating leukocytes and immunoorgan weight (Spleen and Liver) in normal male BALB/c inbred mice.

장기가 될 수 있음을 시사하는 것이다.

혈중 백혈구 수는 propyl gallate 투여군에서 대조군에 비해 각각 13.2%와 29.2%가 감소됨을 보여주었으며, 이러한 백혈구 수 감소는 특히 면역장애를 야기할 수 있다.

지연형 과민증은 2% HA-BSA로 challenge 시킴으로서 유도된다. Systemic anaphylactic response의 발생 방지를 위해 BSA의 heat aggregation은 필수적이며, challenge 부위에서의 방출을 늦추는 부수적인 효과를 얻을 수 있다.[7] Propyl gallate는 HA-BSA에 의한 지연형 과민증을 억제하였고, 이는 체액성 면역 뿐 아니라 세포성 면역에도 propyl gallate가 영향을 미침을 나타내는 것이다. 그러나 propyl gallate는 마크로파지의 탐식능 측정인 colloidal carbon clearance에는 유의적인 영향을 보이지 않았다. 마크로파지의 탐식기능은 opsonin이나 보체의 존재에 의해 증강된다.

또한 propyl gallate 고용량 투여군은 유의적인 것으로 판정할 수는 없으나 $p<0.1$의 확률 수준에서 spleen suspension당 lymphocyte 수가 감소되었으며, 이는 propyl gallate가 cytotoxic할 수 있다는 가능성을 내포하는 것이다.

Phenol성 항산화제가 LPO pathway의 억제를 통해 면역 억제효과를 발휘한다고 보고하고 있다.[3] LPO pathway의 대사체인 LTB_4와 LTC_4는 guanylate cyclase의 활성화에 의해 체액성 면역을 유도한다. BHA와 BHT는 LPO pathway의 활성을 억제하고, SRBC에 대한 체액성 면역을 억제한다. 외인성 Ca^{2+} 또는 di-butyryl-cGMP는 이 면역억제를 무효화 할 수 있다.[4] LPO product들은 세포성 면역의 유도에도 역시 관여된다. Phenol성 항산화제와 specific LPO inhibitor들은 쥐 비장세포의 Con A-stimulated mitogenesis를 저하시키며, Lyt-1^+ 세포에 의한 IL-2 생산과 Lyt-2^+ 세포에 대한 IL-2 작용을 둘다 억제시킨다.[5] Con A 반응은 5-HETE나 12-HETE 어느 것에 의해서도 회복되지 않기 때문에 불안정한 LPO 대사체(5-HPETE, 12-HPETE 또는 LTA_4)가 T 세포의 mitogenesis의 induction에 관련된 듯이 보인다.

감사의 글

이 연구에 소요되는 경비는 한국과학재단 연구비 지원에 의해 충당되었으며 이에 감사하는 바입니다.

국문요약

항산화제인 propyl gallate가 *in vivo*에서 정상 웅성 마우스의 세포 면역기능에 미치는 영향에 관한 실험 결과,

1. Propyl gallate는 지연형과민증을 용량 의존적으로 감소시켰다.
2. Phagocytic index와 corrected phagocytic index는 propyl gallate의 영향을 볼 수 없었다.
3. Propyl gallate는 혈중 백혈구 수를 용량 의존적으로 감소시켰다.

참고문헌

1. Omaye, S.T., K.A. Reddy and C.E. Cross, *J. Toxicol. Environ. Health,* **3,** 829-836 (1977).
2. Ryu, C.K. and M.K. Hwang, *Kor. J. Food Hygiene,* **3,** 83-88 (1988).
3. Goodwin, J.S. and J. Ceuppens, *J. Clin. Immunol.,* **3,** 295-315 (1983).
4. Wess, J.A. and D.L. Archer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **170,** 427-430 (1982).
5. Kato, K. and S. Murota, *Prostagland Leukotr. Med.,* **18,** 39-52 (1985).
6. Kutz, S.A., R.D. Hinsdill and D.J. Weltman, *Environ. Res.,* **22,** 368-375 (1980).
7. Titus, R.G. and J.M. Chiller, *J. Immunol. Methods,* **45,** 65-78 (1981).
8. Hennigsen, G.M., L.D. Koller, J.H. Exon, P.A. Talcott and C.A. Osborne, *J. Immunol. Methods,* **70,** 153-165 (1984).
9. Katsura, Y., K. Nakano, Y. Kabara and I. Uesaka, *Int. Archs Allergy Appl. Immun.,* **53,** 152-161 (1977).

10. Exon, J.H., L.D. Koller, G.H. Henningsen and C.A. Osborne, *Fundam, Appl. Toxicol.*, **43**, 278-283 (1984).
11. Hartley, L.W., J.L. Zimmermann and J.R. Schmidtke, *J. Immunol. Methods*, **58**, 255-262 (1983).
12. French, V.I., J.M. Stark and R.G. White, *Immunology*, **18**, 645-655 (1970).
13. Bourne, H.R., L.M. Lichtenstein, K.L. Melmon, C.S. Henney, Y. Weinstein and G.M. Shearer, *Science*, **84**, 19-28 (1974).
14. Ruddle, N.H. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.*, **53**, 152-161 (1978).
15. Kitamura, K. *J. Immunol. Methods*, **39**, 277-283 (1980).
16. Cohen, S. *Am. J. Pathol.*, **88**(3), 502-528 (1977).
17. Turk, J.L., L. Polak and D. Parker, *Br. Med. Bull.*, **32**(2), 165-170 (1976).
18. Crowle, A.J., *J. Allergy*, **33**(5), 458-467 (1962).
19. Asherson, G.L. and W. Ptak, *Immunology*, **15**, 405-416
20. Crum, E.D. *Cell. Immunol.*, **77**, 385-394 (1983).
21. Morikawa, S., M. Baba, T. Horada and A. Mitsuoka, *J. Exp. Med.*, **145**, 237-248 (1977).
22. Halpern, B.N., B. Benacerraf and G. Biozzi, *Brit. J. Exp. Pathol.*, **34**, 426-440 (1954).
23. Biozzi, G., B. Benacerraf and B.N. Halpern, *Brit. J. Exp. Pathol.*, **34**, 441-457 (1954).
24. Sljivic, V.S. and G.W. Warr, *Measurement of phagocytic function in vivo, Manual of macrophage methodology*, ed. G. Abdul, pp.447-457 (1980).