항산화제의 면역억제 및 항진연구 — 항산화제인 Propyl gallate가 체액성 면역기능과 Aniline 유도 Methemoglobin 함량에 미치는 영향 —

柳忠珪·黃美瓊

梨花女子大学校 藥学大学

Immune Suppression and Stimulation of Antioxidants —Effect of Propyl gallate on Murine Humoral Immune Functions and Methemoglobin Content—

Chung-Kyu Ryu, 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 and methemoglobin content treated with aniline.

As immunotoxicology assay parameters, we adopted circulating leukocytes and immunoorgan weights for pathotoxicology, IgM plaque forming cells and Arthus reaction for humoral immunity.

Propyl gallate's effects were observed as follows;

1. **Propyl gallate decreased circulating leukocyte counts, dose dependently.**
2. **Relative immunoorgan weights were not affected.**
3. **Propyl gallate diminished IgM PFCs/spleen cell and IgM PFCs/spleen.**
4. **Propyl gallate decreased Arthus reaction.**
5. **Propyl gallate did not affect methemoglobin content treated with aniline.**

Keywords□Propyl Gallate, Immune Function, Circulating leukocyte Count, Immunoorgan Weight, Plaque Forming Cell, Arthus reaction, Methemoglobin.

의약품, 식품 첨가물, 환경 물질 등에의 노출은 산업 사회의 발달과 함께 그 빈도가 증가하고 있으며, 이러한 화학물질은 비의도적이든 치료 목적이든 간에 정상적 면역체계의 기능을 바꿀 수 있다. 면역응답에 대한 Xenobiotic의 효과를 예견하는 screening assay들은 개발되고 검토되어야 할 과제이며, 면역반응을 억제하거나 증거시키는 화합물의 검출은 chemical safety assessment program의 중요한 부분을 차지하고 있다.

Propyl gallate는 유지의 산화 과정에서 생성되는 free radical이나 과산화물에 작용하여 이들에 의한 산화의 연쇄반응을 중단시키는 phenol성 항산화제이다. Omaye 등은 phenol성 항산화제를 먹인 실험동물이 성장률의 저하, 체중의 감소, 간비대를 포함하는 다양한 변화를 일으킴을 보고한

Received for publication 2 June; 1988

Reprint requests; Dr. C.K. Ryu at the above address

바 있고[1], Lehman 등은 성장 둔화와 함께 소낭(proventriculus)에서의 비후를 보고하였다[2]. 최근의 연구는 cyclooxygenase(CO)와 lipoxygenase(LPO) pathway의 생성물이 면역반응의 중요한 조절자이고, 항산화제가 이러한 경로의 반응들을 조절함으로써 면역기능에 영향을 줄 수 있다고 보고하고 있다[3]. 실지로 같은 phenol성 항산화제인 BHA, BHT가 SRBC(sheep red blood cell)에 대한 humoral response를 억제시켰다는 보고가 있었고[4], caffeic acid도 specific LPO inhibitor로 밝혀져 있다[5]. 또한 propyl gallate의 in vitro antibody response의 억제도 보고된 바 있다[6].

이에 본 실험에서는 propyl gallate가 정상 웅성 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향을 *in vivo*로 검토함과 동시에 propyl gallate가 aniline 유도 methemoglobin 함량에 미치는 영향에 대해 관찰하였다.

실험 재료 및 방법

실험 동물 및 처리—실험 동물은 6~8주 체중 20±2g의 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 이를 경구투여하였다. 대조군은 corn oil을 사용하였다. Methemoglobin 분석에 있어 시료는 5 mg/kg, 50 mg/kg의 용량이 되도록 따로 조제하였으며, 복강 주사하였다. 실험동물의 circadian rhythm을 고려하여 시료의 투여와 실험은 가능한 한 오전 9시에서 오전 11시 사이에 행하였다.

면역반응에 있어 parameter는 pathotoxicology와 humoral immunity을 사용하였고, 본 실험에서 행한 방법을 Table 1에 나타내었다.

시약 및 기구—propyl gallate, bovine serum albumin, complete Freund's adjuvant는 Sigma社 제품을, guinea pig complement는 Gibco社, Pelikan drawing ink(17 Black India)는 Pelikan A.G社 제품을 사용하였다.

Table 1. Experimental design

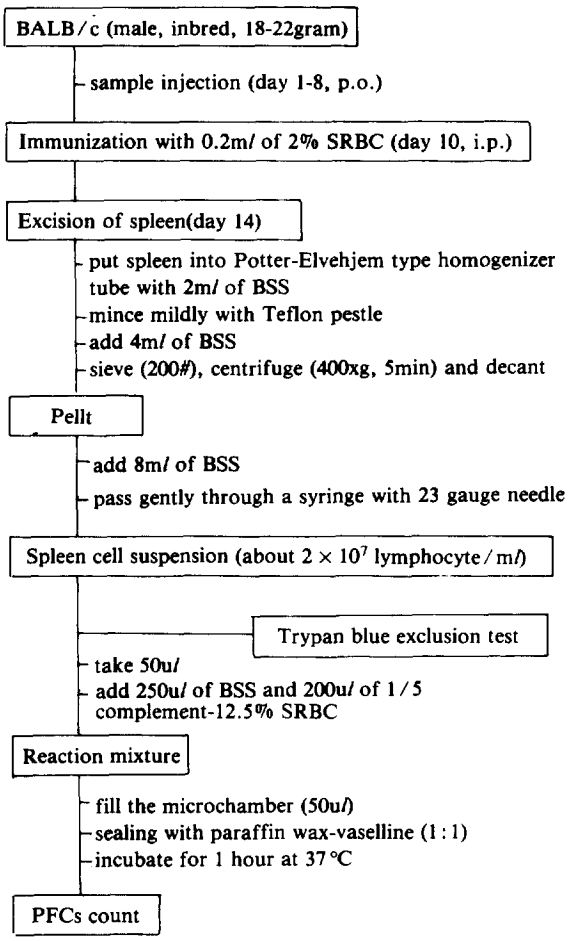
zpstsmryrt	Procedure Performed
1. Pathotoxicology	- Circulating Leukocytes - Lymphoid Organ Weights
2. Humoral Immunity	- Direct IgM Plaque Forming Cells - Antibody Mediated Hypersensitivity (Arthus) Reaction
3. Cell Mediated Immunity	- Delayed Hypersensitivity Reaction to Heat-Aggregated BSA using Footpad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

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

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

용혈반 형성 세포수(Plaque Forming Cell, PFC_s)—Cunninghams liquid monolayer slide method[7,8]를 사용하였고, Scheme 1에 표시하였다. 여기서의 BSS는 phosphate buffered balanced salt solution을 나타낸 것이다.

Methemoglobin—F. L. Rodkey *et al.*[11]의 방법에 준하였다. 웅성 ICR 마우스에 propyl gallate 5 mg/kg, 50 mg/kg 용량을 5일간 복강 주사하고, 5일째는 aniline(0.7 mM/kg)을 같이 투여하여 methemoglobin을 유도하고, 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분 간격으로 retro orbital plexus로부터 헤파린 처리된 모세관으로 채혈하였다. KCN 함유 0.01 M Tris solution으로 약 1500배 희석하고 CO gas로 포화시켜 420 nm에서



Scheme 1. Procedure for Assay of IgM Plaque Forming Cells by Cunningham's Liquid Monolayer Slide Method in Male BALB/c inbred Mice.

흡광도(A1)을 측정하였다. 약 10mg의 $Na_2S_2O_4$를 가하여 잘 혼화 후 15분 방치하고 420μm에서 흡광도를 재측정(A2)하여 이로 부터 methemoglobin의 함량(%)을 계산하였다.

$$\% = \frac{(A2 - A1)\ \varepsilon_{420}^{COHb}}{A2\ (\varepsilon_{420}^{COHb} - \varepsilon_{420}^{CNMetHb})} \times 100$$

In mice, molar absorptivity(ε) per Mol of Hemoglobin Iron for COHb and CNMetHb at 420nm are 1.952 and 1.130, respectively.

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

Table 2. Effect of propyl gallate on the circulating leukocytes and immunooragns (spleen and liver) in male balb/c inbred mice

Group	Circulating leukocyte/ul	Spleen/ body(10^{-3})	Liver/ body(10^{-2})
Control	8,715±429	6.35±0.22	5.35±0.08
Propyl gallate (26mg/kg)	7,567±232*	6.38±0.24	5.23±0.10
Propyl gallate (260mg/kg)	6,167±188**	5.91±0.32	5.33±0.10

Each value represents the arithmetic mean±standard error from 9 mice.
Significance of difference between treated and control groups; *$p<0.05$, **$p<0.01$

결과 및 고찰

Propyl gallate의 투여는 혈중 백혈구 수에 있어 corn oil 투여 대조군에 비해 각각 13.2%와 29.2%가 감소되었으며, 이러한 백혈구 수 감소는 특이 면역장애를 야기할 수 있다. 상대적 면역 장기의 무게는 propyl gallate 260mg/kg 투여군에서 Spleen/Body의 경우 다소 감소되는 양상을 보였으나 유의성은 없었다(Table 2).

체액성 면역반응으로서, 흉선 의존성 항원인 SRBC에 대한 항체의 증식에 협동하는 B세포, T세포 그리고 마크로 파지의 능력에 미치는 propyl gallate의 영향을 관찰한 용혈반 형성 세포수[7,8,12-16]는 propyl gallate 투여군에서 유의적인 감소를 보였다(Table 3). IgM PFCs/10^6 spleen cell은 대조군에 비해 14.3%와 24.0%가 그리고 IgM PFCs/spleen은 각각 25.6%와 40.5% 감소되었다. 또한 propyl gallate 고용량 투여군은 유의적인 것으로 판정할 수는 없으나 $p<0.1$의 확률 수준에서 spleen suspension당 lymphocyte수가 감소되었고, 이는 propyl gallate가 cytotoxic할 수 있다는 가능성을 내포하는 것이다. 실지로 S.A. Kutz 등이 *in vitro*에서 행한 antibody producing assay는 propyl gallate를 cytotoxic chemical로 분류한 바 있다[6]. 그러나 S.A. Kutz 등의 실험은 *in vitro test*였고, *in vivo*에서 propyl gallate의 대사체인 gallic acid는 동일 실험에서 cytotoxic chemical

Table 3. Effect of propyl gallate on the IgM PFCs in normal male BALB/c inbred mice

Group	Lymphocyte (10^7)/ml spleen suspension	PFCs(IgM)/10^6 spleen cells	PFCs(IgM)/ spleen
Control	1.93 ± 0.19	2,035 ± 126	337,070 ± 25,619
Propyl gallate (26mg/kg)	1.76 ± 0.15	1,745 ± 208	250,923 ± 15,250*
Propyl gallate (260mg/kg)	1.50 ± 0.12#	1,548 ± 162*	200,530 ± 28,628*

Each value represents the arithmetic mean ± standard error from 5 mice.
Significance of difference between treated and control groups; #p<0.1, *p<0.05

이 아닌 immunosuppressive chemical에 포함되어 있기 때문에 propyl gallate를 cytotoxic하다고 단정할 수는 없다.

생체내 주사된 가용성 항원이 소정맥내에서 항체와 침강하여 나타나는 급성 염증 반응인 항체 매개 과민반응(Arthus 반응)[17-22]에 있어 AMH Index(Antibody Mediated Hypersensitivity Index)는 각각 62.1%와 76.9% 저하였다(Fig. 1). 이는 propyl gallate의 IgG 항체 합성에 대한 억제나 보체에 대한 기능 장애, 또는 호중구의 화학 주성이나 염증 매개체에 대한 억제 가능성을 말해주는 것이다. 지연형과민증[17,18,22] 등과 Macrophage function[9,10] 등에 영향은 계속 연구가 요청되어 다음번에 보고하고져 한다.

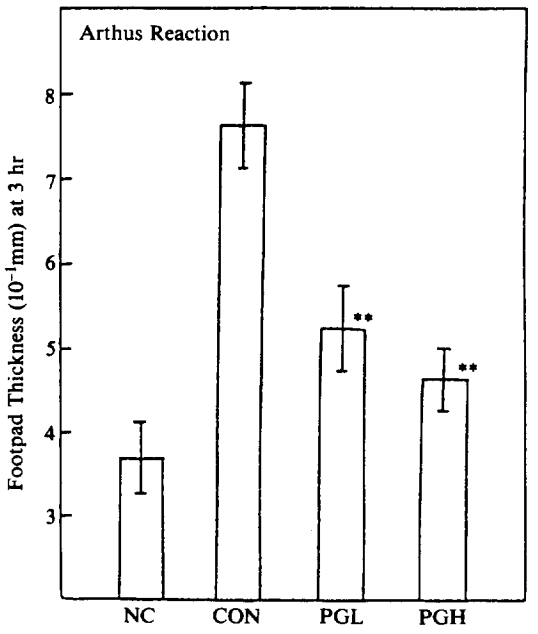


Fig. 1. Effect of Propyl gallate on Arthus Reaction in Normal Male ICR outbred Mice
NC ; Negative Control C; Control *p<0.05 **p<0.01
PGL; Propyl gallate (26mg/kg) PGH; Propyl gallate (260mg/kg)

최근의 문헌은 phenol성 항산화제가 LPO pathway의 억제를 통해 면역억제 효과를 발휘한다고 보고하고 있다[3,26]. 예를 들면, 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-c GMP는 이 면역억제를 무효화할 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-2생산과 Lyt-2^+세포에 대한 IL-2작용을 둘다 억제시킨다[5]. Con A 반응은 5 HETE나 12 HETE 어느 것에 의해서도 회복되지 않기 때문에 불안정한 LPO대사체(5 HPETE, 12 HPETE 또는 LTA_4)가 T세포의 mitogenesis의 induction에 관련된 듯이 보인다.

Methemoglobin을 형성하는 화학물질은 2개의 군으로 대별할 수 있으며, nitrite, chlorate 그리고 quinone 등 산화제의 성질을 가진 것과, aniline과 같은 방향족 nitro 또는 amine 화합물로서 *in vitro*에서는 methemoglobin 형성력이 약하나 살아있는 동물에 투여됨으로써 활성형이 되는 것이 있다[27]. 이 중 후자에 속하는 대표적 물질인 aniline을 사용하여 methemoglobin을 유발시키고 propyl gallate 처리하여 대조군과 비교한 결과, propyl gallate 처리군에서 methemoglobin 함량이 다소 낮은 경향을 보이긴 하였으나, 항산화제가 methemoglobin 함량의 증가나 감소에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났

Table 4. Effect of propyl gallate on MetHb content in normal male ICR mice treated with aniline

Group	Methemoglobin(%)					
	30 min[a]	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Control[b]	10.23 ± 0.57	6.38 ± 0.49	4.95 ± 0.39	3.54 ± 0.36	2.06 ± 0.38	1.33 ± 0.19
Propyl gallate (5mg/kg)[c]	9.57 ± 0.66	6.05 ± 0.71	4.01 ± 0.57	2.90 ± 0.21	1.50 ± 0.32	1.14 ± 0.28
Propyl gallate (50mg/kg)[d]	9.59 ± 0.82	6.20 ± 0.43	4.33 ± 0.35	2.83 ± 0.32	1.63 ± 0.20	1.06 ± 0.31

The data signify the arithmetic mean ± standard error from 7 mice.
[a]Time after last injection.
[b]Treated with corn oil for 4 days and on 5th day injected i.p. with aniline (0.7mM/kg) and corn oil.
[c,d]Treated with propyl gallate (5mg/kg-day, 50mg/kg-day) for 4 days and on 5th day injected i.p. with aniline (0.7mM/kg) and propyl gallate (5mg/kg, 50mg/kg). Treated groups are not significantly different from control group.

다(Table 4). Hemoglobin의 산화는 공기 중에서 매우 느리기는 하나 자발적으로 발생하며, 특정 화합물의 영향하에선 매우 빠른 속도로 진행되지만, intracellular reductive mechanism이 형성된 methemoglobin을 hemoglobin으로 되돌아가게 한다. Intracellular reductive system은 종마다 상당한 차이를 보여 인간의 경우 그 활성을 1.0으로 할 때, 돼지에서는 0.4, 마우스에서는 9.5이다[28].

감사의 말씀

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

국문요약

항산화제인 propyl gallate가 *in vivo*에서 정상 웅성 마우스의 면역기능과 aniline 유도 methemoglobin 함량에 미치는 영향에 관한 실험 결과,

1. Propyl gallate는 혈중 백혈구 수를 용량 의존적으로 감소시켰다.
2. 상대적 면역 장기 무게는 propyl gallate에 의해 영향받지 않았다.
3. IgM PFCs/10^6 spleen cell과 IgM PFCs/spleen은 propyl gallate 처치군에서 유의성 있는 감소를 보였다.
4. 항체 유도 염중 반응인 Arthus 반응은 propyl gallate에 의해 억제되었다.
5. Aniline으로 유도한 methemoglobin에 있어 propyl gallate는 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다.

참고문헌

1. Omaye, S.T., Reddy, K.A. and Cross, C.E.: Effect of butylatedhytroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J. Toxical. Environ. Health,* **3,** 829 (1977).
2. Lehman, A.J., Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A. and Woodard, G.: The pharmacological evaluation of antioxidant. *Adv. Fd. Res.*, **3,** 197 (1951).
3. Goodwin, J.S. and Ceuppens, J.: Regulation of the immune response by prostaglandins. *J. Clin. Immunol.*, **3,** 295 (1983).
4. Wess, J.A. and Archer, D.L.: Evidence from in vitro murine immunologic assays that some phenolic food additives may function as anti-promotors by lowering cyclic GMP levels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **170,** 427 (1982).
5. Kato, K. and Murota, S.: Lipoxygenase specific inhibitors inhibit murine lymphocyte reactivity to con A by reducing IL-2 production and action. *Prostagland. Leukotr. Med.*, **18,** 39 (1985).
6. Kutz, S.A., Hinsdill, R.D. and Weltman, D.J.: Evaluation of chemicals for immunomo-

dulatory effects using an in vitro antibody-producing assay. *Environ. Res.*, **22**, 368 (1980).
7. Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, **14**, 599 (1968).
8. Cunningham, A.J.: Antibody formation studied at the single-cell level. *Progr. Allergy*, **17**, 5 (1973).
9. Halpern, B.N., Benacerraf, B. and Biozzi, G.: Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. I. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **34**, 426 (1954).
10. Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B.N.: Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system II. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **34**, 441 (1954).
11. Rodkey, F.L., Hill, T.A., Pitts, L.L. and Robertson, R.F.: Spectrometric measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin in blood. *Clin. Chem.*, **25**, 1388 (1979).
12. Jerne, N.K., Henry, C., Nordin, A.A., Fuji, H., Koros, A.M.C. and Lefkovits, I.: Plaque forming cells: Methodology and theory. *Transplant. Rev.*, **13**, 130 (1974).
13. Kissinger, R. and Myl, A.D.: Improvements to the plaque assay for antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods*, **66**, 377 (1984).
14. Dininno, V.L., Chenier, V.K. and Fenrick, W.J.: Production of monolayer plaque assay slides. *J. Immunol. Methods*, **43**, 115 (1980).
15. Fernandes, G., Halberg, F., Yunis, E.J. and Good, R.A.: Circadian rhythmic plaque-forming cell response of spleens from mice immunized with SRBC. *J. Immunol.*, **117**(3), 962 (1976).
16. Pang, G.T.M., Gatman, M.R., Drummond, J.M. and Booth, R.J. *J. Immunol. Methods*, **40**, 253 (1981).
17. Exon, J.H., Koller, L.D., Henningsen, G.H. and Osborne, C.A.: Multiple immunoassay in a single animal. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **43**, 278 (1984).
18. Titus, R.G. and Chiller, J.M.: A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *J. Immunol. Methods*, **45**, 65 (1981).
19. Henningsen, G.M., Koller, L.D., Exon, J.H., Talcott, P.A. and Osborne, C.A.: A sensitive delayed-type hypersensitivity model in rat. *J. Immunol. Methods*, **70**, 153 (1984).
20. Ruddle, N.H.: Delayed hypersensitivity to soluble antigens in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **53**, 152 (1978).
21. Katsura, Y., Nakano, K., Kabara, Y. and Uesaka, I.: Cell-mediated and humoral immune response in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immu.*, **53**, 152 (1977).
22. Kitamura, K.: A foodpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse. *J. Immunol. Methods*, **39**, 277 (1980).
23. Benacerraf, B., Biozzi, G., Cuendet, A. and Halpern, B.N.: Influence of portal blood flow and of partial hepatectomy on the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. *J. Physiol.*, **128**, 1 (1955).
24. Sljivic, V.S. and Warr, G.W.: Measurement of phagocytic function in vivo. In "*Manual of macrophage methodology*", Abdul, G. (ed.), pp. 447 (1980).
25, Yoshikai, Y., Miake, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Relationship between non-specific activity of macrophages and immune responses to listeria monocytogens. *Immunology*, **40**, 295 (1980).
26. Panganamala, R.V., Miller, J.S., Gwebu, E.T., Sharma, H.M. and Cornwell, D.G.: Differential inhibitory effects of vitamin E and other antioxidants on prostaglandin synthetase, platelet aggregation and lipoxidase. *Prostaglandins*, **14**(2), 261 (1977).
27. Bruin, A.D. "*Biochemical toxicology of environmental agents*", Elsevier/North-Holland Biochemical press, pp. 1259 (1976).
28. Smith, R.P. and Olson, M.V.: Drug-induced methemoglobinemia. *Semin. Hematol.*, **10**(3), 253 (1973).