

## 염화아연이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향

안영근# · 김정훈 · 채병숙 · 차광재

원광대학교 약학대학

(Received June 15, 1992)

### Effects of Zinc Chloride on the Immune Response in ICR Mice

Young Keun Ahn#, Joung Hoon Kim, Byung Sook Chae and Kwang Jae Cha  
College of Pharmacy, WonKwang University, Iri 570-749, Korea

**Abstract**—Effects of Zinc chloride on the immune responses were studied in ICR mice. ICR male mice were divided into 5 groups(10 mice/group) and Zinc chloride at doses of 0.3, 1.2, 4.8 and 19.2 mg/kg were orally administered to ICR male mice once a day for three weeks. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells(S-RBC).

The results of this study were summarized as follows; (1) Zinc chloride significantly increased the body weight rate, the weight ratios of spleen and thymus to body weight and the number of circulating leukocyte, but significantly decreased them at the high dose of it, and increased dose-dependently the weight ratio of liver to body weight. (2) Zinc chloride significantly increased hemagglutination titer, Arthus reaction and plaque forming cell related to humoral immunity, but significantly decreased them at the high dose of it. (3) Zinc chloride significantly increased delayed-type hypersensitivity reaction and rosette forming cell related to cellular immunity, but significantly decreased them at the high dose of it. (4) Zinc chloride significantly enhanced phagocytic activity, but significantly decreased according to the increase of its dose.

These results suggest that high dose of zinc chloride decreased humoral, cellular and non-specific immune responses.

**Keywords** □ Zinc chloride, hemagglutination titer, Arthus reaction, hemolytic plaque forming cell, delayed-type hypersensitivity reaction, rosette forming cell, phagocytic activity, number of circulating leukocyte.

아연은 동·식물 및 인간의 성장,<sup>1)</sup> 성적발육,<sup>2,3)</sup> 효소의 촉매작용,<sup>4-6)</sup> 중금속(Cd, Pb, Hg)의 해독작용,<sup>7-10)</sup> 단백질 및 핵산의 합성조절작용,<sup>11)</sup> 생체막의 안정화 작용,<sup>12)</sup> 각종 호르몬의 활성화작용<sup>13)</sup> 및 면역계의 필수적 요소로 작용한다.

아연에 대한 면역학적인 보고로서 Dowd 등<sup>14-18)</sup>은 일부 cytokine(interleukin 1, interleukin 2, interferon)의 작용이나 생산을 아연이 좌우한다고 보고하였고, Grekas 등<sup>19)</sup>은 만성신부전증 환자에 있어서 아연투여는 단핵구의 기능을 증가시켜 세포성 면역

장애를 회복시켰다고 보고하였고, Duchateau 등<sup>20)</sup>은 인체의 노년기에 있어서는 아연투여로 T cell, IgG 및 DTH가 증가되어 면역반응이 향상되었으나, 청년기에 있어서는 아연으로 인한 면역반응에 변화가 없었다고 보고하였고, Marone 등<sup>21)</sup>은 생리적농도( $7 \times 10^{-6}$  mol/l)의 아연이 anti-IgE활성에 의해 유발되는  $Ca^{2+}$  uptake를 경쟁적으로 차단하는 histamine 및 leukotriene의 방출을 억제시키고 체액성 면역을 증가시켰다고 보고하였고, Edmund 등<sup>22)</sup>은 갓 태어난 흰쥐에 dexamethasone을 주사하므로써 간의 아연과 metallothioneine 농도가 현저히 감소되었다고 보고하였고, Beach 등<sup>23)</sup>은 자기면역에 걸리기 쉬운 생쥐

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

에게 아연섭취를 제한하므로써 자기면역의 발현을 예방 또는 연장시켰다고 보고하였고, Amiraian 등<sup>24)</sup>은 최적의  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  농도에서 낮은 농도의 아연은 guinea pig 보체의 용해작용을 증가시켰다고 보고하였다.

아연 결핍으로 인한 면역학적인 보고로서 흉선위축,<sup>25)</sup> adrenal gland비대,<sup>26)</sup> cytotoxic cell활성억제,<sup>27)</sup> 자기면역장애와 Down syndrome증가<sup>28)</sup>등이 보고되었고, Fraker 등<sup>29-31)</sup>은 생쥐에 있어서 아연결핍으로 natural killer(NK) cell 활성저하, T helper cell 기능저하, lymphocyte와 phagocyte수 감소, DTH 감소를 초래하였으며, 또한 임신기간동안 아연결핍은 수세대에 면역결핍증을 지속시켰다고 보고하였고, Chandra<sup>32)</sup>은 유전적 아연 흡수부전으로 오는 장성선단피부염(acrodermatitis enteropethica)<sup>33)</sup> 환자에서 흉선위축, helper T cell의 감소 및 mitogen에 대한 증식반응 감소 등을 보고하였고, Ballester 등<sup>34)</sup>은 아연결핍으로 겸상적혈구빈혈증(sickle cell anemia)환자의 DTH와 NK cell 활성이 저하되었다고 보고하였고, Fraker 등<sup>29)</sup>은 leukenkephalin과  $\alpha$ -endorphine은 미성숙 B cell을 성숙하게 하는 trinitrophenylated-lipopolysaccharides(TNP-LPS)활성을 억제하는데 아연결핍으로 훨씬 더 억제되었다고 보고하였고, Cunningham-Rundles 등<sup>35)</sup>은 혈청중 아연농도가 낮으면 내인성 폐동맥 섬유화를 유발한다고 보고하였고, Brummerstedt 등<sup>36)</sup>은 cattle에서 lethal trait A-46은 유전적인 위장관 아연 흡수불능증으로 대부분 감염에 의하여 조기사망을 한다고 보고하였고, DePasqual-Jardieu 등<sup>37)</sup>은 성숙한 생쥐에 있어서 아연결핍은 혈중 corticosteroid농도를 월등히 증가시켰다고 보고하였고, Fabris 등<sup>38)</sup>은 AIDS환자의 경우 T helper cell수와 혈청중 아연농도가 낮다고 보고하였고, Moynahan 등<sup>39)</sup>은 아연을 투여하므로써 장성선단피부염 환자의 아연결핍증이 완전히 치료되었다고 보고하였다.

아연의 과량섭취로 인한 면역독성에 대한 보고로써 Montgomery 등<sup>40,41)</sup>은 아연의 생리학적 범위의 고농도에서는 *in vitro*에서 면역적혈구에 대한 보체의 용해작용이 억제되었다고 보고하였고, Chandra<sup>42)</sup>와 Hooper 등<sup>43)</sup>은 건강한 성인에게 과량의 아연을 투여시 high density lipoprotein(HDL) cholesterol 농도의 감소, lymphocyte와 neutrophil 기능장애 및

세포중  $Ca^{2+}$ 의 축적량 감소가 나타났다고 보고하였고, Canicatti 등<sup>44)</sup>은 아연의 고농도에서 척추동물의 적혈구에 대한 *Holothuria polii*의 coelomic fluid와 coelomocyte lysate의 용혈력이 억제되었다고 보고하였다.

아연의 투여량에 따른 암에 대한 상반된 보고로써, Fong 등<sup>45)</sup>은 흰쥐에 있어서 아연결핍은 methyl benzyl nitrosamine으로 유발된 esophageal carcinoma의 발생을 증가시켰다고 보고하였고, Wallenius 등<sup>46)</sup>은 흰쥐에 있어서 고용량의 아연이 암의 발생과 진행을 증가시켰다고 보고하였으나, Duncan 등<sup>47)</sup>은 흰쥐와 생쥐에 있어서 고용량의 아연이 암의 발생을 감소시켰다고 보고하였고, Pories 등<sup>48)</sup>은 아연결핍된 흰쥐와 생쥐에 있어서 암성장의 감소와 생존기간이 연장되었으며 고용량의 아연은 화학물질로 유발된 구강암에 대해서 보호작용이 있는 반면에 암이 진행된 후 아연투여는 암성장을 촉진시켰다고 보고하였다.

위와 같은 보고로 보아 아연의 투여량이 면역반응에 상이한 영향을 끼칠 것으로 사료되어, 본 실험을 실시한 결과 아연의 투여량에 따른 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 실험방법

**실험동물**—생후 5~6주령, 체중 17~21g의 수컷 ICR 생쥐를 경남축산(경기도 화성소재)에서 분양받아 사료(제일사료 제품 : 조단백질 22.5% 이상, 조지방 35% 이상, 조섬유 7.1% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.7% 이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후에 10마리를 1군으로 하고 전체를 5군으로 나누어 온도  $23 \pm 2^\circ C$ , 습도 50~60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 3주간 사육하였다.

**ZnCl<sub>2</sub>용액의 조제 및 투여**—ZnCl<sub>2</sub>(Sigma, Co., LTd)를 생리식염수에 용해시켜 체중 Kg당 0.3, 1.2, 4.8 및 19.2 mg씩을 3주간 1일 일정한 시각에 경구 투여하였다.

**체중 및 장기의 중량계측**—실험동물의 체중은 공식약품투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 최종 약물투여 1일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 적출하여, 그 중량을 측정하여 대체중백분비를 구하였다.

**항원조제**—본 실험에서는 면양적혈구(Sheep<sup>o</sup> red blood cell 이하 S-RBC)를 사용하였는데, 그 방법은 용성면양의 경동맥으로부터 heparin처리 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver's씨액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks balanced salt solution(이하 HBSS : Gibco Laboratories Co., Ltd.)에 부유시켜 사용하였다.

**면역**—원심 세척한 S-RBC를 Reed 등<sup>49)</sup>의 방법을 참고하여 HBSS에  $1 \times 10^8$  S-RBC/ml의 농도로 부유시키고 부유액 0.1 ml( $1 \times 10^7$  S-RBC)를 생쥐의 미정맥에 주사하여 1차면역을 유도하였다. 2차면역은 1차면역 4일 후에 생쥐의 좌측후지족척피내에  $2 \times 10^8$  S-RBC/ml 부유액 0.05 ml( $1 \times 10^8$  S-RBC)를 주사하여 면역하였다.

**혈청의 분리 및 비등화**—생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈 후 응고시킨 후, 원심 분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비등화시킨 후 4°C에서 보존하여 사용하였다.

**적혈구응집소(Hemagglutination titer 이하 : HA titer)의 측정<sup>50,51)</sup>**—S-RBC의 응집소가를 microtitration tray(Nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 비등화 혈청을 각 Well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 정지하여 적혈구의 응집 유형을 관찰판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

**적혈구 2-Mercaptoethanol(2-ME) 내성응집소가의 측정**—각 혈청의 2-ME내성응집소가를 판정하기 위하여 0.15 N 2-ME(Eastman Kodak Co., Ltd)로 혈청을 처리하여, 2-ME내성항체를 immunoglobulin G (IgG)항체로, 2-ME로 처리하기 전의 항체를 2-ME감수성 항체 또는 IgM항체로 판독하였는데, 판독방법은 다음과 같이 실시하였다. 즉 혈청의 2-ME처리는 0.15 N 2-ME가 함유된 HBSS로 혈청을 희석하고, 증발하지 않도록 tray를 밀폐하여, 37°C에서 30분간 방치한 후, S-RBC를 가하여 응집소가를 상기한 방법으로 검사하였다.

**족척종창반응 측정(Footpad swelling test)**—Arthus 반응 및 지연형과민반응(delayed-type hypersensi-

ty reaction 이하 : DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등<sup>52)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 1차면역 4일 후에 S-RBC 0.05 ml( $1 \times 10^8$ )를 생쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co., Ltd.)로 측정하였으며, 종창정도의 측정가는 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등<sup>53)</sup>의 판독기준에 따라, 3시간 경과 후의 반응을 Arthus 반응, 24시간 경과 후의 반응을 지연형과민반응(DTH)으로 간주하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

**비장세포 부유액의 조제<sup>49)</sup>**—비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 Minimum essential medium(이하 : MEM : Gibco Laboratories Co., Ltd.)조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 사세포괴를 제거하였으며, 한냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포 수가  $2 \times 10^7$  cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험 때마다 비장세포의 생존을 검사를 실시하였는데, 이 검사는 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 하였다. 즉, 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye용액을 가하여 5분 경과 후 백혈구계산판에서 무색 세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정한 후, 그 백분율을 계산하였다. 이때 세포생존율이 95% 이상 되었다.

**비장세포의 rosette 형성세포수(이하 : RFC)의 측정**—비장세포의 rosette 형성세포수의 검사는 Garvey 등<sup>54)</sup> 및 Elliott 등<sup>55)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 비장세포 부유액( $2 \times 10^7$  cells/ml) 0.025 ml를 시험관에 넣은 후, HBSS에 부유한 S-RBC ( $2 \times 10^8$  cells/ml) 0.025 ml를 넣고 혼합하여 200×G에서 12분간 원심분리한 후, 4°C에서 2시간 방치하였다. 그후 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후, 이 부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경 관찰하였다. 검경시 비장세포에 S-RBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cell(\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

**비장세포의 용혈반형성세포수(plaque forming cell 이하 : PFC)의 측정**—비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham<sup>56)</sup>의 방법을 이용하여 다음과 같이 행하였다. 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, 400×G에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거 후 37°C의 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 용액에 부유시켜 3분간 정지하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 PBS에 부유시켜 적혈구 제거 비장세포수를 혈구계산판에 검경 관찰하였다. S-RBC를 PBS로 4회 세척하고(400×G, 5분) 마지막 세척 후 PBS에 4×10<sup>9</sup>S-RBC/ml의 농도로 부유시켰다. 4×10<sup>9</sup> S-RBC 250 μl, guinea pig complement(Gibco Lab. Co., Ltd.) 500 μl를 혼합하여 ice bath 상에서 30분간 정지 후 사용하였다. 상기 guinea pig complement와 4×10<sup>9</sup> S-RBC 혼합액 150 μl, 비장세포 부유액 650 μl를 잘 혼합하여 microchamber (Takahashi Giken Glass 76×26 mm)에 100 μl씩 주입하고 wax-vaseline(1 : 1)으로 밀봉하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C)에서 1시간 배양후 형성된 용혈반형성세포(plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다. 백만개의 비장세포 중 용혈반형성세포수(PFC/total spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$\text{PFC}/\text{total spleen cells} = \left( \frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s$$

단, a =  $\frac{650}{800}$  (배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension

V<sub>m</sub> : volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V<sub>s</sub> : total volume of spleen cell suspension(ml)

**대식세포활성도의 측정**—대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등<sup>57)</sup>이 기술한 방

법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물 투여 2일후에 rotring ink를 멸균증류수에 녹인 1% gelatin액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소현탁액을 생쥐체중 g당 0.01 ml씩 생쥐의 미정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부정맥혈관총(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μl : micro-hematocrit)로 천자하여 20 μl의 혈액을 10분, 20분, 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate용액 2 ml가 든 vial에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient, corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B : body weight

L : liver weight

S : spleen weight

K : phagocytic coefficient(측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph곡선)

**말초순환백혈구수의 측정**—생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 Türk액으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

**통계학적 분석**<sup>58)</sup>—모든 자료는 mean ± standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 Student's t-test로 행하였다.

## 실험결과

Zinc chloride가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 대한 실험결과는 다음과 같다.

**체중의 변화**—각군의 체중변화는 Table I에서와 같다. 대조군의 체중증가율이 39.51 ± 12.31%인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 1.2 mg/kg 투여군에서는 44.32 ± 10.30%(p < 0.05)로 유의하게 증가하였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 35.88 ± 7.96%(p < 0.05)로 유의성있는 체중비 감소를 보였다.

**Table I**—Effects of zinc chloride on the body weight in ICR mice

Group (mg/kg)	Increasing rate (%)
control	39.51± 12.31
ZC 0.3	39.56± 7.41
ZC 1.2	44.32± 10.30*
ZC 4.8	40.77± 10.26
ZC 19.2	35.88± 7.96*

Zinc chloride (ZC; 0.3, 1.2, 4.8 and 19.2 mg/kg) were administered to ICR mice orally once daily for 21 consecutive days.

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. The significances of the difference as compared as control group; \*, p<0.05.

**Table II**—Effects of zinc chloride on the liver weight in ICR mice

Group (mg/kg)	Liver wt. / Body wt. × 100
control	4.26± 0.21
ZC 0.3	4.45± 0.25**
ZC 1.2	4.48± 0.12**
ZC 4.8	4.63± 0.15**
ZC 19.2	4.82± 0.13**

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*, p<0.01).

**간장의 중량변화**—각군의 간장중량변화는 Table II에서와 같다. 대조군의 간장의 대 체중중량비가 4.26±0.21%인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3, 1.2, 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 각각 4.45±0.25%(p<0.01), 4.48±0.12%(p<0.011), 4.63±0.15%(p<0.01) 및 4.82±0.13%(p<0.01)로 용량의존적으로 유의성 있는 증가를 보였다.

**비장과 흉선의 중량변화**—각군의 비장 및 흉선의 체중대 중량비는 Table III에서와 같다. 비장의 체중대 중량비는 대조군의 0.56±0.07%인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 및 4.8 mg/kg 투여군은 각각 0.59±0.03%(p<0.01), 0.64±0.14%(p<0.01)로 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 0.55±0.04%로 유의성 없는 감소를 보였다.

한편, 흉선의 체중대 중량비는 대조군이 0.13±0.01%인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 mg/kg 투여군에서 0.15±0.02%

**Table III**—Effects of zinc chloride on the spleen and thymus weights in ICR mice

Group (mg/kg)	Spleen wt. / Body wt. × 100	Thymus wt. / Body wt. × 100
control	0.56± 0.07	0.13± 0.01
ZC 0.3	0.59± 0.03**	0.15± 0.02**
ZC 1.2	0.57± 0.04	0.12± 0.03**
ZC 4.8	0.64± 0.14**	0.11± 0.02**
ZC 19.2	0.55± 0.04	0.08± 0.02**

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*, p<0.01).

**Table IV**—Effects of zinc chloride on the antibody production in ICR mice

Group (mg/kg)	HA titer (log <sub>2</sub> )	MER HA (log <sub>2</sub> )
control	4.00± 0.10	3.07± 0.28
ZC 0.3	5.12± 0.48**	3.98± 0.32**
ZC 1.2	4.98± 0.52**	3.86± 0.29**
ZC 4.8	4.57± 0.47**	3.66± 0.31**
ZC 19.2	3.53± 0.32**	2.86± 0.25**

\*HA: Hemagglutinin, MER-HA: 2-Mercaptoethanol-resistant HA

Mice were challenged with 10<sup>8</sup> SRBC 4 days after sensitization.

On the 5th day, HA and MER HA titers were assayed. Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*, p<0.01).

(p<0.01)로 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 1.2, 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 각각 0.12±0.03%(p<0.01), 0.11±0.02%(p<0.01), 0.08±0.02%(p<0.01)로 유의성있는 감소를 보였다.

**적혈구응집소와 2-mercaptoethanol(2-ME) 내성 응집소기에 미치는 영향**—각군의 적혈구 응집소가 및 2-ME내성응집소가의 결과는 Table IV와 같다. 적혈구응집소는 대조군이 4.00±0.10인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 각각 5.12±0.48(p<0.01), 4.98±0.52(p<0.01) 및 4.57±0.47(p<0.01)로 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 3.53±0.32(p<0.01)로 유의성있는 감소를 보였다.

**Table V**—Effects of zinc chloride on the Arthus reaction in ICR mice

Group (mg/kg)	FPSI
control	15.81±3.06
ZC 0.3	21.30±2.75**
ZC 1.2	19.55±2.47**
ZC 4.8	19.84±2.79**
ZC 19.2	14.96±1.58*

Mice were challenged with  $10^8$  SRBC on left hind footpad 4 days after sensitization. Footpad thickness was measured immediately before challenge and 3 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index (FPSI)} = \frac{T_3 - T_0}{T_0} \times 100$$

Where,  $T_0$  is the left hind footpad thickness immediately before challenge and  $T_3$  is the left hind footpad thickness 3 hr after challenge.

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$ ).

또한, 2-ME내성응집소가는 대조군이  $3.07 \pm 0.28$ 인 데 비해  $ZnCl_2$  0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 각각  $3.98 \pm 0.32$  ( $p < 0.01$ ),  $3.86 \pm 0.29$  ( $p < 0.01$ ) 및  $3.66 \pm 0.31$  ( $p < 0.01$ )로 유의성있게 증가하였으나,  $ZnCl_2$  19.2 mg/kg 투여군에서는  $2.86 \pm 0.25$  ( $p < 0.01$ )로 유의성있게 감소하였다.

**Arthus반응에 미치는 영향**—Arthus반응의 결과는 Table V에서 보는 것같이 대조군이 Arthus 반응이  $15.81 \pm 3.06$ 인데 비해  $ZnCl_2$  0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 각각  $21.30 \pm 2.75$  ( $p < 0.01$ ),  $19.55 \pm 2.47$  ( $p < 0.01$ ) 및  $19.84 \pm 2.79$  ( $p < 0.01$ )로 유의성있는 증가를 보였으나,  $ZnCl_2$  19.2 mg/kg 투여군에서는  $14.96 \pm 1.58$  ( $p < 0.05$ )로 유의성있는 감소를 보였다.

**용혈반형성세포수에 미치는 영향**—비장세포의 용혈반형성세포수에 대한 결과는 Table VI에서 보는 바와 같이,  $10^6$ 농도의 비장세포에서는 대조군의 용혈반형성세포수가  $56.29 \pm 12.12$ 인데 비해  $ZnCl_2$  0.3 및 1.2 mg/kg 투여군에서는 각각  $62.00 \pm 14.22$  ( $p < 0.01$ ) 및  $61.04 \pm 11.10$  ( $p < 0.05$ )로 유의성있는 증가를 보였으나,  $ZnCl_2$  19.2 mg/kg 투여군에서는  $51.04 \pm 13.12$  ( $p < 0.05$ )로 유의성있는 감소를 보였다.

**지연형과민반응에 미치는 영향**—지연형과민반응의 결과는 Table VII에서 보는 바와 같이, 대조군 지연

**Table VI**—Effects of zinc chloride on the hemolytic plaque forming cell (PFC) in ICR mice

Group (mg/kg)	PFC/total spleen cells
control	56.29±12.12
ZC 0.3	62.00±14.22**
ZC 1.2	61.04±11.10*
ZC 4.8	59.26±13.25
ZC 19.2	51.04±13.12**

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$ ).

**Table VII**—Effects of zinc chloride on the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction in ICR mice

Group (mg/kg)	FPSI
control	8.18±1.19
ZC 0.3	12.16±1.78**
ZC 1.2	10.93±2.58**
ZC 4.8	9.85±2.52**
ZC 19.2	8.10±1.06

Mice were challenged with  $10^8$  SRBC on left hind footpad 4 days after sensitization. Footpad thickness was measured immediately before challenge and 24 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index (FPSI)} = \frac{T_{24} - T_0}{T_0} \times 100$$

Where,  $T_0$  is the left hind footpad thickness immediately before challenge and  $T_{24}$  is the left hind footpad thickness 24 hr after challenge.

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*,  $p < 0.01$ ).

형과민반응이  $8.18 \pm 1.19$ 인데 비해  $ZnCl_2$  0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 각각  $12.16 \pm 1.78$  ( $p < 0.01$ ),  $10.93 \pm 2.58$  ( $p < 0.01$ ) 및  $9.85 \pm 2.52$  ( $p < 0.01$ )로 유의성있는 증가를 보였으나 용량의존적으로 감소하는 경향을 보였고,  $ZnCl_2$  19.2 mg/kg 투여군에서는  $8.10 \pm 1.06$ 로 유의성 없는 감소를 보였다.

**비장세포의 rosette형성능(RFC)에 미치는 영향**—각군에서 관찰한 비장세포의 RFC를 %로 환산측정한 결과 Table VIII에서 보는 바와 같이, 대조군의 RFC가  $4.42 \pm 1.42\%$ 인데 비해  $ZnCl_2$  0.3 및 1.2 mg/kg 투여군에서는 각각  $6.26 \pm 1.26$  ( $p < 0.01$ ) 및  $6.05 \pm 1.96\%$  ( $p < 0.01$ )로 유의성있는 증가를 보였으나 용량의존적으로 감소하는 경향을 보였고,  $ZnCl_2$  19.2 mg/kg 투여군에서는  $6.05 \pm 1.96\%$  ( $p < 0.01$ )로 유의성 없는 감소를 보였다.

**Table VIII**—Effects of zinc chloride on the rosette forming cell (RFC) in ICR mice

Group (mg/kg)	RFC (%)
control	4.42 ± 1.42
ZC 0.3	6.26 ± 1.26**
ZC 1.2	6.05 ± 1.96**
ZC 4.8	4.85 ± 1.66
ZC 19.2	3.52 ± 0.72**

Mice were challenged with 10<sup>8</sup> SRBC on left hind footpad 4 days after sensitization. On the 5th day, RFC assay was performed.

$$RFC(\%) = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*, p < 0.01).

**Table IX**—Effects of zinc chloride on the phagocytic activity in ICR mice

Group (mg/kg)	Corrected phagocytic index
control	5.01 ± 0.70
ZC 0.3	5.25 ± 0.65*
ZC 1.2	5.03 ± 0.37
ZC 4.8	4.69 ± 0.40**
ZC 19.2	4.48 ± 0.28**

Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weight of the liver and spleen.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*, p < 0.05 and \*\*, p < 0.01).

<0.01)로 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 3.52 ± 0.72%(p < 0.01)로 유의성있는 감소를 보였다.

**대식세포의 활성에 미치는 영향**—대식세포의 탐식능을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table IX에서 보는 바와 같다. 대조군의 대식세포활성이 5.01 ± 0.70인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 mg/kg 투여군에서는 5.25 ± 0.65(p < 0.05)로 유의한 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 각각 4.69 ± 0.40(p < 0.01) 및 4.48 ± 0.28(p < 0.01)로 유의한 감소를 보였다.

**말초순환백혈구수에 미치는 영향**—말초순환백혈구수에 대한 결과는 Table X에서 보는 바와 같이, 대

**Table X**—Effects of zinc chloride on the number of circulating leukocyte in ICR mice

Group (mg/kg)	Number of circulating leukocyte(No./mm <sup>3</sup> )
control	7,495 ± 339
ZC 0.3	7,513 ± 850
ZC 1.2	7,136 ± 473**
ZC 4.8	6,123 ± 305**
ZC 19.2	6,181 ± 341**

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (\*\*, p < 0.01).

조군의 백혈구수가 7,495 ± 339인데 비해 ZnCl<sub>2</sub> 1.2, 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 각각 7,136 ± 473(p < 0.01), 6,123 ± 305(p < 0.01) 및 6,181 ± 341(p < 0.01)로 유의성있는 감소를 보였다.

**고 찰**

ZnCl<sub>2</sub> 투여량이 생쥐의 면역반응에 상이한 영향을 미칠 것으로 기대되어 실시한 본 실험결과에 대한 고찰은 다음과 같다.

본 실험에서 실험동물의 체중변화는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 1.2 mg/kg 투여군에서 체중증가율이 유의하게 증가하였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였는데(Table I), 이는 최약한 유아에게 아연을 투여하므로써 체중이 증가되었다는 Castillo-Duran 등<sup>59)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 성장을 촉진시킨 것으로 사료되나, 고용량의 아연투여로 구리의 흡수장애, 적혈구 생명기간 단축 및 Fe간저장 감소등이 유발되었다고 보고한 Van Campen 등<sup>60)</sup>과 Settlemire 등<sup>61,62)</sup>으로 미루어, 고용량의 아연이 빈혈을 초래하므로써 체중이 감소된 것으로 사료된다.

간장의 중량변화는 ZnCl<sub>2</sub>의 양에 따라 비례하여 유의성있는 증가를 보였는데(Table II), 이는 아연의 증가가 비정상적인 cholesterol대사를 일으켰다는 Marshall<sup>63)</sup>과 Hooper 등<sup>43)</sup>의 보고로 미루어, 고용량의 아연이 간의 cholesterol 이상대사를 촉진시킴으로써 간비대를 일으킨 것으로 생각된다.

흉선의 중량변화는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 1.2, 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 용량의 증가에 따라 비례하여 유의하게 감소하였다(Table III). 이는 아연

이 thymulin의 활성화작용이 있다는 Dardenne<sup>64)</sup>의 보고로 미루어, 상용량의 아연이 흉선의 중량을 증가시킨 것으로 생각되나, 고용량의 아연투여로 T-lymphocyte 활성이 저하되었다는 Chandra 등<sup>42)</sup>의 보고로 미루어, 고용량의 아연투여는 흉선을 위축시킨 것으로 사료된다.

비장의 중량변화는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 약간의 감소를 보였다(Table III). 이는 아연이 말초혈액과 비장에서 human B cell의 blastogenesis를 유도한다고 하는 Cunningham-Rundles 등<sup>65)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 B cell 기능을 향진시켜 비장의 중량을 증가시킨 것으로 생각되나, 고용량의 ZnCl<sub>2</sub> 투여는 B cell 기능에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

체액성 면역반응인 적혈구응집소가 및 2-ME내성 응집소가반응은 면양적혈구에 대한 항체와 항원과의 반응으로써 T-dependent antigen에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데,<sup>51)</sup> 본 실험결과 적혈구응집소가 및 2-ME내성응집소는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서 유의성있게 증가하였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의성있게 감소되었다(Table IV). 이는 아연이 *in vitro*에서 mitogen에 대한 T 및 B lymphocyte 특히 helper T cell 증식을 증진시켰다는 Chesters 등<sup>66)</sup>과 Fraker 등<sup>67)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 helper T cell을 향진시켜 항체생성이 증가된 것으로 사료되나, 고용량의 아연이 helper T cell 기능을 억제시킴으로써 항체생성이 억제된 것으로 사료된다.

Arthus 반응은 감각숙주에 주입된 항원이 항원-항체면역복합체를 형성하여 조직에 침착하고 보체를 활성화시키며, 항원에 의해 자극된 비만세포로부터 유리된 histamine 및 leukotriene이 다형핵백혈구의 유주작용을 증가시키고, 유주하여 온 다형핵백혈구가 lysosomal enzyme을 유리하여 염증반응을 촉진시키는 현상으로, 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 유의한 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였다(Table V). 이는 아연이 macrophage와 다형핵백혈구를 증가시켰다는 Chvapil 등<sup>68)</sup>의 보고와 10<sup>-5</sup>~10<sup>-4</sup> M 농도의 ZnSO<sub>4</sub>가 면역복합체와 보체(C1<sub>q</sub>) 결합을 증진시켰으나, 고농도인 10<sup>-3</sup>~10<sup>-2</sup> M의 ZnSO<sub>4</sub>는 면

역복합체와 C1<sub>q</sub>와의 결합도 억제시켰다는 Easterbrook-Smith<sup>69)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 보체계, macrophage 및 다형핵백혈구 등을 증가시킨 것으로 사료되나, 고농도의 아연은 보체계의 활성을 저하시킨 것으로 사료된다.

비장세포의 용혈반형성세포(PFC)는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 및 1.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였다(Table VI). 이는 *in vitro*에서 아연이 human plaque forming cell을 증가시켰다는 Cunningham-Rundles 등<sup>65)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 lymphocyte 기능을 향진시켜 PFC을 증가시킨 것으로 사료되나, 고용량의 아연투여로 lymphocyte 기능장애가 나타났다는 Chandra 등<sup>42)</sup>의 보고로 미루어, 고용량의 아연이 T 의존성 B cell의 항체를 감소시킨 것으로 사료된다.

즉적중창반응에 의해 측정된 DTH 반응은 감각임 파구에 의한 lymphokines의 화학적 전달인자의 유리에 의해서 성립되며 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3, 1.2 및 4.8 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 약간의 감소를 보였다(Table VII). 이는 인체의 노년기에 있어서 아연이 DTH를 상승시킨다는 Duchateau 등<sup>20)</sup>의 보고와 일치하는 점과 아연이 흰쥐에서 IL-2 생산에 영향을 준다고 한 Mengheri 등<sup>70)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 lymphokines를 증가시킨 것으로 생각되나, 고용량의 아연은 lymphokines을 억제시켜 DTH 반응을 감소시킨 것으로 사료된다.

비장세포의 rosette 형성세포(RFC)는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 및 1.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였다(Table VIII). 이는 아연이 thymulin 활성을 향진시켜 T cell을 증가시켰다는 Dardenne 등<sup>64)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 T lymphocyte 기능을 향진시켜 비장세포의 RFC을 증가시킨 것으로 생각되나, 고용량의 아연이 phytohemagglutining에 대한 자극도를 감소시켰다는 Chandra 등<sup>42)</sup>의 보고로 미루어, 고용량의 아연이 T cell 기능을 억제시켜 세포성 면역반응을 저하시킨 것으로 사료된다.

대식세포의 활성화는 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukines의 분비에 중요한 역할을 하며 그 탐식



능이 망상조직내피계에 대한 영향의 측정치표로서 이용되고 있는 바, 본 실험에서 ZnCl<sub>2</sub> 0.3 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였으나, ZnCl<sub>2</sub> 4.8 및 19.2 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 감소를 보였다(Table IX). 이는 아연이 결핍된 생쥐에서 *Trypanosoma cruzi*에 대해 억제된 macrophage가 아연투여로 상승되었다는 Fraker 등<sup>71)</sup>의 보고로 미루어, 아연이 macrophage의 면역능을 활성화시킨 것으로 사료되나, 고용량의 아연이 bacteria의 다형핵백혈구의 chemotaxis와 phagocytosis를 감소시켰다는 Chandra 등<sup>42)</sup>의 보고로 미루어, 고용량의 아연이 macrophage의 증식을 억제시킴으로써 대식세포의 활성이 감소된 것으로 사료된다.

말초순환백혈구수는 대조군에 비해 ZnCl<sub>2</sub>의 양에 따라 비례하여 유의성있는 감소를 보였다(Table X). 이는 sickle cell anemia 환자에 있어서 고용량의 아연투여가 심한 구리감소를 일으켜 erythrocyte microcytosis와 leukopenia를 발현시켰다는 Corman<sup>72)</sup>과 Prasad<sup>73)</sup>의 보고와 일치하는 점으로 미루어, 고용량의 아연이 골수의 혈구생성을 억제시킴으로써 백혈구수가 감소된 것으로 사료된다.

결 론

Zinc chloride(0.3~19.2 mg/kg, 경구투여)가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실험한 결론은 다음과 같다.

1. Zinc chloride는 체중증가율, 비장과 흉선의 대 체중비 및 말초순환백혈구수를 유의성있게 증가시켰으나 고용량에서는 유의성있는 감소를 보였고, 간장의 대 체중비를 용량의존적으로 증가시켰다.

2. Zinc chloride는 체액성면역과 관계되는 적혈구 응집소가, Arthus 반응 및 plaque forming cell에 대해 유의성있게 증가시켰으나, 고용량에 있어서는 유의한 감소를 보였다.

3. Zinc chlorid는 세포성면역에 관계되는 rosette forming cell과 지연형과민반응에 대하여 유의성있게 증가시켰으나, 고용량에 있어서는 유의한 감소를 보였다.

4. Zinc chloride는 대식세포의 활성을 유의성있게 증가시켰으나, 용량의 증가에 따라 유의한 감소를 보였다.

이상의 결과로 보아 고용량의 Zinc chloride는 체액성, 세포성 및 비특이적 면역반응을 감소시켰다.

문 헌

- 1) Hathcock, J.N.: *Nutritional Toxicology II*, p.226 (1987).
- 2) Miller, W.J.: Zinc nutrition of cattle; A review. *J. Dairy Sci.*, **53**, 1123 (1970).
- 3) Elcoate, P.V., Fischer, M.I., Mawson, C.A. and Millar, M.J.: The effect of zinc deficiency on the male genital system. *J. Physiol.*, **129**, 53 (1955).
- 4) Venugopal, B. and Luckey, T.D.: *Metal Toxicity in Mammals 2.; Chemical Toxicity of Metals and Metalloids*. p.69 (1978).
- 5) Blazsek, I. and Mathe, G.: Zinc and immunity. *Biomedicine Pharmacother.*, **38**, 187 (1984).
- 6) Beach, R.S., Gershwin, M.E. and Hurley, L.S.: Zinc, copper, and manganese in immune function and experimental oncogenesis. *Nutr. Cancer* **3**, 172 (1982).
- 7) Hathcock, J.N.: *Nutritional Toxicology I*. p.170 (1982).
- 8) Calabrese, E.J.: *Nutrition and Environmental Health*, Vol. 2, *Minerals and Macronutrients*. p.176 (1981).
- 9) Surcel, D., Ossian, A., Anca, Z., Ramboiu, S. and Abraham, A.: Effect of Pb+Zn simultaneous exposure cell-mediated function. *Spurenelem. Syp.*, **4**, 349 (1983).
- 10) Kruse-Jarres: Review; The significance of zinc for humoral and cellular immunity. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, **3**, 1 (1989).
- 11) Falchuk, K.H., Fawcett, D.W., and Vallee, B.L.: Role of zinc in cell division of euglena gracilis. *J. Cell Sci.*, **17**, 57 (1975).
- 12) Prasad, A.S., Liss, A.R. and Prasad, A.S.: In *Clinical Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*, New York, NY. p.46 (1982).
- 13) Cunningham-Rundles, S. and Cunningham-Rundles, W.F.: Zinc modulation of immune response. *No. Nutr. Immunol. Contemp. Issues Clin. Nutr.*, **2**, 197 (1988).
- 14) Dowd, P.S., Kelleher, J. and Guillon, P.J.: T-lym-

- phocyte subsets and interleukin 2 production in zinc-deficient rats. *Br. J. Nutr.*, **55**, 59 (1986).
- 15) Flynn, A., Loftus, M.A. and Finke, T.H.: Production of interleukin-1 and interleukin-2 in allogeneic mixed lymphocyte cultures under copper, magnesium and zinc deficient conditions. *Nutr. Res.*, **4**, 673 (1984).
  - 16) Frake, P.J., Hildebrandt, K. and Luecke, R.W.: Alteration of antibody-mediated responses of suckling mice to T-cell-dependent and independent antigens by maternal marginal zinc deficiency; Restoration of responsivity by nutritional repletion. *J. Nutr.*, **114**, 170 (1984).
  - 17) Salas, M. and Kirchner, H.: Induction of interferon-gamma in human leukocyte cultures stimulated by  $Zn^{2+}$ . *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **45**, 139 (1987).
  - 18) Winchurch, R.A., Togo, J. and Adler, W.H.: Supplemental zinc restores antibody formation in cultures of aged spleen cells III. Impairment of IL-2 mediated responses. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **49**, 215 (1988).
  - 19) Grekas, D., Tsakalos, N., Giannopoulos, Z. and Tourkantonis, A.: Effect of zinc treatment on cell mediated immunity of chronic renal failure patients. *Proc. EDTA-ERA.*, **21**, 825 (1984).
  - 20) Duchateau, J., Dlepesse, G., Vrijens, R. and Collet, H.: Beneficial effects of oral zinc supplementation on the immune response of old people. *Am. J. Med.*, **70**, 1001 (1981).
  - 21) Marone, G., Colombo, M., De Paulis, A., Cirillo, R., Giugliano, R. and Condorelli, M.: Physiological concentrations of zinc inhibit the release of histamine from human basophils and lung mast cells. *Agents and Actions* **18**, 103 (1986).
  - 22) Edmund, M.K., Gauthier, T. and Cherian, G.: Effects of dexamethasone injection on body retention and hepatic distribution of zinc, cadmium and metallothionein in newborn rats. *Toxicol.*, **41**, 267 (1986).
  - 23) Beach, R.S., Gershwin, M.E. and Hurley, L.S.: Nutritional factors and autoimmunity I, immunopathology of zinc deprivation in New Zealand mice. *J. Immunol.*, **126**, 1999 (1981).
  - 24) Amirarian, K., Mckinney, J.A. and Tuchna, Li.: Effect of zinc and cadmium on guinea-pig complement. *Immunol.*, **25**, 1135 (1974).
  - 25) Miller, E.R., Luecke, R.W., Ullrey, D.E., Baltzer, B.V., Bradley, B.L. and Hoeffer, J.A.: Biochemical skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. *J. Nutr.*, **95**, 278 (1968).
  - 26) Hansen, M.A., Fernandes, G. and Good, R.A.: Nutrition and immunity; The influence of diet on autoimmunity and the role of zinc in the immune response. *Ann. Rev. Nutr.*, **2**, 151 (1982).
  - 27) Iwata, T., Incefy, G., Tanaka, T., Fernandes, G., Menendez-Botet, C.J., Pih, K. and Good, R.A.: Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency. *Cell Immunol.*, **47**, 100 (1979).
  - 28) Keen, C.L.: Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.*, **10**, 415 (1990).
  - 29) Fraker, P.J., Medina, C.A. and Li, G.: Impact of zinc deficiency on immune function; A role for the neuroendocrine system. *Essent. Toxic Trace Elem. Hum. Health Dis.*, **18**, 295 (1988).
  - 30) Fraker, P.J., Zwickle, C.M. and Leucke, R.W.: Delayed-type hypersensitivity in zinc deficient adult mice. *J. Nutr.*, **3**, 309 (1982).
  - 31) Fraker, P.J., Gershwin, M., Good, R. and Prasad, A.S.: Interrelationships between zinc and immune function. *Federation Proc.*, **45**, 1474 (1985).
  - 32) Chandra, R.K.: Acrodermatitis enteropathica: Zinc levels and cell-mediated immunity. *Pediatr.*, **66**, 789 (1980).
  - 33) Danbolt, N. and Closs, K.: Acrodermatitis enteropathica. *Acta. Derm. Veneresol.*, **23**, 127 (1942).
  - 34) Ballester, O.F. and Prasad, A.S.: Anergy, zinc deficiency and decreased nucleoside phosphorylase activity in patients with sickle cell anemia. *Ann. Intern. Med.*, **98**, 180 (1983).
  - 35) Cunningham-Rundles, S., Cunningham-Rundles, C., Dupont, B. and Good, R.A.: Zinc-induced activation of human B lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **16**, 115 (1980).
  - 36) Brummerstedt, E., Andresen, E., Basse, A. and Flagstad, J.: Lethal Trait A-46 in cattle. Immunological investigations. *Nord-Vet. Med.*, **25**, 279 (1974).
  - 37) DePasquale-Jardieu, P. and Fraker, P.J.: The role

- of corticosterone in the loss of immune function in zinc deficient A/J mice. *J. Nutr.*, **109**, 1847 (1979).
- 38) Fabris, N., Mocchegiani, E., Galli, M., Irato, L., Lazarin A. and Moroni, M.: AIDS, zinc deficiency and thymic hormone failure. *JAMA* **259**, 839 (1988).
- 39) Moynahan, E.J. and Barnes, P.M.: Zinc deficiency and a synthetic diet for lactose intolerance. *Lancet* **1**, 676 (1973).
- 40) Montgomery, D.W., Don, L., Zukoski, C.F. and Chvapil, M.: The effect of zinc and other metals on complement hemolysis of sheep red blood cell *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 263 (1974).
- 41) Montgomery, D.W., Chvapil, M. and Zukoski, C.F.: Effects of zinc chloride on guinea pig complement component activity *in vitro*; Concentration-dependent inhibition and enhancement. *Infect. Immun.*, **23**, 424 (1979).
- 42) Chandra, R.K.: Excessive intake of zinc impairs immune responses. *J. Am. Med. Assoc.*, **252**, 1443 (1984).
- 43) Hooper, P.L., Visconti, L., Garry, P.J. and Johnson, G.E.: Zinc lowers high density lipoprotein-cholesterol levels. *JAMA*, **1980**, 224 (1960).
- 44) Canicatti, C. and Grasso, M.: Biodepressive effect of zinc on humoral effector of the *Holothuria polii* immune response. *Marine Biol.*, **99**, 393 (1988).
- 45) Fong, L.Y., Sivak, A. and Newberne, P.M.: zinc deficiency and methylbenzyl nitrosamine-induced esophageal cancer in rats. *JNCI* **61**, 145 (1978).
- 46) Wallenius, K., Mathur, A. and Abdullar, M.: Effect of different levels of dietary zinc on development of chemically induced oral cancer in rats. *Int. J. Oral Surg.*, **8**, 56 (1979).
- 47) Duncan, J.R. and Dresosti, I.E.: Zinc intake, neoplastic DNA synthesis and chemical carcinogenesis in rats and mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 195 (1975).
- 48) Pories, W.J., DeWys, W.D., Flynn, A., Mansour, E. G., Strain, W.H.: Implications of the inhibition of animal tumors by dietary zinc deficiency. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **91**, 243 (1978).
- 49) Reed, N.D., Crowie, P.K. and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. *B. Sordet ed. Karger Baselip*, p.1884 (1984).
- 50) Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.: Detection of complete antibodies to egg albumin by means of sheep red cell egg albumin antigen unit. *Brit. J. Exp. Path.*, **35**, 472 (1954).
- 51) Stavitsky, A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).
- 52) Yoshikai, Y., Maiké, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed-footpad reaction to SRBC in mice. *Immunol.*, **38**, 577 (1979).
- 53) Sugimoto, M., Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 32 (1975).
- 54) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussclorf, D.H.: *Methods in Immunology*. Benjamin, **3**, p.449 (1980).
- 55) Elliott, B.E. and Haskill, J.S.: Characteristics of thymus-derived bone marrow-derived rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973).
- 56) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* **17**, 5 (1973).
- 57) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B.N.: Etude quantitative de l'activité granulopexique du système reticuloendothérial chez la souris. *C. R. Soc. Biol. Paris* **148**, 43 (1954).
- 58) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 6th ed., Iowa State University Press, Iowa, p. 1 (1967).
- 59) Castillo-Duran, C., Heresi, G., Fisberg, M. and Uauy, R.: Controlled trial of zinc supplementation during recovery from malnutrition; Effects on growth and immune function. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 602 (1987).
- 60) Van Campen, D.R. and Scaife, P.V.: Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.*, **91**, 473 (1967).
- 61) Settlemire, C.T. and Matrone, G.: *In vivo* interference of zinc with ferritin iron in the rat. *J. Nutr.*, **92**, 153 (1967).
- 62) Settlemire, C.T. and Matrone, G.: *In vivo* effect of zinc on iron turnover in rats and life span of

- the erythrocyte. *J. Nutr.* **92**, 159 (1967).
- 63) Marshall, C.W.: *Vitamins and Minerals*. Philadelphia, Stickley, (1983).
- 64) Dardenne, M., Pleau, J.M., Nabaira, B., Lefrancier, P., Derrien, M., Choay, J. and Bach, J.F.: Concentration of zinc and other metals to the biological activity of serum thymic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 5370 (1982).
- 65) Cunningham-Rundles, S., Cunningham-Rundles, C., Siegal, F.P., gupta, S., Smithwick, E.M., Kosloff, C. and Good, R.A.: Defective cellular immune response *in vitro* in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, **1**, 65 (1981).
- 66) Chesters, J.K. and Will, M.: Some factors controlling food intake by zinc deficient rats. *Br. J. Nutr.*, **30**, 555 (1973).
- 67) Fraker, P.J., DePasquale-Jardieu, P., Zwickle, C.M. and Luecke, R.W.: Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *Pro. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 5660 (1978).
- 68) Chvapil, M., Zukoski, C.F., Hattler, B.G., Stankova, L., Montgomery, D., Carlson E.C. and Ludwig, J.C.: Prasad A.S. (ed); *Trace Elements in Human Health and Disease. Vol. I. Zinc and Copper*, New York, Acad. Press, p. 259 (1976).
- 69) Easterbrook-Smith, S.B.: Activation of the binding of C1<sub>q</sub> to immune complexes by zinc. *Federation European Biochem. Soc.*, **162**, 117 (1983).
- 70) Mengheri, E., Bises, G. and Gaetani, S.: Differentiated cell-mediated immune response in zinc deficiency and in protein malnutrition. *Nutrition Res.*, **8**, 801 (1988).
- 71) Fraker, P.J., Caruso, R. and Kierszenbaum, F.: Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Nutr.*, **112**, 1224 (1982).
- 72) Corman, L.C.: Effects of specific nutrients on the immune response selected clinical application. *Med. Clin. North. Am.*, **69**, 759 (1985).
- 73) Prasad, E.S.: Effect of vitamin E supplementation on leukocyte function. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 606 (1980).